

**Die Methode der Fluoreszenz-In-Situ-
Hybridisierung zur Analyse von HIV- und
SIV- Genomen auf Einzelzellebene**

Dissertation
zur Erlangung des Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Diplom Biologin
Anke Schultz

Saarbrücken
2009

Tag des Kolloquiums: 30.06.2009

Dekan: Prof. Dr.-Ing. S. Diebels

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Meyerhans
Prof. Dr. E. Meese

Für meine Familie

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Manuskripte:

Schultz, A., Suspene, R., Sopper S., Meyerhans, A.

Multiinfection of single splenocytes from SIV-infected Rhesus Macaques is established during primary infection

(Manuskript in Vorbereitung)

Schultz, A., Suspene, R., Meyerhans, A.

HIV-specific fluorescence in situ hybridization: The strengths and pitfalls

(Manuskript in Vorbereitung)

Aus Kooperationsprojekten hervorgegangene Manuskripte:

Gross, H., Barth, S., Pfuhl T., Armbruester, V., Spurk, A., **Schultz, A.**, Gurtsevitch, V., Sauter, M., Hu, B., Nossner, E., Mueller-Lantzsch, N., Grässer, F.

The NP9 protein encoded by the human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) negatively regulates gene activation of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2)

(Zur Veröffentlichung eingereicht)

Teile dieser Arbeit wurden auf folgendem Kongress vorgestellt:

2005	9 th Saar-Lor-Lux workshop on Virus research, Luxemburg
2005	Retreat-Meeting Kompetenznetz HIV/AIDS, Nürnberg
2006	Retreat-Meeting Kompetenznetz HIV/AIDS, Bochum

Im Laufe dieser Arbeit wurden praktisch betreut:

Georg Bernardy, Student

Tim Schenkel, Student

Marie-Luise Kaiser, Naturwissenschaftliche Doktorandin

Abkürzungen:

AP	Alkalische Phosphatase
AIDS	”acquired immune deficiency syndrome” Erworbenes Immunschwächesyndrom
AZT	3’-Azido-3’-desoxythymidin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaare
CASY	”cell counter and analyser system”
CD	”cluster of differentiation”
cDNA	”complementary DNA”
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTL	”cytotoxic T lymphocyte”
Cy	Carbocyanin
DAPI	4’6-Diamidino-2’-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DexSO ₄	Dextransulfat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-FISH	DNA-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
dNPT	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
Env	”envelope”
Fab	”fragment antigen binding”
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
h	”hour”, Stunde
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HCVcc	HCV ”cell culture”
HIV	”human immunodeficiency virus” Humanes Immundefizienzvirus
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser

HRP	”horseradish peroxidase”, Meerrettich-Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
IL-2	Interleukin 2
KCl	Kaliumchlorid
LTR	”long terminal repeats”
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Na-Citrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
MNC	”mononuclear cells”
OT	Objektträger
PBL	”peripheral blood lymphocytes”
PBMC	”peripheral blood mononuclear cells” Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	”phosphate buffered saline”
PHA	Phythämagglutinin
PMA	”phorbol-12-myristate-13-acetat”
PCR	”polymerase chain reaction” Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-FISH	RNA-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
RNase	Ribonukleasen
rpm	”rotations per minute”
RT	Raumtemperatur
RTase	Reverse Transkriptase
sec	”second”, Sekunde
SIV	”simian immunodeficiency virus”
SSC	”standard sodium citrat”

TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Tyramid-Signal-Amplifikation
U	"unit", Einheit der (Enzym-)Aktivität
v/v	Volumen/Volumen
w/v	"weight", Gewicht/Volumen

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Humane Immundefizienzvirus (HIV)	1
1.1.1.	Struktur, Genom und Genregulation von HIV	2
1.1.2.	HIV-Replikation	4
1.2.	Genetische Variabilität von HIV-1	7
1.2.1.	Klassifizierung von HIV-1	8
1.2.2.	Fehlermechanismen zur Erzeugung der hohen Virusvariabilität bei HIV-1	9
1.2.3.	HIV-Mehrfachinfektionen auf Einzelzellebene	15
1.3.	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung	16
1.3.1.	Das Prinzip der FISH	18
1.3.2.	Anwendungsmöglichkeiten der FISH	22
1.4.	Ziele der Arbeit	25
2.	Material und Methoden	27
2.1.	Chemikalien	27
2.2.	Plasmide	29
2.3.	Zellen/Viren/Bakterien	30
2.3.1.	Zelllinien	30
2.3.2.	Virusstocks	31
2.3.3.	Bakterien	32
2.4.	Zellkultur	33
2.4.1.	Puffer für die Zellkulturarbeit	33
2.4.2.	Zellkulturmedien	33
2.4.3.	Subkultivierung von Zelllinien	34
2.4.3.1.	Subkultivierung von Suspensionszellen	34
2.4.3.2.	Subkultivierung adhärenter Zellen	34
2.4.4.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	35
2.4.5.	Mycoplasmentest	35
2.4.6.	Isolierung peripherer Blutzellen	36
2.4.6.1.	Blutspender	36

2.4.6.2. Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation	36
2.4.7. Vitalitätsprüfung und Zellzahlbestimmung	37
2.4.7.1. Vitalitätsprüfung durch Trypanblau-Ausschlussfärbung	37
2.4.7.2. Zellzahlbestimmung und Charakterisierung mit dem CASY®1 "Cell Counter and Analyser System"	38
2.4.8. <i>Ex vivo</i> HIV-Infektion	40
2.4.8.1. Infektion stimulierter PBL mit HIV _{Lai}	40
2.4.8.2. Einsatz von AZT und T20 während der <i>ex vivo</i> Infektion mit HIV _{Lai}	40
2.4.9. Induktion der HIV-Produktion der ACH2-Zellen	41
2.4.10. Infektion der Huh7.5-Zellen mit HCVcc	42
2.4.11. Infektion der Zelllinie CEMx174 mit SIVmac239	42
2.4.12. Kultivierung des SIV-positiven Probenmaterials	43
2.4.13. Hemmung der SIV-Ausbreitung über AZT nach Ko-Kultivierung von SIV-positiven Milzzellen mit Zellen der Zelllinie CEMx174	44
2.5. Transformation von Bakterien	45
2.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	46
2.6.1. Plasmid-Isolation mittels alkalischer Lyse	47
2.6.2. Plasmidisolierung mit "QIAGEN® Plasmid Maxi Kit"	48
2.7. Phenolextraktion von Nukleinsäuren	48
2.8. Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	49
2.9. Photometrische Messung von Nukleinsäure-Lösungen zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	50
2.10. Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	51
2.11. "Polymerase Chain Reaction"-PCR	52
2.12. Agarosegelelektrophorese	56
2.13. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	57
2.14. RNA-Isolierung aus einzelnen eukaryotischen Zellen mittels "Array Pure™ Nono Scale RNA Purification Kit"	57

2.15.	Amplifizierung der RNA einzelner Zellen mittels "MessageBOOSTER™ cDNA Synthesis Kit for qPCR"	58
2.16.	Methoden zur HIV-spezifischen RNA-FISH	60
2.16.1.	Herstellen Digoxigenin-(DIG) markierter RNA-Sonden	60
2.16.2.	Nachweis der Markierungs-Effizienz von DNA- bzw. RNA-Sonden mittels "Dot Blot"	61
2.16.3.	Fixieren der Zellen	64
2.16.4.	RNA-FISH auf Einzelzellebene	64
2.16.4.1.	Vorbereitung der Zellen	69
2.16.4.2.	Hybridisierung	69
2.16.4.3.	Stringentes Waschen und Detektion der Sonde	70
2.16.5.	Laser-Mikrodissektion	72
2.17.	Methoden zur HIV-spezifischen DNA-FISH	73
2.17.1.	Herstellen von DNA-Sonden mittels Nick-Translation	73
2.17.2.	Zellkernpräparation aus Suspensionszellen	74
2.17.3.	DNA-FISH auf Einzelzellebene	75
2.17.3.1.	Vorbehandlung der Zellkerne	77
2.17.3.2.	Hybridisierung	78
2.17.3.3.	Stringentes Waschen und Detektion der Sonde	78
2.18.	Methoden zur HCV-spezifischen RNA-FISH	80
2.18.1.	Herstellen von DNA-Sonden mittels Nick-Translation	80
2.18.2.	Fixieren der Zellen	80
2.18.3.	HCV-RNA-FISH auf Einzelzellebene	80
2.18.3.1.	Vorbereitung der Zellen	81
2.18.3.2.	Hybridisierung	82
2.18.3.3.	Stringentes Waschen und Detektion der Sonde	82
2.19.	Immunfluoreszenz	83
2.20.	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	84
3.	Ergebnisse	85
3.1.	Versuche zur Entwicklung eines Systems zur Analyse von HIV-1 Transkripten auf Einzelzellebene	85
3.1.1.	Optimierung der HIV-spezifischen RNA-FISH	85

3.1.1.1.	Herstellen HIV-1-spezifischer RNA-Sonden und die Detektion dieser mit Hilfe des TSA™-Systems	87
3.1.1.2.	Nachweis der HCV-RNA in ACH2-Zellen, in <i>ex vivo</i> infizierten PBL und in MNC aus der Milz eines HIV-infizierten Patienten mit Hilfe des optimierten RNA-FISH-Protokolls	90
3.1.2.	Versuche zur Entwicklung eines hoch sensitiven Systems zur Amplifizierung von HIV-1-Transkripten FISH-positiver Zellen auf Einzelzellebene	98
3.1.3.	Simultane Detektion von viraler RNA und Proteinen	106
3.2.	Optimierung der HIV-spezifischen DNA-FISH	109
3.2.1.	Zellkernpräparation	113
3.2.2.	Herstellung spezifischer DNA-Sonden	116
3.2.3.	Permeabilisierung der Zellkerne	118
3.2.4.	Stringentes Waschen nach der Hybridisierung	119
3.2.5.	Auswertung der Signale am Fluoreszenz- Mikroskop	120
3.2.6.	”Wetterfähigkeit” der FISH	121
3.3.	Analyse der Provirusfrequenz im Infektionsverlauf anhand SIV-infizierter Milzzellen mittels SIV-spezifischer DNA-FISH	123
3.3.1.	Etablierung der SIV-spezifischen DNA-FISH	125
3.3.2.	Bestimmung der Provirusfrequenz SIV-infizierter Milzzellen mittels SIV-spezifischer DNA-FISH	128
4.	Diskussion	131
4.1.	Versuche zur Entwicklung eines Systems zur Bestimmung der Transkriptions-Aktivität multipler Proviren	134
4.2.	Optimierung der HIV-spezifischen DNA-FISH zur Analyse proviraler Sequenzen einzelner infizierter Zellen	138
4.3.	Nachweis multipler Proviren in einzelnen infizierten Milzzellen während der Primärvirämie	144

5.	Zusammenfassung	148
6.	Summary	149
7.	Literatur	150
	Danksagung	166
	Lebenslauf	167

1. Einleitung

1.1. Das Humane Immundefizienzvirus (HIV)

Die humanen Immunschwächeviren HIV-1 und HIV-2 ("human immunodeficiency virus") stellen die Ursache des erworbenen Immunschwächesyndroms AIDS ("acquired immunodeficiency syndrome") dar. Das Vollbild AIDS ist charakterisiert durch das Auftreten einer Reihe von Infektionen, die von opportunistischen pathogenen Erregern hervorgerufen werden und die Entstehung von Tumoren. 1981 kam es nach einem gehäuften Auftreten von opportunistischen Infektionen bei jungen homosexuellen Männern zur Erstbeschreibung des Krankheitsbildes AIDS (Gottlieb et al., 1981). Barre-Sinoussi et al. isolierten 1983 ein Virus aus dem Lymphknoten eines Patienten mit Immunschwäche, das zunächst als LAV ("lymphadenopathy associated virus") bezeichnet wurde. Seit 1986 trägt das Virus den Namen HIV (Coffin et al., 1986). Seine Sequenz wurde 1985 entschlüsselt (Muesing et al., 1985; Ratner et al., 1985; Sanchez-Pescador et al., 1985; Wain-Hobson et al., 1985). Heute stellt die Immunschwäche AIDS eine der häufigsten tödlichen Infektionskrankheiten dar. Nach neuesten Schätzungen sind weltweit 33 Millionen (zwischen 30 und 36 Millionen) Menschen mit HIV infiziert, wobei 22 Millionen in der afrikanischen Sub-Sahara-Zone leben. Global betrachtet hat sich die Zahl an Neuinfektionen seit dem Jahr 2000 stabilisiert. Durch die kontinuierliche Zahl an Neuinfektionen, sowie den verbesserten Zugang zur antiretroviralen Therapie und der damit verbundenen größeren Lebenserwartung, ist die Gesamtzahl an HIV-positiven Menschen gestiegen (UNAIDS, Stand 2007).

1.1.1. Struktur, Genom und Genregulation von HIV

HIV gehört zur Familie der *Retroviridae* und hier zur Unterfamilie der Lentiviren. Das Virion besitzt einen Durchmesser von etwa 100 nm und ist von einer Hüllmembran, die sich von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle ableitet, umgeben (Abb. 1.1). In der Virusmembran sind deswegen auch verschiedene Proteine der Wirtszelle inkorporiert, wie beispielsweise HLA Klasse I- und II-Moleküle oder Adhäsionsproteine wie ICAM-1 ("intracellular adhesion molecule 1"). In die Virushülle ist zusätzlich das virale Transmembranglykoprotein gp41 eingelagert, mit dem wiederum das Hüllglykoprotein gp120 nicht-kovalent assoziiert vorliegt. Letzteres ist für die Interaktionen mit dem zellulären Rezeptor CD4 und den Korezeptoren verantwortlich. Das Matrixprotein (p17) kleidet über einen aminoterminal angefügten Myristinsäurerest die Innenseite der Lipiddoppelmembran aus. Das Viruskapsid der Lentiviren weist eine charakteristische konische Form auf und besteht aus dem Kapsidprotein p24. Es umschließt das Virusgenom, welches in Form zweier Moleküle einzelsträngiger RNA in positiver Polarität vorliegt. Die RNA-Genome sind nicht-kovalent verbunden, jedoch mit Nukleokapsidproteinen komplexiert. Des Weiteren befinden sich die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RTase), Integrase und Protease sowie das Vif-Protein ("viral infectivity factor"), das Vpr-Protein ("Virales Protein R"), das Vpu-Protein ("Virales Protein U") sowie das Nef-Protein ("negative effector") im Kapsid. Das Link-Protein bildet die Verbindung zwischen Kapsid und Hüllmembran (Gelderblom et al., 1989; Greene und Peterlin, 2002).

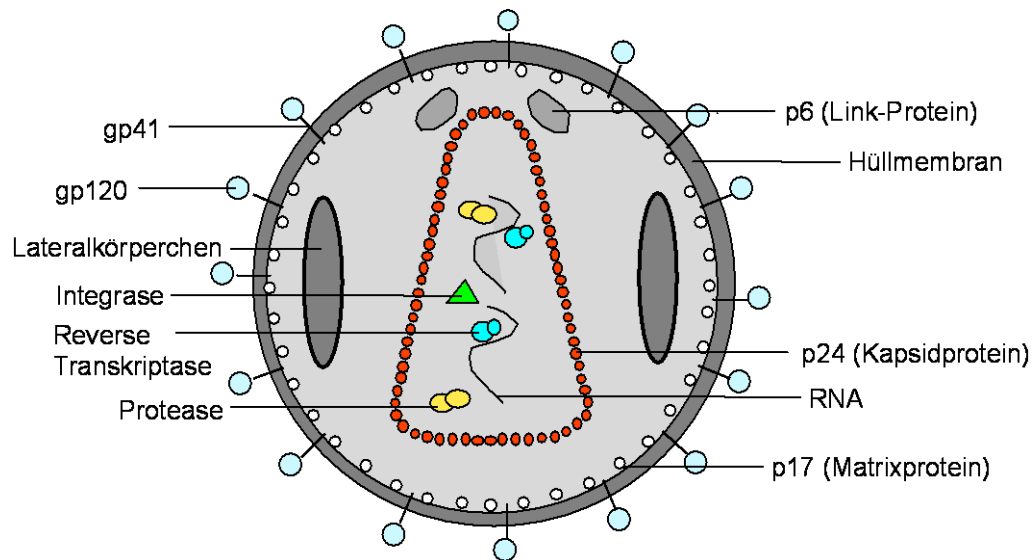


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau eines HIV-Partikels
(In Anlehnung an Modrow und Falke, 1997)

Das RNA-Genom von HIV-1 hat eine Länge von ca. 10 kb (Ratner et al., 1985; Wain-Hobson et al., 1985) und weist mit einer 5'-"Cap"-Struktur und einer 3'-Polyadenylierung Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf. Die reverse Transkription der RNA führt zur Ausbildung einer doppelsträngigen Virus-DNA, welche in das Genom der Wirtszelle integriert und in dieser Form als Provirus bezeichnet wird (Temin, 1976). Dieses wird an den Enden von identischen, für Retroviren charakteristischen repetitiven Sequenzen, sogenannten "long terminal repeats" (LTR), flankiert. Die LTR bestehen von 5' nach 3' aus den Regionen U3, R und U5, die alle *cis*-aktiven Elemente für die retrovirale Transkription und die Integration der viralen DNA enthalten (Haseltine, 1991; Klotman et al., 1991; Steffy und Wong-Staal, 1991). Im U3-Bereich befindet sich unter anderem die Bindungsstellen für die Transaktivatorproteine NF-AT und NF- κ B, die in ihrer aktiven Form in stimulierten T-Lymphozyten vorliegen und die virale Genexpression einleiten. Der Komplex der gruppenspezifischen Antigene (Gag) umfasst das Matrixprotein, das Kapsidprotein, das Link-Protein sowie die Nukleokapsidproteine. Diese Gag-Proteine werden als gemeinsames

Vorläuferprodukt synthetisiert, welches die virale Protease im Verlauf der Virusmorphogenese in die einzelnen Komponenten spaltet. Die *pol*-Gene kodieren die virale Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase, die ebenfalls als Vorläuferprotein synthetisiert werden. Die in der 5'-orientierten Region des Gens lokalisierten Sequenzen der Protease überlappen mit denen des Nukleokapsidproteins. Das *env*-Gen von HIV-1 kodiert Glykoproteine, die in die Zytoplasmamembran der infizierten Zelle und in die Hüllmembran des Viruspartikels eingelagert werden. Zunächst wird ein Vorläufer-Protein (gp160) synthetisiert, das in das externe Glykoprotein gp120 und in das Transmembranprotein gp41 gespalten wird. HIV besitzt als komplexes Retrovirus noch weitere regulatorische und akzessorische Proteine, deren Lokalisation und Funktion aber in dieser Arbeit nicht näher erläutert werden. Sie sind in dem Review von Frankel und Young gut beschrieben (Frankel und Young, 1998).

1.1.2. HIV-Replikation

HIV bindet mit Hilfe des trimeren Glykoproteins gp120 an den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Helfer-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen. Zusätzlich bindet es an Korezeptoren, die der Familie der Chemokinrezeptoren angehören. Dies ist CCR5 bei Makrophagen-tropen HIV-Varianten und CXCR4 bei lymphotropen HIV-Varianten. Die aufeinander folgende Wechselwirkung des gp120 mit dem CD4-Rezeptor und den Chemokin-Korezeptoren führt zu einer Konformationsänderung im gp41. Das Transmembranprotein springt auf, wodurch drei Fusionspeptide in der Lipid-Doppelmembran der Zielzelle verankert werden. In einer sich anschließenden weiteren Konformationsänderung kommt es zur Ausbildung einer Superhelix zwischen der N-terminalen Domäne N36 mit der C-terminalen Domäne C36. Die dabei entstehende Haarnadelstruktur führt dazu, dass die Virusmembran und Zellmembran in unmittelbare Nähe kommen und verschmelzen können. Hierdurch kommt es zur Freisetzung des Viruskapsids in das Innere der Zelle

(Chan und Kim, 1998). Einige der Kapsidproteine dissoziieren aufgrund von lokalen pH-Änderungen vom Kapsid ab, wodurch dieses nun durchlässig für Nukleotide ist. In diesem sogenannten Reversen Transkriptionskomplex befinden sich die zwei einzelsträngigen RNA-Genome und die Enzyme RTase, Protease und Integrase. Die Magnesium-abhängige RTase umfasst die Enzymaktivitäten einer sowohl RNA- als auch DNA-abhängigen DNA-Polymerase, sowie einer RNaseH (Klotman et al., 1991; Kohlstaedt und Steitz, 1992). Die RNaseH baut den RNA-Anteil der DNA-RNA-Hybrid-Doppelstränge ab. Die RTase von HIV-1 ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten p66 und p51. Bei der reversen Transkription schreibt sie die RNA in eine doppelsträngige DNA um. Die neu-synthetisierte DNA bleibt mit den oben genannten Enzymen und einigen zellulären Proteinen komplexiert und wird als Präintegrationskomplex (PIC) bezeichnet. Dieser gelangt über die Kernporen in den Nukleus. Hierbei sind die viralen Matrixproteine (Bukrinsky et al., 1993) und das Vpr (Heinzinger et al., 1994) beteiligt, die ein Kernlokalisierungssignal enthalten. Außerdem spielt noch eine tripelhelikale Struktur eine Rolle, der "central DNA-Flap", der während der diskontinuierlichen Plus-Strang-DNA-Synthese entsteht. Er dient als Ziel für zelluläre Transportproteine und ermöglicht somit die Translokation des Präintegrationskomplexes in den Nukleus (Zennou et al., 2000).

Im Zellkern kann die virale DNA in verschiedenen Formen vorliegen: (1) in linearer Form, (2) in zirkulärer Form mit nur einem LTR ("single-LTR") oder (3) in zirkulärer Form mit zwei LTR ("two-LTR") (Farnet und Haseltine, 1991). Um eine produktive Infektion zu gewährleisten, muss die Virus-DNA jedoch in das Wirtsgenom integriert werden, wobei die viral kodierte Integrase zunächst zwei Nukleotide an den 3'-Enden der viralen DNA entfernt. Zudem schneidet sie die DNA der Wirtszelle, so dass überhängende 5'-Enden entstehen, die vier bis sechs Basen umfassen können. Die 3'-Enden der viralen DNA werden mit den 5'-Enden der Zell-DNA verbunden, die 5'-Überhänge der Virus-DNA entfernt, die Lücken durch zelluläre Reparaturenzyme gefüllt und mit Hilfe von Ligasen zu Doppelsträngen verbunden (Hindmarsh et al., 1999). Die Integration geschieht bevorzugt in Transkriptionseinheiten, das sind

lokale "hot spots", die transkriptionell aktive Bereiche des Wirtgenoms darstellen (Schroder et al., 2002). Zelluläre Proteine, wie z. B. LEDGF/p75 ("lens epithelium-derived growth factor") oder SATB1 ("special AT-rich sequence binding protein 1"), im Zusammenhang mit *Alu*-ähnlichen Sequenzmotiven, die die Integrationsstelle flankieren, unterstützen den zielgerichteten Integrationsprozess und dienen als Brücke zwischen dem PIC und der zellulären DNA (Ciuffi et al., 2005; Kumar et al., 2007).

Um die Transkription des entstandenen Provirus zu beginnen, müssen Transkriptionsfaktoren, wie NFκB oder NF-AT, an die U3-Region im LTR binden. Daraufhin bildet die zelluläre RNA-Polymerase II zunächst in geringen Mengen virale mRNA-Moleküle, die gespleißt werden und unter anderem für das regulatorische Protein Tat ("transactivator of transcription") kodieren. Das Tat-Protein gelangt nach seiner Translation in den Zellkern und steigert dort die Transkriptionsrate um das Hundertfache, indem es an die TAR-Region ("trans-activation response") am 5'-Ende der mRNA bindet, die entstehenden Transkripte stabilisiert und deren Elongation ermöglicht. In der frühen Phase der Infektion entstehen vor allem mehrfach gespleißte mRNA-Moleküle, die unter anderem für das Rev-Protein ("regulator of expression of virion proteins") kodieren. Das Rev-Protein gelangt ebenfalls wieder in den Zellkern. Es bindet an eine als RRE ("rev response element") bezeichnete Sequenz, die sich im Bereich aller einfach- oder ungespleißten viralen mRNA Moleküle befindet. Die Interaktion bewirkt bevorzugt den Export dieser mRNA-Spezies in das Zytoplasma. Einfach gespleißte RNA kodiert für die viralen membranständigen Proteine (Env-Proteine) und die viralen regulatorischen Proteine Vif, Vpu und Vpr. Von dem *env*-Gen wird zunächst ein Vorläufer-Protein (gp160) synthetisiert. Dieses wird glykosyliert und durch eine mit dem Golgi-Apparat assoziierte zelluläre Furinprotease zum externen Glykoprotein gp120 und dem Transmembranprotein gp41 gespalten. Die Env-Proteine können im Endoplasmatischen Retikulum mit neu-synthetisierten CD4-Molekülen komplexiert vorliegen. Das virale Protein Vpu vermittelt die Degradierung der CD4-Moleküle, so dass der Transport der Env-Proteine an die Zelloberfläche fortgesetzt werden kann.

Die Transkripte der *gag*- und *pol*-Gene werden an freien Ribosomen im Zytoplasma translatiert und es entstehen die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine. Diese werden am N-Terminus myristyliert und gelangen mit Hilfe zellulärer Faktoren an die Zytoplasmamembran. Dort lagern sie sich mit den in der Membran verankerten Env-Proteinen und weiteren viralen Proteinen, wie Vpu, Vpr und Vif zusammen. Die RNA-Genome besitzen zwischen der U5-Region und dem *gag*-Gen das sogenannte ψ -Element. Mit diesem binden sie an den Nukleokapsidprotein-Anteil der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine und gelangen somit ebenfalls an die Zytoplasmamembran. Sobald die RNA-Genome in Kontakt mit den membranständigen viralen Proteinen getreten sind, kommt es zur Knospung und ein Viruspartikel wird aus der Zelle freigesetzt. In dem als noch unreif bezeichneten Viruspartikel liegt aufgrund der Zusammensetzung der Aminosäuren ein pH-Wert von 6,0 bis 6,2 vor. Dadurch können die Proteasedomänen in den Gag/Pol-Vorläuferproteinen dimerisieren und sich autokatalytisch herausschneiden. Die Protease prozessiert aus den Gag- und Gag/Pol-Vorläufern die Matrix-, Kapsid-, Nukleokapsid- und Link-Proteine sowie die Reverse Transkriptase und Integrase. Erst nach dieser strukturellen Umlagerung sind die Viruspartikel infektiös (Greene und Peterlin, 2002).

1.2. Genetische Variabilität von HIV-1

Zwei grundlegende Charakteristika von HIV sind die fehlerbehaftete Replikation und die kontinuierliche Virusreplikation, die zur Generierung neuer Virusvarianten während der persistierenden Infektion führen. Dadurch bildet sich im Infizierten eine Viruspopulation verwandter, aber genetisch verschiedener Viren aus. Derartige Viruspopulationen werden als Quasispezies bezeichnet (Goodenow et al., 1989; Meyerhans et al., 1989). Die Quasispezies-Natur stellt ein erhebliches Problem für die antivirale Therapie dar. Die Viren passen sich an veränderte Vermehrungsbedingungen an, so dass durch den Selektionsdruck der Therapeutika resistente Virusvarianten selektiert werden

können (Havlir et al., 1996; Richman et al., 1994). Des Weiteren führt die Zunahme der Variabilität während des Infektionsverlaufs in einem infizierten Individuum zur Generierung von sogenannten "escape"-Mutanten der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen ("cytotoxic T lymphocytes"; CTL). Diese wurden schon früh während der primären und in der chronischen Phase der HIV-Infektion beobachtet (Price et al., 1997; Soudeyns et al., 1999; Wolinsky et al., 1996). Der Selektionsdruck geht von den CTL selbst aus, so dass Viren selektiert werden, die sich den immunologischen Abwehrmechanismen entziehen (Borrow et al., 1997; Goulder et al., 1997; Phillips et al., 1991).

1.2.1. Klassifizierung von HIV-1

Auf der Grundlage phylogenetischer Analysen von zahlreichen Virusisolaten wird HIV-1 in die Gruppen M ("major"), O ("outlier") und N ("non-M/non-O") eingeteilt (Ayoub et al., 2000; Gurtler et al., 1994; Robertson et al., 2000; Simon et al., 1998). Die Hauptgruppe M, zu der 90 % aller HIV-Infektionen zählen, wird weiterhin in die zehn Subtypen ("clades") A, B, C, D, E, F, G, H, J und K unterteilt. Nach Identifizierung weiterer phylogenetischer Strukturen bei den Subtypen A und F erfolgt die Unterteilung in Sub-Subtypen, in A1 und A2 bzw. in F1 und F2 (Gao et al., 2001; Triques et al., 2000). Innerhalb der einzelnen Subtypen besteht eine hohe genetische Variabilität. Sie unterscheiden sich um 15 % im *gag*-Gen und um 25 % im *env*-Gen (Janssens et al., 1994; Korber et al., 2000; Kuiken et al., 2000). Nur die Subtypen B und D besitzen eine höhere Sequenzhomologie (Cornelissen et al., 1997; Louwagie et al., 1993). Global betrachtet weisen die Subtypen geographisch unterschiedliche Verteilungsmuster auf, mit Ausnahme der afrikanischen Sub-Sahara-Zone, in der fast alle Subtypen vorkommen (Hemelaar et al., 2006). Die Subtypen A, B und C besitzen weltweit die höchste Prävalenz, wobei fast 50 % aller HIV-Infektionen auf den Subtyp C zurückzuführen sind. Der Subtyp A kommt hauptsächlich in Zentral-, Ost-Afrika und in Ost-Europa vor. In West-Europa, Nordamerika und Australien ist der Subtyp B der dominierende

Stamm. Der Subtyp C ist in den Ländern im Süden Afrikas, sowie in Südasien und Südostasien, insbesondere in Indien und China, prävalent (McCutchan, 2006).

Bei den phylogenetischen Analysen verschiedener Virusisolate konnten auch rekombinante Viren identifiziert werden, deren virale Genome aus unterschiedlichen Subtypen zusammengesetzt sind (McCutchan et al., 1996; Peeters und Delaporte, 1999; Robertson et al., 1995). Ungefähr 20 % der weltweiten HIV-Infektionen werden von rekombinanten Viren verursacht. Diese spielen somit eine große Rolle bei der globalen Pandemie (Hemelaar et al., 2006; Osmanov et al., 2002). Bis heute konnte mehr als 20 zirkulierende rekombinante Formen ("circulating recombinant forms", CRF) nachgewiesen werden (McCutchan, 2006). Die erste rekombinante Form CRF01_AE wurde im Jahr 1996 beschrieben. Sie besteht aus den Gensegmenten der Subtypen A und E und kommt hauptsächlich in Zentral-Afrika und Asien vor (Gao et al., 1996; McCutchan et al., 1996). Bei der geographischen Verteilung der HIV-1-Rekombinanten zwischen verschiedenen Subtypen fällt auf, dass sie vor allen Dingen in den Regionen beobachtet werden, in denen die parentalen Subtypen ko-zirkulieren. In Ost-Afrika kommen beispielsweise neben den Subtypen A und D auch Rekombinanten von A und D vor, wohingegen in West-Afrika die rekombinante Form CRF02_AG neben den Subtypen A und G dominiert (McCutchan; 2000; Montavon et al., 2000).

1.2.2. Fehlermechanismen zur Erzeugung der hohen Virusvariabilität bei HIV-1

Drei Fehlermechanismen sind für die Erzeugung der genetischen Variabilität von HIV-1 verantwortlich: (1) Punktmutationen, (2) Hypermutationen und (3) Rekombinationen. Punktmutationen entstehen bei der Bildung von Proviren aus der genomischen RNA. Das HIV-RNA-Genom wird bei der reversen

Transkription in einen DNA-Doppelstrang umgeschrieben. Dieser Prozess wird durch das Enzym RTase katalysiert. Da die RTase keine 3'-5' Exonukleaseaktivität und somit keine Korrekturlesefunktion aufweist, können falsch eingebaute Nukleotide nicht wieder entfernt werden. Daher ist die reverse Transkription stark fehlerbehaftet. Die Fehlerrate beträgt $2,5 \times 10^{-5}$ (Mansky und Temin, 1995; Temin, 1995). Für das etwa 10 000 Nukleotide lange HIV-Genom bedeutet dies 0,25 Nukleotidsubstitutionen pro Genom pro Replikationsrunde. Nach vier Replikationszyklen findet also ein Nukleotidaustausch statt und die auftretenden Fehler manifestieren sich in der Erbinformation der Nachkommenviren.

HIV-Hypermutationen entstehen im Zusammenhang mit den zellulären Proteinen APOBEC3G und APOBEC3F (Liddament et al., 2004; Sheehy et al., 2002). Sie gehören zur Familie der Nukleinsäure editierenden Enzyme, die mit APOBEC1, einer Cytidin-Deaminase, die die Apolipoprotein B messenger RNA editiert, verwandt sind (Jarmuz et al., 2002; Teng et al., 1993). APOBEC3G und APOBEC3F können als Cytidin-Deaminasen während der reversen Transkription Cytidine in der viralen Minus-Strang-DNA zu Uridin deaminieren. Bei der Plus-Strang-DNA-Synthese wird dann die komplementäre Base Adenin eingebaut. Es findet also ein Austausch von G nach A statt (Harris et al., 2003; Lecossier et al., 2003; Zhang et al., 2003). Hypermutationen können an bis zu 700 Nukleotiden pro Genom, pro Replikationsrunde stattfinden (Vartanian et al., 2002). Dieser Prozess führt zum Verlust der Replikationsfähigkeit von HIV, denn es entstehen in einem Schritt derart viele Mutationen, dass der Informationsgehalt der DNA die Bildung funktionsfähiger Proteine nicht mehr gewährleistet. Um sich gegen Hypermutationen zu schützen besitzt HIV das Vif-Protein. Es bindet an APOBEC3G und APOBEC3F und verhindert, dass Cytidin-Deaminasen ins Virion gelangen (Lecossier et al., 2003; Mariani et al., 2003; Zhang et al., 2003).

HIV-Rekombinationsereignisse während der reversen Transkription spielen eine entscheidende Rolle bei der Erzeugung neuer Virusvarianten. In einer einzigen Replikationsrunde können zwischen drei und 30 "cross-over" zwischen den beiden HIV-RNA-Genomen erfolgen (Jetzt et al., 2000; Levy et al., 2004). Die reverse Transkription wird jedoch durch Zelltyp-spezifische Aktivierungs-, Differenzierungs- und Proliferationsprozesse beeinflusst, wodurch sich *in vitro* ein Unterschied in der Häufigkeit der "cross-over"-Ereignisse feststellen ließ. Bei T-Lymphozyten finden im Durchschnitt neun und bei Makrophagen bis zu 30 "cross-over" pro Replikationsrunde statt (Levy et al., 2004). Die Rekombination bei HIV erfolgt über den "copy choice"-Mechanismus. Während der reversen Transkription kann die RTase aufgrund ihrer geringen Prozessivität von einem der beiden RNA-Stränge abfallen und die Synthese der Minus-Strang DNA-Kette an dem anderen RNA-Strang fortsetzen (Coffin, 1979). Das Ergebnis ist ein mosaikartiges Provirus mit einer gemischten genetischen Information aus beiden RNA-Matrizen. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich, dass der Rekombinationsprozess dem Strangtransfer ähnelt, der während der reversen Transkription obligatorisch stattfindet. Die RTase beginnt mit der DNA-Neu-Synthese an einem der beiden RNA-Stränge (Donor-RNA). Die RNaseH-Aktivität der RTase baut den bereits revers transkribierten RNA-Strang der Donor-RNA ab und erlaubt somit die Bindung des 3'-Endes der neu-synthetisierten Minus-Strang-DNA an den Akzeptor-Strang. Diese Bindungsstelle definiert den "cross-over"-Punkt und es kommt zum Wechsel der RTase vom Donor-RNA- an den Akzeptor-RNA-Strang, an dem die Synthese fortgesetzt wird (siehe Abb. 1.2 A). Das Kompartiment, in dem die HIV-Rekombinationsereignisse stattfinden, ist der Nukleoprotein-Komplex. Dieser formiert sich nach Eintritt der Virionen in die Zelle und ist der Ort der reversen Transkription (Bowerman et al., 1989; Fassati und Goff, 2001).

Es gibt unterschiedliche Erklärungen für das "template-switching" der RTase, die sich jedoch nicht gegenseitig ausschließen und in Kombination auftreten können (siehe Abb. 1.2 B). Beim "forced copy choice"-Mechanismus wird davon ausgegangen, dass Brüche in der genomischen RNA für den Transfer der RTase verantwortlich sind (Coffin, 1979). Ein weiterer Auslöser für den Wechsel ist das Vorhandensein von sogenannten "pause-sites", das heißt Bereiche, in denen die reverse Transkription kurz unterbrochen wird (DeStefano et al., 1992, 1994; Wu et al., 1995). Sekundärstrukturen der HIV-RNA, wie beispielsweise in der TAR-Haarnadelstruktur der R-Region oder in dem konstanten C2-Bereich des gp120-Proteins (Moumen et al., 2001; 2003), gelten ebenfalls als mögliche Ursache für den Transfer der RTase vom Donor- zum Akzeptor-RNA-Strang. Die Stabilität der Haarnadelstruktur ist für diesen Prozess von großer Bedeutung. Beispielsweise ist die RRE-Region trotz einer hohen Dichte an Sekundärstrukturen kein "hot spots" für Rekombinationsereignisse, da die Stabilität der Sekundärstrukturen zu groß ist (Levy et al., 2004). In anderen Sekundärstruktur-reichen Regionen des HIV-Genoms konnte gezeigt werden, dass die viralen NC-Proteine eine destabilisierende Wirkung auf die Haarnadelstruktur besitzen und diesen Bereich für die DNA-Synthese zugänglich und somit zu einem möglichen "cross-over"-Punkt machen (Beltz et al., 2004; Derebail et al., 2003; Negroni und Buc 1999).

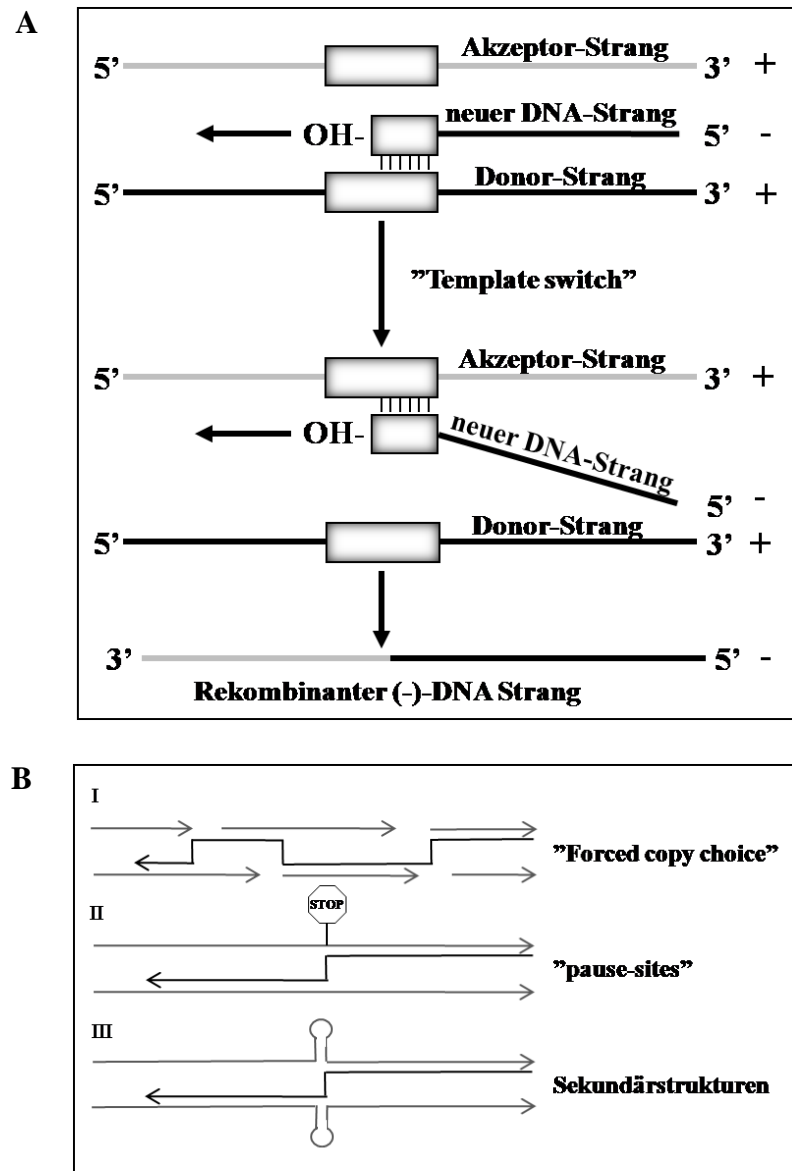


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des ”copy choice”-Mechanismus der homologen Rekombination

(A) Während der reversen Transkription kommt es nach Bindung des 3'-Endes des neu-synthetisierten Minus-DNA-Stranges an den Akzeptor-Strang zu einem Wechsel der RTase von dem Donor- an den Akzeptor-RNA-Strang. Das Endprodukt dieses Vorganges ist ein chimärer Minus-DNA-Strang aus beiden RNA-Strängen. (B) Der ”Template”-Wechsel der RTase wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst: (I) Beim ”forced copy choice”-Modell sind Brüche in der ”Template”-RNA für den Transfer verantwortlich. (II) Des Weiteren kann der Wechsel durch kurze Unterbrechungen der reversen Transkription an ”pause-sites” sowie (III) durch das Vorhandensein von Sekundärstrukturen unterstützt werden (in Anlehnung Galetto und Negroni, 2005).

Rekombinationsereignisse lassen sich nur dann identifizieren, wenn in einem Viruspartikel zwei genetisch verschiedene RNA-Stränge vorhanden sind (siehe Abb. 1.3). Dies ist dann der Fall, wenn eine Zelle mit unterschiedlichen Viren gleichzeitig infiziert ist und zwei genetisch verschiedene RNA-Moleküle bei der anschließenden Virusfreisetzung in ein Viruspartikel verpackt werden ("co-packaging"). Die Voraussetzung für die Erzeugung rekombinanter Virus-Genome über Rekombinationsereignisse ist dementsprechend die Mehrfachinfektion einer einzelnen Zelle mit verschiedenen Virusvarianten (siehe Abschnitt 1.2.3.) und die Formierung heterozygoter Viruspartikel. Für das Verpacken heterozygoter RNA-Moleküle ist eine hoch konservierte palindrome Sequenz von Bedeutung, die als "dimer initiation site" (DIS) bezeichnet wird und sich am 5'-Ende in der nicht-translatierten Region befindet (Clever et al., 1995; Skripkin et al., 1994). Weisen die beiden unterschiedlichen viralen RNA-Genome eine hohe Basenkomplementarität im DIS auf, führt die Watson-Crick Basenpaarung zu einer Dimerisierung dieser Region und dem Verpacken dieser beiden RNA-Moleküle in ein neues Viruspartikel (Kieken et al., 2006; Moore et al., 2007).

