

**Bedeutung von N-Glycanen  
im V3-Bereich des HIV-1 Hüllproteins gp120 für die  
Korezeptornutzung und Neutralisierbarkeit von HIV-1**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Svenja Polzer**

aus Langen

Hamburg 2002

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. SCHMITZ

Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. E. Heinz

Tag der Disputation: 05. Juli 2002

Hamburg, den 15. Juni 2002



Professor Dr. U. Wienand  
Dekan

## Inhalt

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1	Die HIV-Erkrankung .....	6
1.2	Der Aufbau des HIV-1 .....	7
1.3	Die Genomstruktur des HIV-1 .....	10
1.4	Der Replikationszyklus des HIV-1 .....	13
1.5	Der Zelltropismus des HIV-1 .....	16
1.6	Die HIV-1 Rezeptoren .....	17
1.7	Die Struktur des HIV-1 Oberflächenproteins gp120 .....	21
1.8	Die N-Glycosylierungen des gp120 .....	23
1.9	V3-Loop Glycosylierung von Primären HIV-1 Isolaten .....	28
1.10	Ziel dieser Arbeit .....	30
<b>2</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>31</b>
2.1	Bakterien und Zellen .....	31
2.1.1	Bakterien .....	31
2.1.2	Zellen .....	31
2.2	Enzyme .....	32
2.3	Plasmide .....	32
2.4	Seren .....	35
2.5	Antikörper .....	35
2.6	Chemokine .....	35
2.7	verwendete Reaktionssysteme .....	35
2.8	Oligonukleotide .....	36
2.9	Chemikalien .....	40
2.10	Plastikwaren .....	40
2.11	Medien .....	41
2.11.1	Medien für die Zellkultur .....	41
2.11.2	Medien für die Bakterienkultur .....	41
2.12	Verwendete Puffer .....	42
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>43</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	43
3.1.1	Anzucht und Lagerung von Bakterien .....	43

3.1.2	Präparation chemisch kompetenter Bakterien .....	43
3.1.3	Transformation von <i>E. coli</i> .....	44
3.1.4	Präparation von Plasmid-DNA .....	44
3.1.5	Reinigung von DNA .....	44
3.1.6	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	44
3.1.7	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	45
3.1.8	Ligation von DNA .....	45
3.1.9	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	46
3.1.10	Polymerase Kettenreaktion.....	46
3.1.10.1	Polymerase Kettenreaktion von cDNA.....	46
3.1.10.2	Polymerase Kettenreaktion proviraler HIV-1 DNA aus HIV-1 infizierten Zellen .....	47
3.1.10.3	Analytische Polymerase Kettenreaktion von cDNA aus <i>E. coli</i> .....	48
3.1.11	Zielgerichtete Mutagenese.....	49
3.1.12	DNA-Sequenzierung .....	51
3.1.13	Gelelektrophoresen.....	51
3.1.13.1	Analytische Gelelektrophorese .....	51
3.1.13.2	Präparative Gelelektrophorese .....	51
3.2	Zellbiologische Methoden .....	52
3.2.1	Lyse von HIV-1-infizierten Zellen .....	52
3.2.2	Kultivierung adhärenter Zellen .....	52
3.2.3	Bestimmung von Zellzahl und Zustand der Kultur.....	52
3.2.4	Transfektion von Zellen.....	53
3.3	Virologische Methoden .....	54
3.3.1	Infektion von Zellen mit HIV-1 Varianten.....	54
3.3.2	Messung der Infektiosität von HIV-Varianten.....	54
3.3.3	Detektion infizierter Zellen durch Immunfärbung .....	54
3.3.4	HIV-1 Replikationskinetik .....	55
3.3.5	HIV-1 Neutralisationstest .....	55
3.3.6	HIV-1 Inhibitionstest mit SDF-1 .....	56
3.3.7	p24-Antigen ELISA .....	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
4.1	Erstellung der rekombinanten Virusvarianten .....	58
4.1.1	Herstellung der Klonierungsvektoren .....	59