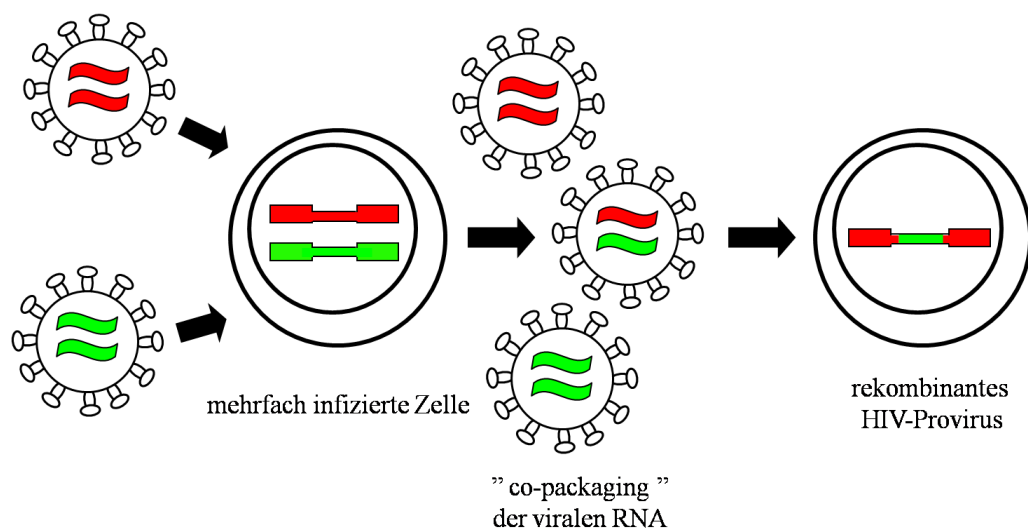


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Entstehung rekombinanter Provirusvarianten

Genetisch unterschiedliche Viruspartikel sind als Virionen dargestellt, die rote und grüne genomische RNA enthalten. Die Infektion einer Zelle mit zwei verschiedenen HIV-Varianten führt zur Integration der beiden Proviren in das Wirtsgenom. Bei der Generierung neuer infektiöser Viruspartikel können homozygote oder heterozygote Virionen erzeugt werden. Infiziert ein heterozygoter Virion eine zweite Zielzelle, kommt es über Rekombinationsereignisse während der reversen Transkription zur Generierung eines chimären Provirus.

1.2.3. HIV-Mehrfachinfektionen auf Einzelzellebene

Der Nachweis der HIV-Kopienzahl in einzelnen infizierten Zellen aus Patienten ist äußerst schwierig, da die Frequenz infizierter Zellen nur sehr gering ist. Je nach Patient wurden Infektionsfrequenzen zwischen 1/100 bis zu 1/55.000 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) beschrieben (Pantaleo et al., 1991; Schnittman et al., 1989). Die lymphatischen Organe, wie Lymphknoten und Milz, sind die wichtigsten Replikationsorte von HIV und man findet dort mit 1/17-1/190 weitaus höhere Infektionsfrequenzen (McIlroy et al., 1995). Somit sind Zellen dieser Organe besonders geeignet, um Mehrfachinfektionen auf Einzelzellebene nachzuweisen.

Früher erschienene Arbeiten schätzten die HIV-Provirus-Kopienzahl auf etwa eine Kopie pro infizierter Zelle (Brinchmann et al., 1991; Simmonds et al., 1990). Dies wurde aus dem vergleichenden Nachweis der HIV-DNA nach spezifischer PCR-Amplifikation aus Grenzverdünnungen infizierter PBMC und isolierter DNA infizierter PBMC geschlossen. Dementsprechend wäre die Virusevolution über Rekombinationsereignisse zwischen HIV-Varianten als äußerst selten einzustufen. Phylogenetische Analysen von HIV-Quasispezies einer Vielzahl von infizierten Personen wiesen allerdings darauf hin, dass Rekombinationen häufig und kontinuierlich stattfinden (Kils-Hutten et al., 2001; Plikat et al., 1997, Wain-Hobson et al., 2003). *In vivo* konnte mittels einer HIV-spezifischen Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) die HIV-Provirus-Kopienzahl in einzelnen infizierten Zellen direkt untersucht werden (Jung et al., 2002). Es zeigte sich, dass die Mehrzahl der HIV-infizierten CD4-positiven T-Zellen aus der Milz zweier HIV-positiver Patienten mehrere Proviren trugen. Die Frequenzverteilung entsprach einer Poissonverteilung mit einem Mittelwert von 3,4 Proviren pro infizierter Zelle. Die infizierten Kerne wurden mittels Laser-Mikrodissektion herausgeschnitten und anschließend eine PCR durchgeführt, die die V1/V2-Region des *env*-Gens amplifiziert. Es konnten sowohl rekombinante als auch nicht-rekombinante HIV-Varianten in Einzelzellen nachgewiesen werden. Diese Resultate demonstrieren, dass die Mehrfachinfektion mit verschiedenen Virusvarianten auf Einzelzellebene *in vivo* vorkommt und somit Rekombinationsereignisse als ein dominierender, kontinuierlich stattfindender Prozess der HIV-Evolution anzusehen sind.

1.3. Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Die FISH ist eine sensitive molekularbiologische Technik, um spezifisch Nukleinsäure-Sequenzen, wie RNA- oder DNA-Sequenzen, in einzelnen Zellen, in Zellkernen, auf Chromosomen oder in Gewebeschnitten zu visualisieren. Die Detektion der Ziel-Sequenzen erfolgt dabei in ihrer

natürlichen Umgebung, also *in situ*. Bei dieser Methode werden sequenzspezifische markierte Nukleinsäure-Sonden eingesetzt, die zu den Ziel-Sequenzen komplementär sind und mit diesen einen Doppelstrang-Hybrid (Duplex) ausbilden. Es gibt zwei Möglichkeiten der Sonden-Markierung. Beim direkten Verfahren werden Fluorochrom-konjugierte Nukleotide direkt in die Sonden-Sequenz eingebaut (Bauman et al. 1980; Wiegant et al., 1991). Bei der indirekten Methode sind die Sonden durch ein Hapten-konjugiertes Nukleotid, wie Digoxigenin-(DIG) oder Biotin, markiert (Holtke und Kessler, 1990; Langer et al., 1981). In einem zusätzlichen Detektionsschritt müssen die Haptene durch die spezifische Bindung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern visualisiert werden (Rudkin und Stollar, 1977).

Fluorochrome oder Fluoreszenzfarbstoffe, wie beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Crabocyanin (Cy3) sind organische Moleküle, welche durch Absorption von Licht bestimmter Wellenlänge auf ein höheres Energieniveau angeregt werden können. Kehren diese angeregten Moleküle in den Grundzustand zurück, emittieren sie Licht mit einer höheren Wellenlänge. Dieses Verhalten (Absorption von kurzwelligem Licht, Emission von längerwelligem Licht = Stokes-Verschiebung) wird als Fluoreszenz bezeichnet. Fluoreszenzen sind ausgesprochen lichtschwach und werden normalerweise durch das wesentlich intensivere Licht der Beleuchtungseinrichtung eines Mikroskops überstrahlt. Bei der konventionellen Mikroskopie im Hellfeld ist deshalb von einer Fluoreszenz im Präparat nichts zu sehen. Wegen der Stokes-Verschiebung ist es möglich, durch eine geschickte Auswahl von Filtern das helle Anregungslicht und das schwache Fluoreszenzlicht im Strahlengang des Mikroskops zu trennen, wodurch nur noch das Fluoreszenzlicht zur Bildentstehung gelangt. Diese Apparatur wird dementsprechend auch als Fluoreszenz-Mikroskop bezeichnet (Lichtman und Conchello, 2005).

1.3.1. Das Prinzip der FISH

Die FISH ist eine komplexe Methode mit mehreren von einander abhängigen Teilschritten, die für ein optimales Resultat sehr präzise durchgeführt und an jede Fragestellung neu angepasst werden müssen. Das Grundprotokoll der FISH lässt sich in fünf Arbeitsschritte unterteilen (siehe Abb. 1.4): (1) Fixierung des biologischen Probenmaterials, (2) Markierung einer sequenzspezifischen Nukleinsäure-Sonde, (3) Permeabilisierung des fixierten Probenmaterials, (4) Denaturierung und Hybridisierung und (5) stringentes Waschen und Detektion der Sonde.

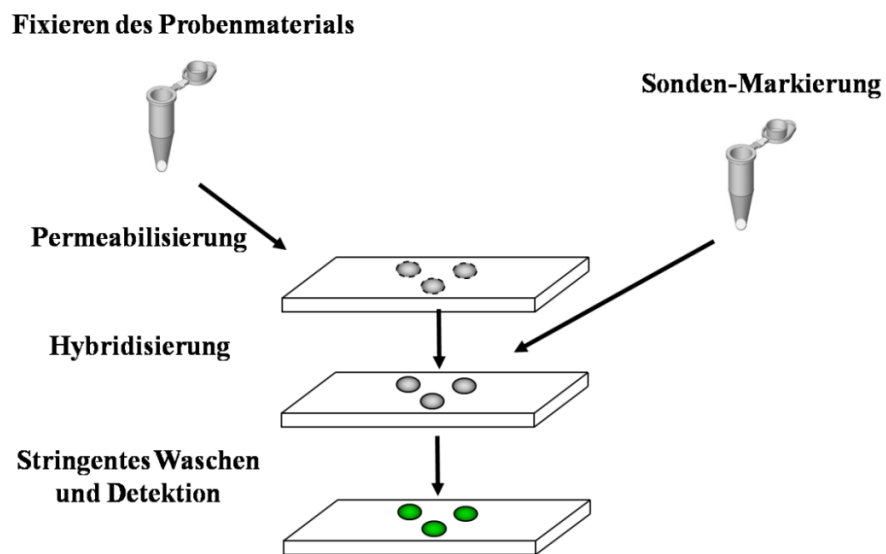


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der grundlegenden Schritte der FISH

Essentielle Voraussetzungen der FISH sind die Vorbehandlung des biologischen Probenmaterials mit einer geeigneten Fixierlösung und die Herstellung einer optimal markierten Nukleinsäure-Sonde. Über einen proteolytischen Verdau wird die Ziel-Sequenz zugänglich gemacht. Nach der Denaturierung der Sonden- und Ziel-Nukleinsäure folgt die Hybridisierung. Das anschließende stringente Waschen dient der Entfernung der unspezifisch gebundenen Sonde. Beim direkten FISH-Verfahren kann die Probe direkt am Fluoreszenz-Mikroskop analysiert werden, während bei der indirekten FISH-Methode ein zusätzlicher Detektionsschritt notwendig ist.

Die Präparation des biologischen Probenmaterials durch Behandlung mit einer geeigneten Fixierlösung stellt eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der FISH dar. Dieser Schritt ist notwendig, um die Zellmorphologie aufrecht zu erhalten und einem Verlust der DNA- oder RNA-Ziel-Sequenzen vorzubeugen. Der Ziel-Nukleinsäure entsprechend werden unterschiedliche Fixative verwendet. Wegen der quervernetzenden Wirkung der RNA mit den zellulären Proteinen werden zum Nachweis der intrazellulären RNA vor allem 4 %-iges Formaldehyd, 1 %-iges Glutaraldehyd oder 4 %-iges Paraformaldehyd (PFA) eingesetzt. Fixierlösungen auf Alkoholbasis sind hingegen ungeeignet, weil diese die Ziel-RNA in den Zellen nicht ausreichend zurückhalten (Dirks et al., 1993; Fleming et al., 1992). Wegen der größeren Stabilität der genomischen DNA im Nukleus eukaryotischer Zellen kommen zu deren Nachweis überwiegend alkoholische Fixative, wie Methanol/Eisessig oder Ethanol, zum Einsatz.

Die Produktion einer optimal markierten sequenzspezifischen Sonde ist ebenfalls von essentieller Bedeutung. Die Hybridisierung der DNA in den Zellkernen erfolgt vorrangig mit doppelsträngigen DNA-Sonden, wohingegen zum Nachweis der intrazellulären RNA bevorzugt einzelsträngige RNA-Sonden verwendet werden. Um eine optimale Sensitivität zu erzielen, müssen die Sonden eine geeignete Größe aufweisen. Generell werden DNA-Sonden mit einer Größe von 200 bis 600 bp und einzelsträngige RNA-Sonden mit einer Größe zwischen 200 und 1000 Nukleotiden eingesetzt. Die Markierung von DNA-Sonden geschieht grundsätzlich über die enzymatische Einlagerung von Hapten- oder Fluorochrom-markierten Desoxynukleotiden. Das gängigste Verfahren der Herstellung einer DNA-Sonde ist die Nick-Translation (Rigby et al., 1977). Die zu markierende Sonden-Sequenz muss dafür zuvor in einen Vektor kloniert werden. In einer anschließenden Reaktion induziert das Enzym DNase I an statistisch verteilten Stellen der DNA Einzelstrangbrüche. Durch die 5'-3'-Polymeraseaktivität des Enzyms DNA-Polymerase I kommt es zum Einbau der markierten Nukleotide, meist dUTP, in die doppelsträngige DNA. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität des Enzyms werden die alten Nukleotide

gleichzeitig entfernt. Die Generierung einzelsträngiger RNA-Sonden geschieht überwiegend über eine In-Vitro-Transkription nach Subklonierung der gewünschten Sonden-Sequenzen in einen Transkriptionsvektor, der Promotorstellen für die SP6- und T7-Polymerase enthält (Holtke und Kessler 1990). Der Einbau der markierten Nukleotide, wie beispielsweise DIG-11-dUTP, erfolgt während der Synthese des RNA-Stranges.

Die Vorbehandlung des fixierten biologischen Probenmaterials stellt einen weiteren wichtigen Schritt dar, um den Zugang der Ziel-Sequenzen für die Sonden zu gewährleisten. Zum Nachweis der DNA ist dies notwendig, um noch zum Teil vorhandene Proteine, wie Histone, zu beseitigen. Auf RNA-Ebene erfolgt eine proteolytische Vorbehandlung, um Quervernetzungen zwischen der RNA und den zellulären Proteinen, die durch das Fixativ PFA entstanden sind, wieder aufzubrechen. Die Membranen werden über verschiedenen Ethanolwaschungen permeabilisiert und die zellulären Proteine über einen proteolytischen Verdau, meistens mit Pepsin oder Proteinase K, beseitigt. Die Konzentration des Enzyms, sowie die Inkubationsdauer hängen dabei von dem jeweiligen Probenmaterial ab. Gewebeschnitte müssen für einen längeren Zeitraum mit einer höheren Enzymkonzentration inkubiert werden als einzelnen Zellen bzw. Zellkerne. Die genauen Bedingungen müssen experimentell ausgetestet werden, denn eine zu kurze Behandlungsdauer führt dazu, dass die Sonde nicht ins Probenmaterial eindringen kann, und eine zu starke Behandlung hat den Verlust der Ziel-Nukleinsäuren, sowie die Zerstörung der Zellmorphologie zur Folge.

Um eine optimale Sensitivität und Spezifität der FISH zu erhalten, müssen die Denaturierungs- und Hybridisierungsbedingungen optimiert werden. Bei der Denaturierung werden die doppelsträngigen DNA-Sonden sowie die Ziel-DNA durch Hitzezufuhr voneinander getrennt. Dies stellt die Voraussetzung dafür dar, dass sich die Hybride zwischen der Ziel-DNA und der markierten Sonden-DNA ausbilden können. Die Schmelztemperatur der DNA wird dabei von der

Länge und der DNA-Sequenz bestimmt. Ohne Formamid-Zugabe wäre diese zu hoch, um eine vollständige Trennung der intrazellulären DNA-Stränge zu gewährleisten und gleichzeitig die Zellmorphologie aufrecht zu erhalten. Das Formamid führt zu einer Destabilisierung der doppelsträngigen DNA-Struktur und setzt somit die Schmelztemperatur herab. Zur Erhöhung der Sensitivität einzelsträngiger RNA-Sonden ist ebenfalls eine Denaturierung notwendig, um die Sekundärstrukturen zu beseitigen. Diesem Schritt schließt sich die Bestimmung der bestmöglichen Hybridisierungsbedingungen an. Dies geschieht durch Austesten der Sondenkonzentration, der Konzentration an monovalenten Kationen, der Formamidkonzentration und der Temperatur. Diese Parameter müssen optimal abgestimmt sein, damit sich nur die spezifischen Hybride zwischen Sonde und Ziel-Nukleinsäure ausbilden.

Das Waschen nach der Hybridisierung ist besonders wichtig, um die unspezifisch gebundene Sonde zu beseitigen, die zur Bildung einer Hintergrundfluoreszenz in den Zellen oder auf dem Objektträger führen könnte. Die Waschschritte werden dabei unter Bedingungen höherer Stringenz vorgenommen, das bedeutet mit einer niedrigeren Konzentration monovalenter Kationen, einer höheren Temperatur und einer höheren Formamidkonzentration (Wetmur et al., 1991). Das Signal der direkt markierten Sonden kann im Anschluss daran am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet werden. Die Hapten-markierten Sonden müssen zusätzlich in einem letzten Schritt visualisiert werden. Dies geschieht über die Bindung Fluorochrom-gekoppelter Antikörper (Rudkin und Stollar, 1977) oder spezifischer Antikörper, die Enzym-konjugiert vorliegen, wie beispielsweise mit der Meerrettich-Peroxidase. Dieses Enzym kann für eine folgende Signalamplifikation mit einem TSA™-System eingesetzt werden (Raap et al., 1995). Bei diesem Verfahren kommt es in einer durch die Meerrettich-Peroxidase-katalysierte Reaktion zu einer Oxidation und Anreicherung des mit Biotin-gekoppelten Phenols Thyramid. Bei der anschließenden Detektion mit Cy3-konjugiertem- oder FITC-konjugiertem Streptavidin können die Streptavidin-Moleküle vermehrt in dem Bereich binden, was zu einem verstärkten, aber distinkten Signal führt.

1.3.2. Anwendungsmöglichkeiten der FISH

Die Anwendungsgebiete der FISH sind im Bereich der klinischen Diagnostik und der Forschung weitgefächert und spielen in vielen Bereichen, wie der Zytogenetik, der Pathologie, der Zellbiologie, der Hämatologie und der molekularen Genetik, eine große Rolle. Mit den ersten Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen wurden repetitive Sequenzen der Zentromerregionen detektiert und dienten zur Klassifizierung numerischer chromosomaler Aberrationen (Gerhard et al., 1981; Harper und Saunders 1981; Malcolm et al., 1981; Pinkel et al., 1986). Die Möglichkeit der FISH, Chromosomen oder Chromosomensegmente spezifisch zu detektieren, stellt den besonderen Vorteil dieser Methode dar, denn sie erlaubt den direkten und schnellen Nachweis von Chromosomenanomalien, wie Amplifikationen, Deletionen oder Translokationen (Gray et al., 1994; Joos et al., 1994). Des Weiteren kann durch den Einsatz von Gen-spezifischen DNA-Sonden die Kopienzahl und Anordnung von Genen auf Chromosomen in einzelnen Zellen unabhängig vom Zellzyklus bestimmt werden (Cremer et al., 1986; Qian et al. 1995). Bei der Mehrfarben-FISH kommen verschiedenen Chromosomen-spezifische Sonden zum Einsatz, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Dieses Verfahren erlaubt die simultane Darstellung der menschlichen Chromosomen und dient der Karyotypisierung (Smit et al., 1991; Speicher et al., 1996). In der Krebsdiagnostik kommen lokusspezifische Sonden zur Markierung von Onkogenen und zur Detektion von Tumorsuppressorgendeletionen zum Einsatz (Mitelman et al., 1997; Oscier, 1999). Beispielsweise wird die FISH in der Brustkrebsdiagnostik zur Bestimmung der Amplifizierung des Onkogens HER-2 eingesetzt (Pauletti et al., 1996). Das Ergebnis der FISH ist in diesem Fall von besonderem Interesse, da es eine Prognose für den Krankheitsverlauf erlaubt, ebenso kann ein Ansprechen auf die Chemotherapie vorhergesagt werden (Romond et al., 2005). Die FISH dient nicht nur der Detektion der intrazellulären DNA, sondern kann auch auf RNA-Ebene angewandt werden. Die meisten Arbeiten befassen sich mit Analysen von Genexpressionsmustern,

beispielsweise der Genexpression von Onkogenen, Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren in Tumorgeweben (McNicol und Farquharson, 1997). Aber auch Transkriptionsmuster von gesundem Gewebe oder Veränderungen im RNA-Gehalt einzelner Zellen nach Zellaktivierung können mit Hilfe einer sensitiven RNA-FISH spezifisch nachgewiesen werden (Levsky und Singer, 2003).

Die Methode der FISH dient auch der Lokalisierung und Visualisierung viraler Nukleinsäuren in einzelnen infizierten Zellen, sowohl auf DNA-Ebene im Nukleus, als auch auf RNA-Ebene im Zellkern oder im Zytoplasma. Von großem Interesse ist der Nachweis viraler DNA, die im Zusammenhang mit einer Tumorentwicklung stehen. Ein Beispiel hierfür ist die Entstehung von Zervixkarzinomen als Resultat einer Infektion mit Humanen Papillomviren (HPV). Über die FISH konnte die integrierte HPV-DNA der Hoch-Risiko-Varianten HPV-16 und HPV-18 in Zellkernen von Gewebebiopsien von Zervixkarzinomen, sowie in zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) der Stufe I bis III detektiert werden (Evans et al., 2002). Die punktuelle Verteilung der FISH-Signale stellt einen geeigneten molekularen Marker zur Detektion von CIN der Stufe II und III dar, mit denen ein erhöhtes Risiko der invasiven Karzinom-Progression verbunden ist. Die FISH könnte in diesem Fall als diagnostisches "Screening"-Verfahren eingesetzt werden, anhand deren Ergebnisse eine Vorhersage des Krankheitsverlaufs erstellt werden kann (Evans et al., 2002; Hopman et al., 2005).

Wie unter 1.2.3. beschrieben konnte mit Hilfe einer HIV-spezifischen DNA-FISH eine grundlegende Erkenntnis für die HIV-Evolution erlangt werden. In unserer Arbeitsgruppe wurden FISH-Experimente mit CD4-positiven Zellen aus der Milz HIV-positiver Patienten durchgeführt. Dabei wurden multiple Proviren in einzelnen infizierten Zellen detektiert (Jung et al., 2002). Anhand einer nachfolgenden Sequenzanalyse wurde gezeigt, dass es sich hierbei um

verschiedene Provirusvarianten handelte, die das Resultat einer Mehrfachinfektion mit verschiedenen Viren waren. Somit konnte die Grundvoraussetzung zur Diversitätssteigerung von HIV über Rekombinationsereignisse *in vivo* bestätigt werden.

Das Verfahren der FISH wurde auch für Analysen der Virusreplikation und Virusevolution von Plus-Strang-RNA Viren, wie dem Poliovirus und dem Hepatitis-C-Virus (HCV) eingesetzt. Ein charakteristisches Merkmal aller bisher untersuchten Plus-Strang-RNA-Viren ist die Ausbildung eines Membran-assoziierten Replikationskomplexes, der aus viralen, zellulären Proteinen sowie modifizierten zellulären Membranen besteht und den Ort der viralen RNA-Synthese darstellt (Ahlquist et al., 2003; Bienz et al., 1990; 1992; Egger et al., 2002). Mit einer Poliovirus-spezifischen RNA-FISH konnte der Beweis erbracht werden, dass die Poliovirus-RNA tatsächlich in diesen Replikationskomplexen vorkommt, wobei die Identifizierung der Replikationskomplexe über eine Immunfluoreszenz des viralen Proteins 2C erfolgte (Bolten et al., 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in den Replikationskomplexen zwei verschiedene Poliovirus-Sequenzen kolo-kalisieren, was die wichtigste Voraussetzung für die Steigerung der Variantenvielfalt über Rekombinationsereignisse darstellt. Dazu wurden Hela-Zellen gleichzeitig mit dem Poliovirus Typ1 Mahoney und Typ 2 Sabin infiziert und diese Sequenzen mit unterschiedlich markierten Sonden detektiert. Die Formierung der Replikationskomplexe wurde dabei über eine Immunfluoreszenz des viralen Proteins 2B überprüft (Egger und Bienz 2002). Die Visualisierung der HCV-induzierten Formierung von Replikationskomplexen erfolgte in Zellen der Leberkarzinom-Zelllinie Huh7, die subgenomische HCV-Replikons enthielten. Über eine HCV-spezifische RNA-FISH wurde die HCV-RNA in den Replikationskomplexen nachgewiesen, die über eine Immunfluoreszenz der Nichtstrukturproteine identifiziert wurden (Gosert et al., 2003).

1.4. Ziele der Arbeit

Rekombinationsereignisse tragen wesentlich zur Erzeugung der Variantenvielfalt des humanpathogenen Retrovirus HIV bei. Voraussetzung dafür ist die gleichzeitige Infektion einer einzelnen Zelle mit verschiedenen Virusvarianten und das Verpacken unterschiedlicher RNA-Genome in ein neues Viruspartikel. Die Infektion einer weiteren Zielzelle mit diesem heterogenen Viruspartikel führt dazu, dass über Rekombinationsereignisse während der reversen Transkription rekombinante Proviren entstehen. In vorherigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurde mit einer HIV-spezifischen DNA-FISH nachgewiesen, dass einzelne HIV-infizierte Zellen *in vivo* mehrere Proviren tragen und sowohl rekombinante als auch nicht-rekombinante HIV-Varianten auf Einzelzellebene vorkommen (Jung et al., 2002).

Die DNA-FISH zur Analyse einzelner infizierter Zellen ist von enormer Bedeutung für das Verständnis grundlegender Prozesse der Virusevolution und ermöglicht detaillierte Einblicke in die Vorgänge während des Infektionsgeschehens. Allerdings ist diese Methode zur Einzelzellanalyse extrem anfällig für Schwankungen der Signalintensität innerhalb der Zellen. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- (1) Optimierung der HIV-spezifischen RNA-FISH in Kombination mit einer RT-PCR zur Amplifizierung der hypervariablen V1/V2-Region des *env*-Gens. Die RT-PCR sollte dabei auf Einzelzellebene, nach der Isolierung FISH-positiver Zellen über Laser-Mikrodissektion erfolgen. Die Entwicklung eines solchen Systems ist von besonderem Interesse, weil es zur Analyse der relativen transkriptionellen Aktivität multipler Proviren auf Einzelzellebene eingesetzt werden könnte.

- (2) Systematische Optimierung der HIV-spezifischen DNA-FISH, so dass diese zur Bestimmung der Provirus-Kopienzahl in einzelnen infizierten Zellen verlässlich angewandt werden kann. Dazu sollten die voneinander abhängigen Teilschritte der DNA-FISH optimal abgestimmt werden, um ein Ergebnis mit ausreichender, reproduzierbarer Signalintensität und einer geringen Hintergrundfluoreszenz zu erlangen.
- (3) Etablierung eines SIV-spezifischen DNA-FISH-Protokolls und Einsatz dieser Technik zur Bestimmung der Provirus-Kopienzahl einzelner SIV-infizierter Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionsverlaufs. Im Vordergrund stand die Frage, ab wann die Mehrfachinfektion etabliert wird und somit mit der Erzeugung neuer Virusvarianten über Rekombinationsprozesse zu rechnen ist. Für diese Analysen standen Milzzellen aus gut charakterisierten SIV-Infektionsstudien an Rhesusaffen von der Primärvirämie bis zum AIDS-Stadium zur Verfügung. Durch die gute Vergleichbarkeit des Infektionsverlaufs von SIV bei Rhesusaffen mit HIV beim Menschen sollten die Ergebnisse wichtige Einblicke in die Bedeutung multipler Proviren für die HIV-Evolution auf Einzelzellebene liefern.

2. *Material und Methoden*

2.1. **Chemikalien**

Agarose	Applichem, Darmstadt
Ampicillin (Binotal™)	Ratiopharm, Ulm
”Blocking” Reagenz	Roche, Mannheim
”Blocking ”Reagenz	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Casyton	Schärfe, Reutlingen
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI-”Mounting Medium”	Vector, Burlingame
DexSO ₄	Sigma-Aldrich, Teuchkirchen bei München
DEPC	Applichem, Darmstadt
DMEM Gibco®	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Applichem, Darmstadt
Ethanol	Riedel-de Haën (Sigma- Aldrich Laborchemikalien, Seelze)
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
EtBr	Sigma-Aldrich, Teuchkirchen bei München
FKS	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Formamid deionisiert	Applichem, Darmstadt
Glyzerin	Serva, Heidelberg

Glycin	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
HCl	Merck, Darmstadt
IL-2 (Proleukin®)	Chiron Behring, Marburg
Isopropanol	Merck, Darmstadt
K-acetat	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Difco-LB-Agar	BD, Sparks, USA
Difco-LB-Medium	BD, Sparks, USA
LiCl	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma-Aldrich, Teuchkirchen bei München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
NaCl	Applichem, Darmstadt
Na-Citrat	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
PFA	Applichem, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Phenol	Merck, Darmstadt
PHA	Difko, Detroit, MI. USA
PMA	Sigma-Aldrich, Teuchkirchen bei München
RPMI 1640	Lonza, Velviers, Belgien
RbCl	Merck, Darmstadt
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Applichem, Darmstadt
TRIS	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
Triton X-100	Applichem, Darmstadt
Tween20	Merck, Darmstadt

2.2. Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurden der Stammsammlung des Instituts für Virologie, der Universitätskliniken Homburg entnommen oder hergestellt. Die Herkunft und die Eigenschaften dieser Plasmide, sowie die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide, sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Herkunft und Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pBru	Klonierungsvektor pKP59; enthält HIV-1 Vollängensequenz	(1)
pBruΔEnv	Klonierungsvektor pKP59; mit einer Deletion im <i>env</i> -Gen	(1)
pD12Z1	Klonierungsvektor; enthält die Sequenz der repetitiven Zentromerregion von Chromosom 12	(1)
pSIV251ΔEnv	Klonierungsvektor; SIV-Sequenz mit einer Deletion im <i>env</i> -Gen	(2)
APP23	Klonierungsvektor; enthält eine chimäre HCV-Vollängensequenz aus FL-J6/JFH1 mit einer "upstream"-Erweiterung	Apath
pGEM	Klonierungsvektor; mit SP6- und T7-Promotor	Promega
pGEM-HIV-1	Klonierungsvektor; plus HIV-Insert, Länge 539 bp, Position 1315-1854	(3)
pGEM-HIV-2	Klonierungsvektor; plus HIV-Insert, Länge 267 bp, Position 2326-2593	(3)
pGEM-HIV-3	Klonierungsvektor; plus HIV-Insert, Länge 307 bp, Position 2811-3118	(3)
pGEM-HIV-4	Klonierungsvektor; plus HIV-Insert, Länge 362 bp, Position 3795-4157	(3)
pGEM-HIV-5	Klonierungsvektor; plus HIV-Insert, Länge 371 bp, Position 4546-4917	(3)

Tab. 2.1: Verwendete Plasmide (Fortsetzung)

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pGEM-HIV-6	Klonierungsvektor; plus HIV-Insert, Länge 506 bp, Position 5847-6353	(3)
pGEM-HIV-7	Klonierungsvektor; plus HIV-Insert, Länge 462 bp, Position 7153-7615	(3)
pGEM-HIV-8	Klonierungsvektor; plus HIV-Insert, Länge 555 bp, Position 7963-8518	(3)
pGEM-HIV-9	Klonierungsvektor; plus HIV-Insert, Länge 617 bp, Position 8796-9413	(3)

(1) Der Stammsammlung des Instituts für Virologie (Homburg) entnommene Plasmide

(2) Pasteur Institut, Paris

(3) Im Laufe dieser Arbeit hergestellte Plasmide; HIV-Referenz-Sequenz: HIVBru (Accession-Nummer K02013)

2.3. Zellen/Viren/Bakterien

2.3.1. Zelllinien

T-Zelllinie ACH2/A3.01:

ACH2 ist ein Subklon der Zelllinie A3.01, die ihrerseits von der Zelllinie CEM abgeleitet ist. CEM ist eine T-Zelllinie aus einem Patienten mit akuter lymphoblastoide Leukämie. ACH2 hat eine Verdopplungszeit von ca. 24 h. Die Zelllinie ist positiv für CD5, Transferrin-Rezeptor und Leu-1. Sie trägt eine HIV-Provirus-Kopie und kann durch TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) oder PMA ("phorbol-12-myristate-13-acetate") zur Produktion großer Mengen an infektiösem HIV-1 induziert werden. Die Zelllinie produziert konstitutiv niedrige Mengen RTase und p24, die im Zytoplasma nachweisbar sind (Clouse et al., 1989; Folks et al., 1989).

T-Zelllinie CEMx174:

Die Zelllinie CEMx174 (zur Verfügung gestellt vom Institut Pasteur, Paris) ist ein Hybrid der humanen T-Zelllinie CEM^R.3 und der humanen B-Zelllinie B721.174 (Salter et al., 1985). Sie zeigen eine MHCII-Molekül-Expression, die von der parentale T-Zelllinie CEM^R.3 kodiert wird und eine verstärkte

Expression der MHCI-Moleküle, die von beiden parentalen Zelllinien kodiert werden. Weiterhin befinden sich auf der Oberfläche die für die HIV-Infektion notwendigen CD4-Moleküle, was sie ebenfalls empfänglich für eine Infektion mit SIV macht und zu einer starken Ausprägung eines Cytopathischen Effekts (CPE) führt. Durch die mikroskopische Beobachtung einer Synzytien-Formierung kann deswegen auf stattgefundenene Infektionsereignisse geschlossen werden (Stefano et al., 1993).

Promonozytäre Zelllinie U1/U937:

Die Zelllinie U1 stellt einen Subklon der promonozytischen Zelllinie U937 dar und ist chronisch mit HIV-1 infiziert. Sie trägt zwei provirale Sequenzen pro Zelle. Durch Behandlung mit bestimmten Zytokinen, wie beispielsweise IL-2, oder PMA können U1-Zellen zur Virusproduktion angeregt werden, jedoch produzieren sie auch konstitutiv niedrige Mengen an HIV. Die Oberflächenexpression an CD4 ist niedrig (Folks et al., 1987).

Leberkarzinom-Zelllinie Huh7.5:

Die Zelllinie Huh7.5 ist eine abgeleitete Form der Leberkarzinom-Zelllinie Huh7. Die ursprünglichen Huh7-Zellen wurden mit HCV-Replikons transfiziert und über eine Behandlung mit Interferon- α (IFN- α) von diesen geheilt. Diese Zellen besitzen nun eine höhere Permissivität für eine HCV-Replikation und werden standardmäßig für die Infektion mit HCVcc eingesetzt (Blight et al., 2002).

2.3.2. Virusstocks

HIV_{Lai}

Die für die HIV-1_{Lai} kodierende DNA ist in dem Plasmid pBru-2 enthalten. Der zugrundeliegende Klonierungsvektor ist pKP59. Die Herstellung eines Stocks infektiöser Partikel erfolgte mittels Transfektion des Plasmids in geeignete Zelllinien. Der vorliegende Virusstock ist durch eine RTase-Aktivität von 12000 cpm/ml, eine p24 Konzentration von 220 ng/ml und eine TCID₅₀/ ml von $2,1 \times 10^6$ charakterisiert (Bartolomé Rodrigues, 2001).

HCVcc

Die Arbeiten zu HCV geschahen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Juana Diez der Pompeu Fabra Universität in Barcelona, die zum Zeitpunkt der Experimente Kooperationspartner von Apath war. Apath ist Lizenzträger des reproduzierbaren Systems der vollständigen HCV-Replikation in Zellkultur. Der Ursprung für HCVcc ("culture-derived" HCV) sind zwei Isolate aus Patienten mit einer fulminanten Hepatitis (Lindenbach et al., Zhong et al., 2005). Die *in vitro* transkribierte RNA von Plasmiden, die die chimäre Sequenz von zwei unterschiedlichen HCV Genotyp 2a Stämmen enthielten, wurden in die hoch permissive Zelllinie Huh7.5 elektroporiert und die Überstände mit den darin enthaltenen Viren gesammelt. Der in dieser Arbeit verwendete Virusstock wurde mit einem $TCID_{50}/ml$ von $7,74 \times 10^3$ charakterisiert (Scheller, 2008).

2.3.3. Bakterien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterien wurden der Stammsammlung des Institutes für Virologie, Universitätskliniken Homburg, entnommen. Ein Überblick über den eingesetzten Stamm und dessen genotypischen Hintergrund findet sich in Tab. 2.2.

Tab. 2.2: Herkunft und Eigenschaften des verwendeten *Escherichia coli*-Stammes

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ^{proAB lacI} ZDM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene

2.4. Zellkultur

Unter Zellkultur versteht man die Kultivierung und Vermehrung eukaryotischer Zellen *in vitro*. Beim Wachstum *in vitro* organisieren sich die Zellen nicht mehr in einem Gewebe, sondern wachsen meist als Einzelschicht (Monolayer), in vielschichtigen Zellschichten (Multilayer) bei adhärennten Zelllinien oder in Suspension als Suspensionskultur.

Die Kultivierung humaner Zellen erfolgte grundsätzlich bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 %.

2.4.1. Puffer für die Zellkulturarbeit

PBS-Puffer (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺):

NaCl	0,14 M
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	0,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

lösen in H₂O_{dest.}, pH 7,4 eingestellt mit HCl

Für die Arbeit mit humanen Zellen muss grundsätzlich PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ verwendet werden, damit es zu keiner Vorstimulation der Zellen beim Waschen kommt.

2.4.2. Zellkulturmedien

Das Inaktivieren des den Medien zugesetzten Fetalen Kälberserums (FKS) erfolgte grundsätzlich für 10 min bei 40 °C.

Standard-Medium zur Kultivierung von Suspensionszellen

RPMI 1640	
hitzeinaktiviertes FKS	10 % (v/v)
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Medium zur Kultivierung der adhärenenten Huh7.5-Zellen

DMEM Gibco®

hitzeinaktiviertes FKS (Sigma)	10 % (v/v)
Nicht-essentielle Aminosäure (PAA)	1 % (v/v)
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml

Einfriermedium

RPMI 1640; DMEM Gibco®

FKS	30 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

2.4.3. Subkultivierung von Zelllinien**2.4.3.1. Subkultivierung von Suspensionszellen**Kultivierung von CEMx174 ACH2-, A3.01-, U1- und U937-Zellen

Die Suspensionszellen der Zelllinie CEMx174, ACH2, A3.01, U1 und U937 wurden je nach Wachstumsverhalten in einer Dichte von 3×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml RPMI-Medium plus 10% FKS in Kultur gehalten. Zweimal pro Woche wurden die Zellen zur Stammhaltung 1:10 gesplittet und die Kultur mit frischem RPMI-Medium versehen. Die verwendeten Zellen wurden mit der VenorGem Mycoplasmen-PCR (siehe 2.4.5.) untersucht und waren Mycoplasmen-negativ.

2.4.3.2. Subkultivierung adhärenenter ZellenHuh7.5

Adhärenente Huh7.5-Zellen wurden 70-80 % konfluent in Kultur gehalten. Dreimal pro Woche wurden die Zellen zuerst mit PBS, zum Entfernen des FKS, gewaschen mit Trypsin/EDTA Gibco® (Invitrogen) abgelöst und die Zellzahl über Trypanblau-Ausschlussfärbung bestimmt. Die Zellen wurden zur

Stammhaltung in einer Dichte von $1,3 \times 10^6$ /ml in einer mittleren Kulturflasche (75 cm^2) in frischem DMEM-Medium ausgesät.

2.4.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren

Die Zellen wurden in vorgekühltem Einfriermedium in einer Dichte von 2×10^7 Zellen/ml aufgenommen und in Einfrier Röhrchen überführt. Um ein langsames Absinken der Temperatur zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst einen Tag in einem Styroporbehälter bei -70 °C , danach in der Gasphase über flüssigem Stickstoff auf Dauer gelagert.

Auftauen

Eingefrorene Zellen wurden aufgetaut und sofort in ein auf 37 °C vorgewärmtes Medium überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 900 rpm wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 6 min bei 1400 rpm) und anschließend in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml Medium in Kultur genommen.

2.4.5. Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind zellwandlose Parasiten, die in der Natur unter anderem als Kommensalen der Schleimhäute von Säugetieren auftreten. Kontaminationen stellen in kontinuierlichen Zellkulturen ein großes Problem dar. Als chronische Infektion beeinflussen sie auf vielfältige Weise die Funktionen von Zellen. Sie nehmen Einfluss auf den Metabolismus der Zellen und verändern so deren Wachstumsverhalten, ihre immunologischen und biochemischen Eigenschaften, sowie deren Lebensfähigkeit. Die Infektion einer Zellkultur mit Mycoplasmen ist visuell oder lichtmikroskopisch nicht zu erkennen. Zur Kontrolle der verwendeten Zelllinien wurde ein Kit der Firma Minerva Biolabs (VenorGeM®) eingesetzt. Der Nachweis erfolgte hierbei über eine Mycoplasmen-spezifische PCR. Der Kit enthält PCR-Primer, die spezifisch für

ein breites Spektrum von Mycoplasmen sind, einschließlich der Spezies *Acholeplasma laidawii*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma hyorhinitis*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hominis* und *Mycoplasma salivarium*. Für die PCR wurden Überstände aus adhärenen Zellkulturen eingesetzt. Suspensionskulturen wurden vor der Durchführung mittels "QIAamp DNA Blood Mini Kit" der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Außerdem mussten die Zelllinie ACH2 und U1 vor der Aufreinigung zur HIV-Inaktivierung 5 min bei 100 °C inkubiert werden.

2.4.6. Isolierung peripherer Blutzellen

2.4.6.1. Blutspender

Leukozyten-Konzentrate ("buffy coats") wurden von der Blutbank der Winterbergklinik in Saarbrücken zur Verfügung gestellt. Die Blutspender waren HIV-1-, HIV-2- sowie Hepatitis B- und -C-Virus-negativ.

2.4.6.2. Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, "peripheral blood mononuclear cells") erfolgte aus Leukozyten-Konzentraten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. "Buffy coats" fallen bei der Herstellung von Blutkonserven durch Zentrifugation und Abnahme des Plasmas an und enthalten neben PBMC Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten. Die Konservenbeutel, in die das Blut abgenommen wird, enthalten Antikoagulantien, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern.

Durchführung:

Der Inhalt eines "buffy coat" wurde zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt. 15 ml Lymphocyte Separation Medium (=Ficoll, Dichte $1,077 \pm 0,001$ g/ml) wurden in einem 50 ml-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 35 ml der verdünnten Suspension überschichtet. Um den Gradienten nicht zu zerstören, wurde 25 min bei 1800 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Dabei trennten sich die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte. Die Erythrozyten und Granulozyten besitzen eine hohe Dichte und sedimentieren während sich die PBMC in der Interphase zwischen Serum/PBS und Ficoll befinden. Da Thrombozyten die geringste Dichte besitzen sammeln sie sich im Überstand über der Zwischenschicht. Die PBMC-enthaltende Zwischenschicht wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, um Ficoll-Rückstände zu entfernen. Verbleibende Erythrozyten wurden entfernt, indem die PBMC zwischen den Waschsritten für ca. 15 sec in 5 ml $H_2O_{dest.}$ resuspendiert und unmittelbar danach mit 45 ml PBS versetzt wurden. Diese Behandlung ermöglicht die selektive Lyse der Erythrozyten, während die PBMC intakt bleiben. Beim Aufnehmen der Zwischenschicht wird stets ein Teil des Überstandes mitüberführt, so dass die PBMC mit Thrombozyten verunreinigt sind. Um diese zu entfernen wurde am Ende ein Waschschrift mit 10-minütiger Zentrifugation bei 900 rpm durchgeführt. Das Pellet wurde in 30-50 ml RPMI-Medium mit 10 % FKS aufgenommen und die Zellzahl im CASY[®] bestimmt (siehe 2.4.7.2.).

2.4.7. Vitalitätsprüfung und Zellzahlbestimmung

2.4.7.1. Vitalitätsprüfung durch Trypanblau-Ausschlussfärbung

Um Aufschluss über die Vitalität einer Zellkultur zu erhalten, wurde bei einigen Experimenten die sogenannte Trypanblau-Ausschlussfärbung durchgeführt. Trypanblau ist ein Farbstoff, dessen Pigmentgröße es nicht erlaubt, in intakte Zellen einzudiffundieren. In Zellen, bei denen die Zellmembran infolge von Apoptose oder Nekrose nicht mehr intakt ist, kann

im Gegensatz dazu der blaue Farbstoff eindringen. Zur Bestimmung der Vitalität einer Zellkultur wurde ein Zellaliquot 1:2 mit Trypanblaulösung gemischt und unter dem Lichtmikroskop in einer Einmalzählkammer (Fast Read 102 der Firma Schwarz Pharma Deutschland GmbH) untersucht. Lebende Zellen mit einer intakten Zellwand erschienen hell und ungefärbt, während das Zytoplasma toter Zellen blau eingefärbt war. Durch Auszählen der Zellen in der Einmalzählkammer, die einen Faktor 10^4 besaß, konnte so die Lebendzellzahl einer Zellkultur bestimmt werden.

2.4.7.2. Zellzahlbestimmung und Charakterisierung mit dem CASY®1 "Cell Counter and Analyser System"

Die Zelldichte einer Kultur wurde routinemässig im "cell counter and analyser system" CASY®1 (Schärfe, Reutlingen) bestimmt. Bei der Passage der Zellen durch eine Leitfähigkeitsmeßzelle bestimmt dieses Gerät die Änderung des Widerstandes in Abhängigkeit von der Zeit. Es verbindet computertechnisch die Widerstandsmessung mit der Signalauswertung über Pulsflächenanalyse. Bei der Messung ist die Fläche des gemessenen Impulses proportional zum Zellvolumen. Daher können gleichzeitig die Zelldichte und die Größenverteilung einer Zellpopulation analysiert werden.

Durchführung:

Zur Messung wurde eine Zellsuspension definierten Volumens 1:1000 in der Elektrolytlösung (Casyton) verdünnt und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare bekannter Geometrie gesaugt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Da intakte Zellen in erster Näherung als Isolatoren betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke. Unter der Voraussetzung, dass die Zellen die Kapillare einzeln passieren, ist diese Widerstandsänderung ein Maß für das Volumen der Zelle. Der Computer errechnet aus zwei

Messsignalen einen Mittelwert in Form eines Integrals, das dem Zelldurchmesser proportional ist. Das Ergebnis der Messung ergibt ein Histogramm, bei dem die relative Zellzahl gegen den Zelldurchmesser aufgetragen wird (Abb. 2.1).

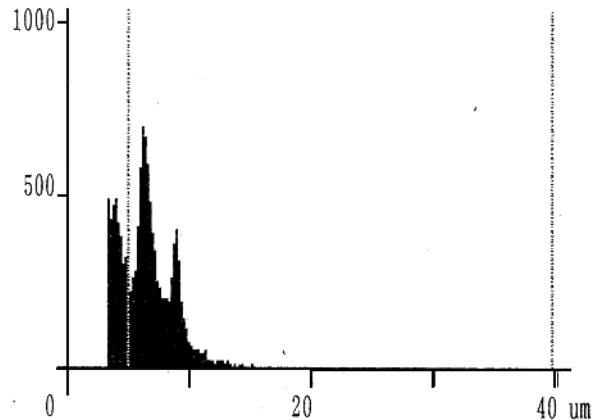


Abb. 2.1 Populationen der kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes nach Isolierung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Dargestellt ist ein Histogramm von PBMC nach der Isolierung über einen Ficoll-Gradienten. Das Histogramm zeigt eine Auftrennung dreier Populationen anhand der relativen Zellgröße. Die Population mit der geringsten Größe umfaßt die Thrombozyten und Zellbruchstücke. Die mittlere stellt die Lymphozyten- und die rechte die Monozyten-Population dar. Die Messung und Auswertung wurde mit Hilfe des "cell counter and analyser system" CASY® (Schärfe) durchgeführt.

Diese Methode wurde für die Bestimmung der Zellzahl der PBMC nach der Isolierung eingesetzt, sowie zur Bestimmung der Zellzahl der nicht-infizierten Zelllinien A3.01, U937 und CEMx174. Bei allen anderen Zellen wurde die Zellzahl mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung (siehe 2.4.7.1.) ermittelt.

2.4.8. *Ex vivo* HIV-Infektion

2.4.8.1. Infektion stimulierter PBL mit HIV_{Lai}

Die verwendeten PBMC wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 2.4.6.2.) isoliert und in 12-Loch-Platten in einer Dichte von 1×10^6 /ml und einem Volumen von 3 ml ausgesät. Durch Zugabe des Lektins Phythämagglutinin (PHA) in einer Konzentration von 2,5 µg/ml wurden die Zellen über Nacht stimuliert. Um die PBL ("peripheral blood lymphocytes") von der adhärennten Monozytenpopulation zu trennen, wurden die nicht-adhärennte Zellpopulation in ein 50 ml-Röhrchen überführt, mit RPMI-Medium ohne Zusätze gewaschen und anschließend in einer neuen 12-Loch-Platte mit RPMI-Medium + 10% FKS ausgesät. Die Infektion mit 83,3 µl Virusstock (18,3 ng p24 pro Ansatz) erfolgt über Nacht in einem Volumen von 750 µl. Die Zellen wurden danach dreimal mit RPMI-Medium ohne Zusätze gewaschen, um die freien HIV-Partikel im Überstand zu entfernen. Darauf folgend wurden sie in 3 ml RPMI-Medium + 10% FKS + IL-2 (100 U/ml) pro Ansatz resuspendiert und in eine neue 12-Loch-Platte überführt. Daran schloss sich die Fixierung der Zellen für die RNA-FISH bzw. DNA-FISH (siehe 2.16.3. und 2.17.2.) an, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion (Tag 4 bis 8).

2.4.8.2. Einsatz von AZT und T20 während der *ex vivo* Infektion mit HIV_{Lai}

Während der *ex vivo* Infektion mit HIV_{Lai} wurde der Reverse-Transkriptase-Inhibitor 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT) (Sigma) und der Fusionsinhibitor T20 (Roche) eingesetzt, um die HIV-Replikation und den Viruseintritt zu hemmen. AZT ist ein sogenanntes Nukleosidanalogen, das durch passive Diffusion in die Zelle gelangt und dort von zellulären Kinasen in das Triphosphat umgewandelt wird. In dieser Form wird es von der viruseigenen Reversen Transkriptase als Substrat in die neugebildete Doppelstrang-DNA eingebaut. In Folge dessen kommt es zum Abbruch der

reversen Transkription. In der vorliegenden Arbeit wurde eine AZT-Konzentration von 10 μM zur Hemmung eingesetzt (Mitsuya et al., 1985). Die Ansätze wurden während der Durchführung dreimal mit AZT versetzt. Die Zugabe erfolgte jeweils eine Stunde vor der Infektion, während der Infektion und nach dem Entfernen des virushaltigen Überstandes.

Der Wirkmechanismus des Fusionsinhibitors T20 liegt auf der Ebene des Eintritts der Viruspartikel in die Zielzelle. T20 ist ein vom transmembranen Glykoprotein gp41 abgeleitetes Peptid, das mit dem aminoterminalen Bereich dieses Proteins interagiert. Hierdurch wird die Konformationsänderung verhindert, die zur Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran notwendig ist (Kilby et al., 1998). T20 wurde im Rahmen dieser Arbeit in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt (Neumann et al., 2005) und 30 min vor Infektion und nach dem Waschschrift, zum Entfernen der freien Viruspartikel, in derselben Konzentration zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden an Tag 4 bis 6 fixiert und der Erfolg der Hemmung mittels RNA-FISH (siehe 2.16.4.) analysiert.

2.4.9. Induktion der HIV-Produktion der ACH2-Zellen

Die Zelllinie ACH2 produziert konstitutiv geringe Mengen an HIV. Wie bereits in vorangegangenen Experimenten gezeigt, konnte die HIV-Produktion der infizierten Zellen mittels PMA verstärkt werden (Clouse et al., 1989; Folks et al., 1989). PMA dient hierbei als Aktivator über den Proteinkinase C (PKC) Signalweg, der in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B mündet. Dieser gelangt in den Nukleus und kann dort an die LTR-Region des HIV-Provirus binden und somit die HIV-Transkription induzieren. PMA wurde in RPMI-Medium verdünnt und in einer Konzentration von 10 μM zur Zellsuspension gegeben, die auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt war. Die Zellsuspension wurde bei 37 °C 15 min inkubiert und anschließend bei 1200 rpm 10 min zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit RPMI-Medium ohne FKS wurden die Zellen in RPMI Medium + 10 % FKS kultiviert

und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 2h, 5h, 7h, 10h, 24h, 48h) für die RNA-FISH fixiert (siehe 2.16.3.).

2.4.10. Infektion der Huh7.5-Zellen mit HCVcc

Die hoch permissive Zelllinie Huh7.5 wurde am Tag vor der HCVcc-Infektion gesplittet. Nach Bestimmung der Zellzahl folgte das Aussäen von 3×10^5 Zellen in 4 ml Medium in eine kleine Kulturflasche (25 cm^2) und einer weiteren Inkubation über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 , damit die Zellen wieder adhäreren konnten. Das Kulturmedium wurde darauf folgend vollständig entfernt und durch 3 ml Virusstock-haltiges Medium ersetzt und die Zellen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von vier Tagen und zweimaligem Splitten der Zellen in einem Verhältnis von 1:10 erfolgte die Überführung in eine mittlere Kulturflasche (75 cm^2). Nach einer weiteren Inkubationszeit von zwei Tagen wurden die Zellen von dem Boden der Kulturflaschen durch Trypsin abgelöst und in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/300 μl in einer Vertiefung eines Flexiperms (Greiner Biotin-One GmbH) ausgesät. Nach einer weiteren zweitägigen Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 300 μl PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 20 min mit 4 % PFA RNase-frei bei RT fixiert und entweder für die HCV-RNA-FISH (siehe 2.18.2.) oder zur Kontrolle der Infektion über eine Immunfluoreszenz (siehe 2.19.) weiterverwendet.

2.4.11. Infektion der Zelllinie CEMx174 mit SIVmac239

Um die SIV-spezifische DNA-FISH auszutesten wurden Zellen der Zelllinie CEMx174 mit SIVmac239 infiziert. Über eine Trypanblau-Ausschlussfärbung wurde die Zellzahl bestimmt und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro ml Medium in einer kleinen Kulturflasche (25 cm^2) mit einem Gesamtvolumen von 5 ml ausgesät. Die Infektion erfolgte mit 20 μl SIVmac239 (zur Verfügung gestellt vom Institut Pasteur Paris), was einer hohen MOI von ca. 10 entsprach. Die Zellen wurden vier Tage bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert und anschließend für eine DNA-FISH fixiert (siehe 2.17.2.).

2.4.12. Kultivierung des SIV-positiven Probenmaterials

Das SIV-positive Probenmaterial wurde uns freundlicherweise von Prof. Sieghart Sopper (Deutsches Primatenzentrum, Göttingen), zur Verfügung gestellt. Es stammt aus Infektionsstudien an Rhesusaffen, die mit SIVmac251 infiziert waren und zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionsverlaufs (siehe Tab 2.3) entnommen wurden. Die SIV-positiven Milzzellen wurden wie unter 2.4.4. beschrieben aufgetaut und nach der Bestimmung der Zellzahl mittels Trypna-Abblau-Ausschlussfärbung die Zellen in einer Dicht von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI Medium + 10 % FKS, + Penicillin/Streptomycin ausgesät. Der 30-minütigen Vorinkubation mit AZT (10 μ M) folgte die Stimulation über PHA (2,5 μ g/ml) in Anwesenheit von IL-2 (100 U/ml) und einer weiteren AZT-Zugabe (10 μ M). Nach einer zweitägigen Inkubation wurden die Zellen für die folgende DNA-FISH fixiert (siehe 2.17.2.).

Tab. 2.3: Charakterisierung des Probenmaterials SIVmac251-infizierter Rhesusaffen

Affe	Wochen nach der Infektion	CD4-Zellzahl absolut	CD4-Zellzahl in der Milz in %	SIV-RNA Kopienzahl / ml Plasma
8310	0	804	41,3	Keine Angaben
8326	2	1980	35,7	Keine Angaben
8152	4	Keine Angaben	11,9	Keine Angaben
1778	29	571	5,1	3.100.000
1718	51	54	15,4	260.000

2.4.13. Hemmung der SIV-Ausbreitung über AZT nach Ko-Kultivierung von SIV-positiven Milzzellen mit Zellen der Zelllinie CEMx174

In einem Kontrollversuch, zur Überprüfung der inhibitorischen Wirkung des Reversen-Transkriptase-Inhibitors AZT auf die SIV-Ausbreitung im Zellkultursystem, wurden SIV-positive Milzzellen des Affens 1718 zusammen mit den CEMx174-Zellen ko-kultiviert. Dazu wurden die Milzzellen in einer Zelldichte von 1×10^6 /ml und zusammen mit den CEMx174-Zellen der Dichte 2×10^6 /ml in RPMI-Medium + Il-2 (100 U/ml) in einem Gesamtvolumen von 5 ml in einer kleinen Kulturflasche (25 cm²) ausgesät. In einem Parallelansatz wurde der Reverse-Transkriptase-Inhibitor AZT in einer Konzentration von 10 µM zugegeben und 30 min vorinkubiert. Nach Induktion der Zellen mit PHA (2,5 µg/ml) erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach vier Tagen erfolgte der Transfer der Zellen in eine mittlere Kulturflasche und einer Zugabe von frischem Medium. Nach einer Inkubationszeit von einer Woche wurden die Zellen mit dem Leica DM IRB Mikroskop (Institut für Virologie, Universitätskliniken Homburg) analysiert. Die Dokumentation erfolgte mit der Digitalkamera AxioCam Color der Firma Zeiss und die Auswertung mittels der AxioVision 3.0 Dokumentations-Software der Firma Zeiss.

2.5. Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterienzellen nach der RbCl-Methode beruht darauf, dass die im Transformationspuffer vorhandenen Alkaliionen die Kompetenz der Bakterienzellen zur DNA-Aufnahme stark erhöhen.

Verwendete Lösungen:

Transformationspuffer 1 :

0,1 M RbCl
0,05 M MnCl₂
0,01 M CaCl₂
0,03 M CH₃COOH
(pH 7,5 mit NaOH eingestellt)
15 % (v/v) Glycerin

in H₂O_{dest.} lösen, pH auf 5,8 einstellen, sterilfiltrieren

Transformationspuffer 2:

0,01 M MOPS (pH 6,8)
0,01 M RbCl
0,075 M CaCl₂
15 % (v/v) Glycerin

in H₂O_{dest.} lösen, sterilfiltrieren

Durchführung:

Zunächst wurden 100 µl der Bakterien *E.coli* des Stamms XL1 blue in 30 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit 8 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml Hauptkultur angeimpft und ein bis zwei Stunden bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,3 wurden die Zellen 15 min auf Eis abgekühlt und im Anschluss 5 min lang bei 2000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 16 ml des Puffer 1 resuspendiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden

in 4 ml Puffer 2 aufgenommen und zu 50 µl aliquotiert. Zu 50 µl der kompetenten Zellen wurden 10 µl Ligationsansatzes oder 10-50 ng Plasmid-DNA gegeben und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert, damit sich die DNA an die Bakterienmembran anlagern kann. Die eigentliche Transformation der Bakterienzellen erfolgte mittels Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C, dabei entstehen Poren in der Membran über diese die DNA in die Zellen gelangen kann. Die Zellen wurden anschließend 5 min auf Eis inkubiert und danach für eine Stunde in 1 ml LB-Medium vorinkubiert. Die Selektion erfolgte durch Ausplattieren der transformierten Zellen auf dem entsprechenden Selektionsmedium.

2.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Um die in Bakterien vermehrte Plasmid-DNA zu untersuchen und weiterzuverarbeiten, müssen die Zellen aufgeschlossen werden. Die Plasmide werden dabei von den anderen Zellbestandteilen, vor allem von der genomischen Bakterien-DNA, abgetrennt. Je nach Fragestellung und benötigter DNA-Menge werden verschiedene Verfahren angewandt, die jedoch auf dem gleichen Prinzip beruhen. Durch eine Erhöhung des pH-Werts und Zusatz geeigneter Reagenzien werden die Zellen lysiert und die Proteine und die DNA denaturiert. Bei einer Neutralisierung kann die Plasmid-DNA aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer geschlossenen, zirkulären Form leicht wieder renaturieren und daher in Lösung bleiben. Die genomische DNA, Proteine und andere Zellbestandteile hingegen gehen unter diesen Bedingungen nicht in Lösung und können leicht abgetrennt werden.

2.6.1. Plasmid-Isolation mittels alkalischer Lyse

Verwendete Lösungen:

STET-Puffer:

Saccharose	8% (w/v)
Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
EDTA	50 mM
Triton X-100	0,1 % (v/v)

Lösung 1:

NaOH	0,2 N
SDS	1 % (w/v)

Lösung 2:

K-Acetat (pH 4,8)	0,3 M
LiCl	9,0 M

Durchführung:

1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden 5 min bei 5.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl STET Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung 1 und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurden die Zellen lysiert. Die Neutralisation der Lösung erfolgte durch 300 µl Lösung 2 für 30 Minuten auf Eis. Durch Zentrifugation wurden die ausgefällten Proteine und chromosomale DNA entfernt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 95%-igem Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl Puffer P1 des Plasmids Maxi Kits (Qiagen) aufgenommen. Dieser Puffer enthält eine RNaseA, die RNA-Verunreinigungen beseitigt, da diese einen inhibitorischen Effekt für anschließende Verwendungen der DNA, wie beispielsweise den Restriktionverdau, haben kann.

2.6.2. Plasmidisolierung mit "QIAGEN® Plasmid Maxi Kit"

Zur Isolation von hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der "QIAGEN® Plasmid Maxi Kit" verwendet. Die Isolierung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers, wobei die durchgeführte Methode auf einer modifizierten Form der alkalischen Lyse basiert. Nach dem Entfernen der Zelltrümmer und denaturierten Proteine wurde die Plasmid-DNA auf eine "QIAGEN" Anionen-Austauschersäule gegeben. Nach der Bindung der DNA an die Säulenmatrix wurden durch Waschen mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration RNA und Verunreinigungen mit niedermolekularen Komponenten entfernt. Durch Zugabe eines Puffers mit höherer Salzkonzentration wurde anschließend die Plasmid-DNA eluiert. Nach der Fällung der DNA mit Isopropanol und einmaligem Waschen mit 70 %-igem Ethanol wurde das DNA-Pellet getrocknet und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ resuspendiert.

2.7. Phenolextraktion von Nukleinsäuren

Diese Methode dient dazu, Proteinverunreinigungen aus wässrigen DNA-Lösungen nach der Plasmidpräparation zu entfernen. Nukleinsäuren sind als Polyanionen in organischen Lösungsmitteln unlöslich, Proteine hingegen lassen sich sehr gut in Lösung bringen.

Verwendete Lösungen:

CIA-Lösung:

Chloroform-Isoamylalkohol (24:1(v/v))

Phenollösung:

destilliertes Phenol

CIA 50%

8-OH-Chinol (Oxidationsschutz 0,1% (v/v))

die Lösung wird mit TE-Puffer abgesättigt und bei 4°C gelagert.

Durchführung:

Zu den wässrigen DNA-Lösungen wurde dasselbe Volumen Phenollösung hinzugesetzt, 2 h auf dem Drehrad inkubiert und anschließend zentrifugiert (5000 rpm, 5 min), wobei die Lösungen voneinander getrennte Phasen bilden. Die DNA-haltige obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und durch Ethanolzugabe gefällt (siehe 2.8.).

2.8. Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Dieses Verfahren wird angewandt, um DNA-Lösungen zu konzentrieren und aufzureinigen. Dabei werden Phenol- und Salzurückstände entfernt, die bei den unterschiedlichen Isolierungsmethoden in der Nukleinsäure-Lösung zurückgeblieben sind. Bei der Zugabe von Ethanol kommt es in Gegenwart relativ hoher Konzentrationen monovalenten Kationen (0,1-0,5 M) zur Aggregation und Präzipitation der Nukleinsäuremoleküle, während Salze und organische Lösungsmittel in Lösung bleiben.

Durchführung:

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung versetzt und mit 2,5-fachem Volumen an eiskaltem Ethanol (100 %) gemischt. Die DNA wurde bei -20 °C über Nacht gefällt und dann abzentrifugiert (14000 rpm, 30 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in H₂O_{dest.} aufgenommen. Die Fällung der RNA erfolgt analog zur DNA-Fällung mit dem Unterschied, dass die RNA mit 1/10 Volumen 5 M LiCl versetzt wurde und das trockene RNA-Pellet in DEPC-H₂O aufgenommen wurde.

2.9. Photometrische Messung von Nukleinsäure-Lösungen zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund ihrer Basenzusammensetzung Licht zwischen einer Wellenlänge von 250 nm und 270 nm. Proteine absorbieren hingegen aufgrund ihrer Tyrosin- und Tryptophanreste am stärksten bei 280 nm. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und des Grades der Verunreinigung mit Proteinen wurden sich diese Eigenschaften zu Nutzen gemacht.

Durchführung:

Die Messung der Absorption einer wässrigen DNA-Lösung gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Ein Maß für die Reinheit der DNA errechnet sich aus dem Quotient A_{260}/A_{280} , wobei ein Wert von 1,8 optimal ist. Werte kleiner als 1,8 weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, während Werte größer als 1,8 auf das Vorhandensein von RNA schließen lassen. Eine DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm einer Extinktion von 1, so dass sich die Konzentration der isolierten DNA nach folgender Formel errechnet:

$$A_{260} \times 50 \mu\text{g}/\text{ml} \times V = \text{DNA-Konzentration der Probe } [\mu\text{g}/\text{ml}]$$

A_{260} : Absorption bei 260 nm
V : Verdünnungsfaktor

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration mit dem Photometer Ultraspec 3000 der Firma Pharmacia Biotech.

2.10. Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau der DNA erfolgt mittels Typ II Restriktionsendonukleasen. Sie sind in der Lage, in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen beide Stränge eines DNA-Doppelstranges an spezifischen Erkennungssequenzen, meist palindromer Sequenzen von 4-8 Basenpaaren, so zu schneiden, dass entweder überstehende 5'- bzw. 3'-Enden ("sticky ends") oder glatte Enden ("blunt ends") entstehen. Die durch Restriktion erhaltenen DNA-Fragmente können dann anhand ihrer Größe identifiziert und im Anschluß weiterverwendet werden.

Verwendete Lösungen:

"Blaumarker":

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Glyzerin	50 % (v/v)
EDTA	0,05 M

Durchführung:

Zum Restriktionsverdau wurden 0,5 µg bis 1 µg der jeweiligen Plasmid-DNA, 1 U des entsprechenden Enzyms und 2 µl des vom Hersteller (New England Biolabs® GmbH) für die verwendeten Enzyme empfohlenen zehnfach konzentrierten Puffers eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit $H_2O_{dest.}$ auf 20 µl aufgefüllt und für maximal zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde durch Zugabe von 5 µl "Blaumarker" abgestoppt, indem das darin enthaltene EDTA die für die Restriktionsendonukleasen notwendigen Mg^{2+} -Ionen komplexiert.

Tab. 2.4: Auflistung der Restriktionsenzyme zur Kontrolle der Orientierung des HIV-”Inserts” im pGEM-Vektor

Plasmid	Restriktionsschnittstelle im pGEM-Vektor	Restriktionsschnittstelle im HIV-”Insert”
pGEM-HIV-1	XmnI	SphI
pGEM-HIV-2	XmnI	DpnI
pGEM-HIV-3	XmnI	ScaI
pGEM-HIV-4	XmnI	KpnI
pGEM-HIV-5	XmnI	EcoRI
pGEM-HIV-6	XmnI	EcoNI
pGEM-HIV-7	XmnI	NheI
pGEM-HIV-8	XmnI	BamHI
pGEM-HIV-9	XmnI	XhoI

2.11. ”Polymerase Chain Reaction”-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein In-Vitro-Verfahren, um spezifische DNA-Fragmente aus einem ”Pool” von DNA selektiv zu amplifizieren. Die doppelsträngige DNA wird zunächst denaturiert, so dass sich die Primer an die 5’-Bereiche der zu amplifizierenden DNA anlagern können und als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen. Durch wiederholte Zyklen von Denaturieren, Primer-”Annealing” und Primer-Elongation kommt es zur exponentiellen Vermehrung der DNA.

Durchführung:

Zur Amplifikation von HIV-DNA-Fragmenten aus dem Plasmid pBru wurden einem PCR-Ansatz die folgenden Komponenten zugesetzt:

Tab. 2.5: Auflistung der PCR-Komponenten und Angabe der Endkonzentration, zur Amplifikation der HIV-Fragmente

Komponenten	Endkonzentration
10 x PCR-Puffer plus MgCl ₂	1 x
Primer 1	0,5 µM
Primer 2	0,5 µM
dNTP-Mix	0,2 mM
Taq-Polymerase	1,25 U
”Template”-DNA	50 ng
H ₂ O _{dest.}	ad 50 µl

Für die PCR zur Amplifikation der HIV-Fragmente wurde die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* der Firma Sigma eingesetzt und in einem Thermocycler Thermal Cycler PTC 200 der Firma Peltier durchgeführt. Die ”Annealing”-Temperatur der PCR-Programme unterschied sich den Primerpaaren entsprechend und lag zwischen 55 und 58 °C.

Tab. 2.6: Auflistung der Primer zur Amplifikation verschiedener HIV-Fragmente aus dem Plasmid pBru

HIV-Fragment	"Forward Primer" (5' - 3')	"Reverse Primer" (5' - 3')
F-HIV-1	CAGAAGGAGCCACCCCA CAAGATT	TCCTCCCCTCCTGACA
F-HIV-2	TACAGGAGCAGATGATA CAG	CCTGGCTTTAATTTTACT GG
F-HIV-3	TGGGAAGTTCAATTAGG AATACC	CCTACATACAAATCATC CATGTATTG
F-HIV-4	TTTGTCATACCCCTCCT TTAGTG	GTACCCATGCCAGATAG ACCTT
F-HIV-5	AGCAGGAAGATGGCCAG TAAAAAC	TGTCCCTGTAATAAACCC CGAAAAT
F-HIV-6	TAGACTAGAGCCCTGGA AGCATC	AGGTACCCCATATAATAGA CTGTGAC
F-HIV-7	GAGGGGACCAGGGAGA GCATTTG	CCATTGTTGTTATTACCA CCATCT
F-HIV-8	CCTGGCTGTGGAAAGAT ACC	AGGCACAGGCTCCGCAG AT
F-HIV-9	ATGGGTGGCAAGTGGTC AAAAAGT	GCAGTTCTTGAAGTACT CCGGATGCAG

PCR-Programm zur Amplifikation der HIV-Fragmente aus pBru

1. 5 Minuten 94°C;
2. 30 Zyklen aus 45 sec 94°C, 30 sec 55-58°C, 45 sec 72°C;
3. 15 Minuten 72°C
4. bis Weiterverarbeitung 4°C

Für die Amplifikation der hypervariablen V1/V2-Bereiche des *env*-Gens wurde die thermostabile Taq-Polymerase der Firma Applied Biosystem eingesetzt. Als Ausgangsmaterial diente die RNA einer einzelnen Zelle, die über eine In-Vitro-Transkription amplifiziert und revers transkribiert wurde (siehe 2.15.). Wegen der geringen Menge an Ausgangsmaterial wurde eine "nested"-PCR durchgeführt. Das ist ein hoch sensitives PCR-Verfahren, bei dem zwei PCR-Reaktionen aufeinander folgen. Das Amplifikat der ersten PCR wird als Matrize für die zweite PCR eingesetzt, bei der ein inneres Primerpaar innerhalb dieser Sequenz bindet und ein kürzeres DNA-Fragment amplifiziert wird.

Äußeres Primerpaar (Delassus et al., 1992):

LV15:5'-GCCACACATGCCTGTGTACCCACA-3'

LV13:5'-CTTAGAATGCGAAAACCAGCC-3'

Inneres Primerpaar (Goodenow et al. 1989):

SK122: 5'-CTAAAGCCATGTGTAAATTAACC-3'

SK123: 5'-TGGCTCAAAGGATACCTTTGGA-3'

Tab. 2.7: Auflistung der PCR-Komponenten und Angabe der Endkonzentration, zur Amplifikation der hypervariablen V1/V2-Region des *env*-Gens

Komponenten	Endkonzentration
10 x PCR-Puffer ohne MgCl ₂	1 x
MgCl ₂	2,5 mM
Primer 1	2 µM
Primer 2	2 µM
dNTP-Mix	1,6 mM
Taq-Polymerase	1 U
"Template"-DNA	5 µl
H ₂ O _{dest.}	ad 50 µl

PCR-Programm zur Amplifikation der V1/V2-Region des *env*-Gens

1. 5 Minuten 95°C;
2. 40 Zyklen aus 45 sec 95°C, 30 sec 55°C, 3 min 72°C;
3. 20 Minuten 72°C
4. bis Weiterverarbeitung 4°C

2.12. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Trennung geladener Moleküle im elektrischen Feld und basiert darauf, dass die DNA bei neutralem pH polyanionisch ist. Das Wanderungsverhalten ist dabei abhängig von der Nettoladung, der Größe und der Form der Nukleinsäuren, sowie von der Porengröße der verwendeten Matrix. Im Agarosegel wird die Porengröße durch die Menge an zugesetzter Agarose definiert und wirkt so als Molekularsieb.

Verwendete Lösungen:

50 x TAE-Puffer:

Tris/HCl (pH auf 7,8 einstellen)	2,00 M
Na-Acetat	0,25 M
EDTA	0,50 M

Durchführung:

Zur Gelelektrophorese wurden standardmässig 1 %-ige Agarose-Gele in 1 x TAE-Puffer verwendet. Entsprechend der in dieser Arbeit zu erwartenden Fragmentgrößen zwischen 100 und 800 bp wurden auch 1,5-2.5 %-ige Agarose-Gele eingesetzt. Angefärbt wurde die DNA durch das in doppelsträngige DNA/RNA interkalierende Ethidiumbromid (EtBr), welches mit einer Endkonzentration von 0,7 µg/ml der in 1 x TAE-Puffer gelösten Agarose zugesetzt wurde. Zur Markierung der Lauffront und Erhöhung der Dichte der DNA-Proben wurden diese mit 1/5 Volumen Blaumarker versetzt. Dabei entspricht das Wanderungsverhalten von Bromphenolblau einem doppelsträngigen linearisierten 300 bp-Fragment. Die Elektrophorese erfolgte bei 8 V/cm in 1 x TAE-Puffer. Die Anregung der DNA-EtBr-Komplexe erfolgte unter UV-Licht. Zur anschließenden fotografischen Detektion diente ein Bildverarbeitungssystem mit angeschlossenem Drucker Gel Print 2000i der Firma MWG Biotech.

2.13. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente können mit dem QIAquick Spin Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel isoliert werden. Die Durchführung folgte den Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung erfolgt über eine Anionenaustausch-Säule und ist für Nukleinsäuren zwischen ungefähr 80 bp und 10 kb optimiert. Die DNA-Fragmente im Gel wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in dem dafür vorgesehenem Lösungs-Puffer bei 56 °C vollständig gelöst. Da für die Absorption der Nukleinsäure an die Silica-Membran ein Puffer mit hoher Salzkonzentration notwendig ist und sie pH-Wert anhängig ist, enthält dieser Puffer die entsprechende Konzentration einen pH-Indikator, der die Überprüfung des optimalen pH-Wertes (≤ 7.5) ermöglicht. Verbleibende Verunreinigungen des Agarosegels wurden mittels Waschschritten effizient entfernt und die DNA durch den Einsatz eines Puffers mit einer niedrigeren Salzkonzentration eluiert. Die so aufgereinigte DNA kann nun für folgende Anwendungen, wie z. B. Ligation in einen Vektor, verwendet werden.

2.14. RNA-Isolierung aus einzelnen eukaryotischen Zellen mittels "Array Pure™ Nano Scale RNA Purification Kit"

Zur Analyse der RNA einzelner Zellen wurde der "Array Pure™ Nano Scale RNA Purification Kit" der Firma Epicenter nach Herstellerangaben verwendet. Dieser Kit ist speziell darauf ausgelegt die gesamte RNA einer einzelnen eukaryotischen Zelle nach einer Isolierung mittels Laser-Mikrodissektion (siehe 2.16.5.) aufzureinigen und für die weitere Verwendung vorzubereiten. Während des ersten Schrittes, der Lyse mittels "Nano Scale Lysis"-Lösung, wurde ein Proteinase K-Verdau für einer Stunde bei 60 °C durchgeführt. Dieser diente dazu die Quervernetzungen zwischen Proteinen und der RNA, die während der Fixierung der Zellen mit 4%-igem PFA entstehen, wieder aufzubrechen. Nach Präzipitierung der Proteine mittels "MCP Protein

Precipitation Reagent” wurde die RNA mit Isopropanol gefällt und für die folgende Behandlung der DNase I aufgereinigt. In dieser Arbeit sollte ausschließlich die Sequenz der Transkripte einer einzelnen Zelle untersucht werden, weswegen jegliche Kontamination durch DNA ausgeschlossen werden musste. Aus diesem Grund erfolgte der Verdau der noch verbleibende DNA mit der TurboDNase der Firma Ambion für eine Stunde bei 37 °C. Anschließend folgten ein erneuter Präzipitierungsschritt, sowie die Fällung der verbleibenden RNA mittels Isopropanol. Nach dem Waschen des RNA-Pellets mit 70 % Ethanol wurde dieses für die folgende reverse Transkription in 10 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.15. Amplifizierung der RNA einzelner Zellen mittels ”MessageBOOSTER™ cDNA Synthesis Kit for qPCR”

Die besondere Schwierigkeit der RT-PCR der V1/V2-Region des *env*-Bereichs einer einzelnen Zelle besteht darin, dass die Menge an Ausgangsmaterial äußerst gering ist. Nach Aufreinigung der RNA mittels ”Nano Scale RNA Purification Kits” (Epicentre) (siehe 2.14.), wurde die RNA einer einzelnen Zelle mit einer modifizierten Version des ”MessageBOOSTER™“-Systems der Firma Epicenter amplifiziert.

Grundsätzlich besteht dieses System zur sensitiven Amplifizierung der Gesamt-RNA einer einzelnen Zelle aus folgenden Schritten:

1. Erste Erststrang cDNA-Synthese:

In einem ersten Schritt wird mit Hilfe des Enzyms RTase, SuperScript III (Invitrogen), aus der RNA eine cDNA (”complementary DNA”) revers transkribiert. Als Ausgangspunkt dienen T7-Oligo(dT)-Primer, die an den Poly-(A)-Schwanz der mRNA eukaryotischer Zellen binden und eine Promotorregion für die T7-Polymerase enthalten.

2. Zweitstrang cDNA-Synthese:

Über eine RNaseH-Behandlung wird die RNA im cDNA-RNA-Hybrid zu kleinen RNA-Fragmenten abgebaut. Die RNA-Fragmente dienen dann als Primer für die Zweitstrang cDNA-Synthese. Das Produkt

dieser Synthese ist eine doppelsträngige cDNA, die eine T7-Promotor-Region enthält, welche für die Synthese einer (-)-Strang-RNA während des folgenden In-Vitro-Transkriptionsschrittes benötigt wird.

3. In-vitro-Transkription:

Durch das Binden der T7-RNA-Polymerase an die, über die Primer eingeführte T7-Promotor-Region, wird über eine *in vitro* Transkription eine große Menge an neuer RNA synthetisiert. Dieser Schritt stellt demnach den Amplifikationsschritt dieses Systems dar.

4. Aufreinigung der neu-synthetisierten RNA mittels "RNeasy® MinElute® Cleanup Kit" der Firma Qiagen (genaue Durchführung siehe Herstellerangaben).

5. Zweite Erststrang cDNA-Synthese:

Die aufgereinigte neu-synthetisierte RNA wird in diesem Schritt revers transkribiert. Als Startpunkt für die Erststrangsynthese dienen hierbei "Random-Hexamer"-Oligonukleotide, die sich nach dem Zufallsprinzip entlang der RNA anlagern und so die Startpunkte für die reverse Transkription mittels RTase SuperScriptIII (Invitrogen) definieren. Die so amplifizierte RNA kann nun für die folgende PCR eingesetzt werden.

Eine detaillierte Ausführung der einzelnen Schritte ist dem Handbuch des "MessageBOOSTER™"-Systems der Firma Epicenter zu entnehmen.

Zur Amplifikation der HIV-RNA in einzelnen infizierten Zellen, die mit 4 % PFA fixiert waren, wurde von uns eine Modifikation im ersten Schritt vorgenommen. Es wurden Primer entworfen, die in der V1/V2-Region des *env*-Gens binden und eine T7-Promotoregion für die T7-RNA-Polymerase enthielten.

Die Primersequenz lautet:

3'-CCCTATAGTGAGTCGTATTAGGGATATCACTCAGCATAAT-5'

2.16. Methoden zur HIV-spezifischen RNA-FISH

2.16.1. Herstellen Digoxigenin-(DIG) markierter RNA-Sonden

Sonden sind zu einer Zielregion komplementäre RNA- oder DNA-Fragmente, die mit einem Hapten gekoppelt sind, um eine spätere Detektion zu ermöglichen. Die Herstellung einer spezifischen DIG-markierten RNA-Sonde wurde mit Hilfe des "DIG RNA Labeling Kit" (Sp6/T7) (Roche) nach Angaben des Herstellers vorgenommen. Das Prinzip besteht darin, dass RNA-Polymerasen, wie beispielsweise SP6 oder T7 spezifisch die gewünschten Sequenzen stromabwärts einer geeigneten Promotorregion transkribieren. Die Sonden-Sequenzen mussten deswegen zunächst in einen Plasmidvektor kloniert werden, der Promotorstellen für die SP6- oder T7-Polymerase besitzt, die sich vor bzw. hinter dem Fragment befinden. In der vorliegenden Arbeit wurden deswegen verschiedene HIV-Fragmente zwischen 250 und 650 bp Länge, die insgesamt 40 % des HIV-Genoms abdecken, in den pGEM®-T-Vektor (Promega) kloniert. Der erste Schritt der Sondenproduktion war die Linearisierung des Plasmides mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease (siehe Tab. 2.8), deren Erkennungssequenz sich in der das Fragment flankierenden "multiple cloning site" (MCS) befand. Damit wurde gewährleistet, dass nur die Fragment-Sequenz und nicht die Plasmidsequenz transkribiert wurde. Daran schloss sich das Aufreinigen der geschnittenen DNA über eine Phenol-Extraktion an (siehe 2.7.). Während der nun folgenden Transkription zur Generierung einer HIV-spezifischen einzelsträngigen RNA-Sonde erfolgte der Einbau des markierten Nukleotids DIG-11-dUTP. Je nach Orientierung des HIV-Inserts im pGEM-Vektor wurde zur Herstellung einer "antisense"-Sonde ((-)-Strang-Sonde) die T7- bzw. SP6-Polymerase eingesetzt (siehe Tab. 2.8).

Tab. 2.8: Auflistung der Restriktionsenzyme zur Linearisierung der Plasmide und der eingesetzten RNA-Polymerasen zur Herstellung der "antisense"-Sonde

Plasmid	Restriktionsenzym zur Linearisierung des Plasmids	RNA-Polymerase
pGEM-HIV-1	NdeI	T7
pGEM-HIV-2	NcoI	SP6
pGEM-HIV-3	NdeI	T7
pGEM-HIV-4	NcoI	SP6
pGEM-HIV-5	NcoI	SP6
pGEM-HIV-6	NcoI	SP6
pGEM-HIV-7	NdeI	T7
pGEM-HIV-8	NcoI	SP6
pGEM-HIV-9	NcoI	SP6

2.16.2. Nachweis der Markierungs-Effizienz von DNA- bzw. RNA-Sonden mittels "Dot Blot"

Unter der Methode des "Blottens" versteht man ursprünglich, DNA, RNA oder Proteine, die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine Membran zu übertragen und darauf zu fixieren. Der "Dot Blot" dient der schnellen Bestimmung der relativen Konzentration einer Nukleinsäure in einer RNA- bzw. DNA-Lösung. Da es hierbei nicht auf die Auftrennung nach Größe ankommt, wird die Nukleinsäure-Lösung direkt auf die Membran aufgetragen. Die zu detektierenden Nukleinsäuren sind mit Haptenen konjugiert, die während der Herstellung der HIV-spezifischen RNA-Sonde mit Hilfe des "DIG-RNA Labeling-Kits" in die RNA-Fragmente inkorporiert (siehe 2.16.1.) oder bei der Generierung der HIV-spezifischen DNA-Sonde über Nick-Translation (siehe 2.17.1.) eingebaut wurden.

Die Detektion basiert auf einer colorimetrischen Reaktion, die von einer alkalischen Phosphatase (AP) katalysiert wird, welche über Hapten-spezifische Antikörper an die markierten Sonden gebunden wird. BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat) dient hierbei als AP-Substrat, welches nach seiner Dephosphorylierung durch die AP oxidativ in einen blauen Indigofarbstoff überführt wird. Als Oxidationsmittel dient NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid), das bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff reagiert. NBT wirkt somit farbverstärkend.

Verwendete Antikörper:

Anti-DIG-AP-Konjugat:

Alkalische Phosphatase (AP) konjugiertes anti-Digoxigenin Fab-Fragment (Roche)

Streptavidin-AP-Konjugat:

Alkalische Phosphatase (AP) konjugiertes Streptavidin (DAKO)

Verwendete Lösungen:

20x SSC:

NaCl 3,0 M

Na-Citrat 0,3 M

in H₂O_{dest.} lösen, pH auf 7,0 einstellen

Puffer I (TN-Puffer):

Tris 1,0 M

NaCl 1,5 M

einstellen des pH 7,5 mit HCl

Puffer II

Tris 0,2 M

MgCl₂ 10 mM

RNA-Verdünnungs-Puffer:

20 x SSC	30% (v/v)
Formaldehyd	20% (v/v)
DEPC-H ₂ O	50% (v/v)

Durchführung:

Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe von 2 ng/μl bis 0,02 pg/μl der DIG-markierten RNA oder von 10 ng/μl bis 0,1 pg/μl der Biotin-markierten DNA-Sonde in einem Volumen von 20 μl erstellt. Die Verdünnung der RNA-Sonde erfolgte dabei in dem RNA-Verdünnungspuffer mit Formaldehyd, um das Ausbilden von Sekundärstrukturen zu verhindern, während die Verdünnungsreihe der DNA-Sonde mit 6 x SSC geschah. Je 2 μl jeder Konzentrationsstufe wurden punktförmig auf ein Stück Nitrozellulosemembran übertragen. Nach Lufttrocknung wurde die Membran per "Auto-Cross-Link" mit dem Straterlinker 1800 der Firma Stratagene mit 120 mJ UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde der Streifen mit 1 %-igem "Blocking"-Reagenz in 6 x SSC für 30 min bei 37 °C inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blocken und der Streifen anschließend zweimal für 2 min in Puffer I gewaschen. Danach wurden 3 μl anti-DIG-AP-Konjugat bzw. 3 μl Streptavidin-AP-Konjugat zu 3 ml Puffer I gegeben und bei RT 30 min auf dem Drehrad inkubiert. Es folgten nochmals zwei Waschschrte mit Puffer I, bevor die Membran für 10 min in Puffer II äquilibriert wurde. Für die Farbreaktion wurde die Nitrozellulosemembran ca. 16 h im Dunkeln in einer Lösung aus 10 ml Puffer II und 200 μl NBT/BCIP-Stammlösung ohne Bewegung inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Spülen mit H₂O_{dest.} und Leitungswasser wurde die Membran luftgetrocknet und in Folie eingeschweißt. Gut markierte RNA-Sonden waren im Bereich von 0,2 bis 2 pg noch nachweisbar, wohingegen bei den DNA-Sonden ein Signal bei der Verdünnung von 1 pg zu erkennen war. Diese Sonden wurden anschließend für die FISH eingesetzt (siehe 2.16.4., 2.17.3. und 2.18.3.).

2.16.3. Fixieren der Zellen

Ein entscheidender Schritt bei der RNA-FISH ist die Fixierung der Zellen. Zum einen, damit die Zellmorphologie aufrecht erhalten bleibt und zum anderen, damit die RNA-Ziel-Sequenzen innerhalb der Zellen verbleiben. Die am häufigsten verwendeten Fixative sind 4 % Formaldehyd, 4 % PFA oder 1 % Glutaraldehyd. Fixative, die auf Methanol, Ethanol oder Aceton basieren, sind nicht geeignet, da die RNA während der zahlreichen Waschschriffe verloren geht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deswegen 4 % PFA verwendet.

Durchführung:

Die entsprechenden Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 20 min mit 4 % PFA/1 x PBS bei 4 °C fixiert. Daran schloss sich ein Waschschriff mit 1 x PBS (RNase-frei) an, wobei die Zentrifugation für 6 min bei 1600 rpm stattfand. Die Zellzahl wurde so eingestellt, dass 2×10^5 Zellen in einem Volumen von 50 µl 1 x PBS (RNase-frei) vorlagen.