4.1.1.1	Herstellung des Vektors pUC $\Delta$ env.....	59
4.1.1.2	Herstellung des Vektors pUC $\Delta$ V3 .....	59
4.1.1.3	Herstellung des Vektors pNL $\Delta$ env.....	60
4.1.2	Konstruktion von NL4-3 Chimären mit unterschiedlichen Korezeptornutzung.....	65
4.1.3	Konstruktion von Virusvarianten mit unterschiedlicher N-Glycosylierung des V3-Loop .....	68
4.1.3.1	Herstellung der NL4-3 V3-Loop Glycovarianten .....	68
4.1.3.2	Herstellung der Glycovarianten von NL-930 .....	70
4.1.3.3	Herstellung der Glycovarianten von NL-918 .....	71
4.1.3.4	Herstellung der Glycovarianten von NL-991 .....	71
4.1.3.5	Herstellung der Glycovarianten von NL-952 .....	72
4.2	Charakterisierung der NL-Glycovarianten.....	79
4.2.1	Expression von rekombinantem gp120 in Hela-T4-Zellen .....	79
4.2.2	Infektion von CXCR4-Indikatorzellen mit NL4-3 Glycovarianten .....	81
4.2.2.1	Infektion von GHOST-Indikatorzellen ohne Inhibitor .....	81
4.2.2.2	Infektion von GHOST-Indikatorzellen in Gegenwart des CXCR4- Liganden SDF-1 .....	83
4.2.2.3	Infektion von CXCR4-Indikatorzellen mit NL4-3-g15 Mutanten.....	87
4.2.3	Infektion von CXCR4-Indikatorzellen mit NL-930 Mutanten.....	91
4.2.3.1	Replikation in Gegenwart von HIV-1 Negativserum.....	91
4.2.3.2	Replikation in Gegenwart von HIV-1 Positivserum.....	91
4.2.4	Infektion von CCR5-Indikatorzellen mit NL-918 Mutanten .....	95
4.2.4.1	Infektion mit NL-918 Mutanten in Gegenwart von HIV-1 Negativserum .....	95
4.2.4.2	Infektion mit NL-918 Mutanten in Gegenwart von HIV-1 Positivserum .....	95
4.2.5	Replikation von R5-monotropen NL-991-Varianten .....	98
4.2.5.1	Replikation in unterschiedlichen CCR5-Indikatorzellen.....	98
4.2.5.2	Replikation in Gegenwart von HIV-1 Negativserum.....	98
4.2.5.3	Replikation in Gegenwart von HIV-1 Positivserum.....	99
4.2.6	Infektion von Indikatorzellen mit NL-952 Mutanten .....	103
4.2.6.1	Infektion von CCR5 und CXCR4 Indikatorzellen.....	103
4.2.6.2	Replikation von NL-952-Varianten in CCR5- und CXCR4- Indikatorzellen in Gegenwart von HIV-1 Negativserum.....	104

4.2.6.3	Replikation von NL-952 Varianten in CCR5 und CXCR4 Indikatorzellen in Gegenwart von HIV-1 Positivserum .....	104
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>109</b>
5.1	Auswahl der HIV-1 Primärisolate und der V3-Sequenzen für die Herstellung rekombinanter NL4-3 Chimären.....	109
5.2	Die N-Glycosylierung des V3-Loops beeinflusst die Interaktion mit den Korezeptoren CXCR4 und CCR5.....	112
5.3	Einfluss des g15-Glycans auf die Bindung neutralisierender Antikörper .....	118
5.4	N-Glycosylierung und Pathogenese.....	120
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>138</b>
8.1	Abkürzungen.....	138
8.1.1	Aminosäuren.....	140
8.2	Veröffentlichungen .....	141
8.3	Danksagungen.....	142
8.4	Lebenslauf .....	143

## 1 Einleitung

### 1.1 Die HIV-Erkrankung

Das Humane-Immundefizienzvirus-Typ-1 (HIV-1) wurde Anfang der 80er Jahre erstmals als Erreger des Erworbenen Immunschwächesyndroms AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) beschrieben (Barre´-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1984). Die damit verbundene Erkrankung war schon ca. 25 Jahre vorher bei einigen Patienten beobachtet worden, wurde aber erst seit Ende der siebziger Jahre ein immer größeres Gesundheitsproblem, das sich schnell weltweit ausdehnte. Zum Ende des Jahres 2001 waren weltweit 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert und es sterben zur Zeit 3-4 Millionen Menschen pro Jahr an den Folgen der HIV-Infektion (AIDS epidemic update, UNAIDS/WHO, 2001). Innerhalb von zwanzig Jahren hat sich die HIV-1 Infektion zu der bedeutendsten Infektionserkrankung entwickelt und verursacht pro Jahr die meisten Erreger-induzierten Todesfälle (Balter 1999).