Die Zellen wurden mittels Zytozentrifugation auf die Objektträger aufgebracht, die zuvor in Chloroform gereinigt und somit gleichzeitig RNase-frei gemacht wurden. Dies geschah mit einer geringen Umdrehungszahl (500 rpm), damit die Zellmorphologie möglichst erhalten blieb. Die Objektträger mit den Zellen wurden dann mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 100 %) dehydriert und bei -20 °C über mehrere Wochen gelagert oder direkt für die RNA-FISH eingesetzt.

2.16.4. RNA-FISH auf Einzelzellebene

Die FISH ist eine Technik, um spezifisch Nukleinsäure-Sequenzen auf Chromosomen, in einzelnen Zellen oder Geweben zu identifizieren, indem man Nukleinsäure-Sonden verwendet, die komplementär zu einer Ziel-Sequenz sind. Die markierte Sonde und die Ziel-Sequenz "reannealen" und bilden somit einen Doppelstrang-Hybrid (Duplex) aus. Als Ausgangsprotokoll diente hier ein System zum Nachweis der EBER-RNA ("EBV-encoded RNA") in

Zellkernen von EBV-assoziierten Lymphomen (Herbst et al., 1996, 1997), das für die Detektion der HIV-RNA entsprechend modifiziert wurde. Da während dieser Arbeit die HIV-RNA mittels einer HIV-spezifischen DIG-markierten RNA-Sonde nachgewiesen werden sollte, ist besonders darauf zu achten, dass mit RNase-freien Puffern, Lösungen und Materialien gearbeitet wird. RNA-Moleküle sind extrem anfällig für die Degradierung durch RNasen, wie beispielsweise die RNaseA, die in der Molekularbiologie ein breites Anwendungsspektrum findet und auch auf der Haut vorkommt. Um die Abwesenheit von RNasen zu garantieren, wurden die Laborgegenstände und Oberflächen entweder mit Chloroform oder "RNase-away" (Roth) vorbehandelt, immer mit Handschuhe gearbeitet und die verwendeten Lösungen durch die Behandlung mit der stark acetylierenden Substanz DEPC RNase-frei gemacht.

Verwendete Antikörper:

α -DIG-POD Fab-Fragmente:

Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Fab-Fragmente eines anti-Dioxigenin-Antikörpers aus dem Schaf (Roche)

Cy3-SA:

CyTM 3-konjugiertes Streptavidin (Dianova)

Verwendete Lösungen:

DEPC-H₂O:

DEPC 0,1 % (v/v)

1 h bei 37 °C unter Rühren lösen, anschließend autoklavieren

10 x PBS-Puffer:

NaCl	1,3 M
Na ₂ HPO ₄	0,08 M
NaH ₂ PO ₄	0,02 M

RNase-frei: 0,1 % (v/v) DEPC 1h bei 37 °C unter Rühren lösen, anschließend autoklavieren, pH auf 7,2 mit NaOH einstellen

4 % Paraformaldehyd/PBS:

Paraformaldehyd	4 % (w/v)
1x PBS RNase-frei	

4 h bei 70 °C rühren bis das PFA gelöst ist, pH auf 7,0 mit NaOH einstellen

100x Denhardts-Lösung:

Ficoll 400	2 % (w/v)
PVP	2 % (w/v)
BSA Fraktion V	2 % (w/v)

in DEPC-H₂O lösen

50 % DexSO₄:

DexSO ₄	50 % (w/v)
--------------------	------------

in DEPC-H₂O lösen

EDTA-Lösung:

EDTA	0,5 M
------	-------

RNase-frei: 0,1 % (v/v) DEPC 1h bei 37 °C unter Rühren lösen, anschließend autoklavieren, pH auf 8,0 mit NaOH-Tabletten einstellen

NaCl-Lösung:

NaCl 5 M

RNase-frei: 0,1 % (v/v) DEPC 1h bei 37 °C unter Rühren lösen, anschließend autoklavieren

Tris/HCl-Lösung:

Tris 1 M

RNase-frei: 0,1 % (v/v) DEPC 1h bei 37 °C unter Rühren lösen, anschließend autoklavieren, pH auf 7,5 mit rauchender HCl einstellen

Natriumphosphat-Puffer (NaPO₄):

Na₂HPO₄ 1 M

1 M NaH₂PO₄ zugeben bis pH von 6,8 erreicht wird
RNase-frei: mit DEPC-H₂O ansetzen

10 x Salzlösung:

5,0 M NaCl	60 % (v/v)
1,0 M Tris/HCl pH 7,5	10 % (v/v)
1,0 M NaPO ₄ -Puffer	10 % (v/v)
0,5 M EDTA	10 % (v/v)
Denhardts-Lösung 100x	1 % (v/v)

RNase-frei: 0,1 % (v/v) DEPC 1h bei 37 °C unter Rühren lösen, anschließend autoklavieren

Glycin-Lösung:

Glycin 1 M

in 1x PBS RNase-frei lösen

Pronase:

Pronase	4 % (v/w)
---------	-----------

in DEPC-H₂O lösen zu 468,8 µl aliquotieren, 4 h bei 37 °C inkubieren,
anschließend bei -20 °C lagern

HCl-Lösung:

HCl	0,2 N
-----	-------

1 N HCl-Lösung in DEPC-H₂O verdünnen

Posthybridisierungs-Waschlösung:

Formamid	50 % (v/v)
10 x Salzlösung	10 % (v/v)
DEPC-H ₂ O	40 % (v/v)

TES-Waschlösung:

1,0 M Tris/HCl	1,0 % (v/v)
0,5 M EDTA	0,2 % (v/v)
5,0 NaCl	10,0 % (v/v)

in DEPC-H₂O lösen

TNB-Puffer:

Tris/HCl pH 7,5	0,1 M
NaCl	0,15 M
”Blocking”-Reagenz	0,5 % (w/v)

in DEPC-H₂O lösen

”Blocking”-Reagenz:

”Blocking”-Reagenz	0,5 % (w/v)
--------------------	-------------

in 4 x SSC (RNase-frei) lösen, bei -20 °C lagern

20 x SSC Puffer:

NaCl	3,0 M
------	-------

Na-Citrat	0,3 M
-----------	-------

in 750 ml H₂O_{dest.} lösen, 0,1 % (v/v) DEPC zugeben, 1h bei 37 °C unter Rühren lösen, anschließend autoklavieren, pH auf 7,0 mit NaOH einstellen, auf 1000 ml mit DEPC-H₂O auffüllen

Durchführung:**2.16.4.1.Vorbereitung der Zellen**

Die Objektträger (OT) mit den Zellen, wie beispielsweise der HIV-positiven T-Zelllinie ACH2, wurden 1 h bei RT aufgetaut. Nach kurzem Spülen in 1 x PBS wurden sie 5 min in 0,2 N HCl bei RT zur Denaturierung der basischen Proteine inkubiert. Nach zweimaligem kurzem Waschen in 1 x PBS fand eine Pronase-Behandlung mit 250 µg/ml in 1 x PBS für 5 min bei RT statt, um einen Zugang der Ziel-RNA für die Sonde zu erzielen. Durch das Waschen in 0,1 M Glycin in 1 x PBS für 30 sec wurde die Pronaseaktivität inhibiert. Darauf folgend wurden die OT wieder zweimal kurz in 1 x PBS gewaschen, in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 100 %) dehydriert und 1-3 h lang luftgetrocknet.

2.16.4.2.Hybridisierung

Von den unterschiedlichen Sonden (HIV-1 bis HIV-9) wurden je 11,1 ng (inklusive des *env*-Bereich) bzw. 16.1 ng (ohne den *env*-Bereich) eingesetzt und pro OT insgesamt 100 ng in einem sogenannten Sondenmix aufgenommen. Dieser Mix enthielt neben den Sonden 50 % Formamid und

DEPC-H₂O. Der Sondenmix wurde mit einem sogenannten Hybridisierungsmix gemischt, der aus der gleichen Formamidkonzentration, 1 x Salzlösung, 2,5 % Hefe-tRNA (Konzentration der Stocklösung 50 mg/ml in DEPC-H₂O gelöst) und 25 % DexSO₄ (Konzentration der Stocklösung 50 % DexSO₄ in DEPC-H₂O gelöst) bestand. Das Formamid dient der Herabsetzung der Schmelztemperatur (T_m) und somit auch der Hybridisierungstemperatur. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sonden zwischen 250 und 650 Nukleotiden, fand die Hybridisierung bei 37° C und einer Konzentration von 50% Formamid statt. Das DexSO₄ im Hybridisierungsmix diente der Erhöhung der Sondenkonzentration, da DexSO₄ in wässrigen Lösungen stark wasseranziehend wirkt. Makromoleküle, wie die Sonde, haben deswegen keinen Zugang zu dem Wasser, was zu einer lokalen Steigerung der Sondenkonzentration und somit der Hybridisierungsrate führt.

Der Hybridisierungsmix wurde ohne Formamid bei -20 °C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde das Formamid hinzugegeben, das Gemisch 30 sec lang bei 80 °C erhitzt und bis zum Gebrauch bei 50°C im Wasserbad erwärmt, um die Viskosität des DexSO₄ zu verringern. Die Denaturierung des Sondenmixes zur Reduktion der Sekundärstrukturen der Sonden-RNA, geschah ebenfalls für 30 sec bei 80 °C. Anschließend wurde ein erforderliches Volumen an Hybridisierungsmix hinzugegeben, damit ein Verhältnis von 5:1 (Hybridisierungsmix:Sondenmix) entstand. Von diesem Gemisch wurden 25 µl auf den OT mit den Zellen gegeben, dieser wurde mit einem Deckglas abgedeckt und mittels "Fixogum Rubber Cement" (Marabu) versiegelt. Die Hybridisierung fand in einer feuchten Kammer für 48 h bei 37 °C statt.

2.16.4.3.Stringentes Waschen und Detektion der Sonde

Das Waschen nach der Hybridisierung diente dazu die unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, da diese zu einer unspezifischen Hintergrundfluoreszenz führen könnte. Deswegen wurden die OT für 1¹/₂ h in der Posthybridisierungs-Waschlösung gewaschen. Dies erfolgte unter Bedingungen mit einer höheren Stringenz, das heißt bei 55 °C, einer Ionenkonzentration von 0,15 M und einer

Formamidkonzentration von 50 %. Anschließend folgten weitere Waschschriffe für zweimal 5 min bei 47 °C mit der TES-Waschlösung, um das Formamid vollständig zu entfernen.

Die Detektion der Sonde wurde mit dem TSA™-Biotin-System von Perkin-Elmer durchgeführt. Bei diesem Signal-Amplifikations-System wird durch eine Antikörper-konjugierte Peroxidase das mit Biotin-gekoppelte Phenol Tyramid oxidiert. Hierdurch entsteht ein hoch reaktives Zwischenprodukt, welches an elektronenreiche Aminosäurereste, wie zum Beispiel Tyrosin, in unmittelbarer Nähe der Peroxidase bindet. Dadurch wird das Biotin um die Peroxidase herum angereichert. Bei der anschließenden Detektion mit Fluorochrom-konjugiertem Streptavidin bindet dieses verstärkt in dem Bereich um die Peroxidase. Das Signal erscheint somit intensiver, bleibt aber distinkt.

Vor Beginn der Detektion wurden die OT mit 100 µl TNB-Puffer für 30 min bei RT inkubiert, um eine ausreichende Menge an Proteinen für die Bindung des reaktiven Tyramid-Zwischenproduktes bereitzustellen und um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurden die OT mit 100 µl anti-DIG-Pod (1:100 verdünnt in TNB-Puffer) für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend dreimal 5 min mit 4 x SSC 0.1 % Triton-X 100 bei RT gewaschen. Zur Signalamplifikation wurden die OT 10 min mit 100 µl Biotin-konjugiertem Tyramid (1:50 verdünnt in "Amplification Reagent") bei RT inkubiert und wieder dreimal 5 min mit 4 x SSC 0.1 % Triton-X 100 bei RT gewaschen. Danach erfolgte die Detektion mittels Cy3-konjugiertem Streptavidin, das in einer 1:400 Verdünnung mit "Blocking" Reagenz aufgetragen wurde. Nach der 30-minütigen Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer folgte der letzte Waschschriff von dreimal 5 min mit 4 x SSC 0.1 % Triton-X 100 bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Die OT wurden dann in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 100 %) dehydriert, luftgetrocknet und mit DAPI-haltigem "Mounting Medium" eingedeckelt. Das DAPI diente zur Anfärbung der DNA in den Zellkernen und somit als Gegenfärbung. Die Arbeitsschritte ab dem Fluorochrom-markierten-Streptavidin erfolgten im Dunkeln, um das Ausbleichen des

Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Für die Versuche zur Amplifikation der HIV-RNA einzelner Zellen wurden die Detektionsarbeiten unter RNase-freien Bedingungen vorgenommen, um einem Verlust der RNA vorzubeugen.

2.16.5. Laser-Mikrodissektion

Um eine RT-PCR der V1/V2-Region des *env*-Gens auf Einzelzelleben durchführen zu können, mussten die FISH-positiven Zellen mit Hilfe eines Laser-Mikrodissektion-Gerätes (Humangenetik, Universitätskliniken Homburg) einzeln isoliert werden. Bei dem "Palm Laser Microbeam System" der Firma "Carl Zeiss Microimaging" (München) kommt ein Stickstoff-Laser zum Einsatz, der bei einer Wellenlänge von 337 nm arbeitet. Die FISH-positive Zellen wurden markiert und diese Areale spezifisch ausgeschnitten. Durch ein spezielles Fokussierungsverfahren, die sogenannte "Laser Pressure Catapulting" (LPC)-Technologie, wurde durch eine extrem hohe Photonendichte und einer sehr präzisen Fokussierung des Laserstrahls, die Probe nach oben in einen Deckel eines Reaktionsgefäßes katapultiert, der mit einer adhäsiven Silikonschicht ("Palm Adhesive Caps opaque" der Firma "Carl Zeiss Microimaging") versehen war. Da sich die Zellen nicht von konventionellen OT ablösen, wurden OT verwendet, die mit einer 1 mm dicken Polyethylenaphthalat-Folie (PEN) (Palm "Membrane Slides" 1mm der Firma "Carl Zeiss Microimaging") beschichtet waren. Der Erfolg der Laser-Mikrodissektion wurde mikroskopisch im Deckel des Reaktionsgefäßes überprüft und die einzelnen Zellen über einen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 5000 rpm an den Boden des Reaktionsgefäßes gebracht. Unmittelbar daran schloss sich die Aufreinigung und Amplifikation der RNA (siehe 2.14. und 2.15.) für die PCR der V1/V2-Region des *env*-Gens an (siehe 2.11.).

2.17. Methoden zur HIV-spezifischen DNA-FISH

2.17.1. Herstellen von DNA-Sonden mittels Nick-Translation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden markierte DNA-Sonden eingesetzt, die mit Hilfe des "Nick Translation Kits" (Roche) generiert wurden. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass das Enzym DNase I, bei sehr niedrigen Enzymkonzentrationen und in Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen, an statistisch verteilten Stellen der DNA Einzelstrangbrüche induziert. Anschließend werden am 3'-Ende der Bruchstelle (Nick) durch die 5'-3'-Polymeraseaktivität des Enzyms DNA-Polymerase I neue, durch ein Hapten markierte Nukleotide in den DNA-Strang eingebaut und durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität die alten Nukleotide entfernt. Neben einer hohen spezifischen Markierungsausbeute ist für den Einsatz in der In-Situ-Hybridisierung die Größe der entsprechenden Fragmente relevant, da zu kleine Fragmente nach der Hybridisierung leicht wieder gewaschen werden und so eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz verursachen können. Zu große Sonden-Fragmente sind ebenfalls unvorteilhaft, da sie keine ausreichende Zugänglichkeit zu den Ziel-Sequenzen in der Zelle haben. Nach der Durchführung der Nick-Translation nach Angaben des Herstellers konnten Sonden mit einer optimalen Länge zwischen 200 und 800 bp eingesetzt werden.

Durchführung:

Zur Herstellung der DIG-markierten Kontrollsonde D12Z1 wurde das Plasmid pD12Z1 eingesetzt, das die Sequenz der Zentromerregion des Chromosoms 12 enthält. Um HIV-Sequenzen spezifisch zu detektieren, wurde das Plasmid pBru Δ env, das die HIV-Sequenz ohne den *env*-Bereich enthielt, Biotin-markiert. 1 μ g der entsprechenden Plasmid-DNA wurde mit 4 μ l DIG- bzw. Biotin-Nick-Translationsmix und 16 μ l $H_2O_{dest.}$ gemischt und 90 min bei 15 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 1 μ l 0.5 M EDTA (pH 8,0) und einer 10-minütigen Inkubation bei 65 °C. Anschließend wurde der Ansatz mit 50-fachem Überschuss an humaner

Cot-DNA (Roche) und eben soviel Heringssperma-DNA (Roche) versetzt, um repetitive Sequenzen bei der folgenden FISH zu maskieren. Daran schloss sich die Fällung der DNA-Sonde über Nacht bei -20 °C durch die Zugabe von Ethanol an (siehe 2.8.).

2.17.2. Zellkernpräparation aus Suspensionszellen

Verwendete Lösungen:

Hypotonische Lösung:

KCl	0,075 M bei Zelllinien
	0,1 M bei primären Zellen

Fixativ:

Methanol/Eisessig	Verhältnis 4:1
-------------------	----------------

Eine in der Wachstumsphase befindlich Zellkultur wurde mit 0,1 µg/ml Colcemid (Roche, 1:100 Verdünnung der Stammlösung) versetzt. Colcemid ist ein Derivat des Alkaloids Colchicin aus der Herbstzeitlosen *Colchicum autumnale*, welches den Spindelapparat bei der Zellteilung hemmt und so einen Zellzyklusarrest in der Metaphase auslöst. Die Inkubationsdauer für eine optimale Ausbeute an Metaphasen ist vom Zelltyp abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zelllinien 90 min und die primären Zellen zwischen 90 und 180 min nach der Colcemidzugabe inkubiert.

Durchführung:

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen in 50 ml Gefäße überführt und 10 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den Waschschritten fand bei 1400 rpm für je 6 min statt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand bis auf einen kleinen Rest verworfen. Mit einer Einmal-Pasteurpipette (Sarstedt) wurde die hypotonische Lösung (0,075 M KCl-Lösung bei Zelllinien und 0,1 M KCl-Lösung bei

primären Zellen) erst tropfenweise, anschließend zweimal zu je 2 ml zugegeben. Die Zellen wurden darauf folgend gut resuspendiert. Die Zelllinien wurden 6 min bei RT und die primären Zellen 30 min bei 37 °C inkubiert. Die hypotonische Lösung lässt die Zellen anschwellen, zerstört sie somit und es kommt zur Beseitigung der Zellmembran. Die doppelte Kernmembran ist aufgrund der kurzen Inkubationsdauer nicht betroffen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm wurde der Überstand dekantiert und die Zellkerne wurden resuspendiert. Die Zugabe des eiskalten Fixatives erfolgte zunächst tropfenweise mit einer Einmal-Pasteurpipette, bevor die Zellen darauf folgend mit zweimal jeweils 2 ml gut durchmischt und für 20 min bei 4 °C fixiert wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt von 6 min bei 1600 rpm wurden die Zellkerne erneut im Fixativ aufgenommen und 20 min inkubiert. Dieser Vorgang wurde zum Entfernen von Zytoplasmaresten und anderer für die FISH inhibierenden Faktoren nochmals wiederholt. Die Zellkerne wurden bis zur Verwendung in dem Fixativ bei -20 °C gelagert.

2.17.3. DNA-FISH auf Einzelzellebene

Verwendete Antikörper:

α -DIG-Cy3:

CyTM 3-konjugierte monoklonale anti-Digoxigenin-Antikörper (IgG) aus der Maus (Dianova)

GAM-Cy3:

CyTM 3-konjugierte anti-Maus Antikörper aus der Ziege (Dianova)

FITC-SA:

Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-konjugiertes Streptavidin (SA) (Vector)

Verwendete Lösungen:

20 x SSC Puffer: genaue Beschreibung siehe 2.16.2.

RNase-Arbeitslösung:

RNase (DNase-frei) 500µg/ml (Roche) in 2x SSC (1:20 Verdünnung)

Pepsin-Arbeitslösung:

100 ml 0,01 M HCl

1 ml Pepsin (4mg/ml) (Sigma 3200-4500 units/mg)

PBS-Puffer (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺): genaue Beschreibung siehe 2.4.1.

Präfix-Puffer:

Formaldehyd (37%)	2 ml
1 M MgCl ₂	4 ml
PBS	75 ml

Denaturierungs-Puffer:

Formamid	70 % (v/v)
2x SSC	10 % (v/v)
H ₂ O _{dest.}	20 % (v/v)

Natriumphosphat-Puffer (NaPO₄):

Na ₂ HPO ₄	0.5 M
----------------------------------	-------

0.5 M NaH₂PO₄ zugeben bis pH von 7,0 erreicht wird

Hybridisierungs-Mix:

Formamid deionisiert	50 % (v/v)
DexSO ₄	10 % (v/v)
Natriumphosphat-Puffer (NaPO ₄)	0,05 M
2x SSC	30 % (v/v)

TNB-Puffer: genaue Beschreibung siehe 2.16.4.

Stringenz-Puffer:

Formamid	50 % (v/v)
2x SSC	50 % (v/v)

TNT-Puffer:

NaCl	0.15 M
Tris/HCl pH 7,5	0,10 M
Tween 20	0,05% (v/v)

mit H₂O_{dest.} auffüllen

Durchführung:**2.17.3.1. Vorbehandlung der Zellkerne**

Zunächst wurden die OT über Nacht in 100% Ethanol gereinigt, dann kurz in 70% Ethanol gewaschen und unter dem Abzug getrocknet. Die OT wurden anschließend auf ein mit H₂O_{dest.} befeuchtetes Papiertuch aufgelegt und die entsprechenden Zellkerne in der Fixierlösung aus 20 cm Abstand aufgetropft. Die gesteigerte Luftfeuchtigkeit war hierbei notwendig, um eine Aufspreitung der Metaphasen zu erzielen. Nach dem vollständigen Trocknen der OT wurden diese in einer steigenden Ethanol-Reihe (70%, 80%, 100%) dehydriert. Die verbleibende RNA in den Zellkernen, die eine inhibitorische Wirkung auf die Hybridisierung der Sonde mit der Ziel-DNA haben könnte, wurde durch eine Behandlung mit einer DNase-freien RNase beseitigt. Diese wurde in 2 x SSC 1:20 verdünnt, die OT wurden mit 100 µl der RNase-Arbeitslösung überschichtet, einem Deckglas bedeckt und mit der Oberfläche nach unten in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert.

Nach viermaligem Waschen der OT mit 2 x SSC für 5 min bei RT folgte der Pepsinverdau von 6 min in 0,01 M HCl bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Dieser diente dazu, die in den Zellkernen vorhandenen Proteine, wie Histone zu entfernen und die teilweise noch intakten Zellmembranen permeabel zu

machen, so dass die Ziel-Sequenzen für die Sonden zugänglicher wurden. Nach einem 5-minütigen Waschschrift mit PBS bei RT auf dem Schüttler wurden die Zellkerne 5 min mit der Präfixierungslösung bei RT unter Schütteln inkubiert und darauf folgend wieder 5 min mit PBS bei RT gewaschen. Die OT wurden dann mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%, 80%, 100%) dehydriert und unter dem Abzug getrocknet. Die Denaturierung der zellulären DNA erfolgte mit 100 µl des sogenannten Denaturierungspuffers, der 70% Formaldehyd (deionisiert) enthielt. Dazu wurden die OT mit 100 µl dieser Lösung überschichtet, mit einem Deckglas bedeckt und für 7 min auf dem Heizblock auf 75 °C erhitzt. Die OT wurden danach sofort mit einer eiskalten, aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%, 80%, 100%) dehydriert, um den Denaturierungszustand der DNA aufrecht zu erhalten und anschließend unter dem Abzug getrocknet.

2.17.3.2. Hybridisierung

Die Lagerung des Hybridisierungsmixes erfolgte bis zum Gebrauch bei -20 °C ohne Formamid (deionisiert). Auf jeden OT wurden 100 ng der Biotin-markierten HIV-Sonde und 50 ng der DIG-markierten Kontrollsonde K12Z1 gegeben. Kurz vor der Hybridisierung wurden das Formamid (deionisiert) und die entsprechende Sondenmenge zum Hybridisierungsmix gegeben und die Sonden-DNA bei 75 °C für 7 min denaturiert. Der Hybridisierungsmix inklusive der Sonde wurde anschließend 2 min auf Eis und darauf folgend 12 min bei 37 °C inkubiert, bevor 50 µl pro OT aufgetragen wurde. Die OT wurden mit einem Deckglas abgedeckt und mit "Fixogum Rubber Cement" (Marabu) versiegelt. Das Binden der Sonde an die Ziel-DNA erfolgte über Nacht bei 37 °C in einer feuchten Kammer.

2.17.3.3. Stringentes Waschen und Detektion der Sonden

Nach der Hybridisierung wurden die OT zunächst dreimal 5 min mit dem Stringenz-Puffer bei 45 °C im Schüttelwasserbad gewaschen, um die unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen und somit eine Reduktion der

unspezifischen Hintergrundfluoreszenz auf dem OT zu erzielen. Darauf folgten weitere Waschschrte für dreimal 4 min mit 0,1 x SSC ebenfalls bei 45 °C im Schüttelwasserbad und für 2 min mit 2 x SSC bei RT.

Bevor man mit der Antikörperdetektion der Kontrollsonde beginnen konnte, mussten die unspezifischen Bindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation bei RT mit TNB-Puffer blockiert werden. Diesem Schritt folgte die Bindung des Erstantikörpers anti-DIG-Cy3 aus der Maus, für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Es wurde eine 1:200-Verdünnung in TNB-Puffer eingesetzt und 100 µl pro OT aufgetragen. Zur Verstärkung des Signals fand eine Inkubation mit einem zweiten Antikörper (Ziege-anti-Maus-Cy3) für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer statt. Von der 1:400-Verdünnung in TNB-Puffer wurden ebenfalls 100 µl pro OT aufgetragen. Zwischen den Antikörperinkubationen wurde jeweils dreimal 5 min mit TNT-Puffer bei 37 °C gewaschen.

Bevor mit der Detektion der Biotin-Sonde begonnen wurde, folgte ein weiterer "Blocking"-Schritt mit 100 µl TNB-Puffer für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Die Detektion der Biotin-Sonde wurde ebenfalls mit dem TSATM-Biotin-System durchgeführt (siehe 2.16.4.3.). Bei der DNA-FISH gab es jedoch einige Modifikationen bezüglich der Verdünnungen und den Waschschrten. Die Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (SA-HRP "horseradish peroxidase") wurde 1:75 in TNB-Puffer verdünnt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal 5 min mit TNT-Puffer bei RT gewaschen. Das Biotin-konjugierte Tyramid wurde 1:30 in dem "Amplification Reagent" verdünnt und 20 min bei RT inkubiert. Der folgende Waschschrte für dreimal 5 min bei RT erfolgte ebenfalls mit dem TNT-Puffer. Das FITC-konjugierte Streptavidin wurde 1:400 in TNB-Puffer verdünnt und die OT für 30 min bei 37 °C in der feuchten Kammer überschichtet. Die letzten Waschschrte fanden bei 37 °C für dreimal 5 min im Schüttelwasserbad statt. Anschließend wurden die Objektträger mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 100 %) dehydriert, luftgetrocknet und mit DAPI-haltigem "Mounting Medium" eingedeckelt. Das DAPI diente der Gegenfärbung der

DNA in den Zellkernen. Alle Arbeitsschritte ab dem ersten Antikörper erfolgten im Dunkeln, um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern.

2.18. Methoden zur HCV-spezifischen RNA-FISH

2.18.1. Herstellen von DNA-Sonden mittels Nick-Translation

Die für die HCV-RNA-FISH eingesetzten DNA-Sonden wurden, wie unter 2.17.1. beschrieben, über Nick-Translation hergestellt. Als Ausgangsplasmid diente hier APP23 der Firma Apath, das die HCV-Vollängensequenz enthielt. Es wurden Biotin-markierte Sondenfragmente zwischen 200 und 800 bp Länge generiert. Die "Labeling"-Effizienz wurde auch hier über einen "Dot Blot" analysiert (siehe 2.16.2.).

2.18.2. Fixieren der Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die HCVcc-infizierten Huh7.5-Zellen (3×10^4 Zellen pro Vertiefung eines "Flexiperm") zweimal mit 300 µl PBS pro Vertiefung gewaschen und anschließend 20 min mit 300 µl 4 % PFA/1 x PBS (RNase-frei) bei RT fixiert. Nach dieser Inkubationszeit folgte ein erneuter Waschschrift mit 1 x PBS (RNase-frei) und der direkte Einsatz dieser Zellen für die HCV-RNA-FISH.

2.18.3. HCV-RNA-FISH auf Einzelzellebene

Die Durchführung der HCV-RNA-FISH erfolgte unter RNase-freien Bedingungen. Eine detaillierte Vorgehensweise des RNase-freien Arbeitens ist unter 2.16.2. beschrieben. Da einige Lösungen denen der HIV-spezifischen RNA-FISH entsprechen, ist deren genaue Beschreibung unter 2.16.4. aufgeführt.

wurde das milde Detergenz Triton-X 100 eingesetzt, um die Kombination der RNA-FISH mit einer Immunfluoreszenz zu ermöglichen. Eine proteolytische Permeabilisierung der Zellen würde hier zu einem Verdau der Ziel-Epitope führen und diese könnten somit nicht mehr mit Antikörpern detektiert werden. Die OT wurden danach einmal kurz in 1 x PBS gewaschen. Daran schloss sich ein Post-Fixierungsschritt mit 4% PFA/1 x PBS (RNase-frei) für 20 min unter Schütteln in einem Eis/Wasserbad an. Nach dem erneuten Waschen mit 1 x PBS RNase-frei wurden die OT in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 100 %) dehydriert und 1-3 h luftgetrocknet.

2.18.3.2.Hybridisierung

Von den Sondenfragmenten wurden pro OT 100 ng in dem Hybridisierungsmix aufgenommen, der aus 50 % Formamid, 4 x SSC RNase-frei und 10 % DexSO₄ (Konzentration der Stocklösung 50 % DexSO₄ in DEPC-H₂O gelöst) bestand. Der Hybridisierungsmix inklusive der Sonde wurde für 12 min bei 80 °C denaturiert, anschließend 50 µl auf den OT gegeben, dieser mit einem Deckglas abgedeckt und mittels "Fixogum Rubber Cement" (Marabu) versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37 °C in einer feuchten Kammer.

2.18.3.3.Stringentes Waschen und Detektion der Sonde

Das stringente Waschen für dreimal 5 min bei 45 °C in einem Schüttelwasserbad mit dem Stringenz-Puffer, der aus 50 % Formamid und 2 x SSC bestand, diente zur Reduktion der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz. Daran schloss sich ein weiterer Waschschrift für zweimal 5 min bei 45 °C mit der TES-Waschlösung an. Die Detektion der Sonde wurde mit dem TSATM-Biotin-System von Perkin-Elmer durchgeführt und geschah analog zur Detektion der DNA-FISH (siehe 2.17.3.3.). Zum Schluss wurden die Zellen mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 100 %) dehydriert, luftgetrocknet, mit DAPI-haltigem "Mounting Medium" eingedeckelt und am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

2.19. Immunfluoreszenz

In der Immunfluoreszenz (IF) werden Fluoreszenzfarbstoffe, wie beispielsweise FITC oder Cy3, mit einem Antikörper gekoppelt und so die Nachweisempfindlichkeit fluoreszenzmikroskopischer Methoden mit der strengen Spezifität einer Antikörperbindung verbunden. Somit lassen sich Antigene im Gewebe oder innerhalb von Zellen lokalisieren. Die Immunfluoreszenz kann aber auch indirekt erfolgen, das heißt, dass zunächst ein unmarkierter Erstantikörper eingesetzt wird, der spezifisch an die Epitope in der Zelle bindet und dieser mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper detektiert wird.

Durchführung:

In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis des Nichtstrukturproteins NS5A als Kontrolle für eine erfolgreiche HCVcc-Infektion der Huh 7.5-Zellen eingesetzt. Nach Fixierung der Zellen mit 4 % PFA wurden sie mit 300 µl PBS gewaschen und darauf folgend zur Permeabilisierung mit 0,2 % Triton-X 100 in PBS für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 300 µl PBS erfolgte das Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit PBS + 10 % FKS für 30 min bei RT. Anschließend folgte die Bindung des primären Antikörpers anti-NS5A aus der Maus, 1:25000 in PBS + 10 % FKS verdünnt, für 1 h bei RT. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurde der FITC-gekoppelte sekundäre anti-Maus-Antikörper in einer 1:1000-Verdünnung in PBS + 10 % FKS zugegeben und ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert. Abschließend wurde viermal mit PBS gewaschen, die Zellen in einer aufsteigende Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 100 %) in DAPI-haltigem Mounting-Medium eingedeckelt und mit dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

In einem zusätzlichen Versuch sollte die HIV-RNA mit Hilfe der HIV-spezifischen RNA-FISH und der HIV-1-Kapsid-Antigene (55, 39, 33 und 24 kD) über eine Immunfluoreszenz simultan nachgewiesen werden. Dafür wurden mit PMA induzierte Zellen der HIV-positiven Zelllinie ACH2 10 h

nach Beginn der Stimulation mit 4 % PFA/1 x PBS (RNase-frei) fixiert. Zunächst wurde die HIV-spezifische RNA-FISH durchgeführt (siehe 2.16.4.). Daran schloss sich die IF analog zu dem oben aufgeführten Protokoll an. Die Detektion der Kapsid-Proteine erfolgte mit dem monoklonalen Phycoerythrin-gekoppelten Antikörper Coulter Clone® KC57-RD1 (Coulter Corporation) in einer 1:20 Verdünnung in PBS + 10% FKS. Dieser wurde anschließend mit einem Cy3-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper in einer 1:400-Verdünnung in PBS + 10 % FKS nachgewiesen.

2.20. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Alle fluoreszenzmikroskopische Auswertungen wurden an dem Fluoreszenz-Mikroskop Olympus AX 70 mit einer Quecksilberlampe als Lichtquelle (HG100) (Humangenetik, Universitätskliniken Homburg) durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit der Digitalkamera der Firma Hamamatsu DC C4742-95; die Auswertung mit dem Verarbeitungssystem "Metasystem ISIS".

3. Ergebnisse

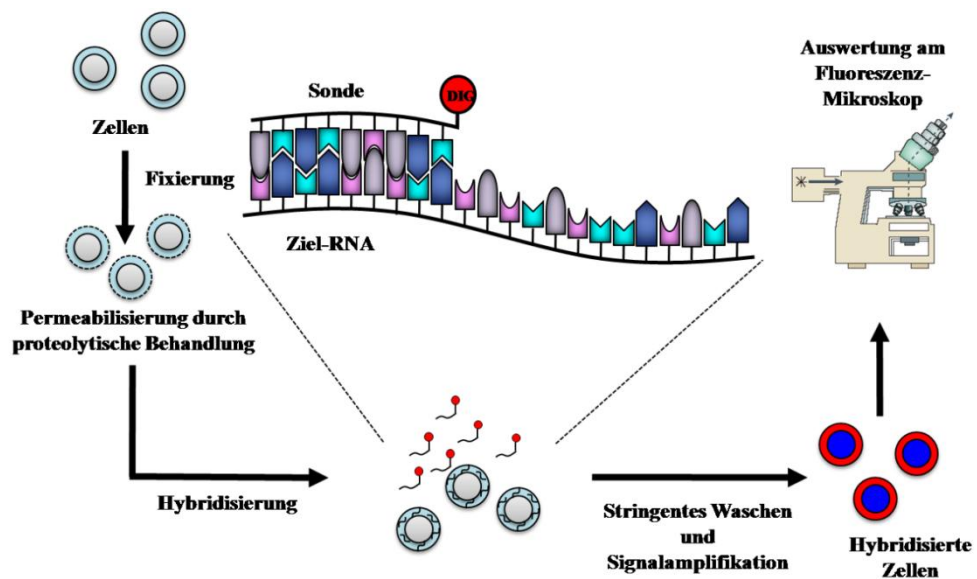
3.1. Versuche zur Entwicklung eines Systems zur Analyse von HIV-1 Transkripten auf Einzelzellebene

In vorherigen Arbeiten wurde mit Hilfe einer HIV-spezifischen DNA-FISH die Provirus-Kopienzahl einzelner infizierter Zellen HIV-positiver Patienten bestimmt. Mit diesem Verfahren wurde gezeigt, dass die Mehrzahl der HIV-infizierten CD4-positiven T-Zellen aus der Milz zweier HIV-positiver Patienten multiple Proviren trugen (Jung et al., 2002). Mit dem *in vivo* Nachweis der Mehrfachinfektion auf Einzelzellebene wurde somit die Voraussetzung für die Variantenerzeugung über Rekombinationsereignisse bewiesen. Die relative transkriptionelle Aktivität der multiplen Proviren einzelner infizierter Zellen ist bis heute unbekannt. Um diese zu analysieren, muss ein geeignetes, hoch sensitives System entwickelt werden. Ein solches System kann experimentell wie folgt aufgebaut sein. Mit Hilfe einer HIV-spezifischen RNA-FISH kann die HIV-RNA in einzelnen infizierten Zellen identifiziert werden. Die so markierten Zellen können über eine Laser-Mikrodissektion isoliert werden. Dies bietet die Möglichkeit, eine RT-PCR einzelner infizierter Zellen durchzuführen, deren Amplifikat für eine sich anschließende Sequenzanalyse eingesetzt werden kann. Anhand der Häufigkeitsverteilung der HIV-Varianten kann die relative transkriptionelle Aktivität der entsprechenden Proviren in einzelnen infizierten Zellen abgeschätzt werden.

3.1.1. Optimierung der HIV-spezifischen RNA-FISH

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die HIV-spezifische RNA-FISH etabliert. Mit dieser Technik konnte in 10 bis 30 % der Zellen der T-Zelllinie ACH2 ein spezifisches Signal nachgewiesen werden. Die Sensitivität dieses RNA-FISH Protokolls war jedoch zu gering, um die HIV-RNA in Milzzellen

HIV-infizierter Patienten nachzuweisen, da die Zahl der HIV-Transkripte auf wenige Hundert Kopien pro Zelle geschätzt wird. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Sensitivitätssteigerung unseres HIV-spezifischen RNA-FISH-Protokolls. Bei der HIV-spezifischen RNA-FISH handelt es sich um ein technisch komplexes Verfahren, das sich aus mehreren Schritten zusammensetzt, die in Abb. 3.1.1 dargestellt sind. Bevor die eigentliche Hybridisierung vorgenommen werden konnte, mussten zwei wichtige Voraussetzungen erfüllt werden. Erstens war die Erzeugung DIG-markierter HIV-spezifischer RNA-Sonden notwendig. Zweitens mussten die Zellen mit einer geeigneten Fixierlösung, wie beispielsweise mit 4 % PFA, vorbehandelt werden, um die Zellmorphologie zu erhalten und einen Verlust der Ziel-RNA in den Zellen zu vermeiden. Der proteolytischen Vorbehandlung, um einen Zugang der Ziel-RNA für die Sonden zu erlangen, folgte die Hybridisierung. Daran schloss sich das stringente Waschen an, was der Entfernung von unspezifisch gebundener Sonde und damit zur Reduktion der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz diente. Der letzte Schritt bestand aus der Detektion und der Signalamplifikation der DIG-markierten RNA-Sonden, bevor die Proben am Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet werden konnten.



In Anlehnung an Amann und Fuchs, 2008

Abb. 3.1.1 Schematische Darstellung der grundlegenden Schritte der RNA-FISH

Zum Erhalt der Zellmorphologie und um die RNA in den Zellen zu stabilisieren, wurden die Zellen mit dem quervernetzenden Fixativ PFA fixiert. Die Zugänglichkeit der Ziel-RNA erfolgte über eine proteolytische Vorbehandlung. Nach der Generierung einzelsträngiger DIG-markierter RNA-Sonden wurden diese für die Hybridisierung eingesetzt. Dem stringenten Waschen folgte eine Signal-Amplifikation und die anschließende Auswertung der Signale am Fluoreszenz-Mikroskop (in Anlehnung an Amann und Fuchs, 2008).

3.1.1.1. Herstellen HIV-1-spezifischer RNA-Sonden und die Detektion dieser mit Hilfe des TSA™-Systems

Bei den im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführten FISH-Experimenten kam lediglich eine DIG-markierte RNA-Sonde zum Einsatz, die eine Länge von 773 Nukleotiden besaß und an die einfach-gespleißte HIV-1 mRNA hybridisierte. Zur Steigerung der Anzahl an potentiellen Bindungsmöglichkeiten fand die Subklonierung von verschiedenen, zwischen 250 und 650 bp langen HIV-Fragmenten in den Transkriptionsvektor pGEM®

statt. Zusammen deckten die Fragmente etwa 40 % des HIV-Genoms ab (siehe Abb. 3.1.2). Der Vektor pGEM enthält Promotorregionen für die SP6- und die T7-Polymerase, was den Vorteil bietet, dass je nach Orientierung des HIV-„Inserts“ die Transkription sowohl von der SP6-Polymerase, als auch von der T7-Polymerase gestartet werden konnte (siehe Tab. 2.8). Da die HIV-RNA in den Zellen in (+)-Orientierung vorliegt, wurden zu deren Nachweis ausschließlich Sonden mit (-)-Polarität erzeugt. Bei dem Herstellungsverfahren mittels *in vitro* „run off“-Transkription fand der Einbau eines DIG-11-dUTP in die neuentstehende RNA-Kette statt und gewährleistete, dass nur Strang-spezifische, einzelsträngige RNA-Sonden entstehen, die frei von Resten des Vektors sind. Dies stellt einen Vorteil der Verwendung von RNA-Sonden dar, denn die Vektorreste könnten zu einer unspezifischen Hintergrundfluoreszenz auf den Objektträgern führen. Ein weiterer Vorteil der RNA-Sonden ist deren große Sensitivität, denn RNA-RNA-Hybride besitzen eine höhere Stabilität im Vergleich zu RNA-DNA-Hybriden. RNA-Sonden sind dementsprechend achtmal sensitiver als doppelsträngige DNA-Sonden und somit besonders zur Detektion geringer RNA-Mengen geeignet (Cox et al., 1984). Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RNA-FISH-Experimente kamen nur optimal markierte RNA-Sonden zum Einsatz. Mittels „Dot Blot“ konnte die Markierungs-Effizienz der Sonden abgeschätzt werden. Sonden, bei denen bei einer Menge von 0,2 bis 2 pg ein Signal auf der Membran detektiert werden konnte, waren ausreichend markiert und wurden für die RNA-FISH verwendet (Daten nicht gezeigt).

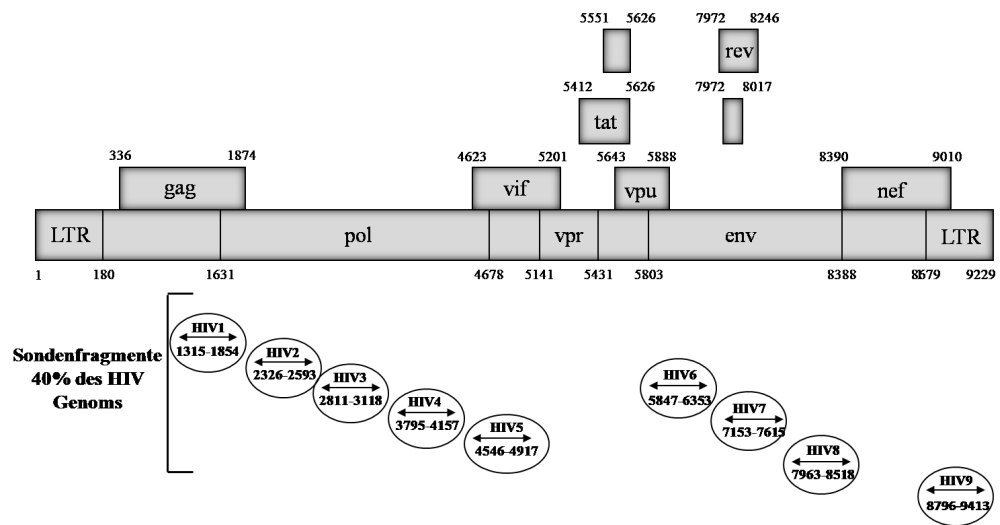


Abb. 3.1.2 Schematische Darstellung des HIV-Genoms und der jeweiligen Fragmente für die Herstellung der HIV-spezifischen RNA-Sonde; HIV-Referenz-Sequenz: HIVBru (Accession-Nummer K02013); Darstellung der Plasmide siehe Tab. 2.1

Die Verwendung eines Tyramid-Signal-Amplifikation-Systems (TSATM-Biotin-System) stellt eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Sensitivität des FISH-Protokolls dar (siehe Abb. 3.1.3). Bei diesem kommt es in einem ersten Schritt zur spezifischen Bindung eines anti-DIG-Antikörpers, der mit einer Peroxidase gekoppelt vorliegt, an die DIG-markierte hybridisierte RNA. Die katalytische Aktivität der Peroxidase führt zu einer Oxidation des Biotin-konjugierten Phenols Tyramid. Hierdurch entsteht ein hoch reaktives Zwischenprodukt, welches an elektronenreiche Aminosäurereste, wie zum Beispiel Tyrosin, in unmittelbarer Nähe der Peroxidase bindet. Dadurch wird das Biotin um die Peroxidase herum angereichert. Bei der anschließenden Detektion mit Fluorochrom-konjugiertem Streptavidin bindet dieses verstärkt in dem Bereich um die Peroxidase. Das spezifische Signal erscheint in diesem Bereich intensiver, bleibt aber distinkt.

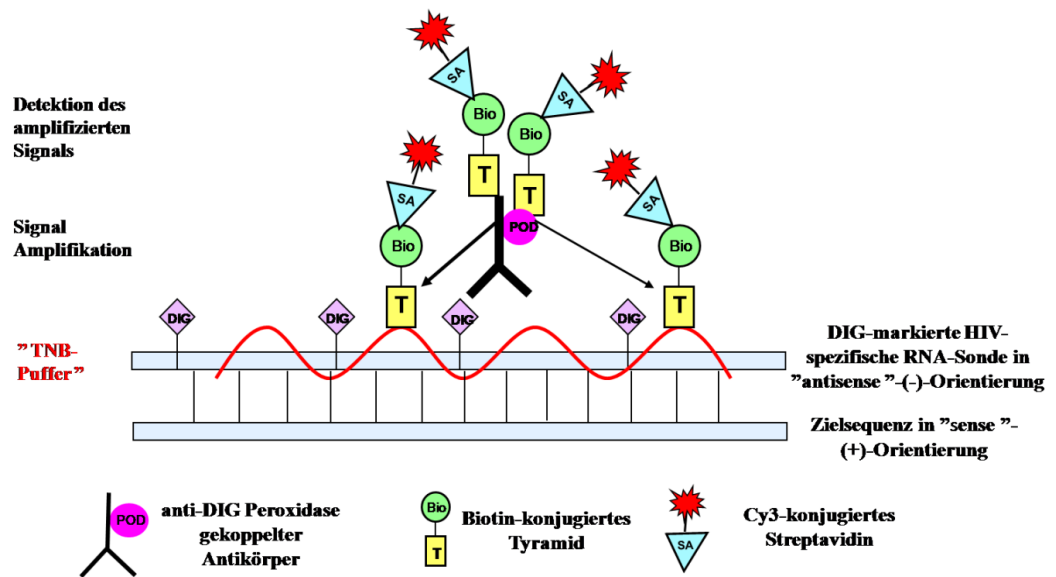


Abb. 3.1.3 Prinzip der Tyramid-Signal-Amplifikation

In einem ersten Schritt wurden die Objektträger mit TNB-Puffer inkubiert, um genug Proteine für die Bindung des reaktiven Tyramid-Zwischenproduktes bereitzustellen und um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Darauf folgte die Bindung eines anti-DIG Peroxidase-konjugierten Antikörpers an die DIG-markierte RNA-Sonde. Die katalytische Aktivität der Peroxidase führt zu einer Oxidation des Biotin-konjugierten Tyramids. Hierdurch entsteht ein hochreaktives Zwischenprodukt, welches an elektronenreiche Aminosäurereste, wie zum Beispiel Tyrosin, in unmittelbarer Nähe der Peroxidase bindet. Dies hat die Anreicherung des Biotins in diesem Bereich zur Folge. Bei der anschließenden Detektion mit Cy-3-gekoppeltem Streptavidin erscheint das Signal intensiver, bleibt aber distinkt.

3.1.1.2. Nachweis der HIV-RNA in ACH2-Zellen, in *ex vivo* infizierten PBL und in MNC aus der Milz eines HIV-infizierten Patienten mit Hilfe des optimierten RNA-FISH-Protokolls

Um den optimalen Zeitpunkt zum Nachweis der HIV-RNA nach T-Zell-Stimulierung zu bestimmen, wurden Zellen der HIV-positiven T-Zelllinie ACH2-Zellen mit PMA (10 μ M) stimuliert (Patterson et al., 1998; Poli et al., 1990). Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0h, 2h, 5h, 7h, 10h, 24 h und 48h) nach der Zugabe des Phorbolesters wurden die Zellen mit 4 % PFA für 20 min

bei 4 °C fixiert und das modifizierte HIV-spezifische RNA-FISH-Protokoll durchgeführt. Die HIV-RNA konnte in allen Stimulationsansätzen in den ACH2-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.1.4). Als Negativkontrolle wurden Zellen der HIV-negativen T-Zelllinie A3.01 eingesetzt. Die Intensität der RNA-Signale und die Verteilung innerhalb der Zelle waren abhängig von der Stimulationsdauer der ACH2-Zellen. Unstimulierte Zellen zeigten ein schwaches Signal, das auf das äußere Zytoplasma der Zellen beschränkt war. 5 h nach der Stimulation mit PMA konnte ein Signal größerer Intensität beobachtet werden, das teilweise zentriert vorlag. Bei den ACH2-Zellen 10 h nach der Stimulierung war das Signal über die gesamte Zelle verteilt und wies die größte Signalintensität auf. Bei den Proben 24 und 48 h nach Beginn der Stimulation fand eine Polarisierung der Signale mit einer hohen Intensität auf einer Seite des Zytoplasmas statt. Nach Auszählen der ACH2-Zellen mit einem spezifischen Signal, konnte ein Anstieg der FISH-positiven Zellen im zeitlichen Verlauf beobachtet werden, wobei 10 h nach der Stimulation die meisten Zellen (89 %) ein spezifisches Signal aufwiesen (Abb. 3.1.4 G).

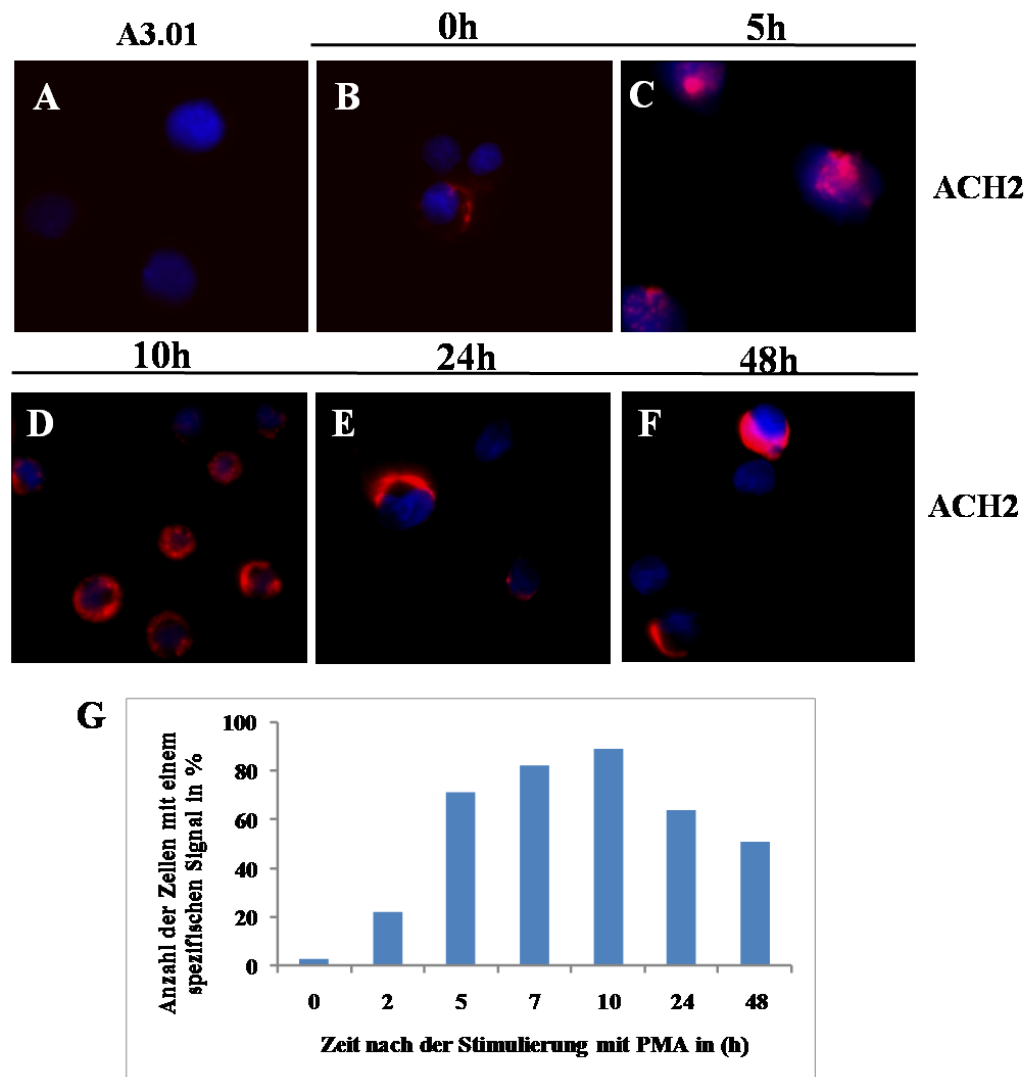


Abb. 3.1.4 Nachweis der HIV-1-RNA mit Hilfe der HIV-spezifischen RNA-FISH in einzelnen ACH2-Zellen nach Stimulation mit PMA

blau: Zellkerne nach DAPI-Färbung; rot: spezifisches Signal der intrazellulären HIV-RNA (Cy3-Filter): (A) Negativkontrolle: Zellen der HIV-negativen T-Zelllinie A3.01, (B) Nicht-stimulierte ACH2-Zellen; (C) bis (F) ACH2-Zellen nach unterschiedlicher Stimulationsdauer mit PMA: (C) 5 h, (D) 10 h, (E) 24 h und (F) 48 h nach Beginn der Stimulierung. (G) Relative Anzahl der FISH-positiven Zellen nach unterschiedlich langer Stimulation mit PMA.

Zur Überprüfung, ob sich die HIV-spezifische RNA-FISH auf primäre Zellen übertragen lässt, wurden HIV-Ex-Vivo-Infektionsstudien durchgeführt. Dafür wurden 3×10^6 PBMC von HIV-negativen Donoren über Nacht mit dem Lektin PHA in einer Konzentration von 2,5 µg/ml stimuliert. Am folgenden Tag erfolgte die Trennung der aktivierten PBL von der adhärennten Monozytenpopulation und die Infektion dieser mit dem HIV_{Lai}-Virusstock (18,3 ng p24 pro Ansatz). An Tag 4 bis Tag 8 nach der Infektion wurden die Zellen mit 4 % PFA für die RNA-FISH fixiert. In parallelen Infektionsansätzen wurde zur Kontrolle AZT in einer Konzentration von 10 µM zugegeben (Mitsuya et al. 1985). AZT ist ein Nukleosidanalogen und wird als triphosphorylierte Form während der reversen Transkription in den neu-synthetisierten DNA-Strang eingebaut, was zum Kettenabbruch führt und die reverse Transkription somit verhindert. In zusätzlichen Experimenten wurde der Effekt des Fusionsinhibitors T20 untersucht. Dieser wirkt auf der Ebene der Verschmelzung der Virusmembran mit der Wirtsmembran und verhindert somit die Aufnahme der Viruspartikel (Kilby et al., 1998). Für die Ex-Vivo-Infektion mit HIV_{Lai} wurde T20 in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt (Neumann et al., 2005). In Abb. 3.1.5 ist das Resultat der HIV-spezifischen RNA-FISH der Proben von Tag 5 nach der Infektion dargestellt. In den *ex vivo* infizierten PBL war die HIV-RNA als intensiv leuchtendes Signal im Zytoplasma zu erkennen (Abb. 3.1.5 B und D). Die eingesetzten Mengen an AZT und T20 waren ausreichend, um die HIV-Replikation und den Viruseintritt vollständig zu hemmen. Mit Hilfe der HIV-spezifischen RNA-FISH wurde bei diesen Ansätzen keine HIV-RNA nachgewiesen (siehe Abb. 3.1.5 A und C). Anhand dieser Ergebnisse kann auf eine inhibierende Wirkung von AZT und T20 auf die Virusausbreitung im Zellkultursystem während einer Inkubation der Zellen über einen längeren Zeitraum geschlossen werden.

Viele der *in vivo* mit HIV-infizierten Zellen sind latent infiziert. Um transkriptionsaktive HIV-Varianten nachweisen zu können, muss die HIV-Transkription in diesen Zellen zunächst aktiviert werden. Um herauszufinden, ob der Fusionsinhibitor T20 eine hemmende Wirkung auf die Virusreaktivierung hat, wurden Zellen der T-Zelllinie ACH2, mit einem Mix aus verschiedenen Zytokinen (IL-2 (100 U/ml), IL-6 (5 ng/ml) und TNF α (2,5 ng/ml)) behandelt und 10 h nach der Stimulation mit 4 % PFA fixiert (Chun et al., 1998). In einem Parallelansatz wurde der Fusionsinhibitor T20 in einer Konzentration von 10 μ g/ml 30 min vor der Reaktivierung hinzugegeben. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der HIV-spezifischen RNA-FISH ergab, dass in beiden Ansätzen ein intensiv leuchtendes Signal in Rot im Zytoplasma zu erkennen ist (Abb. 3.1.5 E und F). T20 hat demnach keinen inhibierenden Effekt auf die Reaktivierung der HIV-Expression.

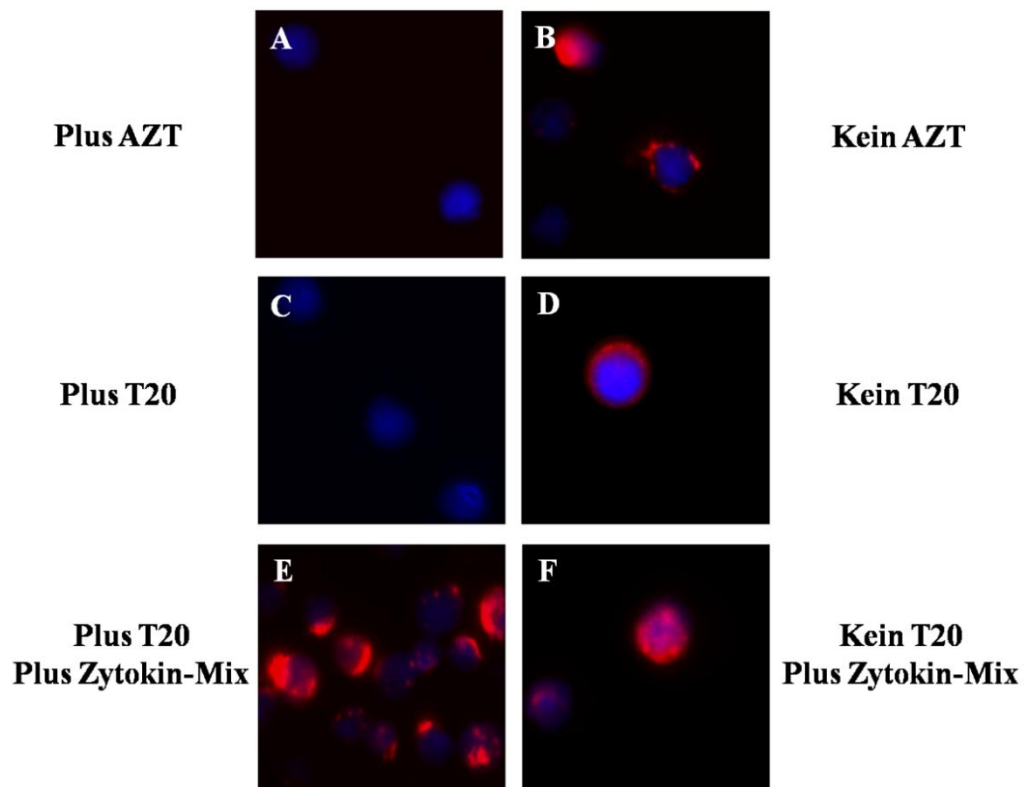


Abb. 3.1.5 Hemmung der HIV_{Lai}-Vermehrung durch den Reverse-Transkriptase-Inhibitor AZT und den Fusionsinhibitor T20

blau: Zellkerne nach DAPI-Färbung; rot: spezifisches Signal der intrazellulären HIV-RNA (Cy3-Filter). Die HIV-spezifische RNA-FISH wurde mit verschiedenen *ex vivo* Infektionsansätzen HIV-negativer PBL durchgeführt: (A) plus AZT, (B) ohne AZT, (C) plus T20, (D) ohne T20. (E) und (F) ACH2-Zellen 10 h nach der Stimulierung mit einem Zytokin-Mix (IL-2, IL-6 und TNF α) (E) plus T20 oder (F) ohne T20.

Zum Nachweis der HIV-RNA in primärem Probenmaterial wurden MNC aus der Milz eines HIV-positiven Patienten verwendet, die uns von Prof. Simon Wain-Hobson, Institut Pasteur, Paris, zur Verfügung gestellt wurden. Zur Zeit der Entnahme befand sich der Patient in der klinischen Phase B1 und besaß eine CD4-T-Zellzahl von 583 pro μ l Blut und eine Viruslast von 5900 Kopien pro ml Plasma. Die Analysen wurden mit Zellen sekundärer lymphatischer Organe vorgenommen, weil sie die wichtigsten Replikationsorte von HIV darstellen und man dort mit 1/17-1/190 eine weitaus höhere Infektionsfrequenz als im peripheren Blut findet (McIlroy et al., 1995).

Die experimentelle Vorgehensweise ist in Abb. 3.1.6 A skizziert. Das Probenmaterial aus der Milz wurde gemäß dem Standardprotokoll aufgetaut und die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in einer 12-Lochplatte ausgesät. Der Fusionsinhibitor T20 wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt, um eine Virusausbreitung im Zellkultursystem auszuschließen. Nach einer 30-minütigen Vorinkubation wurde die HIV-Expression durch Zugabe des Lektins PHA in einer Konzentration von 2,5 µg/ml induziert und die MNC zwei Tage später mit 4 % PFA fixiert. Die HIV-spezifische RNA-FISH wurde mit einem Mix aus einzelsträngigen RNA-Sonden durchgeführt, die zusammen 40 % des HIV-Genoms abdecken. Als Negativkontrolle wurden PBL von HIV-negativen Blutspendern eingesetzt. Die HIV-positiven MNC zeigten ein spezifisches Signal in Rot, das auf eine Seite des Zytoplasmas beschränkt war (siehe Abb. 3.1.6 B). Dabei wiesen von 100 Zellen ungefähr zwei bis drei Zellen ein spezifisches FISH-Signal auf. Des Weiteren konnte mit der RNA-FISH die Lokalisierung der HIV-RNA in der gegenüberliegenden Zytoplasmaregion zweier aneinander grenzender Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 3.1.6 B, Bild c).

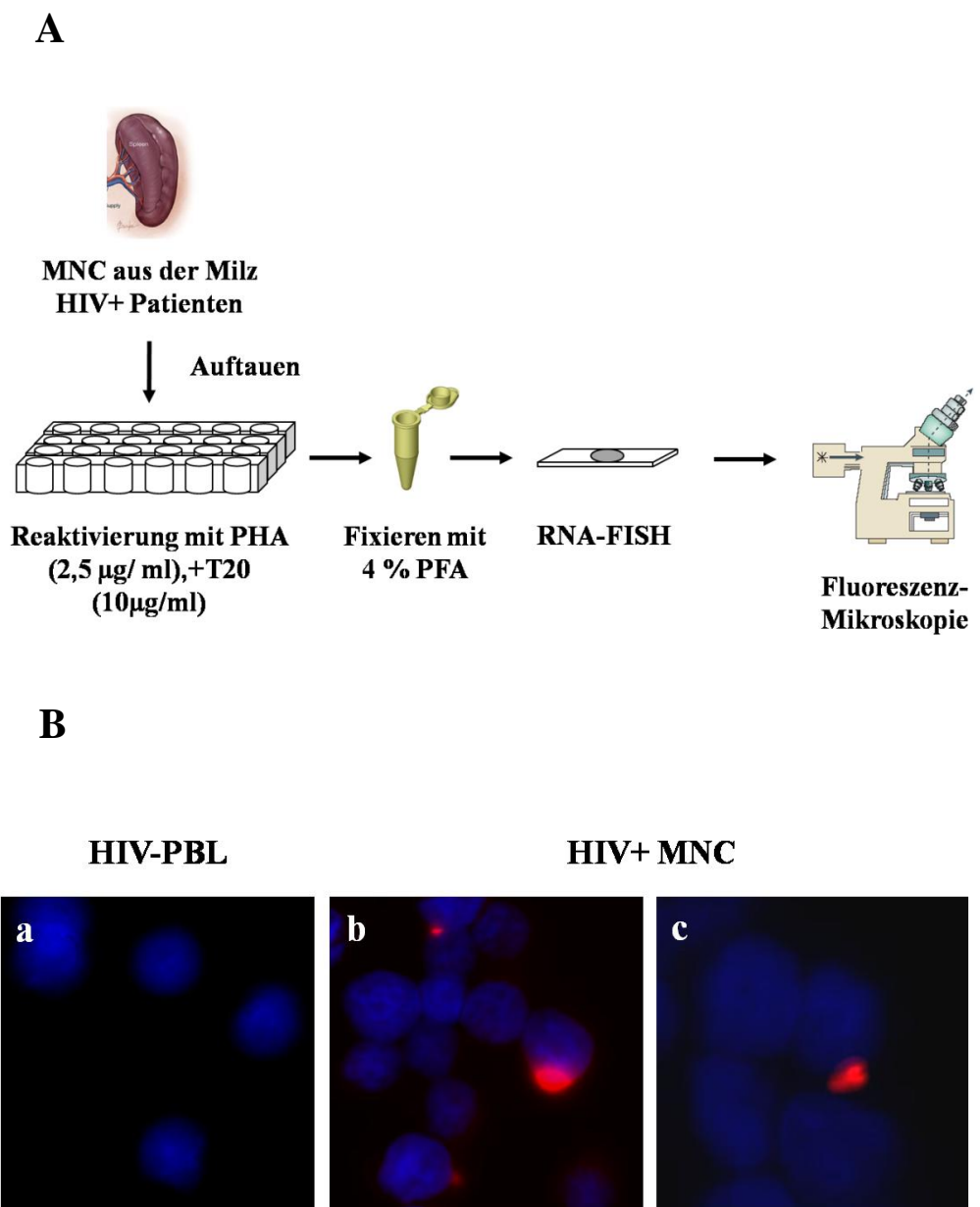


Abb. 3.1.6 Analyse der MNC aus der Milz eines HIV-positiven Patienten

(A) Die MNC wurden aufgetaut und in einer Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in einer 12-Lochplatte ausgesät. Zur Stimulierung diente PHA. Durch Zugabe von T20 wurde die Ausbreitung von HIV in der Zellkultur verhindert. Zwei Tage nach der HIV-Reaktivierung wurden die Zellen mit 4 % PFA für die RNA-FISH fixiert. (B) blau: Zellkerne nach DAPI-Färbung; rot: spezifisches Signal der HIV-RNA (Cy3-Filter): (a) Negativkontrolle: PBL eines HIV-negativen Donors; (b) MNC aus der Milz eines HIV-positiven Patienten; (c) zwei aneinander grenzende MNC aus der Milz eines HIV-positiven Patienten.

3.1.2. Versuche zur Entwicklung eines hoch sensitiven Systems zur Amplifizierung von HIV-1-Transkripten FISH-positiver Zellen auf Einzelzellebene

Um eine Sequenzanalyse transkriptionsaktiver HIV-Varianten zu ermöglichen, muss die HIV-RNA nach spezifischer RNA-FISH und Einzelzellisolierung amplifiziert werden. Solch ein System zur Einzelzellanalyse ist technisch sehr anspruchsvoll und besteht aus zahlreichen experimentellen Schritten, die in Abb. 3.1.7 dargestellt sind. Mit dem PHA-stimulierten HIV-positiven Probenmaterial wird nach zwei Tagen eine HIV-spezifische RNA-FISH durchgeführt. Die FISH dient zur Identifizierung der HIV-RNA in einzelnen infizierten Zellen. Die FISH-positiven Zellen wurden anschließend markiert und über Laser-Mikrodissektion einzeln isoliert. Die FISH muss auf speziellen Objektträgern durchgeführt werden, die mit einer Polyethylennaphthalat-Membran (PEN-Membran) überschichtet sind. Nach Aufreinigung der RNA einer einzelnen Zelle mittels des "Nano Scale RNA Purification"-Kits der Firma Epicentre, sollte die geringe RNA-Menge mit einer modifizierten Version des "MessageBOOSTER™"-Systems von Epicenter über einen *in vitro* Transkriptionsschritt zusätzlich amplifiziert werden. Der letzte Schritt besteht aus einer RT-PCR der hypervariablen V1/V2-Region des *env*-Gens und anschließender Sequenzanalyse.

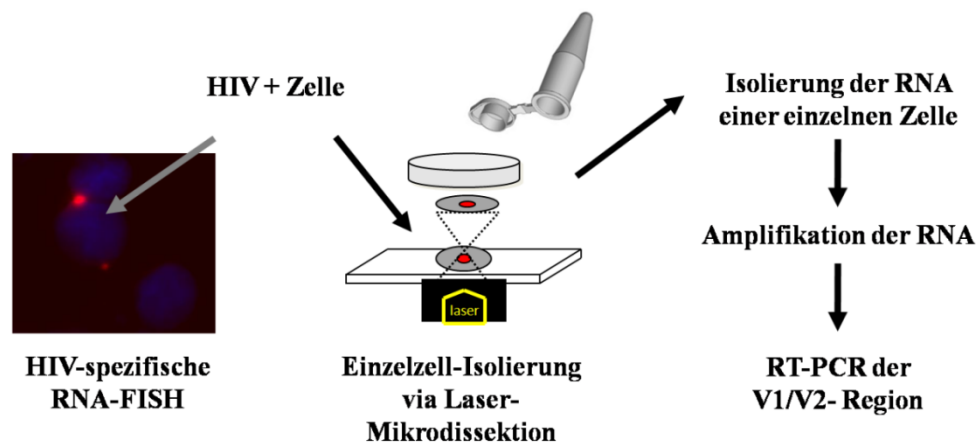


Abb. 3.1.7 Experimentelles Schema zur Einzelzellanalyse von HIV-1 Transkripten

Nach der Reaktivierung der HIV-Transkription der MNC aus der Milz HIV-positiver Patienten über PHA, in Anwesenheit von T20 werden die HIV-Transkripte mit einer HIV-spezifischen RNA-FISH identifiziert. Eine einzelne RNA-FISH-positive Zelle wird darauf folgend mittels Laser-Mikrodissektion isoliert, die RNA aufgereinigt, amplifiziert und eine RT-PCR der V1/V2 Region durchgeführt, deren Produkt für eine Sequenzanalyse verwendet werden kann.

Da die RT-PCR auf Einzelzellebene vorgenommen werden sollte, musste die Sensitivität der "nested"-PCR zur Amplifikation der hypervariablen V1/V2-Region des *env*-Bereichs in einem Kontroll-Versuch überprüft werden. Dazu wurde mit dem Plasmid pBru, das eine HIV-Vollängensequenz beinhaltet, eine Verdünnungsreihe durchgeführt, so dass pro Ansatz 10^3 Moleküle bis 1 Molekül vorlagen. Diese Verdünnungsstufen dienen als Matrize für die zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen mit dem äußeren Primerpaar LV15/LV13 und dem inneren Primerpaar SK122/SK123. Das Amplifikat wurde in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Nach der ersten Runde der PCR ist ein Produkt bei 443 bp bei den Verdünnungen von 10^2 und 10^3 Molekülen zu erkennen, nach der folgenden zweiten PCR ist zusätzlich bei der Verdünnung von 10 pBru Molekülen eine Bande bei 275 bp zu erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass mit dieser hoch sensitiven PCR-Technik bis zu 10 HIV-Moleküle nachgewiesen werden können (siehe Abb. 3.1.8 A).

Da die Analysen auf RNA-Ebene stattfinden sollten, war der folgende Schritt die Austestung der RT-PCR mit Zellen der HIV-positiven Zelllinie ACH2. Diese wurden in einer Dichte von 1×10^6 /ml ausgesät und mit PMA (10 μ M) stimuliert. 18 Stunden nach der Induktion wurde eine Verdünnungsreihe der ACH2-Zellen durchgeführt, damit pro Reaktionsansatz von 10^4 ACH2-Zellen bis eine Zelle vorlagen. Die RNA der einzelnen Ansätze wurde mittels "Nano Scale RNA-Purification Kit" der Firma Epicenter aufgereinigt. Darauf folgten die reverse Transkription mit Hexanukleotid-Primern und die "nested"-PCR. Die HIV-RNA einer einzelnen ACH2-Zelle konnte so nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um auszutesten, ob auch die HIV-RNA einzelner PFA-fixierter Zellen amplifiziert werden kann, wurden Zellen der Zelllinie ACH2 in einer Dichte von 1×10^6 /ml ausgesät und die HIV-Expression mittels PMA (10 μ M) induziert. Die Fixierung der Zellen erfolgte 10 h nach der Stimulation mit 4 % PFA für 20 min bei 4 °C. Die HIV-spezifische RNA-FISH wurde unter Berücksichtigung verschiedener Modifikationen vorgenommen. Zum einen wurde die FISH, für die spätere Laser-Mikrodissektion, auf Objektträgern durchgeführt, die mit einer PEN-Membran überschichtet waren. Außerdem erfolgte die Hybridisierung mit einem Sondenmix ohne den *env*-Bereich (ohne die Fragmente HIV-6 bis HIV-8), um eine spätere PCR-Amplifizierung der Sonden-Sequenz auszuschließen. Desweiteren geschah das stringente Waschen und die Detektion der RNA-Sonde unter RNase-freien Bedingungen, um einem Verlust der HIV-RNA vorzubeugen. Daran schloss sich die Isolierung der FISH-positiven Zellen über Laser-Mikrodissektion an. Es wurden 50 Zellen, 20 Zellen, zehn Zellen, sowie zahlreiche einzelne Zellen in den Deckel eines Reaktionsgefäßes katapultiert, der mit einer speziellen adhäsiven Schicht versehen war. Der folgende Schritt war die Aufreinigung der RNA mit Hilfe des "Nano Scale RNA Purification Kit". Der Proteinase K Verdau erfolgte bei diesen Versuchen für 1h bei 60 °C, damit die Quervernetzungen zwischen den zellulären Proteinen und der RNA, die während der Fixierung mit 4 % PFA entstehen, wieder aufgebrochen werden. Eine zusätzliche Variation war der Einsatz der TurboDNase der Firma Ambion für eine Stunde bei 37 °C. Die

gesteigerte katalytische Aktivität dieses Enzyms bezüglich der Degradierung der DNA war für die Entfernung möglicher DNA-Kontaminationen von besonderer Bedeutung. Daran schlossen sich die reverse Transkription sowie die aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen und die Kontrolle mittels Gelelektrophorese an. Bei den Ansätzen mit 50 Zellen, 20 Zellen bzw. zehn Zellen konnte die HIV-RNA amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Die RNA-Amplifikation der V1/V2-Region des *env*-Gens gelang auch bei einer einzelnen HIV-positiven Zelle der T-Zelllinie ACH2 (siehe Abb. 3.1.8 B). Wie hier abgebildet, war von den neun einzelnen isolierten Zellen nur bei einer Probe eine Bande bei 275 bp zu erkennen. In weiteren Experimenten dieser Form konnte diese Schwankungen in der Sensitivität weiterhin beobachtet werden. Für die Analysen der HIV-Transkripte von primärem Probenmaterial sind diese Schwankungen jedoch problematisch, da wie oben beschrieben mit der HIV-spezifischen RNA-FISH nur in 2 bis 3 % der MNC aus der Milz eines HIV-positiven Patienten die HIV-RNA detektiert werden konnte.

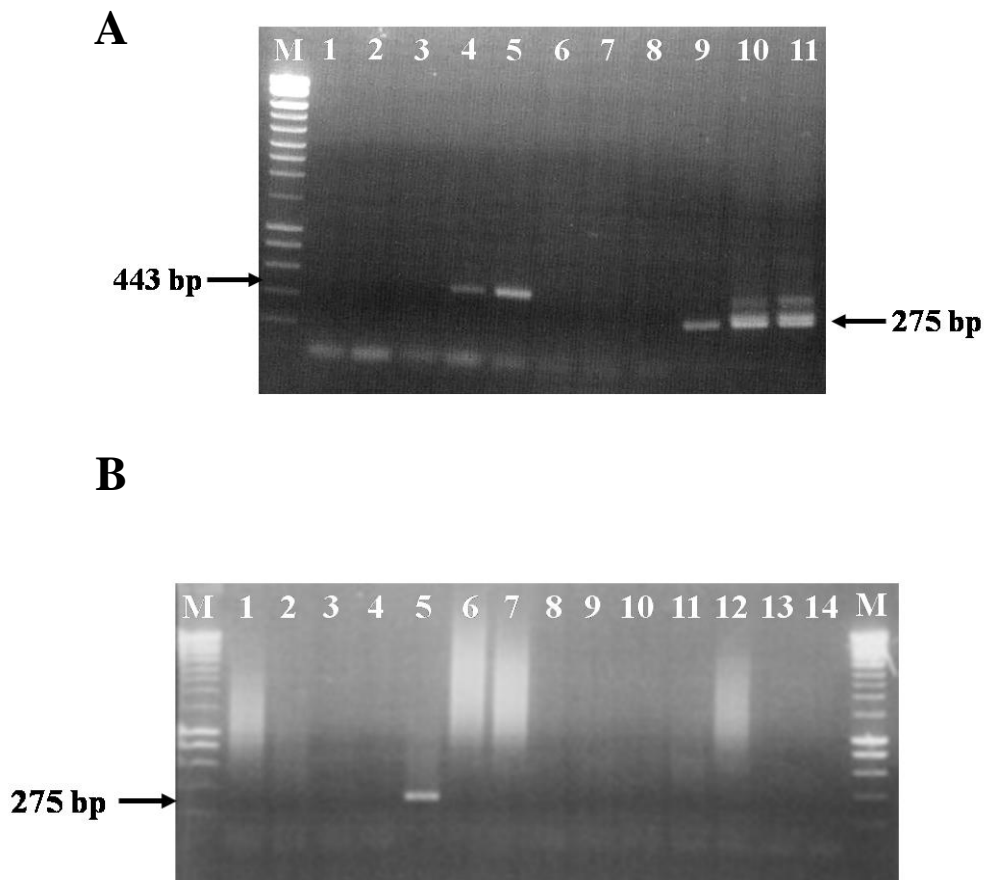


Abb. 3.1.8 Gelelektrophoretische Auftrennung nach der "nested"-PCR zur Amplifizierung der hypervariablen V1/V2-Region des *env*-Gens von HIV-1

(A) Verschiedene Verdünnungsstufen des Plasmids pBru: M = Marker, (1) Negativkontrolle der 1. PCR, (2) bis (5) erste PCR mit Verdünnungsstufen des pBru-Plasmides: (2) ein Molekül, (3) 10 Moleküle, (4) 10^2 Moleküle, (5) 10^3 Moleküle, (6) Negativkontrolle aus 1. PCR, (7) Negativkontrolle der 2. PCR, (11) bis (14) zweite PCR mit Verdünnungsstufen des pBru-Plasmides (11) ein Molekül, (12) 10 Moleküle, (13) 10^2 Moleküle, (14) 10^3 Moleküle. (B) "Nested"-PCR nach Isolierung einzelner FISH-positiver ACH2-Zellen mittels Laser-Mikrodissektion: M= Marker, (1) eine ACH2-Zelle ohne RTase, (2) bis (10) eine ACH2-Zelle plus RTase, (11) und (12) Negativkontrolle der 1. PCR, (13) und (14) Negativkontrolle der 2. PCR.

Um eine Sensitivitätssteigerung bei der HIV-RNA-Amplifikation einer einzelnen infizierten Zelle nach RNA-FISH zu erreichen, wurde ein Verfahren angewandt, bei dem über einen In-Vitro-Transkriptionsschritt die geringe Ausgangsmenge der RNA zusätzlich amplifiziert wird. Im ersten Schritt werden der isolierten RNA T7-Oligo(dT)-Primer zugesetzt. Diese binden an den Poly-(A)-Schwanz der RNA und können über die sich anschließende T7-Polymerasezugabe die mRNA kopieren. Dadurch wird eine große Menge an neuer RNA synthetisiert und somit die Gesamt-RNA einer einzelnen Zelle amplifiziert (Van Gelder et al., 1990). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine modifizierte Version des "MessageBOOSTER™"-Systems der Firma Epicenter angewandt. Dafür wurden Primer entwickelt, die in der hypervariablen *env*-Region des HIV-Genoms binden und eine T7-Promotor-Sequenz enthielten. Der Einsatz dieser Primer war notwendig, da die Fixierung der Zellen mit PFA zu einer Degradierung der intrazellulären RNA zu Fragmenten von ungefähr 500 Nukleotiden führt (Klimecki et al., 1994). Der Abstand des Poly-(A)-Schwanzes zum *env*-Bereich des HIV-Genoms ist jedoch größer als 500 Nukleotide, weshalb die neuen Primer entworfen wurden. Die Amplifizierung der HIV-RNA einzelner Zellen mit dem "MessageBOOSTER™"-System erfolgte nach Angaben des Herstellers und schloss sich der Laser-Mikrodissektion einzelner FISH-positiver Zellen der T-Zelllinie ACH2 nach Aufreinigung der RNA mit Hilfe des "Nano Scale RNA Purification Kit" an. Da dieses Verfahren aus mehreren Teilschritten besteht und die RNA einer einzelnen Zelle amplifiziert werden sollte, mussten verschiedene Kontrollen vorgenommen werden. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit 50 pg der im Kit enthaltenden Kontroll-RNA ("Normal Rat Kidney") durchgeführt und der Erfolg über eine PCR mit im Kit enthaltenen Primern zur Amplifikation der Porphobilinogen Deaminase mRNA überprüft. Des Weiteren wurden als Negativkontrolle der Elutionspuffer des "Nano Scale RNA-Purification Kit", eine H₂O-Kontrolle und eine Kontrolle des im Kit enthaltenen RNase-freien H₂O mitgeführt. Bei drei Proben mit der HIV-RNA einer einzelnen Zelle erfolgte die Durchführung des "MessageBOOSTER™"-Systems mit den T7-Oligo(dT)-Primer, wobei bei drei weiteren Ansätzen die

neu entworfenen Primer zum Einsatz kamen. Nach der "nested"-PCR war bei einer der Proben mit den HIV-spezifischen T7-Primern eine Bande bei 275 bp zu erkennen, was auf den ersten Blick auf eine erfolgreiche Amplifikation der HIV-RNA einer einzelnen Zelle hindeutete. Die Isolierung der Gelbande zur Klonierung für eine Sequenzanalyse ergab jedoch, dass es sich um eine Kontamination mit HIV-1SFB2, einem retroviralen Vektor handelte. Die HIVBru-Sequenz einer einzelnen ACH2-Zelle wurde nicht spezifisch amplifiziert (Daten nicht gezeigt). Dieses Resultat demonstriert, dass durch die zahlreichen Einzelschritte während der Versuchsdurchführung an vielen Stellen eine hohe Kontaminationsgefahr gegeben ist.

Ein großer Nachteil des "MessageBOOSTER™"-Systems ist die Anfälligkeit für Kontaminationen. Ein weiteres Problem stellt der Einsatz des quervernetzenden Fixativs PFA dar, der die direkte Amplifikation der HIV-RNA über eine RT-PCR erschwert. In einem letzten Schritt wurde überprüft, ob die HIV-RNA unter Verwendung alternativer Fixierlösungen mit unserem FISH-Protokoll detektiert werden konnte. Die Zellen der HIV-positiven T-Zelllinie ACH2 wurden mittels PMA (10 µM) stimuliert und die Zellen 18 h nach der Induktion mit verschiedenen Fixativen bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit Methanol für 30 min, mit 70 % Ethanol für 30 min, mit Aceton für 30 min, mit 4 % Glutaraldehyd für 20 min und mit 4 % PFA für 20 min fixiert. Als Negativkontrolle dienten für jeden Ansatz die Zellen der HIV-negativen T-Zelllinie A3.01. Die Durchführung der RNA-FISH erfolgte unter Standardbedingungen mit dem Sondenmix, der die Sondenfragmente enthielt, die an 40 % des HIV-Genoms hybridisieren. In den ACH2-Zellen, die mit Methanol, 70 % Ethanol und Aceton behandelt wurden, war kein Signal im Zytoplasma zu erkennen. Der Einsatz des quervernetzenden Fixativs Glutaraldehyd führte zu einer unspezifischen, intensiv leuchtenden Hintergrundfluoreszenz in den HIV-negativen A3.01-Zellen, weshalb das intensiv leuchtende Signal in den ACH2-Zellen ebenfalls als unspezifische Hintergrundfluoreszenz angesehen werden muss. Nur der Einsatz von 4 % PFA zeigte das optimale Resultat. Bei den ACH2-Zellen war ein spezifisches intensiv leuchtendes HIV-RNA Signal zu erkennen (siehe Abb. 3.1.9). Die

hoch sensitive Detektion der HIV-RNA war also nur mit dem Fixativ PFA möglich.

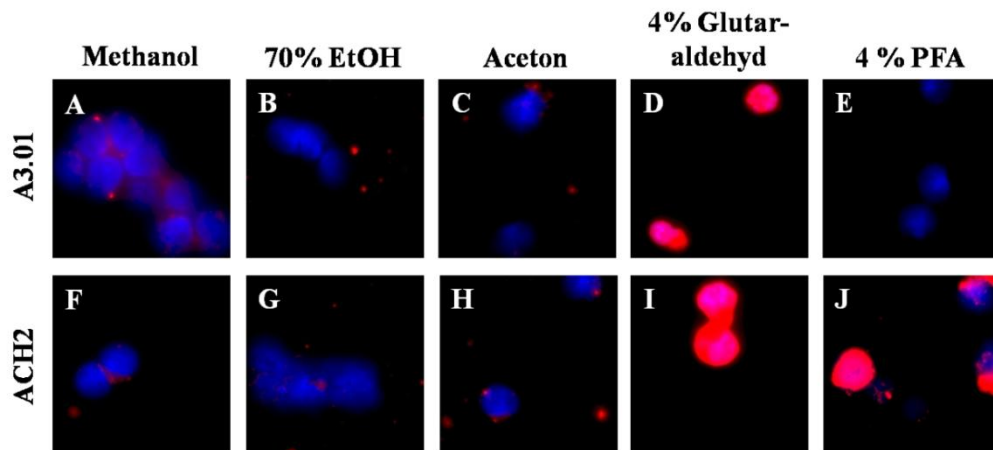


Abb. 3.1.9 Verwendung verschiedener Fixative für die HIV-spezifische RNA-FISH

blau: Zellkerne nach DAPI-Färbung; rot: spezifisches Signal der HIV-RNA (Cy3-Filter): In der oberen Reihe ist die HIV-negative Zelllinie A3.01 und in der unteren Reihe die HIV-positive Zelllinie ACH2 nach Induktion der HIV-Transkription mit PMA abgebildet. Die Zellen wurden mit Methanol (A, F), mit 70%-igem Ethanol (B, G), mit Aceton (C, H), mit 4 % Glutaraldehyd (D, I) und mit 4 % PFA (E, J) fixiert.