HIV gehört zur Familie der Retroviridae, die durch das Vorhandensein eines speziellen viralen Enzyms, der Reversen Transkriptase (RT), gekennzeichnet ist. Mit Hilfe dieses Enzyms ist das Virus in der Lage, sein RNA-Genom in DNA umzuschreiben. Die DNA-Kopie, das sogenannte Provirus, wird dann in das Genom der Wirtszelle integriert, um sich durch den Replikationsapparat der Zelle vermehren zu lassen. In integriertem Zustand kann das Virus außerdem unerkannt im Wirt persistieren. Die Familie der Retroviridae umfaßt unter anderem die Gruppe von „langsamen“ Viren, die zu chronischen Infektionen mit einer langen asymptomatischen Phase führen und daher als Lentiviren (*lenti* = griechisch: langsam) bezeichnet werden. Zu den Lentiviren zählen neben humanpathogenen Arten auch verschiedene tierpathogene Arten, z.B. das *Bovine Immundeficiency Virus* (BIV) aus Rindern, das *Feline Immundeficiency Virus* (FIV) aus Katzen und das *Caprine Arthritis-Encephalitis Virus* (CAEV) aus Ziegen (Levy, 1998).

Das humanpathogene Lentivirus HIV infiziert in erster Linie Zellen des menschlichen Immunsystems, vor allem T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. In diesen Zellen kann das Virus jahrelang persistieren, ohne schwere Krankheitssymptome

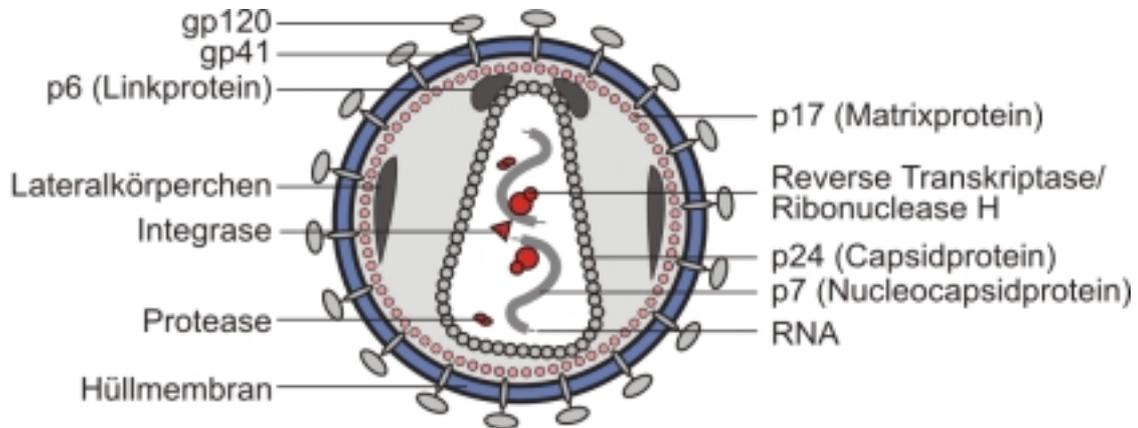
zu verursachen. Diesen Zeitraum der Erkrankung bezeichnet man als die asymptomatische Phase. Im weiteren Verlauf der HIV-1 Infektion kommt es zu einer starken Abnahme der CD4-positiven T-Lymphozyten, den sogenannten T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen). Durch den kontinuierlichen Verlust der  $T_H$ -Zellen wird das Immunsystem geschwächt, bis schließlich ein Schwellenwert von 200  $T_H$ -Zellen pro  $\mu$ l Blut unterschritten wird. Die Folgen sind das Auftreten opportunistischer Infektionen wie z.B. der *Pneumocystis carinii*- Pneumose, *Candida*-Infektionen oder Histo-, sowie Toxoplasmosen, deren Erreger für den gesunden Menschen ungefährlich sind, aber für den immungeschwächten HIV-Infizierten ein großes gesundheitliches Problem darstellen. Diese Phase opportunistischer Infektionen und geringer  $T_H$ -Zellzahlen ist kennzeichnend für das symptomatische- bzw. das AIDS- (*acquired immunodeficiency syndrome*) Stadium der Erkrankung, das letztendlich zum Tode des Patienten führt.