Zusammenfassend zeigte dies, dass wichtige Teilversuche zur Entwicklung eines Systems zur Analyse der transkriptionellen Aktivität multipler Proviren experimentell erfolgreich abgeschlossen werden konnten: (1) Modifizierung unseres RNA-FISH-Protokolls zur spezifischen Detektion der HIV-RNA in 2 bis 3 % der MNC aus der Milz eines HIV-positiven Patienten nach Virusreaktivierung mit PHA, (2) Inhibition der Virusausbreitung im Zellkultursystem durch den Einsatz des Fusionsinhibitors T20 in einer Konzentration von 10 µg/ml, (3) Isolierung einzelner RNA-FISH-positiver Zellen über Laser-Mikrodissektion. Da es trotz mehrfacher Versuche nicht gelang, die RNA nach RNA-FISH und Einzelzellisolierung mittels PCR zu amplifizieren, konnte die beschriebene Methode nicht zur HIV-Transkriptionsanalyse auf Einzelzellebene angewandt werden. Die Arbeit an diesem Teilprojekt wurde an dieser Stelle nicht weitergeführt.

3.1.3. Simultane Detektion von viraler RNA und Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Kooperation mit Prof. Juana Diez der Universität Pompeu Fabra, Barcelona. Der Forschungsschwerpunkt ihrer Arbeitsgruppe liegt in der Analyse zellulärer Faktoren, insbesondere der Rolle zellulärer Prozessierungskörpern ("P-bodies"), im Replikationsprozess von Plus-Strang-RNA-Viren. "P-Bodies" sind intrazellulär abgegrenzte RNA-Protein-Strukturen, in denen die zelluläre mRNA degradiert oder für spätere Translationsvorgänge zwischengelagert wird (Bregues et al., 2005; Cougot et al., 2004; Sheth et al., 2003). Da das Genom von Plus-Strang-RNA-Viren, wie dem Hepatitis-C-Virus, den Eigenschaften der zellulären mRNA ähnelt, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass "P-Bodies" auch bei der Replikation dieser Viren eine wichtige Rolle spielen. Von dort aus könnte die virale RNA entweder in neue Viruspartikel verpackt oder wieder in den Translationsprozess rekrutiert werden. Die "P-Bodies" würden somit eine regulierende Funktion für die Synthese viraler Proteine und den Zusammenbau neuer Viruspartikel einnehmen. Ein Ziel dieses Forschungsvorhabens ist die Ko-Lokalisation der HCV-RNA in den "P-Bodies". Entsprechend sollte eine Methode zur simultanen Detektion von RNA und Proteinen in einer Zelle etabliert werden.

Um den simultanen Nachweis viraler RNA und viraler Proteine in einer einzelnen Zelle zu überprüfen, wurde in einem Modellversuch das hier etablierte HIV-RNA-Protokoll mit einer Immunfluoreszenz (IF) zur Detektion der HIV-Kapsid-Proteine kombiniert. Dazu wurden die Zellen der HIV-positiven T-Zelllinie ACH2 mit 0,2 % Triton-X 100 permeabilisiert. Dadurch wurde eine Zugänglichkeit der HIV-RNA in den Zellen erreicht und gleichzeitig wurden die Ziel-Epitope für die IF nicht zerstört. Die Detektion der DIG-markierten RNA-Sonde erfolgte mit Hilfe des TSATM-Systems, wobei in dem letzten Schritt FITC-konjugiertes Streptavidin verwendet wurde. Die IF wurde mit dem Phycoerythrin-gekoppelten HIV-Kapsid-spezifischen

Antikörper KC57-RD1 durchgeführt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 3.1.10 dargestellt. In einer einzelnen ACH2-Zelle ist 10 h nach der Stimulierung mit PMA (10 μ M) das spezifische Signal der HIV-RNA in Grün und gleichzeitig das Kapsid-Protein in Rot zu erkennen. Die spezifischen Signale sind dabei über das gesamte Zytoplasma verteilt. Als Negativkontrolle dienten Zellen der HIV-negativen T-Zelllinie A3.01. Die Kombination dieser beiden Techniken ist somit in unserem Labor etabliert und kann in anderen Projekten zur Ko-Lokalisation viraler RNA und zellulärer Proteine eingesetzt werden.

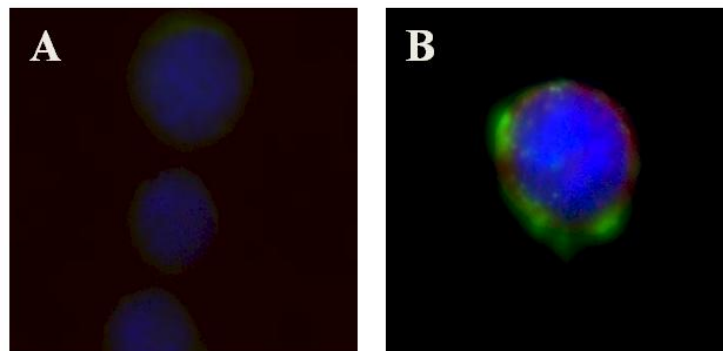


Abb. 3.1.10 Simultane Detektion der HIV-RNA mittels RNA-FISH und der HIV-Kapsid-Proteine mittels IF

blau: Zellkerne nach DAPI-Färbung; grün: spezifisches Signal der HIV-RNA nach der RNA-FISH (FITC-Filter); rot: spezifisches Signal der HIV-Kapsid-Proteine nach IF (Cy3-Filter); (A) HIV-negative T-Zelllinie A3.01, (B) ACH2-Zellen nach PMA-Stimulierung.

Um den Nachweis der HCV-RNA in den "P-Bodies" zu ermöglichen, wurde eine HCV-spezifische RNA-FISH etabliert. Als Ausgangsprotokoll diente unser HIV-spezifisches RNA-FISH-Protokoll, das entsprechend modifiziert wurde. Die Detektion der HCV-RNA erfolgte mit einer Biotin-markierten DNA-Sonde, die über Nick-Translation des Plasmides APP23, das die HCV-

Vollängensequenz enthielt, hergestellt wurde. Als Zielzellen dienten mit HCVcc-infizierte Zellen der Leberkarzinom-Zelllinie Huh7.5. Der Erfolg der produktiven HCV-Infektion wurde über eine IF des viralen Nichtstrukturproteins NS5A überprüft (siehe Abb. 3.1.11 B). Die Permeabilisierung der Zielzellen erfolgte mit 0,2 % Triton-X 100. Dadurch wurde eine Zugänglichkeit der HCV-RNA erreicht, gleichzeitig die Ziel-Epitope für eine spätere IF nicht zerstört. Nach der Detektion der Biotinmarkierten DNA-Sonde mit Hilfe eines TSATM-Systems wurde das spezifische Signal der HCV-RNA in einer punktuellen Verteilung im Zytoplasma infizierter Huh7.5-Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 3.1.11 D). Als Negativkontrolle der FISH dienten nicht-infizierte Zellen der Zelllinie Huh7.5. Das punktuelle Verteilungsmuster der HCV-RNA deutet darauf hin, dass die HCV-RNA möglicherweise in den "P-Bodies" vorkommt. Um dies zu bestätigen, muss in zukünftigen Ko-Lokalisationsstudien die HCV-spezifische RNA-FISH mit einer Immunfluoreszenz zur Detektion von "P-Body"-Proteinen kombiniert werden. Die experimentellen Voraussetzungen konnten im Rahmen dieser Arbeit in unserem Labor etabliert werden.

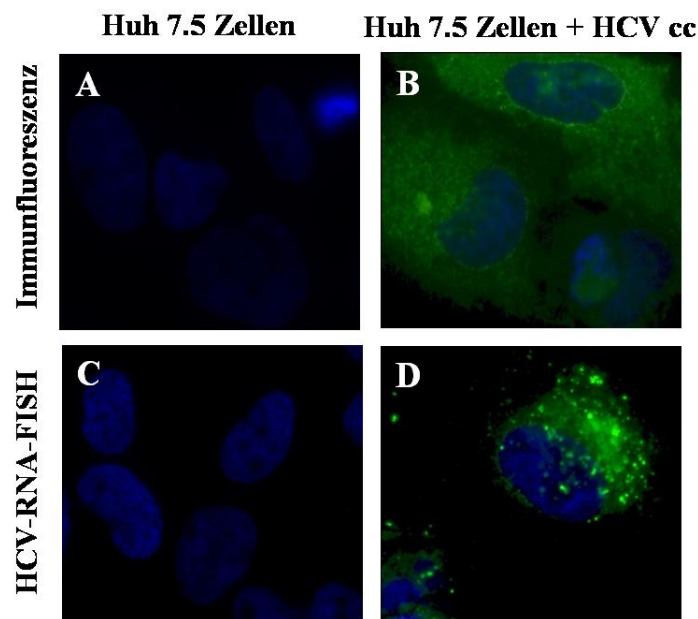


Abb. 3.1.11 Immunfluoreszenz (IF) mit anti-NS5a-Antikörpern und spezifische Detektion der HCV-RNA mittels RNA-FISH

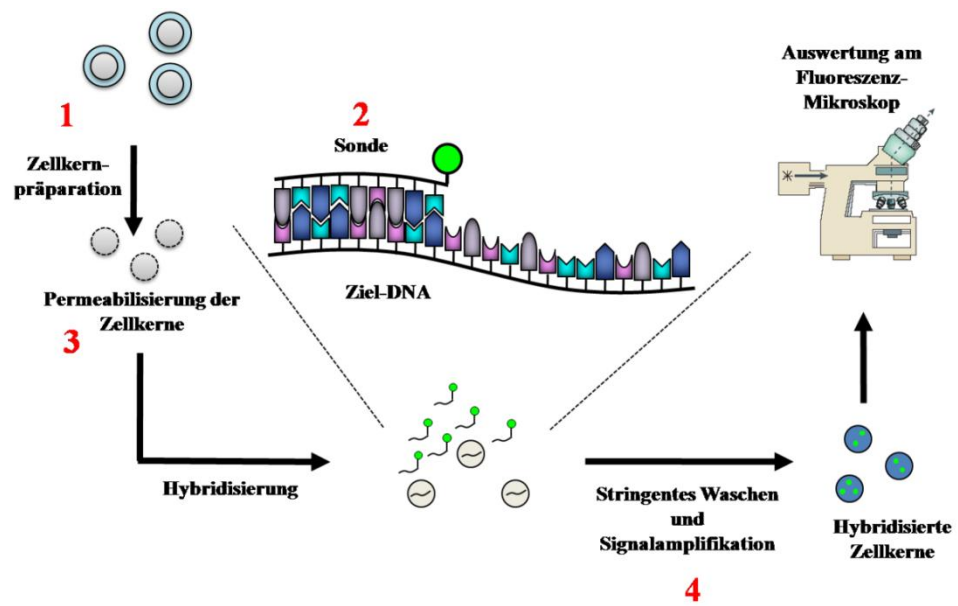
blau: Zellkerne nach DAPI-Färbung; (B) grün: Signal der Immunfluoreszenz des HCV-NS5A Proteins; (D) grün: spezifisches Signal der HCV-RNA nach RNA-FISH: (A) Negativkontrolle der IF: Zellen der Zelllinie Huh7.5, (B) HCVcc-infizierte Huh7.5-Zellen nach IF, (C) Negativkontrolle der RNA-FISH: Zellen der Zelllinie Huh7.5, (D) HCVcc-infizierte Huh7.5-Zellen nach der HCV-spezifischen RNA-FISH.

3.2. Optimierung der HIV-spezifischen DNA-FISH

Die hoch sensitive Methode der HIV-spezifischen DNA-FISH zum Nachweis proviraler Sequenzen in einzelnen infizierten Zellen ist von großer Bedeutung zur Analyse grundlegender Prozesse der Virusevolution auf Einzelzellebene. Die Größe der Ziel-Nukleinsäuren einzelner proviraler Sequenzen innerhalb der Zellkerne liegt mit ungefähr 9 kb an der unteren Detektionsgrenze, weshalb das Resultat der FISH gewissen Schwankungen bezüglich der Signalintensität und dem verstärkten Auftreten einer unspezifischen Hintergrundfluoreszenz auf den Objektträgern unterliegt. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit erfolgte die systematische Optimierung der HIV-spezifischen DNA-FISH, damit diese Technik reproduzierbar mit einer ausreichenden Signalintensität

verlässlich eingesetzt werden kann. Da die FISH aus mehreren Teilschritten besteht, die an jede neue Fragestellung angepasst werden muss, eröffnen sich zahlreiche Möglichkeiten der Modifikation einzelner Parameter (siehe Abb. 3.2.1). Eine Zusammenfassung und eine detaillierte Beschreibung der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Veränderung findet sich in Tab. 3.1

- (1) Bei der Präparation der Zellkerne wurde die KCl-Konzentration der hypotonen Lösung und die Inkubationsdauer mit dieser verändert sowie die Zellkern-Fixierung und -Aufreinigung.
- (2) Bei der Herstellung HIV-spezifischer Biotin-markierter DNA-Sonden über Nick-Translation wurden Sonden-Fragmente verschiedener Länge erzeugt und die Auswirkung der Sonden-Größe auf das Signal-Hintergrund Verhältnis ausgetestet.
- (3) Um eine optimale Zugänglichkeit der Ziel-DNA in den Zellen zu erzielen, gibt es verschiedene Möglichkeiten der Permeabilisierung. Zum einen können die Zellkerne über einen proteolytischen Verdau mit Pepsin permeabilisiert werden, was eher als "milde" Vorbehandlung angesehen werden kann, zum anderen können die Zellen auch unter "härteren" Bedingungen vorbehandelt werden, wie z. B. mit einer zusätzlichen Behandlung mit Natriumthiocyanat (NaSCN) bei 80°C oder durch Kochen in einem Dampfkochtopf. All diese Bedingungen wurden experimentell überprüft.
- (4) Das stringente Waschen nach der Hybridisierung erfolgte ebenfalls unter verschiedenen Bedingungen bezüglich der Konzentration monovalenter Kationen, der Temperatur und der Formamidkonzentration.
- (5) Die Auswertung und Dokumentation am Fluoreszenz-Mikroskop stellt einen weiteren wichtigen Punkt dar, bei dem besonders auf das Mitführen geeigneter Kontrollen in Form von HIV-negativem Probenmaterial geachtet werden musste.



In Anlehnung an Amann und Fuchs, 2008

Abb. 3.2.1 Schematische Darstellung der Schritte der DNA-FISH

Bei der DNA-FISH gibt es verschiedene Parameter, die variiert werden können:

- (1) Bei der Zellkernpräparation kann die hypotone Lösung und Inkubationsdauer verändert werden sowie die Aufreinigung der Zellkerne.
- (2) Bei der Herstellung Biotin-markierter DNA-Sonden können diese in unterschiedlicher Größe generiert werden.
- (3) Um eine optimale Zugänglichkeit der Ziel-DNA zu erzielen, gibt es ebenfalls verschiedene Modifikationsmöglichkeiten bezüglich der Vorbehandlung (proteolytische Vorbehandlung oder Kochen).
- (4) Das Waschen nach der Hybridisierung kann unter verschiedenen stringenten Bedingungen vorgenommen werden.
- (5) Bei der Auswertung am Fluoreszenz-Mikroskop ist besonders auf das Mitführen geeigneter Negativkontrollen zu achten (in Anlehnung an Amann und Fuchs, 2008).

Tab. 3.1: Modifikation verschiedener Parameter zur Optimierung der HIV-spezifischen DNA-FISH

Parameter	Modifikation	Ergebnis
Zellkernpräparation	<ul style="list-style-type: none"> • Zellline U937/U1: Inkubation mit 0,075 M KCl-Lösung für 6 min bei RT • Primäre Zellen: Inkubation mit 0,1 M KCl-Lösung für 30 min bei 37 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • Spezifisches Signal mit guter Intensität (siehe Abb. 3.2.2) • Steigerung der Signalintensität (siehe Abb. 3.2.2)
Sondenherstellung	<ul style="list-style-type: none"> • Kinetik der Nick-Translation • Sondengröße zwischen 200 und 800 bp • Sondengröße zwischen 100 und 600 bp 	<ul style="list-style-type: none"> • Sondenfragmente verschiedener Größe (siehe Abb. 3.2.3) • spezifisches Signal mit guter Intensität, Hintergrund auf OT • keine Steigerung der Signalintensität, keine Reduktion des Hintergrundes
Permeabilisierung der Zellkerne	<ul style="list-style-type: none"> • Proteolytische Vorbehandlung mit Pepsin (4 mg/ ml) in 0,01 M HCl für 6 min bei 37°C • Proteolytische Vorbehandlung mit Pepsin (4 mg/ ml) in 0,01 M HCl für 12 min bei 37°C • Proteolytische Vorbehandlung mit Pepsin (4 mg/ ml) in 0,01 M HCl für 6 min bei 37°C, plus Inkubation mit 1 M NaSCN für 5 min bei 80°C • Kochen für 5 min in 0,1 M Zitronensäure-Puffer 	<ul style="list-style-type: none"> • Spezifisches Signal mit guter Intensität • Keine Steigerung der Signalintensität • Keine Steigerung der Signalintensität • Keine Steigerung der Signalintensität

Tab. 3.1: Modifikation verschiedener Parameter zur Optimierung der HIV-spezifischen DNA-FISH (Fortsetzung)

Parameter	Modifikation	Ergebnis
Stringentes Waschen	<ul style="list-style-type: none"> • 2 x SSC, 50 % Formamid, 45 °C • 2 x SSC, 50 % Formamid, 65 °C • 2 x SSC, 70 % Formamid, 45 °C • 1 x SSC, 50 % Formamid, 45 °C 	<ul style="list-style-type: none"> • Spezifisches Signal mit guter Intensität • Geringere Signalintensität • Geringere Signalintensität • Geringere Signalintensität
Auswertung am Fluoreszenz-Mikroskop	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Belichtungszeit bei dem HIV-positiven Probenmaterial • hohe Belichtungszeit bei dem HIV-negativen Probenmaterial 	<ul style="list-style-type: none"> • Spezifisches Signal mit guter Intensität (siehe Abb. 3.2.4) • Keine Signale (siehe Abb. 3.2.4)
Luftfeuchtigkeit	<ul style="list-style-type: none"> • höhere Luftfeuchtigkeit • niedrige Luftfeuchtigkeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Spezifisches Signal mit guter Intensität, verstärkte Hintergrundfluoreszenz auf dem OT (siehe Abb. 3.2.5) • Spezifisches Signal mit geringer Intensität, keine Hintergrundfluoreszenz auf dem OT (siehe Abb. 3.2.5)

3.2.1. Zellkernpräparation

Die Vorbereitung und Fixierung der Zellkerne stellt den ersten essentiellen Schritt für die HIV-spezifische DNA-FISH dar. Die in Kultur gehaltenen Zellen wurden 90 min bis 180 min mit Colcemid inkubiert, um die Zellen in der Metaphase zu arretieren. Dadurch wird eine mögliche Präparation der Metaphase-Chromosomen gewährleistet. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit einer hypotonen Lösung, die über einen osmotischen Schock zum Zerplatzen der Zellen führt. Dabei bleibt die doppelte Kernmembran

jedoch intakt. Zur Präparation der Zellen der Zelllinie U937 und U1 war die standardmäßige Inkubation mit einer 0,075 M KCl-Lösung für 6 min bei RT ausreichend, um die äußere Plasmamembran zu entfernen. Bei den Versuchen mit HIV-infizierten primären PBL erfolgte eine Variation bezüglich der Behandlungsdauer (30 min bei 37 °C) und Konzentration der hypotonen Lösung (0,1 M KCl). HIV-infizierte PBL wurden wie folgt generiert: PBMC HIV-negativer Blutspender wurden in einer Dichte von $3 \times 10^6/\text{ml}$ über Nacht mit PHA (2,5 µg/ml) stimuliert, damit die Zellen in einen aktivierten Zustand übergehen. Nach Trennung der adhärennten Monozytenpopulation von den in Suspension befindlichen PBL wurden diese über Nacht mit HIV_{Lai} infiziert (18,3 ng p24 pro Ansatz). Fünf Tage nach der Infektion erfolgte die Arretierung der PBL durch eine Colcemid-Zugabe (0,1 µg/ml) und einer folgenden Inkubation von 180 min. Die Behandlung der infizierten Zellen erfolgte mit einer hypotonen Lösung mit einer 0,1 M KCl-Konzentration für 30 min bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂. Sowohl die Zellen der Zelllinie, als auch die *ex vivo* infizierten PBL wurden mit einem Methanol/Eisessig-Fixativ für 20 min bei 4 °C fixiert. Drei zusätzliche Waschschritte mit der Methanol/Eisessig-Fixierlösung inklusive einer dazwischenliegenden Inkubationszeit von 20 min bei 4 °C waren notwendig, um FISH-inhibierende Faktoren, wie zelluläre Proteine, zu entfernen. In den durchgeführten Versuchen wurde eine Zwei-Farben-FISH eingesetzt, mit der die integrierten HIV-Sequenzen und die Zentromerregion des Chromosom 12 als interne Kontrolle simultan detektiert werden konnten. Die DIG-markierte Kontrollsonde wurde in einer Menge von 50 ng pro Objektträger aufgetragen und mit murinen, Cy3-gekoppelten anti-DIG-Antikörpern detektiert. Durch den Einsatz von sekundären, ebenfalls Cy-3-gekoppelten anti-Maus-Antikörpern aus der Ziege wurde das Signal zusätzlich verstärkt. Die proviralen Sequenzen wurden mit einer Biotin-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Dabei wurden jeweils 100 ng der Sonde pro Objektträger aufgetragen. Die Detektion der HIV-spezifischen DNA-Sonde geschah mit einem Tyramid-Signal-Amplifikations-System. Bei diesem wird eine Streptavidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase (HRP) an die Biotin-markierte Sonde gebunden. Diese

katalysiert eine Reaktion, die zur Anreicherung ihres Substrates, Biotin-gekoppeltes Tyramid, in ihrer unmittelbaren Umgebung führt. In einem letzten Schritt wird das Signal mit FITC-gekoppeltem Streptavidin sichtbar gemacht. Als Negativkontrollen wurden die HIV-negative Zelllinie U937 und nicht-infizierte PBL mitgeführt. Bei diesen Zellen ist kein spezifisches Signal der HIV-Sonde zu erkennen, lediglich das Signal der Kontrollsonde. Bei den Zellen der Zelllinie kommt es aufgrund des langen Zeitraums in Kultur zu Abweichungen im Chromosomensatz. Deswegen konnten in den U937-Zellen mit der Kontrollsonde drei spezifische Signale in Rot (Cy3-Filter) nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2.2 A). Bei den primären PBL wurden hingegen immer nur zwei Kopien der Chromosom 12-Region detektiert (Daten nicht gezeigt). Bei den HIV-positiven Zellen der Zelllinie U1 sind neben den Signalen der Kontrollsonde (zwei oder drei Signale) pro Zelle auch zwei spezifische Signale der integrierten HIV-Sequenz in Grün (FITC-Filter) zu erkennen (siehe Abb. 3.2.2 B). Bei optimal durchgeführten FISH-Experimenten weist die Mehrzahl der Zellen ein spezifisches Signal auf, in ungefähr 80% der Zellen, wobei die Anzahl an Provirus-Kopien variieren kann. In den meisten Zellen können zwei Kopien (43 %), darauf folgend eine Kopie (31 %) und in wenigen Zellen können drei Signale (6 %) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Das Resultat der HIV-spezifischen DNA-FISH mit *ex vivo* infizierten PBL zeigt, dass mit der Behandlung der Zellen mit der hypotonen Lösung nach den für die Zelllinie definierten Bedingungen, spezifische Signale nachgewiesen werden können, diese aber eine relativ schwache Intensität aufweisen (siehe Abb. 3.2.2 C). Durch den Einsatz der 0,1 M hypotonen Lösung und einer verlängerten Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C konnte eine Vergrößerung der Zellkerne beobachtet werden und eine Verstärkung der Intensität der Signale (siehe Abb. 3.2.2 D). Ungefähr 30 % der Zellen beinhalteten ein spezifisches Signal, wobei die Anzahl an Proviren in einer einzelnen Zelle zwischen einer bis hin zu sechs Provirus-Kopien reichte (Daten nicht gezeigt).

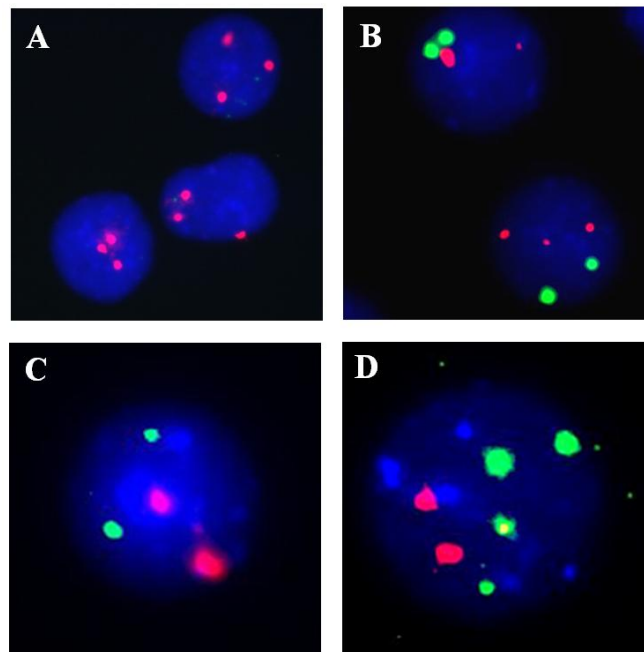


Abb. 3.2.2 HIV-spezifische DNA-FISH mit Zellen der Zelllinie U937 und U1 und PBL nach Ex-Vivo-Infektion mit HIV_{Lai}

blau: Interphase-Kerne nach DAPI-Färbung; rot: spezifisches Signal der Kontrollsonde der Zentromerregion von Chromosom 12 (Cy3-Filter); grün: spezifische Signale der integrierten proviralen Sequenzen nach HIV-spezifischer DNA-FISH (FITC-Filter): (A) Negativkontrolle: Zellkerne der Zelllinie U937, (B) HIV-positive Zelllinie U1; (C) mit HIV_{Lai} *ex vivo* infizierte PBL, Vorbehandlung der Zellen mit 0,075 M KCl-Lösung für 6 min bei RT, (D) mit HIV_{Lai} *ex vivo* infizierte PBL; Vorbehandlung der Zellen mit einer 0,1 M KCl-Lösung für 30 min bei 37 °C.

3.2.2. Herstellung spezifischer DNA-Sonden

Zum spezifischen Nachweis proviraler Sequenzen wurden Biotin-markierte DNA-Sonden eingesetzt, die über Nick-Translation erzeugt wurden. Die Sondenfragmente sollten eine Länge von 200 bis 800 bp besitzen, um eine optimale Zugänglichkeit der Ziel-Nukleinsäure zu gewährleisten. Das Prinzip der Nick-Translation beruht darauf, dass das Enzym DNase I, an statistisch verteilten Stellen der DNA, Einzelstrangbrüche induziert. Am 3'-Ende der Bruchstelle werden durch die 5'-3'-Polymeraseaktivität des Enzyms DNA-Polymerase I neue, durch ein Hapten markierte Nukleotide in den DNA-Strang eingebaut und durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität die alten Nukleotide

entfernt. Die Markierung der DNA wurde mit dem Nick-Translations-Kit der Firma Roche durchgeführt. Dazu wurden 1 µg des Plasmides pBruΔenv mit 4 µl des Biotin-Nick-Translationsmix und 16 µl H₂O_{dest.} bei 15 °C inkubiert. Nach Angaben des Herstellers sollte die Inkubation für 90 min stattfinden. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde jedoch eine Degradierung der DNA zu 100 bp großen Fragmenten festgestellt. Zur Herstellung der optimalen Sondengröße wurden deswegen mehrere Proben gleichzeitig angesetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten deren Größe mittels Gelelektrophorese bestimmt (siehe Abb. 3.2.3). Nach einer 30- bzw. 40- minütigen Inkubationszeit wiesen die DNA-Fragmente eine zu große Länge auf (ungefähr 200 bis 2500 bp bzw. 200 bis 1500 bp). Nach 45 min konnten Sondenfragmente mit einer Größe von 200 bis 800 bp generiert werden, wohingegen 50 min nach Beginn der Nick-Translation Fragmentgrößen zwischen 100 und 600 bp erreicht wurden. Zur Kontrolle der Markierungs-Effizienz wurde ein "Dot Blot" durchgeführt. Bei einer visuellen Detektion von 1 pg Sonde war die Markierung für die anschließende FISH geeignet.

Sonden der Größe zwischen 200 und 800 bp führten nicht nur zu einem spezifischen HIV-Signal mit großer Intensität (siehe Abb. 3.2.2), sondern auch zu einer punktförmigen Hintergrundfluoreszenz mit geringerer Intensität auf den Objektträgern. Eine Reduktion der Sondengröße könnte zu einer Verringerung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz bei einer gleichzeitigen Verstärkung des spezifischen Signals führen. Dazu wurden in FISH-Experimenten mit den Zellen der Zelllinie U1 DNA-Sonden mit einer Fragmentgröße von 100 bis 600 bp eingesetzt. Das Resultat dieser Versuch ergab jedoch keine offensichtliche Reduktion der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz und keine Verstärkung des spezifischen Signals der integrierten HIV-Sequenzen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden für die folgenden FISH-Analysen standardmäßig die Sonden der Größe von 200 bis 800 bp eingesetzt.

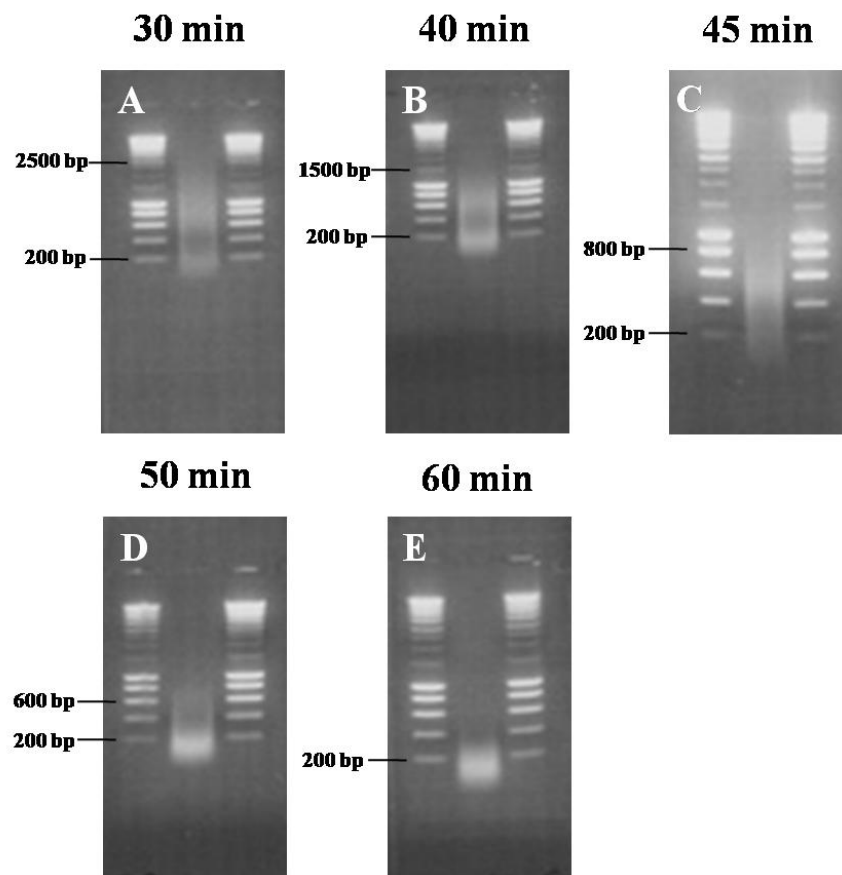


Abb. 3.2.3 Ermittlung der geeigneten Sondengröße nach der Nick-Translation
 Gelelektrophoretische Auftrennung der Sondenfragmente nach unterschiedlicher Inkubationszeit der Nick-Translationsansätze der Plasmid-DNA (pBru Δ Env): (A) nach 30 min, (B) nach 40 min, (C) nach 45 min, (D) nach 50 min, (E) nach 60 min.

3.2.3. Permeabilisierung der Zellkerne

Um die bestmögliche Zugänglichkeit der DNA-Sonden an die Ziel-Sequenzen zu gewährleisten, ist nicht nur die Sondengröße entscheidend. Die Auswahl der richtigen Vorbehandlung der Zellkerne stellt einen weiteren bedeutenden Faktor dar. Die in den Zellkernen lokalisierte DNA liegt mit zellulären Proteinen, wie Histonen, komplexiert vor. Des Weiteren kann die Zellmembran teilweise noch intakt vorliegen. Um diese inhibierenden Auswirkungen auf die optimale Hybridisierung zu verringern, wurden die fixierten Zellkerne durch einen proteolytischen Verdau mit dem Enzym Pepsin (4mg/ml) in

0,01 M HCl-Lösung für 6 min bei 37 °C vorgenommen. Die HCl-Lösung hat zum einen eine unterstützende Funktion der enzymatischen Aktivität des Enzyms Pepsin, zum anderen führt es zu einer Denaturierung der basischen Proteine, was die Permeabilisierung der Zellkerne zusätzlich unterstützt und den Eintritt der Sonden-Fragmente ermöglicht. Diese Art der Vorbehandlung wird in der vorliegenden Arbeit als "mild" definiert und ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 3.3.2 dargestellt. In weiteren Versuchen mit unterschiedlichen Vorbehandlungsbedingungen, die als "hart" bezeichnet werden, sollte überprüft werden, ob sich die Signalintensität verbessern lässt. So wurde die Inkubationszeit des proteolytischen Verdau auf 12 min bei 37 °C ausgedehnt. Zusätzlich zu dem proteolytischen Verdau wurde eine Behandlung mit 1 M NaSCN für 5 min bei 80 °C durchgeführt, sowie die Anwendung einer thermischen Permeabilisierungsmethode über das Kochen der Objektträger in einem Dampfkochtopf für 5 min in einem 0,1 M Zitronensäure-Puffer. Keine dieser Variationen führte zu einer Steigerung der Signalintensität, sondern die Signale wurden teilweise mit einer schwächeren Intensität nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die folgenden FISH-Analysen wurden deshalb auch weiterhin unter den "milden" Vorbehandlungsbedingungen durchgeführt.

3.2.4. Stringentes Waschen nach der Hybridisierung

Das Waschen nach der Hybridisierung stellt einen essentiellen Schritt zur Reduktion der unspezifisch gebundenen Sondenfragmente dar. Im Vergleich zu den Stringenzbedingungen, die während der Hybridisierung vorherrschen, geschieht dies unter Bedingungen höherer Stringenz, also mit einer höheren Temperatur, einer niedrigeren Salzkonzentration oder einer höheren Formamidkonzentration. Mit dem Ziel, die punktförmige Hintergrundfluoreszenz auf den Objektträgern zu reduzieren, aber keinen Verlust der spezifischen Signalintensität herbeizuführen, wurde das stringente Waschen unter verschiedenen Bedingungen ausgetestet. Die Hybridisierung der Zellkerne erfolgte in 2 x SSC-Puffer, einer Formamidkonzentration von 50 % bei 37 °C über Nacht. Die unterschiedlichen Bedingungen des stringenten

Waschens waren: (1) 2 x SSC, 50 % Formamid bei 45 °C; (2) 2 x SSC, 50 % Formamid bei 60 °C; (3) 2 x SSC, 70 % Formamid bei 45 °C; (4) 1 x SSC, 50 % Formamid bei 45 °C. Die beste Signalintensität wurde nach Waschen mit 2 x SSC, 50 % Formamid bei 45 °C erzielt. Auf den Objektträgern konnte eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz festgestellt werden, die jedoch von den spezifischen Signalen mit einer hohen Intensität eindeutig unterschieden werden konnte. Alle anderen Modifikationen führten zwar zu einer Reduktion der punktförmigen Hintergrundfluoreszenz, beseitigten diese jedoch nicht vollständig. Da diese stringenten Bedingungen auch mit einem Verlust der spezifischen Signalintensität einhergingen, wurden diese für die folgenden FISH-Experimente nicht verwendet.

3.2.5. Auswertung der Signale am Fluoreszenz-Mikroskop

Trotz der oben beschriebenen Veränderungen konnte die unspezifische Hintergrundfluoreszenz bei dem gleichzeitigen Beibehalten der optimalen Signalintensität nicht vollständig entfernt werden. Der Hintergrund auf den Objektträgern ist dementsprechend teilweise auch in den Zellkernen zu finden, kann aber von den spezifischen Signalen, die eine weitaus höhere Intensität aufweisen, eindeutig unterschieden werden. Das Mitführen geeigneter Negativkontrollen stellt deswegen eine wichtige Voraussetzung dar, um das Ergebnis der FISH auszuwerten. Deswegen wurde die FISH immer parallel mit nicht-infizierten Zellen durchgeführt. Bei Versuchen mit Zelllinien dienten U937-Zellen als Negativkontrolle, bei primären Zellen waren es nicht-infizierte PBL. Dies stellt einen essentiellen Punkt für die Aufnahmen am Fluoreszenz-Mikroskop mit der Digitalkamera der Firma Hamamatsu DC C4742-95 und Auswertung mit dem Verarbeitungssystem "Metasystem ISIS" dar. Um die punktförmige unspezifische Hintergrundfluoreszenz bei den HIV-negativen Zellen von dem spezifischen Signal unterscheiden zu können, mussten die HIV-negativen und die HIV-positiven Zellen mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen werden. In Abb. 3.2.4 ist diese Vorgehensweise abgebildet. Die Aufnahmen der HIV-negativen PBL und der *ex vivo* infizierten PBL nach der

FISH erfolgte jeweils mit einer Belichtungszeit von 6 sec. Die schwache unspezifische Hintergrundfluoreszenz, die im Mikroskop zu sehen ist, wird bei dieser Belichtungszeit nicht sichtbar. Das spezifische Signal der HIV-spezifischen DNA-Sonde, das eine weitaus höhere Intensität aufweist, ist hingegen in punktueller Verteilung im Nukleus detektierbar.

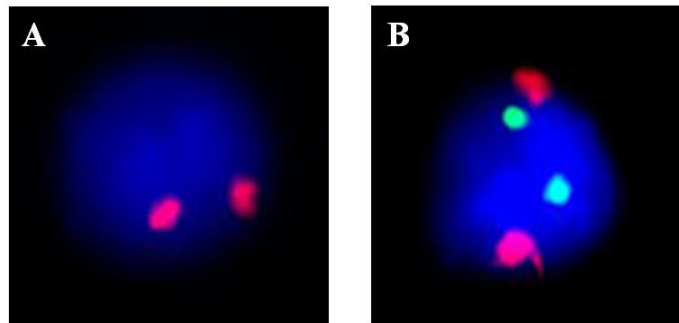


Abb. 3.2.4 Dokumentation HIV-negativer und HIV-positiver PBL nach Durchführung der HIV-spezifischen DNA-FISH

blau: Interphase-Kerne nach DAPI-Färbung; rot: Signal der Kontrollsonde zum Nachweis der Zentromerregion von Chromosom 12; grün: spezifische Signale der integrierten proviralen Sequenzen nach HIV-spezifischer DNA-FISH (FITC-Filter): (A) HIV-negative PBL; Aufnahme des Bildes mit einer Belichtungszeit von 6 sec (B) mit HIV_{Lai} *ex vivo* infizierte PBL; Aufnahme des Bildes mit einer Belichtungszeit von 6 sec.

3.2.6. "Wetterfähigkeit" der FISH

Zuletzt sei bei den Optimierungsbemühungen der FISH eine Beobachtung beschrieben, die nicht systematisch weiteruntersucht wurde, mich aber zeitweilig an den Rand meiner Toleranzfähigkeit gebracht hat. Nach langwierigen erfolgreichen Optimierungsschritten waren plötzlich keine FISH-Signale mehr detektierbar. Dies fiel in die kalte Jahreszeit, in der die Raumtemperatur durch Heizungen erhöht wurde und dadurch die Luftfeuchtigkeit in den Laborräumen herabgesetzt wurde. Bei der Durchführung des DNA-FISH-Protokolls mit U1 Zellen bei einer geringen Luftfeuchtigkeit wurde ein fast vollständiges Fehlen des spezifischen Signals

beobachtet. Durch die Erhöhung der Luftfeuchtigkeit im Labor mittels doppelter Wasserbäder konnte das spezifische, intensiv leuchtende Signal wieder erreicht werden (siehe Abb. 3.2.5).

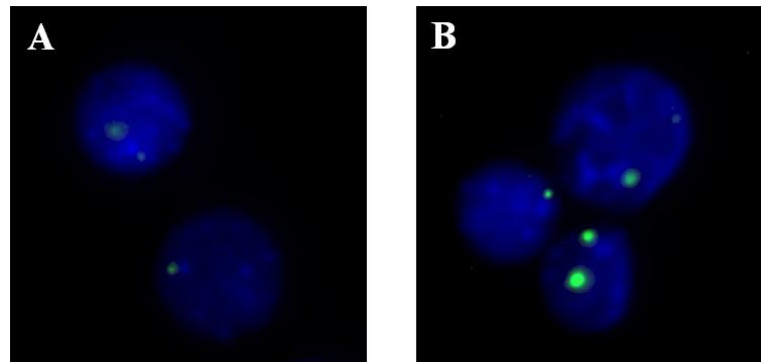


Abb. 3.2.5 Durchführung der HIV-spezifischen DNA-FISH mit Zellen der Zelllinie U1 bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit

blau: Interphase-Zellkern nach DAPI-Färbung; grün: spezifisches Signal der HIV-Sonde: (A) Durchführung der FISH mit U1-Zellen bei einer niedrigen Luftfeuchtigkeit, (B) Durchführung der FISH mit U1-Zellen bei einer höheren Luftfeuchtigkeit.

Die Methode der FISH unterliegt als komplexes Verfahren mit zahlreichen einzelnen Teilschritten gewissen Schwankungen, die auf die praktische Durchführung der Experimente zurückzuführen sind. Durch das Austesten verschiedener Modifikationen, sowie die richtige Auswahl geeigneter Kontrollen kann jedoch ein reproduzierbares Resultat mit ausreichender Signalintensität erzielt werden. Eine detaillierte Beschreibung des in der vorliegenden Arbeit standardmäßig verwendeten Grundprotokolls der HIV-spezifischen DNA-FISH ist unter 2.17. aufgeführt.

3.3. Analyse der Provirusfrequenz im Infektionsverlauf anhand SIV-infizierter Milzzellen mittels SIV-spezifischer DNA-FISH

In früheren Arbeiten wurde mit Hilfe der HIV-spezifischen DNA-FISH die Provirus-Kopienzahl CD4-positiver T-Zellen aus der Milz zweier HIV-positiver Patienten bestimmt (Jung et al., 2002). Zur Zeit der Entnahme hatten die Patienten eine CD4-T-Zellzahl zwischen 300 und 600 pro μ l Blut und eine Viruslast zwischen 5000 und 120.000 Kopien pro ml Plasma. Patient B befand sich in der klinischen Phase B1, das heißt während der chronischen Phase, und Patient R wurde in Kategorie C2 eingestuft, was dem AIDS-Stadium entspricht. Es ist unbekannt, zu welchem Zeitpunkt im Infektionsverlauf die Mehrfachinfektion etabliert wird und somit ab wann mit der Erzeugung neuer Virusvarianten über Rekombinationsprozesse zu rechnen ist. Da uns keine infizierten Zellen von HIV-Patienten vorlagen, die sequentiell den gesamten Infektionszeitraum von der Primärvirämie bis zum AIDS-Stadium abdecken, wurden die Zellen von SIV-infizierten Rhesusaffen untersucht. Die SIV-Infektion bei Rhesusaffen ist weitgehend mit der HIV-Infektion bei Menschen vergleichbar (Geretti, 1999; Hirsch und Lifson, 2000).

Über Prof. Sieghart Sopper vom Deutschen Primatenzentrum in Göttingen standen uns MNC von Milzen SIVmac251-infizierter Rhesusaffen zur Verfügung. Die Zeitpunkte der Milzentnahmen während der Infektionsverläufe verschiedener Affen sind in Abb. 3.3.1 dargestellt. Als Ausgangsplasmid zur Herstellung einer SIV-spezifischen DNA-Sonde diente das Plasmid pSIV251 Δ Env, das uns von Prof. Simon Wain-Hobson, Institut Pasteur, Paris zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Plasmid enthielt die Sequenz eines SIVmac251-Provirus mit einer 1 kb großen Deletion in der *env*-Region. Diese Deletion erlaubt ein späteres Amplifizieren des hypervariablen SIV env -Bereiches aus dem Affenmaterial.

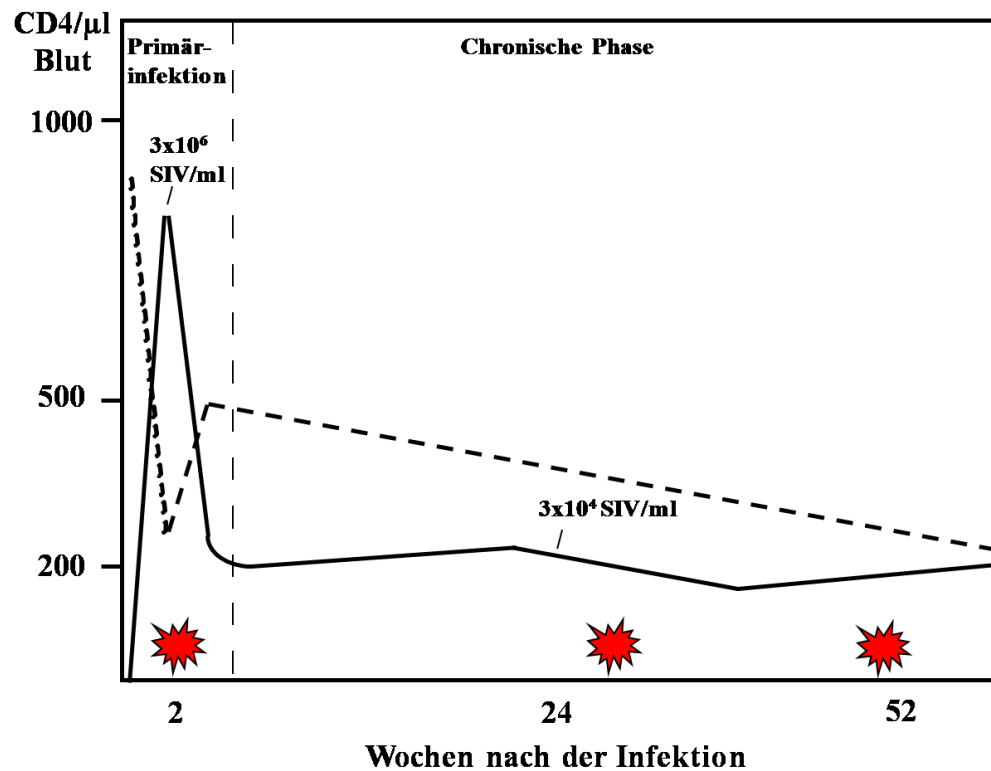


Abb. 3.3.1 Typischer Verlauf einer SIVmac251-Infektion von Rhesusaffen

Der Verlauf der SIV-Infektion ist annähernd identisch mit dem HIV-Infektionsverlauf und ist in der primären Phase durch einen rapiden Abfall der CD4-T-Zellzahl/ μ l Blut und einer schnellen Zunahme der SIV-Viruslast innerhalb der ersten zwei bis drei Wochen gekennzeichnet. Nach einer Stabilisierung der CD4-positiven Zellen und einem Rückgang der SIV-Viruslast, schließt sich in der chronischen Phase eine stetige Reduktion der CD4-positiven Zellen an. Die DNA-FISH-Analysen erfolgten mit Probenmaterial während der Primärvirämie (Woche zwei und vier nach Infektion), in der chronischen Phase (Woche 29 nach Infektion) und der späten Phase (Woche 51 nach Infektion).

3.3.1. Etablierung der SIV-spezifischen DNA-FISH

Um die SIV-DNA spezifisch in infizierten Affenzellen nachzuweisen, wurde das HIV-DNA-FISH-Protokoll mit einer entsprechenden SIV-Sonde durchgeführt. Zunächst wurden als Positivkontrolle CEMx174-Zellen mit SIVmac293 *ex vivo* infiziert. Nach vier Tagen wurden die Zellkerne präpariert und mittels Methanol/Eisessig-Lösung fixiert. Als Sonde wurde eine Biotin-markierte DNA-Sonde eingesetzt, die über Nick-Translation des Plasmides pSIVmac251 Δ Env erzeugt wurde und eine Größe zwischen 200 bis 800 bp besaß. Wegen der hohen Sequenzhomologie von SIVmac251 mit SIVmac239 (Naidu et al., 1988) kann diese DNA-Sonde an die provirale DNA der infizierten CEMx174-Zellen binden. Nach der Hybridisierung über Nacht bei 37 °C und dem stringenten Waschen folgte die Signalamplifikation mit Hilfe des TSATM-Systems. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte CEMx174-Zellen (Abb. 3.3.2 A). Ungefähr 70 bis 80 % der SIV-infizierten CEMx174-Zellen zeigten spezifische Signale im Nukleus, die eine punktuelle Verteilung aufwiesen. Dabei konnten in einer Zelle zwischen einem und sechs Signale detektiert werden, wobei die Mehrzahl der Zellen zwei bis drei Signale beinhalteten (siehe Abb. 3.3.2 B-D). Da die nicht-infizierten Zellen keine SIV-spezifischen Fluoreszenzsignale aufwiesen, war das DNA-FISH-Protokoll für den Nachweis proviraler SIV-DNA geeignet.

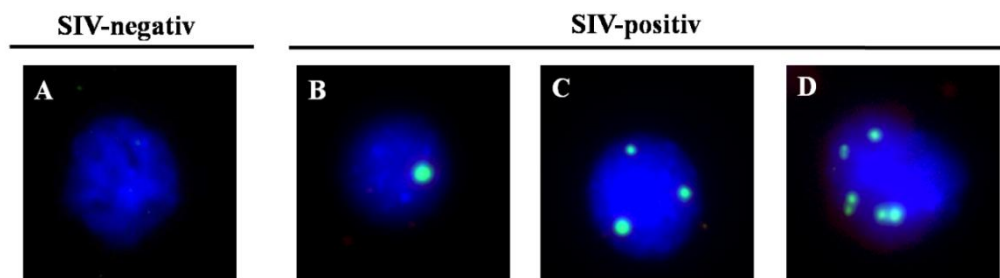


Abb. 3.3.2 SIV-spezifische DNA-FISH zum Nachweis der proviralen Sequenzen in mit SIVmac239-infizierten CEMx174-Zellen

blau: Interphase-Zellkerne nach DAPI-Färbung; grün: Signal der SIV-spezifischen DNA-Sonde (FITC-Filter): (A) Negativkontrolle, nicht-infizierte CEMx174 Zellen, (B-D) mit SIVmac239 infizierte CEMx174 Zellen: Es wurden (B) eine, (C) zwei oder (D) sechs provirale SIV-Sequenzen in einem einzelnen Nukleus detektiert.

Bei der Untersuchung des primären Probenmaterials sollte nur die tatsächliche Provirus-Kopienzahl in einzelnen Zellen detektiert werden, die ursprünglich in den infizierten Zellen vorlagen. Eine Reinfektion während der zweitägigen Inkubation nach Stimulation der SIV-Expression mittels PHA musste deswegen ausgeschlossen werden. Der Reverse-Transkriptase-Inhibitor AZT, der als Nucleosidanalogon über passive Diffusion in die Zellen gelangt und in seiner aktiven Form von der RTase in den neu-synthetisierten DNA-Strang eingebaut wird, führt zum Kettenabbruch (Mitsuya et al., 1985). AZT wird auch von der SIV-kodierten RTase als Substrat erkannt, was somit die SIV-Infektion auf der Ebene der reversen Transkription hemmt (Van Rompay et al., 1992). Um dies zusätzlich zu überprüfen, wurden die SIV-positiven Milzzellen des Rhesusaffens 1718 (51 Wochen nach der Infektion) zusammen mit den Zellen der Zelllinie CEMx174 ko-kultiviert. Die CEMx174-Zellen sind ein Indikator für eine Virusausbreitung in der Zellkultur, da sie in diesem Fall Synzytien ausbilden (Stefano et al., 1993). Synzytien sind mehrkernige Riesenzellen, die durch die Verschmelzung der Zellmembran der Wirtszellen entstehen. Die Zell-Zell-Fusion wird durch die Einlagerung viraler Fusionsproteine in die Plasmamembran der infizierten Zelle induziert, was zu einer Verschmelzung dieser mit einer Nachbarzelle führt. SIV-positive

Affenzellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 /ml ausgesät. Die doppelte Menge an CEMx174-Zellen wurde zugegeben und die HIV-Produktion mittels PHA ($2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) induziert. Ein Parallelansatz wurde 30 min vor der PHA-Zugabe mit dem Reversen-Transkriptase-Inhibitor AZT in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ versetzt. Eine Woche nach Beginn der Ko-Kultur wurde das Ergebnis dokumentiert und ist in Abb. 3.3.3 dargestellt. Die Zellen ohne AZT-Zugabe zeigten die typischen morphologischen Veränderungen infizierter Zellen. Durch Verschmelzung der Plasmamembran der infizierten Wirtszellen mit einer Nachbarzelle kam es zur Synzytien-Formierung (Abb. 3.3.3 A und B), wohingegen bei dem Ansatz mit AZT einzelne runde Zellen vorlagen. AZT hatte einen inhibierenden Effekt auf die Virusausbreitung im Zellkultursystem und wurde für die folgenden Versuche eingesetzt.

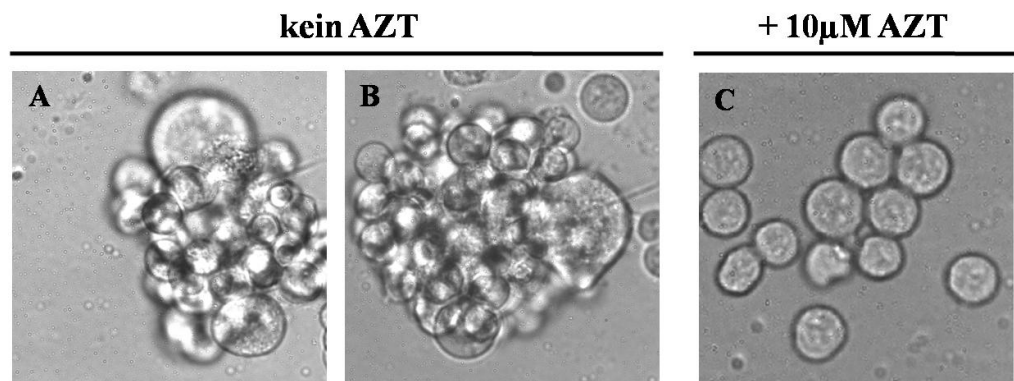


Abb. 3.3.3 Inhibition der SIV-Ausbreitung im Ko-Kultur-System von SIV-positiven Affenmilzzellen mit CEMx174 Zellen durch AZT

Ko-Kultur von SIV-positiven Milzzellen des Affens 1718 (51 Wochen nach der Infektion) mit CEMx174-Zellen nach Stimulierung der SIV-Produktion mit PHA: (A) und (B) ohne AZT-Zugabe, (C) nach Zugabe von AZT.

3.3.2. Bestimmung der Provirusfrequenz SIV-infizierter Milzzellen mittels SIV-spezifischer DNA-FISH

Die Analyse der Provirus-Kopienzahl SIVmac251-infizierter Milzzellen erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten des Infektionsverlaufs. Die Probe der Rhesusaffen 8326 und 8152 stammen aus der Primävirämie (zwei bzw. vier Wochen nach der Infektion), die Proben des Affens 1778 wurde während der chronische Phase (29 Wochen nach der Infektion) und die des Affens 1718 in der späten Infektionsphase (51 Wochen nach der Infektion) entnommen (siehe Abb. 3.3.1, roter Stern). Die Milzzellen der SIV-infizierten Tiere wurden aufgetaut, in einer Dichte von 1×10^6 /ml ausgesät, mit AZT in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ versehen und 30 min vorinkubiert. Daran schloss sich die Stimulierung mit PHA und die Inkubation für zwei Tage an. Für die Zellkernpräparation des primären Probenmaterials wurden die Zellen mit einer hypotonen Lösung (0,1 M KCl) für 30 min bei 37°C inkubiert und danach mit einer Methanol/Eisessig-Lösung fixiert.

Nach Hybridisierung der entsprechenden Zielzellen mit der Biotin-markierten DNA-Sonde (100 ng pro Objektträgern) und der Detektion dieser mit Hilfe eines TSATM-Systems wurden die Frequenzen der spezifischen Signale am Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt. Als Negativkontrolle wurde die SIV-spezifische DNA-FISH auf Milzzellen von SIV-negativen Rhesusaffen durchgeführt. Bei diesen ist kein spezifisches Signal in den Zellkernen zu erkennen (Daten nicht gezeigt). In der primären Phase der Infektion konnten in einzelnen Zellen eine (11,5 %), zwei (3 %), als auch drei (0,7 %) Provirus-Kopien detektiert werden. In der Mehrzahl der Zellen (85 %) wurde kein spezifisches Signal detektiert. Die Versuchsreihe des Probenmaterials vier Wochen nach der Infektion zeigte ein ähnliches Ergebnis. In 85 % der Zellen konnte kein Signal detektiert werden, 12 % der Zellen beinhalteten eine Provirus-Kopie und in 2,6 % der Zellen konnten zwei Proviren nachgewiesen werden. In der chronischen Phase hatte sich die Zahl der Zellen ohne spezifisches Signal reduziert (78 %). Die Zahl der Zellen mit einem

spezifischen Signal hatte sich auf 10 % reduziert, wohingegen die Zahl der Zellen mit zwei Provirus-Kopie auf 11,4 % gestiegen war. In der späten Phase der Infektion hatte sich die Frequenz der Zellen ohne Signal weiterhin reduziert auf 65 % und die Zahl der Zellen mit einem spezifischen Signal war auf 22 % gestiegen. In 11 % der Milzzellen konnten spezifisch zwei Provirus-Kopien und in 1,5 % drei Provirus-Kopien detektiert werden (siehe Abb. 3.3.4).

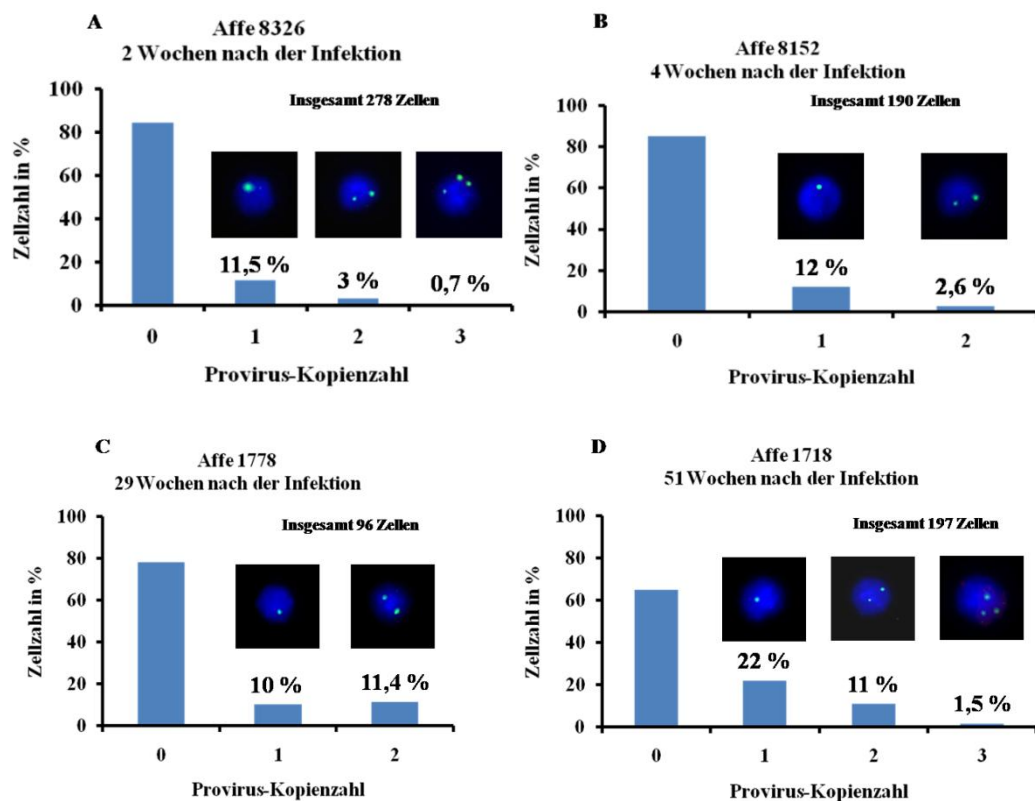


Abb. 3.3.4 Frequenzverteilung der Provirus-Kopienzahl in einzelnen Milzzellen SIV-infizierter Rhesusaffen nach Durchführung der SIV-spezifischen DNA-FISH blau: Interphase-Zellkern nach DAPI-Färbung; grün: Signal der integrierten SIV-Genome: (A) Rhesusaffe 8326 (zwei Wochen nach der Infektion): Nachweis von einer, zwei oder drei Provirus-Kopien in einer einzelnen infizierten Milzzelle, (B) Rhesusaffe 8152 (vier Wochen nach der Infektion): Nachweis von einer oder zwei Provirus-Kopien in einer einzelnen infizierten Milzzellen, (C) Rhesusaffe 1778 (29 Wochen nach der Infektion); Nachweis von einer oder zwei Provirus-Kopien in einer einzelnen infizierten Milzzelle, (D) Rhesusaffe 1718 (51 Wochen nach der Infektion); Nachweis von einer, zwei oder drei Provirus-Kopien in einer einzelnen infizierten Milzzelle.

Mit der Methode der SIV-spezifischen DNA-FISH konnten durch Untersuchungen an SIV-infizierten Milzzellen multiple Proviren auf Einzelzellebene während des gesamten Infektionsverlaufs detektiert werden. Diese sind das Resultat einer Mehrfachinfektion, die somit schon während der Primärvirämie in den sekundären lymphatischen Organen stattfindet. Die Verteilung der Provirus-Frequenzen, über den gesamten Infektionszeitraum hin betrachtet, war bei allen Proben ähnlich. In der Mehrzahl der Zellen wurde eine Provirus-Kopie detektiert, daran schlossen sich die Zahl der Zellen, die zwei Provirus-Kopien trugen an, und in einigen wenigen Zellen konnten drei Provirus-Kopien nachgewiesen werden. In der chronischen Phase der Infektion beinhaltete eine leicht höhere Anzahl an Zellen zwei Proviren. Die SIV-Infektionsfrequenz der MNC der Milzen war gering und nahm im Verlauf der Infektion zu.

4. Diskussion

Das Humane Immundefizienzvirus zeichnet sich durch eine extrem schnelle Virusevolution aus. Verantwortlich für die schnelle Zunahme der genetischen Variabilität sind die fehlerbehaftete Replikation sowie die hohe Replikationsrate von $\sim 10^{10} - 10^{12}$ neuen Virionen pro Tag (Perelson et al., 1996). Diese kontinuierliche, fehlerbehaftete HIV-Replikation führt im Infizierten zum Auftreten einer komplexen Viruspopulation verwandter, aber genetisch verschiedener Viren (Goodenow et al., 1989; Meyerhans et al., 1989). Derartige als virale Quasispezies bezeichnete Viruspopulationen stellen ein erhebliches Problem bei der Entwicklung einer protektiven HIV-Vakzine und der antiviralen Therapie dar. Unter dem Selektionsdruck der Therapeutika können mit zum Teil erschreckender Geschwindigkeit resistente Virusvarianten selektiert werden (Havlir et al., 1996; Richman et al., 1994). Während des Infektionsverlaufs ist HIV auch natürlichen Selektionsprozessen ausgesetzt. Der Selektionsdruck geht hierbei vom Immunsystem, durch die neutralisierenden Antikörper, CD4-positiven T-Helferzellen sowie zytotoxischen T-Lymphozyten, aus (Goulder et al., 1997; Kawashima et al., 2009; Philips et al., 1991; Richman et al., 2003; Ross und Rodrigo, 2002). Durch die kontinuierliche Steigerung der Variabilität werden die Varianten selektiert, die sich den immunologischen Abwehrmechanismen entziehen.

Verschiedene Fehlerprozesse treten während der Replikation auf, die zur Steigerung der genetischen Variabilität von HIV führen. Bei der reversen Transkription des RNA-Genoms in einen DNA-Doppelstrang liegt eine Fehlerrate von etwa $2,5 \times 10^{-5}$ vor (Mansky und Temin, 1995). Für das etwa 10 000 Nukleotide lange HIV-Genom bedeutet dies 0,25 Nukleotidsubstitutionen pro Genom pro Replikationsrunde. Darüberhinaus spielen Rekombinationsereignisse bei der Entstehung von HIV-Varianten eine entscheidende Rolle. Dies wird bereits durch die hohe Rekombinationsrate

deutlich, die mit ~3-30 Rekombinationsereignissen pro Genom und Replikationsrunde etwa 10-100fach höher liegt als die Punktmutationsrate (Jetzt et al., 2000; Levy et al., 2004). Derartige Rekombinationsereignisse lassen sich allerdings nur dann identifizieren, wenn in einem Viruspartikel zwei genetisch verschiedene RNA-Stränge vorhanden sind. Dies ist dann der Fall, wenn eine Zelle mit verschiedenen Viren infiziert wird und die beiden genetisch verschiedenen RNA-Moleküle bei der sich anschließenden Virusfreisetzung in ein Partikel verpackt werden. Während der folgenden reversen Transkription kann die Reverse Transkriptase von einem der RNA-Stränge abfallen und die sich bildende DNA-Kette entsprechend dem anderen RNA-Strang weiterverlängern (Coffin, 1979). Das Ergebnis ist ein Provirus mit einer gemischten genetischen Information aus beiden RNA-Matrizen.

Rekombinante HIV sind auf verschiedenen Ebenen nachgewiesen worden (McCutchan, 2000; Peeters und Delaporte, 1999; Robertson et al., 1995). Einige der sich derzeit ausbreitenden Virusstämme stammen in genetischer Hinsicht von mindestens zwei bis drei verschiedenen HIV-Subtypen ab (Gao et al., 1998; Montavon et al., 2002). Ebenso wurden, wenn auch selten, rekombinante Viren der Hauptgruppen M und O beobachtet (Peeters et al., 1999; Takehisa et al., 1999). Innerhalb der Gruppe infizierter Personen weist der komplexe Netzwerkcharakter der HIV-Quasispezies nach phylogenetischer Analyse auf stattgefundene Rekombinationsereignisse hin (Kils-Hutten et al., 2001; Plikat et al., 1997, Wain-Hobson et al., 2003). *In vivo* konnte eine Rekombinante zwischen einer mehrfach medikamentenresistenten Variante und einem Wildtyp-Virus in einem Patienten nachgewiesen werden (Brenner et al., 2002). Diese Beispiele demonstrieren, dass Rekombinationen einen essentiellen Mechanismus der Virusevolution darstellen und deren genaue Analysen zum besseren Verständnis des Infektionsgeschehens beitragen.

In unserer Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe einer hoch sensitiven HIV-spezifischen DNA-FISH die HIV-Kopienzahl in einzelnen, infizierten Zellen direkt bestimmt werden. Mit dieser Methode wurde gezeigt, dass die Mehrzahl der HIV-infizierten CD4-positiven T-Zellen aus der Milz zweier HIV-positiver Patienten mehrere Proviren trugen (Jung et al., 2002). Durch anschließende Untersuchung der genetischen Variation konnten sowohl rekombinante als auch nicht-rekombinante HIV-Varianten in Einzelzellen nachgewiesen werden. Der Nachweis der Mehrfachinfektion auf Einzelzellebene *in vivo* zeigte die zentrale Rolle der Rekombination zur Steigerung der genetischen Variabilität von HIV. Basierend auf diesen Erkenntnissen resultieren folgende grundlegende Fragestellungen zur biologischen Bedeutung multipler HIV-Proviren in einzelnen, infizierten Zellen: (1) Wie ist die relative transkriptionelle Aktivität der multiplen Proviren? (2) Wann im Infektionsverlauf wird die Mehrfachinfektion etabliert? (3) Welche Auswirkungen hat die Mehrfachinfektion auf die Rekombination und die HIV-Evolution, insbesondere auf die Entwicklung mehrfach medikamentenresistenter HIV-Varianten? Für diese wichtigen Analysen auf Einzelzellebene stehen teilweise noch keine geeigneten experimentellen Systeme zur Verfügung oder bereits existierende, wie die HIV-spezifische DNA-FISH, müssen noch optimiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen der Versuch unternommen, ein hoch sensitives System zu entwickeln, mit dem die relative transkriptionelle Aktivität multipler Proviren bestimmt werden kann. Des Weiteren erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die systematische Optimierung der HIV-spezifischen DNA-FISH, damit diese mit einer hohen Verlässlichkeit und einer ausreichenden Signalintensität zur Bestimmung der Provirus-Kopienzahl eingesetzt werden kann.

4.1. Versuche zur Entwicklung eines Systems zur Bestimmung der Transkriptions-Aktivität multipler Proviren

Um die relative transkriptionelle Aktivität multipler Proviren in einzelnen infizierten Zellen analysieren zu können, ist die Methodenentwicklung eines hoch sensitiven Systems notwendig. Die Etablierung eines solchen Systems zur Einzelzellanalytik ist technisch äußerst komplex und besteht aus folgenden experimentellen Teilschritten. Mit Hilfe einer HIV-spezifischen RNA-FISH kann die HIV-RNA in einzelnen infizierten Zellen detektiert werden. Die so identifizierten Zellen können dann mit Hilfe einer Laser-Mikrodissektion isoliert werden. Durch eine HIV-spezifische RT-PCR der hypervariablen V1/V2-Region des *env*-Gens, die nicht in der FISH-Sonde vorkommt, lassen sich HIV-Transkripte spezifisch vermehren und können anschließend kloniert und sequenziert werden. Befänden sich unterschiedliche Proviren innerhalb einer infizierten Zelle, so ist zu erwarten, dass sich die Sequenzen in dem V1/V2-Bereich des Hüllproteingens unterscheiden. Sequenzunterschiede in den Transkripten und deren Häufigkeitsverteilung in der Zelle würden somit Aussagen über die relative transkriptionelle Aktivität der verschiedenen Proviren erlauben. Anhand entsprechender Ergebnisse könnten wichtige Erkenntnisse zum Infektionsgeschehen auf Einzelzellebene abgeleitet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die ersten wesentlichen Arbeitsschritte zur Methodenentwicklung experimentell abgeschlossen: (1) Spezifische Detektion der HIV-RNA in Zellen aus der Milz HIV-positiver Patienten nach Virusreaktivierung mit PHA durch Modifizierung eines in unserem Labor etablierten RNA-FISH-Protokolls, (2) Inhibition der Virusausbreitung im Zellkultursystem durch den Einsatz des Fusionsinhibitors T20, (3) Isolierung einzelner FISH-positiver Zellen über Laser-Mikrodissektion.

Bei der Entwicklung eines Systems zur Einzelzellanalytik spielt die HIV-spezifische RNA-FISH eine zentrale Rolle. Mit dieser Methode können die transkriptionell aktiven Proviren direkt identifiziert werden. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die HIV-spezifische RNA-FISH in unserem Labor etabliert. Mit Hilfe dieser Technik wurde spezifisch die HIV-RNA im Zytoplasma der mit HIV-1 infizierten T-Zelllinie ACH2 detektiert. Die Sensitivität dieses FISH-Protokolls war jedoch zu gering, um die FISH-Experimente mit Milzzellen HIV-infizierter Patienten vorzunehmen, da die Zahl der HIV-Transkripte pro Zelle auf wenige Hundert Kopien geschätzt wird. Die Sensitivitätssteigerung erfolgte erstens über die Generierung von neun verschiedenen DIG-markierten RNA-Sonden zwischen 250 und 650 Nukleotiden, die zusammen etwa 40 % des HIV-Genoms abdecken. Zweitens erfolgte die Detektion der DIG-markierten RNA-Sonden durch den Einsatz eines TSATM-Systems, was zu einer Verstärkung des spezifischen Signals führte. Mit dem modifizierten RNA-FISH Protokoll wurden in 89 % der Zellen der T-Zelllinie ACH2 ein spezifisches Signal 10 h nach der Stimulation mit PMA detektiert. Der spezifische Nachweis der HIV-RNA erfolgte auch in 30 bis 40 % *ex vivo* mit HIV_{Lai} infizierter PBL. Mit dieser Sensitivität der HIV-spezifischen RNA-FISH war die Identifizierung der HIV-RNA in MNC aus der Milz HIV-positiver Patienten erfolgreich. In 2 bis 3 % der MNC konnte zwei Tage nach Stimulation mit PHA ein spezifisches Signal nachgewiesen werden. Die HIV-spezifische RNA-FISH zur Identifizierung von HIV-1 Transkripten in einzelnen infizierten Zellen aus Patientenmaterial konnte also im Rahmen dieser Arbeit mit einer ausreichenden Sensitivität etabliert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten neben der HIV-spezifischen RNA-FISH noch weitere Arbeitsschritte zur Entwicklung des Systems zur Einzelzellanalyse experimentell abgeschlossen werden. Es gelang, einzelne FISH-positive Zellen der T-Zelllinie ACH2 mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion zu isolieren. Nach Aufreinigung der HIV-RNA dieser

einzelnen ACH2-Zelle konnte die V1/V2-Region des *env*-Gens über eine RT-PCR amplifiziert werden. Die Resultate mehrerer unabhängiger Versuche unterlagen zum Teil großen Schwankungen, so konnte beispielsweise von neun einzelnen Zellen nur in einer Probe ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Die Sensitivität unseres Systems der Amplifikation der HIV-1 Transkripte war zu gering und konnte nicht verlässlich eingesetzt werden. Ein Grund war die niedrige Ausgangsmenge der HIV-RNA einer einzelnen Zelle, die auf wenige Hundert Kopien pro infizierter Zelle geschätzt wird. Deshalb sollte eine Sensitivitätssteigerung dieses Systems durch den Einsatz einer modifizierten Version des "MessageBOOSTER™"-Systems von Epicenter erzielt werden. Über einen *in vitro* Transkriptionsschritt wird hierbei die RNA einer einzelnen Zelle zusätzlich amplifiziert. Das Protokoll musste jedoch unseren Verwendungszwecken entsprechend abgewandelt werden. Die HIV-spezifische RNA-FISH funktionierte nur, wenn die Zellen mit 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert wurden. Dies führt jedoch zu einer Degradierung der RNA zu 500 Nukleotide großen Fragmenten (Klimecki et al., 1994). Aus diesem Grund wurden Primer verwendet, die in der Nähe der V1/V2-Region binden. An den Primern befand sich die Sequenz des T7-Promotors, so dass der Vorteil des initialen RNA-Amplifikationsschrittes über *in vitro* Transkription genutzt werden konnte. Wegen der zahlreichen Arbeitsschritte bei der Durchführung des "MessageBOOSTER™"-Systems und der hohen Sensitivität der "nested"-PCR, ist dieses System anfällig für Kontaminationen. In der vorliegenden Arbeit konnte deswegen die Methode nicht erfolgreich angewandt werden. Mit diesem Verfahren wurde nicht der *env*-Bereich der HIVBru-Sequenz einer einzelnen ACH2-Zelle amplifiziert, sondern die HIV-1-SFB2-Sequenz eines retroviralen Vektors. Trotz mehrfacher Versuche gelang es nicht, die RNA nach RNA-FISH und Einzelzellisolierung mittels PCR spezifisch zu amplifizieren. Die beschriebene Methode konnte deswegen nicht zur HIV-Transkriptionsanalyse auf Einzelzellebene angewandt werden. Die Arbeit wurde an dieser Stelle nicht weitergeführt.

Bei dem Versuch ein hoch sensitives System zur Einzelzellanalyse zu entwickeln, bestand ein großes Problem in der Kombination des FISH-Protokolls mit der Amplifikation der HIV-RNA einer einzelnen Zelle. Um die HIV-RNA mit Hilfe der RNA-FISH zu detektieren, ist die Fixierung der Zellen mit dem quervernetzenden Fixativ Paraformaldehyd notwendig. Dies führt jedoch zu Degradierungen der RNA (Klimecki et al., 1994), was ein erhebliches Problem für die Amplifikation der RNA mittels RT-PCR darstellt. In zukünftigen FISH-Experimenten müsste deswegen eine alternative Fixierlösung, wie Ethanol oder Methanol eingesetzt werden. Alkoholische Fixierlösungen besitzen keine quervernetzte Wirkung und halten die intrazelluläre RNA nur in geringem Maß in der Zelle zurück. Unser FISH-Protokoll müsste vor allen Dingen bezüglich der Anzahl der Waschschrte verändert werden. Diese müssen reduziert werden, um einem Verlust der Ziel-RNA vorzubeugen. Der Einsatz einer alternativen Methode zur Identifizierung HIV-infizierter Zellen stellt einen weiteren Lösungsansatz dar, um diese Problematik zu umgehen. Es könnte beispielsweise eine Oberflächenfärbung der Env-Proteine an nicht-fixierten Zellen durchgeführt werden (Miranda et al., 2002). Dies eröffnet die Möglichkeit der Sortierung einzelner HIV-positiver Zellen mit Hilfe eines FACS-Gerätes. Durch Einzelzellablage, anschließende PCR-Amplifikation und darauf folgender Sequenzanalyse wäre dies eine Alternative. Eine weitere Möglichkeit der Sequenzanalyse besteht in der direkten RNA-Sequenzierung der HIV-Transkripte nach Isolierung einzelner infizierter Zellen mit Hilfe eines FACS-„Sorters“. Die RNA-Sequenzierung zur Transkriptomanalyse ist noch eine junge Methode. Bis heute konnte das Transkriptom von zwei verschiedenen menschlichen Zellen untersucht werden (Sultan et al., 2008). Bei diesen RNA-Sequenzierungen wurde eine sogenannte „sequencing by synthesis“ durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird aus dem Transkriptom einer Zelle eine cDNA hergestellt. Diese wird an beiden Enden mit Oligonukleotiden als Adapter versehen. Die cDNA-Moleküle werden über ihre Adapter an eine Glasoberfläche gekoppelt, was durch die Bindung von zu den Adaptern komplementären Oligonukleotiden vermittelt wird. Die cDNA-Fragmente können mit beiden Enden binden und eine Art „Brücke“ ausbilden.

In einem folgenden Schritt werden die cDNA-Moleküle über eine Art PCR amplifiziert, so dass aus einer einzelnen cDNA ein "Cluster" von mehreren Tausend Kopien gebildet wird. Diese "Cluster" werden in einem folgenden Schritt sequenziert. Die Oligonukleotide an den Glaträgern dienen als Primer und die Einzelmoleküle der "Cluster" als Matrize. Eine Polymerase baut fluoreszenzmarkierte Nukleotide ein, wobei für jede Nucleinsäurebase ein unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoff verwendet wird. Die Polymerase baut pro Zyklus ein Nucleotid ein, dessen Fluoreszenzsignal anhand der Farbe der Emission spezifisch ermittelt werden kann. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe besitzen eine hohe Sensitivität gegenüber dem Anregungslicht, so dass sie nach der Messung an Intensität verlieren. Der erneute Einbau eines markierten Nucleotids definiert den Beginn eines neuen Messzyklus (Bennett et al., 2004; 2005). Dieses System der direkten RNA-Sequenzierung zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, so dass geringe RNA-Transkripte identifiziert und quantifiziert werden können. Somit könnte mit diesem Verfahren die Häufigkeit verschiedener HIV-Transkripte in einzelnen infizierten Zellen bestimmt werden. Allerdings ist diese sensitive Methode der RNA-Sequenzierung wegen der Anschaffung geeigneter Geräte mit einem hohen Kostenaufwand verbunden und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eingesetzt werden. Zusätzlich stand kein FACS-Gerät zur Einzelzellablage im S3-Labor mit Aerosolschutz zur Verfügung.

4.2. Optimierung der HIV-spezifischen DNA-FISH zur Analyse proviraler Sequenzen einzelner infizierter Zellen

Die molekularbiologische Methode der FISH zeichnet sich durch zahlreiche Vorteile aus, weshalb dieses Verfahren zur Bestimmung der Kopienzahl von proviralen HIV-Sequenzen in einzelnen infizierten Zellkernen eingesetzt werden kann. Die Provirus-Sequenzen können dabei direkt im infizierten Probenmaterial auf Einzelzellebene untersucht werden. Die hohe Sensitivität

dieser Technik ermöglicht den Nachweis proviraler Ziel-Nukleinsäuren, die eine geringe Sequenzgröße von 9 kb aufweisen. Durch die Herstellung von optimal markierten Sonden-Sequenzen sowie den Einsatz von Detektionssystemen, die zu einer Signalamplifikation führen, wird diese hohe Sensitivität erzielt. Die Spezifität ist ein weiteres Merkmal der FISH. Für alle bekannten Ziel-Sequenzen können über verschiedene Markierungs-Verfahren Sonden erzeugt werden, die spezifisch an diese binden und somit deren gezielte Visualisierung und Lokalisierung ermöglichen. Die Spezifität wird auch durch die stringenten Bedingungen während der Hybridisierung und des Waschens nach der Hybridisierung, unter Bedingungen höherer Stringenz, definiert. Diese Parameter sind für die Ausbildung von Hybriden zwischen der Sonden- und Ziel-Nukleinsäure mit der größten Sequenzhomologie entscheidend. Ein Nachteil der FISH ist der, dass dieses Verfahren aus mehreren voneinander abhängigen Teilschritten besteht. Das Resultat ist deswegen sehr anfällig für Schwankungen in der Signalintensität und dem Vorkommen einer unspezifischen Hintergrundfluoreszenz, die das größte Problem bei der Detektion einzelner HIV-Provirus-Kopien darstellt. Das Austesten der bestmöglichen Bedingungen ist die Grundvoraussetzung für die Auswertung der FISH-Ergebnisse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nach Modifikation verschiedener Parameter ein Protokoll der HIV-spezifischen DNA-FISH definiert, das mit ausreichender Signalintensität und hoher Verlässlichkeit eingesetzt werden kann. Die Zellkernpräparation erfolgte bei den Zellen der Zelllinie U1 standardmäßig mit einer 0,075 M KCl-Lösung für 6 min bei Raumtemperatur. Um die Zellmorphologie aufrecht zu erhalten und dem Verlust der Ziel-Nukleinsäuren vorzubeugen, wurden die Zellkerne mit einem Methanol/Eisessig-Gemisch fixiert. Diese Vorbehandlung war ausreichend, um in den U1-Zellkernen ein spezifisches Signal mit hoher Sensitivität zu detektieren. PBL, nach *ex vivo* Infektion mit HIV_{Lai}, wurden mit einer 0,1 M KCl-Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert, was zu einer Vergrößerung der

Zellkerne führte, die mit einer Verstärkung der Signalintensität einherging. Die *ex vivo* infizierten PBL wurden zusätzlich dreimal mit der Methanol/Eisessig-Lösung gewaschen, um zelluläre Proteine und Reste der Zytoplasmamembran zu entfernen, die einen inhibierenden Effekt auf das Eindringen der Sonde hatten. Ein sehr kritischer Schritt für die Durchführung einer erfolgreichen FISH ist die Herstellung einer optimal markierten DNA-Sonde. Der Nachweis der proviralen HIV-Sequenzen erfolgte generell mit Hilfe Biotin-markierter doppelsträngiger DNA-Sonden, die über Nick-Translation des Plasmids pBruΔEnv erzeugt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die FISH mit zwei Sonden verschiedener Fragmentgrößen von 200 bis 800 bp bzw. von 100 bis 600 bp auf der HIV-positiven Zelllinie U1 durchgeführt. Bei beiden Versuchsansätzen besaßen die spezifischen Signale eine hohe Intensität, die sich deutlich von der unspezifisch "gepunkteten" Hintergrundfluoreszenz auf den Objektträgern unterschied. Folglich konnten für die Versuche mit primärem Probenmaterial beide Fragmentgrößen eingesetzt werden. Ein Nachteil des Herstellungsverfahrens über Nick-Translation ist der, dass keine Sonden definierter Länge produziert werden, sondern nur Sondenfragmente in einem bestimmten Größenbereich. Die Einführung der Einzelstrangbrüche erfolgt dabei an zufälligen Stellen. Dies spiegelte sich auch in der Signalintensität nach Durchführung der FISH mit Zellen der Zelllinie U1 wider. Trotz der Erzeugung gleich großer Sondenfragmente traten Unterschiede in der Signalintensität auf. Nach Generierung neuer Biotin-markierter DNA-Sonden, musste immer in einem zusätzlichen Kontrollexperiment die ausreichende Sensitivität der Sonde mit Zellen der Zelllinie U1 überprüft werden. Die Permeabilisierung der Zellkerne erfolgte im Rahmen dieser Arbeit über eine proteolytische Vorbehandlung mit Pepsin für 6 min bei 37 °C. Nach dieser Vorbehandlung besaßen die spezifischen Signale in den U1-Zellen eine hohe Signalintensität. Das Austesten der Hybridisierungsbedingungen ist ebenfalls wichtig, damit sich die spezifischen Hybride zwischen den proviralen Ziel-Sequenzen und der DNA-Sonde optimal ausbilden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Hybridisierung bei 37 °C über Nacht, einer Formamidkonzentration von 50 % in 2 x SSC-Puffer. Weiterhin

war die Ermittlung der stringenten Waschbedingungen nach der Hybridisierung von großer Bedeutung zum Entfernen der unspezifisch gebundenen Sonde und somit zur Reduktion der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz. Nach dreimaligem Waschen bei 45 °C mit einem Formamid-haltigen Puffer (50 % Formamid; 2 x SSC-Puffer) wurde das Ergebnis mit der größten Signalintensität erzielt, bei gleichzeitigem Vorkommen einer schwachen unspezifischen Hintergrundfluoreszenz.

Das Mitführen geeigneter Negativkontrollen stellt einen essentiellen Schritt für die Auswertung der Signale am Fluoreszenz-Mikroskop dar. Denn trotz der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Modifikationen lag eine schwache "punktförmige", unspezifische Hintergrundfluoreszenz vor, die teilweise auch in den Zellkernen vorzufinden war. Diese konnte aber von den spezifischen Signalen unterschieden werden, da sie eine wesentlich geringere Intensität aufwies. Deswegen wurde die DNA-FISH auch mit Zellkernen der HIV-negativen promonozytären Zelllinie U937 oder PBL von HIV-negativen Donoren durchgeführt. Bei der Dokumentation am Fluoreszenz-Mikroskop wurden die HIV-positiven und HIV-negativen Zellkerne mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. Das spezifische Signal mit einer hohen Intensität wurde ausschließlich bei den HIV-positiven Zellen dokumentiert. Mit diesem Kontrollverfahren kann gewährleistet werden, dass nur die spezifischen Signale ausgewertet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe des optimierten DNA-FISH-Protokolls spezifisch einzelne Kopien der proviralen HIV-Sequenzen mit einer ausreichenden Signalintensität und einer schwachen Hintergrundfluoreszenz reproduzierbar detektiert werden. In den Interphase-Kernen der HIV-positiven promonozytären Zelllinie U1, wiesen ungefähr 80 % der Zellen ein spezifisches Signal auf, wobei 31 % ein Signal, 43 % zwei Signale und 6 % drei Signale enthielten. Nach *ex vivo* Infektion von HIV-negativen PBL mit

HIV_{Lai} konnten in ungefähr 30 % der Zellen ein spezifisches Signal mit hoher Intensität nachgewiesen werden. In einzelnen Zellen wurden ein bis sechs Signale beobachtet. Die Resultate dieser FISH-Experimente demonstrieren, dass die HIV-spezifische DNA-FISH eine ausreichende Sensitivität besitzt, die mit einer hohen Verlässlichkeit für die Analyse von primärem Probenmaterial eingesetzt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden teilweise Schwankungen im Signal-Hintergrundverhältnis bei der HIV-spezifischen DNA FISH beobachtet. Dies ließe sich möglicherweise durch eine verbesserte Affinität der Sonde zu den komplementären Ziel-Sequenzen verhindern. Möglich wäre der Einbau modifizierter Nukleotide, wie beispielsweise den sogenannten "peptid nucleic acids" (PNA) oder "locked nucleic acids" (LNA). PNA sind Oligomere, bei denen die einzelnen Basen über ein neutrales Peptid-Rückgrat miteinander verbunden sind (Egholm et al., 1993). Diese Modifizierung vermindert die elektrostatische Abstoßung, die normalerweise von dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA ausgeht. LNA sind RNA-Derivate, die modifizierte Ribose-Moleküle enthalten. Durch Einführung eines Methylrestes zwischen dem 2'-Sauerstoffatom und dem 4'-Kohlenstoffatom wird die Ribose in einer 3'-Endo-Konformation gehalten (Nielsen et al. 1999; Petersen et al., 2000). Die Integration von LNA in die Sonden-Sequenz führt zu einer besseren Duplex-Stabilität, was mit einer Erhöhung der Schmelztemperatur verbunden ist (Petersen et al., 2002). Der Vorteil der PNA- und LNA-Sonden besteht in der größeren Hybrid-Stabilität. Deswegen kann das Waschen nach der Hybridisierung unter stringenteren Bedingungen erfolgen, was zu einer verstärkten Reduktion der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz führt. Die spezifisch gebundene Sonde bleibt mit ihrer komplementären Ziel-Sequenz weiterhin verbunden. Ein Nachteil dieser modifizierten Nukleotide besteht in den hohen Kosten der Synthese, weshalb sie im Rahmen dieser Arbeit nicht eingesetzt wurden.

Die Schwankungen der Signalintensität und der Hintergrundfluoreszenz könnte auch durch Detektion der Ziel-Sequenzen mit Hilfe der "branched-DNA"-Signal-Amplifikations-Technologie vermindert werden. Die Signal-Amplifikation wird bei dieser Technologie über zusätzliche DNA-Verzweigungen vermittelt, die über den sequenzspezifischen Oligonukleotid-Sonden aufgebaut werden. Der erste Schritt besteht aus der Detektion der intrazellulären Ziel-Sequenz mit einer Sequenz-spezifischen Oligonukleotid-Sonde, die eine Größe von weniger als 30 Nukleotiden besitzt. An diese Oligonukleotid-Sonden bindet ein "preamplifier", eine DNA-Sequenz, die als Brücke für die Hybridisierung der "amplifier"-DNA fungiert. Der eigentliche Amplifikationsschritt besteht in der Bindung von mehreren Molekülen der "amplifier"-DNA, die mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist. Nach Zugabe des fluoreszierenden Substrates kann nach dessen Umsetzung das verstärkte spezifische Signal am Fluoreszenz-Mikroskop analysiert werden (Urdea et al., 1993). Dieses System besitzt eine sehr hohe Sensitivität und konnte erfolgreich zum Nachweis einzelner DNA-Genome des Humanen Papillomavirus in Zellen einer Zervixkarzinom-abgeleiteten Zelllinie eingesetzt werden (Player et al, 2001). Ein besonderer Vorteil dieser Methode besteht im Einsatz von Oligonukleotid-Sonden, die eine geringe Größe von weniger als 30 Nukleotiden besitzen und so einen leichteren Zugang zu den Ziel-Sequenzen haben. Unter Verwendung von mindestens 15 Oligonukleotid-Sonden konnten mit diesen auch kleinere Ziel-Sequenzen, wie die Gene E6 und E7 von HPV-16, nachgewiesen werden. Die "branched-DNA"-Signal-Amplifikations-Technologie könnte somit optimal zur Detektion der proviralen HIV-DNA eingesetzt werden. Der limitierende Faktor war jedoch auch hier die hohen Kosten für die Synthese der "amplifier"-DNA.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der vorliegenden Arbeit durch die systematische Optimierung verschiedener Parameter der HIV-spezifischen DNA-FISH ein Resultat mit einer hohen Signalintensität reproduzierbar und mit guter Verlässlichkeit etabliert werden. Das Verfahren setzt sich aus

mehreren Teilschritten zusammen, die sehr präzise aufeinander abgestimmt sein müssen, um ein Resultat mit einer ausreichenden Signalintensität zu erzielen. Jedoch wurden zum Teil große Schwankungen in der Signalintensität und dem Vorkommen einer unspezifischen Hintergrundfluoreszenz beobachtet. Die Durchführung der DNA-FISH mit geeigneten Negativ- und Positivkontrollen war die Voraussetzung, um die spezifischen Signale auszuwerten. Die so entwickelte DNA-FISH besitzt eine ausreichende Sensitivität, um FISH-Analysen mit Zellen aus HIV-infizierten Patienten vorzunehmen.

4.3. Nachweis multipler SIV-Proviren in einzelnen infizierten Milzzellen während der Primärvirämie

Die Mehrfachinfektion einer einzelnen Zelle mit mindestens zwei verschiedenen Viren stellt die Voraussetzung für die Erzeugung von Virusvarianten über Rekombinationsereignisse dar. Um zu erklären, ab wann im Infektionsverlauf mehrfach infizierte Zellen vorkommen, wurden Zellen sekundärer lymphatischer Organe aus gut charakterisierten SIV-Infektionsstudien eingesetzt. Die FISH-Analysen wurden mit MNC aus der Milz von SIVmac251-infizierten Rhesusaffen vorgenommen, die den gesamten Infektionszeitraum von der Primärvirämie bis zum AIDS-Stadium abdecken. Die SIV-Infektion bei Rhesusaffen ist weitgehend mit der HIV-Infektion bei Menschen vergleichbar (Geretti, 1999; Hirsch und Lifson, 2000), daher sollten sich diese Ergebnisse auch auf den Menschen übertragen lassen.

Die FISH-Experimente der MNC von Milzen SIV-infizierter Rhesusaffen erfolgten unter den Bedingungen der HIV-spezifischen DNA-FISH (siehe 4.2.), da mit diesem Protokoll ein spezifisches Ergebnis mit einer hohen Verlässlichkeit und ausreichender Signalintensität erzielt wurde. Zum

Nachweis der proviralen SIV-Sequenzen wurde das DNA-FISH-Protokoll mit einer entsprechenden SIV-Sonde durchgeführt und deren spezifische Hybridisierung mit SIVmac239 *ex vivo* infizierter CEMx174-Zellen überprüft. Ungefähr 70 bis 80 % der Interphase-Kerne zeigten spezifische Signale mit einer hohen Intensität. Die Mehrzahl der Zellkerne beinhalteten zwei bis drei Signale, wobei in einem einzelnen Nukleus auch bis zu sechs Signale detektiert werden konnten. Mit diesem Kontrollversuch wurde gezeigt, dass die SIV-spezifische DNA-FISH von ausreichender Sensitivität war.

Die Analysen der Provirus-Kopienzahl SIVmac251-infizierter Milzzellen ergaben, dass die Mehrfachinfektion auf Einzelzellebene während der SIV-Primärvirämie etabliert wird. Die MNC aus der Milz SIV-infizierter Rhesusaffen während der chronischen und späten Phase der Infektion trugen ebenfalls multiple Proviren. In der frühen Phase der Infektion war die Anzahl der Zellkerne mit zwei Provirus-Kopien niedrig (3 % bzw. 2,6 %), nahm aber im Laufe der Infektion zu (11 % in der chronischen und späten Phase der Infektion). In wenigen Zellkernen konnten drei Provirus-Kopien detektiert werden, in 0,7 % der Zellen zwei Wochen nach der Infektion und in 1,5 % der Zellen 51 Wochen nach der Infektion. Mit dem Nachweis multipler Proviren während der Primärvirämie konnte gezeigt werden, dass der Grundstein zur Steigerung der Variantenvielfalt über Rekombinationsereignisse schon in der frühen Phase (zwei Wochen nach Infektionsbeginn) der SIV-Infektion gelegt wird. Dies stimmt damit überein, dass im Affenmodell rekombinante Viren bereits zwei Wochen nach Infektion nachgewiesen werden konnten (Wooley et al., 1997). Des Weiteren zeigen die Resultate der SIV-spezifischen FISH-Experimente, dass die Mehrfachinfektion auf Einzelzellebene während des gesamten Infektionsverlaufs nachzuweisen ist. Die Steigerung der Variantenvielfalt über Rekombinationsereignisse findet demnach kontinuierlich während des gesamten Infektionsgeschehens statt.

Die Bestimmung der SIV-Provirus-Kopienzahl auf Einzelzellebene, insbesondere in der Primärvirämie, kann als Parameter für mathematische Modelle der HIV-Evolution verwendet werden. Um die Dynamik der HIV-Infektion zu simulieren, werden die verschiedenen Prozesse im HIV-Replikationszyklus in Modellrechnungen mit einbezogen: Infektion der Zelle, Punktmutation, Rekombination, Integration multipler Proviren, Virusproduktion, Zusammenbau der Viruspartikel und das Verlassen der Zelle. Die Werte der Modellparameter können zum Teil direkt aus bereits bekannten experimentellen Daten genommen werden, wie beispielsweise die Mutations- und Rekombinationsrate sowie die Provirusverteilung (Jetzt et al., 2000; Jung et al., 2002; Levy et al., 2004; Mansky und Temin, 1995). Mit einem bereits beschriebenen Modell konnte der Einfluss multipler HIV-Proviruskopien pro infizierter Zelle und der Rekombinationsereignisse auf die schnelle Zunahme der Sequenzdiversität von HIV abgeschätzt werden (Bocharov et al., 2005). Die zugrunde liegenden Daten der Provirus-Kopienzahl stammen aus den DNA-FISH-Studien. Das Probenmaterial stammt von HIV-positiven Patienten während der chronischen Phase und der späten Phase des Infektionsverlaufs. In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis der Mehrfachinfektion während der Primärvirämie. Dieser Parameter kann in zukünftige Modellrechnungen mit einbezogen werden und erlaubt somit die Abschätzung der Dynamik der HIV-Evolution beginnend mit der Primärvirämie.

Zusammenfassend lassen die Daten der SIV-spezifischen DNA-FISH-Experimente die zentrale Bedeutung der Mehrfachinfektion auf Einzelzellebene für die Erzeugung neuer Virusvarianten über Rekombinationsereignisse erkennen. Die Rekombinationsrate ist mit 3-30 Rekombinationsereignissen pro Genom pro Replikationsrunde hoch (Jetzt et al., 2000; Levy et al., 2004), weshalb dieser Mechanismus ein großes Potential zur Steigerung der genetischen Variabilität besitzt. Mit dem Nachweis der Mehrfachinfektion einzelner infizierter Zellen zwei Wochen nach der Infektion konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der Sequenzvariabilität über

Rekombinationen während der Primärvirämie einsetzt. Die Bestimmung multipler Proviren während des gesamten Infektionsverlaufs demonstriert, dass dieser Prozess ein kontinuierlich stattfindendes Ereignis darstellt. Die Ergebnisse der FISH-Analysen geben einen Einblick in die Virusevolution auf Einzelzellebene. Deren genaue Analyse ist für das Verständnis grundlegender Prozesse während des Infektionsgeschehens von großer Bedeutung.

5. Zusammenfassung

HIV zeichnet sich durch eine hohe genetische Variabilität aus. Die fehlerbehaftete Replikation stellt ein wesentliches Charakteristikum und die Grundlage für die Pathogenität dar. Um Einblicke in grundlegende Veränderungsmechanismen von HIV zu gewinnen, ist eine Analyse auf Ebene einzelner infizierter Zellen von Patienten notwendig. Die HIV-spezifische FISH spielt bei den Untersuchungen auf Einzelzellebene eine entscheidende Rolle. In dieser Arbeit konnte sowohl die RNA-FISH als auch die DNA-FISH erfolgreich etabliert und optimiert werden. Mit Hilfe beider Methoden gelang es, Patientenmaterial bezüglich der Zahl produktiv-infizierter Zellen und der Provirus-Kopienzahl zu analysieren. In einzelnen Zellen aus lymphatischen Geweben von SIV-infizierten Rhesus Makaken wurden von der Primärvirämie bis zum späten Stadium der Infektion zwei bis drei provirale SIV-Sequenzen spezifisch detektiert. Der Nachweis der Mehrfachinfektion in einzelnen MNC aus der Milz eines Rhesusaffens zwei Wochen nach Beginn der Infektion zeigte, dass der Grundstein zur Steigerung der Variantenvielfalt über Rekombinationsereignisse in der frühen Phase der Infektion gelegt wird. Die Bestimmung multipler Proviren während des gesamten Infektionsverlaufs demonstriert, dass dieser Prozess als ein kontinuierlich stattfindendes Ereignis während des Infektionsgeschehens anzusehen ist. Diese Daten dienen nun als Basis mathematischer Modellrechnungen zur HIV-Evolution.

6. *Summary*

The pathogenic retrovirus HIV is characterized by a high genetic diversity, which is induced by different error processes. To get detailed insights into mechanisms that contribute to the genetic variants, the analysis of single infected cells of HIV-positive patients is essential. The HIV-specific FISH is of great importance for analysing HIV-infection on the single cell level. In the present work, the technical improvement of both, the HIV-specific RNA-FISH and the HIV-specific DNA-FISH, was successful. Using both techniques, productively infected cells and the provirus copy number in patient material could be determined. With the help of the SIV-specific DNA-FISH, two or three integrated proviral SIV-sequences were detected in single splenocytes of SIV-infected rhesus macaques from the primary viremia to the late stage of infection. The detection of multiple proviruses within single cells two weeks post infection shows that the increase of genetic diversity via recombination begins in the primary stage of infection. Furthermore, the detection of multiinfection in single cells during the complete course of infection demonstrates that recombination is a dominant continuous mechanism for generating new virus variants. These results will be incorporated as fundamental parameters in a mathematical model for simulating HIV-evolution.

7. Literatur

Ahlquist, P., Noueir, A. O., Lee, W. M., Kushner, D. B. & Dye, B. T. (2003). Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* **77**, 8181-8186.

Amann, R. & Fuchs, B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* **6**, 339-348.

Ayouba, A., Souquieres, S., Njinku, B. & other authors (2000). HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *Aids* **14**, 2623-2625.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F. & other authors (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.

Bauman, J. G., Wiegant, J., Borst, P. & van Duijn, P. (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res* **128**, 485-490.

Beltz, H., Piemont, E., Schaub, E., Ficheux, D., Roques, B., Darlix, J. L. & Mely, Y. (2004). Role of the structure of the top half of HIV-1 cTAR DNA on the nucleic acid destabilizing activity of the nucleocapsid protein NCp7. *J Mol Biol* **338**, 711-723.

Bennett, S. (2004). Solexa Ltd. *Pharmacogenomics* **5**, 433-438.

Bennett, S. T., Barnes, C., Cox, A., Davies, L. & Brown, C. (2005). Toward the 1,000 dollars human genome. *Pharmacogenomics* **6**, 373-382.

Bienz, K., Egger, D., Troxler, M. & Pasamontes, L. (1990). Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol* **64**, 1156-1163.

Bienz, K., Egger, D., Pfister, T. & Troxler, M. (1992). Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J Virol* **66**, 2740-2747.

Blight, K. J., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2002). Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **76**, 13001-13014.

Bocharov, G., Ford, N. J., Edwards, J., Breinig, T., Wain-Hobson, S. & Meyerhans, A. (2005). A genetic-algorithm approach to simulating human immunodeficiency virus evolution reveals the strong impact of multiply infected cells and recombination. *J Gen Virol* **86**, 3109-3118.

Bolten, R., Egger, D., Gosert, R., Schaub, G., Landmann, L. & Bienz, K. (1998). Intracellular localization of poliovirus plus- and minus-strand RNA visualized by strand-specific fluorescent In situ hybridization. *J Virol* **72**, 8578-8585.

Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X. & other authors (1997). Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* **3**, 205-211.

Bowerman, B., Brown, P. O., Bishop, J. M. & Varmus, H. E. (1989). A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev* **3**, 469-478.

Bregues, M., Teixeira, D. & Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**, 486-489.

Brenner, B. G., Routy, J. P., Petrella, M. & other authors (2002). Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *J Virol* **76**, 1753-1761.

Brinchmann, J. E., Albert, J. & Vartdal, F. (1991). Few infected CD4+ T cells but a high proportion of replication-competent provirus copies in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **65**, 2019-2023.

Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P. & other authors (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**, 666-669.

Chan, D. C. & Kim, P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684.

Chun, T. W., Engel, D., Mizell, S. B., Ehler, L. A. & Fauci, A. S. (1998). Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines. *J Exp Med* **188**, 83-91.

Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J. R. & Bushman, F. (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* **11**, 1287-1289.

Clever, J., Sasseti, C. & Parslow, T. G. (1995). RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**, 2101-2109.

Clouse, K. A., Powell, D., Washington, I. & other authors (1989). Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone. *J Immunol* **142**, 431-438.

Coffin, J. M. (1979). Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen Virol* **42**, 1-26.

Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A. & other authors (1986). What to call the AIDS virus? *Nature* **321**, 10.

Cornelissen, M., van den Burg, R., Zorgdrager, F., Lukashov, V. & Goudsmit, J. (1997). pol gene diversity of five human immunodeficiency virus type 1 subtypes: evidence for naturally occurring mutations that contribute to drug resistance, limited recombination patterns, and common ancestry for subtypes B and D. *J Virol* **71**, 6348-6358.

Cougot, N., Babajko, S. & Seraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol* **165**, 31-40.

Cox, K. H., DeLeon, D. V., Angerer, L. M. & Angerer, R. C. (1984). Detection of mrnas in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev Biol* **101**, 485-502.

Cremer, T., Landegent, J., Bruckner, A., Scholl, H. P., Schardin, M., Hager, H. D., Devilee, P., Pearson, P. & van der Ploeg, M. (1986). Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* **74**, 346-352.

Delassus, S., Cheynier, R. & Wain-Hobson, S. (1992). Nonhomogeneous distribution of human immunodeficiency virus type 1 proviruses in the spleen. *J Virol* **66**, 5642-5645.

Derebail, S. S., Heath, M. J. & DeStefano, J. J. (2003). Evidence for the differential effects of nucleocapsid protein on strand transfer in various regions of the HIV genome. *J Biol Chem* **278**, 15702-15712.

DeStefano, J. J., Mallaber, L. M., Rodriguez-Rodriguez, L., Fay, P. J. & Bambara, R. A. (1992). Requirements for strand transfer between internal regions of heteropolymer templates by human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* **66**, 6370-6378.

DeStefano, J. J., Bambara, R. A. & Fay, P. J. (1994). The mechanism of human immunodeficiency virus reverse transcriptase-catalyzed strand transfer from internal regions of heteropolymeric RNA templates. *J Biol Chem* **269**, 161-168.

Dirks, R. W., van de Rijke, F. M., Fujishita, S., van der Ploeg, M. & Raap, A. K. (1993). Methodologies for specific intron and exon RNA localization in cultured cells by haptenized and fluorochromized probes. *J Cell Sci* **104** (Pt 4), 1187-1197.

Egger, D. & Bienz, K. (2002). Recombination of poliovirus RNA proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication start sites. *J Virol* **76**, 10960-10971.

Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. & Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**, 5974-5984.

Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L. & other authors (1993). PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **365**, 566-568.

Evans, M. F., Mount, S. L., Beatty, B. G. & Cooper, K. (2002). Biotinyl-tyramide-based in situ hybridization signal patterns distinguish human papillomavirus type and grade of cervical intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* **15**, 1339-1347.

Farnet, C. M. & Haseltine, W. A. (1991). Circularization of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. *J Virol* **65**, 6942-6952.

Fassati, A. & Goff, S. P. (2001). Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**, 3626-3635.

Fleming, K. A., Evans, M., Ryley, K. C., Franklin, D., Lovell-Badge, R. H. & Morey, A. L. (1992). Optimization of non-isotopic in situ hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded material using digoxigenin-labelled probes and transgenic tissues. *J Pathol* **167**, 9-17.

Folks, T. M., Justement, J., Kinter, A., Dinarello, C. A. & Fauci, A. S. (1987). Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. *Science* **238**, 800-802.

Folks, T. M., Clouse, K. A., Justement, J., Rabson, A., Duh, E., Kehrl, J. H. & Fauci, A. S. (1989). Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2365-2368.

Frankel, A. D. & Young, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**, 1-25.

Galetto, R. & Negroni, M. (2005). Mechanistic features of recombination in HIV. *AIDS Rev* **7**, 92-102.

Gao, F., Robertson, D. L., Morrison, S. G. & other authors (1996). The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* **70**, 7013-7029.

Gao, F., Robertson, D. L., Carruthers, C. D. & other authors (1998). An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I). *J Virol* **72**, 10234-10241.

Gao, F., Vidal, N., Li, Y. & other authors (2001). Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 675-688.

Gelderblom, H. R., Ozel, M. & Pauli, G. (1989). Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch Virol* **106**, 1-13.

Geretti, A. M. (1999). Simian immunodeficiency virus as a model of human HIV disease. *Rev Med Virol* **9**, 57-67.

Gerhard, D. S., Kawasaki, E. S., Bancroft, F. C. & Szabo, P. (1981). Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 3755-3759.

Goodenow, M., Huet, T., Saurin, W., Kwok, S., Sninsky, J. & Wain-Hobson, S. (1989). HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2**, 344-352.

Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K. & Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* **77**, 5487-5492.

Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A. & Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**, 1425-1431.

Goulder, P. J., Phillips, R. E., Colbert, R. A. & other authors (1997). Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* **3**, 212-217.

Gray, J. W., Pinkel, D. & Brown, J. M. (1994). Fluorescence in situ hybridization in cancer and radiation biology. *Radiat Res* **137**, 275-289.

Greene, W. C. & Peterlin, B. M. (2002). Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* **8**, 673-680.

Gurtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M. & Kaptue, L. (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* **68**, 1581-1585.

Harper, M. E. & Saunders, G. F. (1981). Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* **83**, 431-439.

Harris, R. S., Bishop, K. N., Sheehy, A. M., Craig, H. M., Petersen-Mahrt, S. K., Watt, I. N., Neuberger, M. S. & Malim, M. H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**, 803-809.

Haseltine, W. A. (1991). Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *Faseb J* **5**, 2349-2360.

Havlic, D. V., Eastman, S., Gamst, A. & Richman, D. D. (1996). Nevirapine-resistant human immunodeficiency virus: kinetics of replication and estimated prevalence in untreated patients. *J Virol* **70**, 7894-7899.

Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A. & other authors (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7311-7315.

Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D. & Osmanov, S. (2006). Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *Aids* **20**, W13-23.

Herbst, H. (1996). Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Semin Cancer Biol* **7**, 183-189.

Herbst, H., Foss, H. D., Samol, J., Araujo, I., Klotzbach, H., Krause, H., Agathangelou, A., Niedobitek, G. & Stein, H. (1996). Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood* **87**, 2918-2929.

Herbst, H., Samol, J., Foss, H. D., Raff, T. & Niedobitek, G. (1997). Modulation of interleukin-6 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells by Epstein-Barr virus. *J Pathol* **182**, 299-306.

Hindmarsh, P. & Leis, J. (1999). Retroviral DNA integration. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 836-843, table of contents.

- Hirsch, V. M. & Lifson, J. D. (2000).** Simian immunodeficiency virus infection of monkeys as a model system for the study of AIDS pathogenesis, treatment, and prevention. *Adv Pharmacol* **49**, 437-477.
- Holtke, H. J. & Kessler, C. (1990).** Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection. *Nucleic Acids Res* **18**, 5843-5851.
- Hopman, A. H., Kamps, M. A., Smedts, F., Speel, E. J., Herrington, C. S. & Ramaekers, F. C. (2005).** HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer* **115**, 419-428.
- Janssens, W., Heyndrickx, L., Fransen, K., Temmerman, M., Leonaers, A., Ivens, T., Motte, J., Piot, P. & Van der Groen, G. (1994).** Genetic variability of HIV type 1 in Kenya. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 1577-1579.
- Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J. & Navaratnam, N. (2002).** An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* **79**, 285-296.
- Jetzt, A. E., Yu, H., Klarmann, G. J., Ron, Y., Preston, B. D. & Dougherty, J. P. (2000).** High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* **74**, 1234-1240.
- Joos, S., Fink, T. M., Ratsch, A. & Lichter, P. (1994).** Mapping and chromosome analysis: the potential of fluorescence in situ hybridization. *J Biotechnol* **35**, 135-153.
- Jung, A., Maier, R., Vartanian, J. P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., Meese, E., Wain-Hobson, S. & Meyerhans, A. (2002).** Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* **418**, 144.
- Kawashima, Y., Pfafferott, K., Frater, J. & other authors (2009).** Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I. *Nature* **458**, 641-645.
- Kieken, F., Paquet, F., Brule, F., Paoletti, J. & Lancelot, G. (2006).** A new NMR solution structure of the SL1 HIV-1Lai loop-loop dimer. *Nucleic Acids Res* **34**, 343-352.
- Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M. & other authors (1998).** Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**, 1302-1307.
- Kils-Hutten, L., Cheynier, R., Wain-Hobson, S. & Meyerhans, A. (2001).** Phylogenetic reconstruction of inpatient evolution of human immunodeficiency virus type 1: predominance of drift and purifying selection. *J Gen Virol* **82**, 1621-1627.

- Klimecki, W. T., Futscher, B. W. & Dalton, W. S. (1994).** Effects of ethanol and paraformaldehyde on RNA yield and quality. *Biotechniques* **16**, 1021-1023.
- Klotman, M. E., Kim, S., Buchbinder, A., DeRossi, A., Baltimore, D. & Wong-Staal, F. (1991).** Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5011-5015.
- Kohlstaedt, L. A. & Steitz, T. A. (1992).** Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus can use either human tRNA(3Lys) or Escherichia coli tRNA(2Gln) as a primer in an in vitro primer-utilization assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9652-9656.
- Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S. & Bhattacharya, T. (2000).** Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**, 1789-1796.
- Kuiken, C., Thakallapalli, R., Esklid, A. & de Ronde, A. (2000).** Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. *Am J Epidemiol* **152**, 814-822.
- Kumar, P. P., Mehta, S., Purbey, P. K. & other authors (2007).** SATB1-binding sequences and Alu-like motifs define a unique chromatin context in the vicinity of human immunodeficiency virus type 1 integration sites. *J Virol* **81**, 5617-5627.
- Langer, P. R., Waldrop, A. A. & Ward, D. C. (1981).** Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6633-6637.
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F. & Hance, A. J. (2003).** Hypermethylation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **300**, 1112.
- Levsky, J. M. & Singer, R. H. (2003).** Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci* **116**, 2833-2838.
- Levy, D. N., Aldrovandi, G. M., Kutsch, O. & Shaw, G. M. (2004).** Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4204-4209.
- Lichtman, J. W. & Conchello, J. A. (2005).** Fluorescence microscopy. *Nat Methods* **2**, 910-919.
- Liddament, M. T., Brown, W. L., Schumacher, A. J. & Harris, R. S. (2004).** APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* **14**, 1385-1391.

- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J. & other authors (2005).** Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623-626.
- Louwagie, J., McCutchan, F. E., Peeters, M. & other authors (1993).** Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *Aids* **7**, 769-780.
- Malcolm, S., Barton, P., Murphy, C. & Ferguson-Smith, M. A. (1981).** Chromosomal localization of a single copy gene by in situ hybridization--human beta globin genes on the short arm of chromosome 11. *Ann Hum Genet* **45**, 135-141.
- Mansky, L. M. & Temin, H. M. (1995).** Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* **69**, 5087-5094.
- Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H. & Landau, N. R. (2003).** Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**, 21-31.
- McCutchan, F. E., Salminen, M. O., Carr, J. K. & Burke, D. S. (1996).** HIV-1 genetic diversity. *Aids* **10 Suppl 3**, S13-20.
- McCutchan, F. E. (2000).** Understanding the genetic diversity of HIV-1. *Aids* **14 Suppl 3**, S31-44.
- McCutchan, F. E. (2006).** Global epidemiology of HIV. *J Med Virol* **78 Suppl 1**, S7-S12.
- McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J. P., Oksenhendler, E., Debre, P. & Hosmalin, A. (1995).** Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol* **69**, 4737-4745.
- McNicol, A. M. & Farquharson, M. A. (1997).** In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *J Pathol* **182**, 250-261.
- Meyerhans, A., Cheynier, R., Albert, J., Seth, M., Kwok, S., Sninsky, J., Morfeldt-Manson, L., Asjo, B. & Wain-Hobson, S. (1989).** Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* **58**, 901-910.
- Miranda, L. R., Schaefer, B. C., Kupfer, A., Hu, Z. & Franzusoff, A. (2002).** Cell surface expression of the HIV-1 envelope glycoproteins is directed from intracellular CTLA-4-containing regulated secretory granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8031-8036.
- Mitelman, F., Johansson, B., Mandahl, N. & Mertens, F. (1997).** Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **95**, 1-8.

- Mitsuya, H., Weinhold, K. J., Furman, P. A., St Clair, M. H., Lehrman, S. N., Gallo, R. C., Bolognesi, D., Barry, D. W. & Broder, S. (1985). 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7096-7100.
- Modrow S., Falke D. (1997). *Molekulare Virologie*. Spektrum, Akademischer Verlag
- Montavon, C., Toure-Kane, C., Liegeois, F. & other authors (2000). Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J Acquir Immune Defic Syndr* **23**, 363-374.
- Montavon, C., Vergne, L., Bourgeois, A., Mpoudi-Ngole, E., Malonga-Mouellet, G., Butel, C., Toure-Kane, C., Delaporte, E. & Peeters, M. (2002). Identification of a new circulating recombinant form of HIV type 1, CRF11-cpx, involving subtypes A, G, J, and CRF01-AE, in Central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**, 231-236.
- Moore, M. D., Fu, W., Nikolaitchik, O., Chen, J., Ptak, R. G. & Hu, W. S. (2007). Dimer initiation signal of human immunodeficiency virus type 1: its role in partner selection during RNA copackaging and its effects on recombination. *J Virol* **81**, 4002-4011.
- Moumen, A., Polomack, L., Roques, B., Buc, H. & Negroni, M. (2001). The HIV-1 repeated sequence R as a robust hot-spot for copy-choice recombination. *Nucleic Acids Res* **29**, 3814-3821.
- Moumen, A., Polomack, L., Unge, T., Veron, M., Buc, H. & Negroni, M. (2003). Evidence for a mechanism of recombination during reverse transcription dependent on the structure of the acceptor RNA. *J Biol Chem* **278**, 15973-15982.
- Muesing, M. A., Smith, D. H., Cabradilla, C. D., Benton, C. V., Lasky, L. A. & Capon, D. J. (1985). Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* **313**, 450-458.
- Naidu, Y. M., Kestler, H. W., 3rd, Li, Y. & other authors (1988). Characterization of infectious molecular clones of simian immunodeficiency virus (SIVmac) and human immunodeficiency virus type 2: persistent infection of rhesus monkeys with molecularly cloned SIVmac. *J Virol* **62**, 4691-4696.
- Negroni, M. & Buc, H. (1999). Recombination during reverse transcription: an evaluation of the role of the nucleocapsid protein. *J Mol Biol* **286**, 15-31.

- Neumann, T., Hagmann, I., Lohrengel, S., Heil, M. L., Derdeyn, C. A., Krausslich, H. G. & Dittmar, M. T. (2005). T20-insensitive HIV-1 from naive patients exhibits high viral fitness in a novel dual-color competition assay on primary cells. *Virology* **333**, 251-262.
- Nielsen, C. B., Singh, S. K., Wengel, J. & Jacobsen, J. P. (1999). The solution structure of a locked nucleic acid (LNA) hybridized to DNA. *J Biomol Struct Dyn* **17**, 175-191.
- Oscier, D. G. (1999). Cytogenetics and molecular genetics of chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica* **84 Suppl EHA-4**, 88-91.
- Osmanov, S., Pattou, C., Walker, N., Schwardlander, B. & Esparza, J. (2002). Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**, 184-190.
- Pantaleo, G., Graziosi, C., Butini, L., Pizzo, P. A., Schnittman, S. M., Kotler, D. P. & Fauci, A. S. (1991). Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9838-9842.
- Patterson, B. K., Mosiman, V. L., Cantarero, L., Furtado, M., Bhattacharya, M. & Goolsby, C. (1998). Detection of HIV-RNA-positive monocytes in peripheral blood of HIV-positive patients by simultaneous flow cytometric analysis of intracellular HIV RNA and cellular immunophenotype. *Cytometry* **31**, 265-274.
- Pauletti, G., Godolphin, W., Press, M. F. & Slamon, D. J. (1996). Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* **13**, 63-72.
- Peeters, M. & Delaporte, E. (1999). [Genetic diversity of HIV infection worldwide and its consequences]. *Med Trop (Mars)* **59**, 449-455.
- Peeters, M., Liegeois, F., Torimiro, N., Bourgeois, A., Mpoudi, E., Vergne, L., Saman, E., Delaporte, E. & Saragosti, S. (1999). Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J Virol* **73**, 7368-7375.
- Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. & Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**, 1582-1586.
- Petersen, M., Nielsen, C. B., Nielsen, K. E. & other authors (2000). The conformations of locked nucleic acids (LNA). *J Mol Recognit* **13**, 44-53.
- Petersen, M., Bondensgaard, K., Wengel, J. & Jacobsen, J. P. (2002). Locked nucleic acid (LNA) recognition of RNA: NMR solution structures of LNA:RNA hybrids. *J Am Chem Soc* **124**, 5974-5982.

- Phillips, R. E., Rowland-Jones, S., Nixon, D. F. & other authors (1991).** Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* **354**, 453-459.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J. W. (1986).** Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2934-2938.
- Player, A. N., Shen, L. P., Kenny, D., Antao, V. P. & Kolberg, J. A. (2001).** Single-copy gene detection using branched DNA (bDNA) in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* **49**, 603-612.
- Plikat, U., Nieselt-Struwe, K. & Meyerhans, A. (1997).** Genetic drift can dominate short-term human immunodeficiency virus type 1 nef quasispecies evolution in vivo. *J Virol* **71**, 4233-4240.
- Poli, G., Kinter, A., Justement, J. S., Kehrl, J. H., Bressler, P., Stanley, S. & Fauci, A. S. (1990).** Tumor necrosis factor alpha functions in an autocrine manner in the induction of human immunodeficiency virus expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 782-785.
- Price, D. A., Goulder, P. J., Klenerman, P., Sewell, A. K., Easterbrook, P. J., Troop, M., Bangham, C. R. & Phillips, R. E. (1997).** Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1890-1895.
- Qian, J., Bostwick, D. G., Takahashi, S., Borell, T. J., Herath, J. F., Lieber, M. M. & Jenkins, R. B. (1995).** Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* **55**, 5408-5414.
- Raap, A. K., van de Corput, M. P., Vervenne, R. A., van Gijlswijk, R. P., Tanke, H. J. & Wiegant, J. (1995).** Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum Mol Genet* **4**, 529-534.
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R. & other authors (1985).** Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**, 277-284.
- Richman, D. D., Havlir, D., Corbeil, J. & other authors (1994).** Nevirapine resistance mutations of human immunodeficiency virus type 1 selected during therapy. *J Virol* **68**, 1660-1666.
- Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J. & Petropoulos, C. J. (2003).** Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4144-4149.

- Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977).** Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* **113**, 237-251.
- Robertson, D. L., Sharp, P. M., McCutchan, F. E. & Hahn, B. H. (1995).** Recombination in HIV-1. *Nature* **374**, 124-126.
- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A. & other authors (2000).** HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**, 55-56.
- Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J. & other authors (2005).** Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **353**, 1673-1684.
- Ross, H. A. & Rodrigo, A. G. (2002).** Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *J Virol* **76**, 11715-11720.
- Rudkin, G. T. & Stollar, B. D. (1977).** High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* **265**, 472-473.
- Salter, R. D., Howell, D. N. & Cresswell, P. (1985).** Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* **21**, 235-246.
- Sanchez-Pescador, R., Power, M. D., Barr, P. J. & other authors (1985).** Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* **227**, 484-492.
- Schnittman, S. M., Psallidopoulos, M. C., Lane, H. C., Thompson, L., Baseler, M., Massari, F., Fox, C. H., Salzman, N. P. & Fauci, A. S. (1989).** The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**, 305-308.
- Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R. & Bushman, F. (2002).** HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521-529.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D. & Malim, M. H. (2002).** Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646-650.
- Sheth, U. & Parker, R. (2003).** Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805-808.
- Simmonds, P., Balfe, P., Peutherer, J. F., Ludlam, C. A., Bishop, J. O. & Brown, A. J. (1990).** Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J Virol* **64**, 864-872.

Simon, F., Mauclore, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barre-Sinoussi, F. & Brun-Vezinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* **4**, 1032-1037.

Skripkin, E., Paillart, J. C., Marquet, R., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1994). Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4945-4949.

Smit, V. T., Wessels, J. W., Mollevanger, P. & other authors (1991). Improved interpretation of complex chromosomal rearrangements by combined GTG banding and in situ suppression hybridization using chromosome-specific libraries and cosmid probes. *Genes Chromosomes Cancer* **3**, 239-248.

Soudeyns, H., Paolucci, S., Chappey, C., Daucher, M. B., Graziosi, C., Vaccarezza, M., Cohen, O. J., Fauci, A. S. & Pantaleo, G. (1999). Selective pressure exerted by immunodominant HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses during primary infection drives genetic variation restricted to the cognate epitope. *Eur J Immunol* **29**, 3629-3635.

Speicher, M. R., Gwyn Ballard, S. & Ward, D. C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* **12**, 368-375.

Stefano, K. A., Collman, R., Kolson, D., Hoxie, J., Nathanson, N. & Gonzalez-Scarano, F. (1993). Replication of a macrophage-tropic strain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in a hybrid cell line, CEMx174, suggests that cellular accessory molecules are required for HIV-1 entry. *J Virol* **67**, 6707-6715.

Steffy, K. & Wong-Staal, F. (1991). Genetic regulation of human immunodeficiency virus. *Microbiol Rev* **55**, 193-205.

Sultan, M., Schulz, M. H., Richard, H. & other authors (2008). A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* **321**, 956-960.

Takehisa, J., Zekeng, L., Ido, E., Yamaguchi-Kabata, Y., Mboudjeka, I., Harada, Y., Miura, T., Kaptu, L. & Hayami, M. (1999). Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon. *J Virol* **73**, 6810-6820.

Temin, H. M. (1976). The DNA provirus hypothesis. *Science* **192**, 1075-1080.

Temin, H. M. (1995). Genetics of retroviruses. *Ann N Y Acad Sci* **758**, 161-165.

- Teng, B., Burant, C. F. & Davidson, N. O. (1993).** Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* **260**, 1816-1819.
- Triques, K., Bourgeois, A., Vidal, N. & other authors (2000).** Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 139-151.
- Urdea, M. S., Wilber, J. C., Yeghiazarian, T. & other authors (1993).** Direct and quantitative detection of HIV-1 RNA in human plasma with a branched DNA signal amplification assay. *Aids* **7 Suppl 2**, S11-14.
- Van Gelder, R. N., von Zastrow, M. E., Yool, A., Dement, W. C., Barchas, J. D. & Eberwine, J. H. (1990).** Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1663-1667.
- Van Rompay, K. K., Marthas, M. L., Ramos, R. A., Mandell, C. P., McGowan, E. K., Joye, S. M. & Pedersen, N. C. (1992).** Simian immunodeficiency virus (SIV) infection of infant rhesus macaques as a model to test antiretroviral drug prophylaxis and therapy: oral 3'-azido-3'-deoxythymidine prevents SIV infection. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 2381-2386.
- Vartanian, J. P., Henry, M. & Wain-Hobson, S. (2002).** Sustained G→A hypermutation during reverse transcription of an entire human immunodeficiency virus type 1 strain Vau group O genome. *J Gen Virol* **83**, 801-805.
- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S. & Alizon, M. (1985).** Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* **40**, 9-17.
- Wain-Hobson, S., Renoux-Elbe, C., Vartanian, J. P. & Meyerhans, A. (2003).** Network analysis of human and simian immunodeficiency virus sequence sets reveals massive recombination resulting in shorter pathways. *J Gen Virol* **84**, 885-895.
- Wetmur, J. G. (1991).** DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **26**, 227-259.
- Wiegant, J., Ried, T., Nederlof, P. M., van der Ploeg, M., Tanke, H. J. & Raap, A. K. (1991).** In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Res* **19**, 3237-3241.
- Wolinsky, S. M., Korber, B. T., Neumann, A. U. & other authors (1996).** Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* **272**, 537-542.
- Wooley, D. P., Smith, R. A., Czajak, S. & Desrosiers, R. C. (1997).** Direct demonstration of retroviral recombination in a rhesus monkey. *J Virol* **71**, 9650-9653.

Wu, W., Blumberg, B. M., Fay, P. J. & Bambara, R. A. (1995). Strand transfer mediated by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in vitro is promoted by pausing and results in misincorporation. *J Biol Chem* **270**, 325-332.

Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L. & Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**, 173-185.

Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R. J., Zhang, C., Arunachalam, S. C. & Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**, 94-98.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G. & other authors (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9294-9299.

Danksagung:

Allen voran gilt mein besonderer Dank Prof. Andreas Meyerhans für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung, die Schaffung von Freiräumen zum eigenständigen Arbeiten sowie seine ständige Bereitschaft zur fachlichen Diskussion und Unterstützung meiner Arbeit.

Ebenso möchte ich Prof. Eckart Meese für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Bei allen Mitarbeitern der Virologie/Homburg möchte ich mich herzlich für die nette Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft bedanken, vor allem aber auch bei dem ehemaligen Leiter des Instituts für Virologie, Prof. Nikolaus Müller-Lantzsch.

Mein Dank richtet sich auch an Prof. Friedrich Grässer für die Kooperation und die freundliche Unterstützung.

Für die Bereitstellung der Milzzellen HIV-positiver Patienten, dem SIV-Plasmid sowie für den Forschungsaufenthalt am Institut Pasteur, Paris danke ich Prof. Simon Wain-Hobson. Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Sieghart Sopper für Kooperation hinsichtlich des SIV-infizierten Probenmaterials.

Darüber hinaus möchte ich mich besonders bei Dr. Tanja Breinig bedanken, die mich mit viel Geduld, fachlicher Kompetenz, stete Diskussionsbereitschaft unterstützte und mir mit zahlreichen aufmunternden Gesprächen sehr beim Erstellen dieser Arbeit geholfen hat.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich für die große Hilfsbereitschaft und Freude an der Arbeit im Labor, sowie die freundschaftliche Unterstützung bei Christina Hohn, Marie-Luise Kaiser, Birgit Glombitza, Martina Fuß, Angela Mazzotta, Nicoletta Scheller, Tanja Tänzer, Michael Erhardt, Rui Galao, Leonardo Mina, Javier Martinez, Stefanie Koch, Jochen Reiter, Elke Sartorius, Tim Schenkel und Rodolphe Suspene.

Meinem Freund Bastian Ruschel danke ich über alles dafür, dass er mir mit viel Geduld und Verständnis in der letzten und schwierigsten Phase meiner Doktorarbeit zur Seite gestanden hat.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern und meinem "kleinen" Bruder für ihren unermüdlichen moralischen Beistand in jeder Phase meiner Doktorarbeitszeit. Ohne ihren Rückhalt, ihren aufbauenden und stets motivierenden Zuspruch wäre das Erstellen meiner Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

Persönliche Angaben

Name:	Anke Schultz
Geburtsdatum:	06.08.1979
Geburtsort:	Saarbrücken

Schulbildung

1986 – 1990	Grund- und Hauptschule Merchweiler
1990 – 1999	Illtal-Gymnasium-Illingen

Allgemeine Hochschulreife

Wissenschaftlicher Werdegang

1999 – 2004	Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes Hauptfach: Virologie Nebenfächer: Humangenetik und Zellbiologie Thema der Diplomarbeit: Etablierung der HIV-spezifischen RNA-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung auf Einzelzellebene Abschluß mit Auszeichnung
-------------	---

2004-2009	Anfertigung der Dissertation an den Universitätskliniken Homburg/Saar, Institut für Virologie Thema der Dissertation: Die Methode der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung zur Analyse von HIV- und SIV-Genomen auf Einzelzellebene Betreuer: Prof. Andreas Meyerhans
-----------	---

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, Mai 2009

(Anke Schultz)