Die Besonderheit des HIV ist seine Vielfalt und Variabilität. Die Gruppe der HI-Viren unterteilt sich in zwei Virusstämme, die als HIV-1 und HIV-2 bezeichnet werden. HIV-2 ähnelt auf molekularer Ebene den Immundefizienzviren der Affen (SIV, *simian immunodeficiency virus*) und kommt im Vergleich zu HIV-1 sehr selten vor. HIV-2 findet sich in erster Linie bei Patienten in Westafrika. Im Gegensatz zu HIV-2 findet man HIV-1 weltweit verbreitet. Dieser Virusstamm wird aufgrund von Sequenzvariationen in die drei Gruppen M, O und N unterteilt. Die M- („Main“) Gruppe findet man auf allen Kontinenten, während die O- („Outlier“) und N- („New“-) Gruppen vor allem in Westafrika auftreten (Simon *et al.*, 1998). Innerhalb der M-Gruppe unterteilen sich die Viren in die Untergruppen A bis J. Diese Untergruppen treten jeweils bevorzugt in bestimmten geographischen Regionen auf. In Afrika dominieren die Subtypen A und C, während im nordeuropäischen und amerikanischen Raum derzeit ca. 1,5 Millionen Menschen mit dem Subtyp B infiziert sind.

## 1.2 Der Aufbau des HIV-1

Das Virus bildet ca. 100 nm große, umhüllte Viruspartikel (Abb. 1). An der Innenseite der Virusmembran befinden sich das Matrixprotein p17 und die Lateralkörperchen. Das Matrixprotein ist durch aminoterminalen Myristinsäurereste mit der Virusmembran assoziiert und für die Form und die Stabilität des Viruspartikels verantwortlich. Im Inneren des Virus befindet sich ein Capsid, welches von dem Capsidprotein p24

gebildet wird. Das Capsid enthält das virale Genom, das in Form von zwei Kopien einzelsträngiger positiv-Strang-RNA vorliegt. Direkt mit der RNA assoziiert findet man das Nucleocapsidprotein p7 und die virale RNA-abhängige DNA-Polymerase, die auch als Reverse-Transkriptase (RT) bezeichnet wird. Im Capsid der reifen, infektiösen Viruspartikel befinden sich zusätzlich zur HIV-RT die beiden Enzyme HIV-Integrase und HIV-Protease. Das virale Protein p6, aufgrund seiner Funktion als Linkprotein bezeichnet, verbindet das Viruscapsid mit der Hüllmembran. In der Membran des Virus befinden sich zwei weitere Proteine, die dazu dienen, die HIV-Rezeptoren auf den Zielzellen zu binden. Aufgrund ihrer starken Glycosylierung werden sie als Glycoprotein (gp) gp41 und gp120 bezeichnet. Das gp41 ist in der Virusmembran verankert und wird auch als HIV-Transmembranprotein (TM) bezeichnet. Das TM-Protein gp41 liegt nach dem Stand der Wissenschaft als Trimer in der Membran vor (Weissenhorn *et al.*, 1997). Das zweite, auch als externes äußeres Oberflächenprotein (SU, *surface unit*) bezeichnete Glycoprotein gp120 ist mit der Ektodomäne des gp41 assoziiert, jedoch nicht kovalent mit dieser verbunden. Es befindet sich somit auf der Oberfläche des Virus, wo es funktionell für die Bindung an die viralen Rezeptoren verantwortlich ist.



*Modifiziert nach Modrow und Falke, 1997*

### **Abb. 1 Aufbau und Struktur des HIV-1**

Die Virusmembran ist blau dargestellt. In die Virusmembran eingelagert ist das Transmembranprotein gp41, das mit dem externen Hüllprotein gp120 assoziiert ist (grau). An der Innenseite der Membran findet man die Matrixproteine p17 (hellrot). Das Linkprotein p6 und die Lateralkörperchen (dunkelgrau) sind mit dem Matrixprotein assoziiert. Die Virusmembran umschließt das Capsid, das von dem Capsidprotein p24 (hellgrau) gebildet wird und die beiden Kopien der viralen RNA umschließt. Das Nucleocapsidprotein p7 (grau) und die Reverse Transkriptase (roter Kreis) sind mit der RNA assoziiert. Im Capsid befinden sich außerdem die Integrase (rotes Dreieck) und die Protease (rotes Oval)

### 1.3 Die Genomstruktur des HIV-1

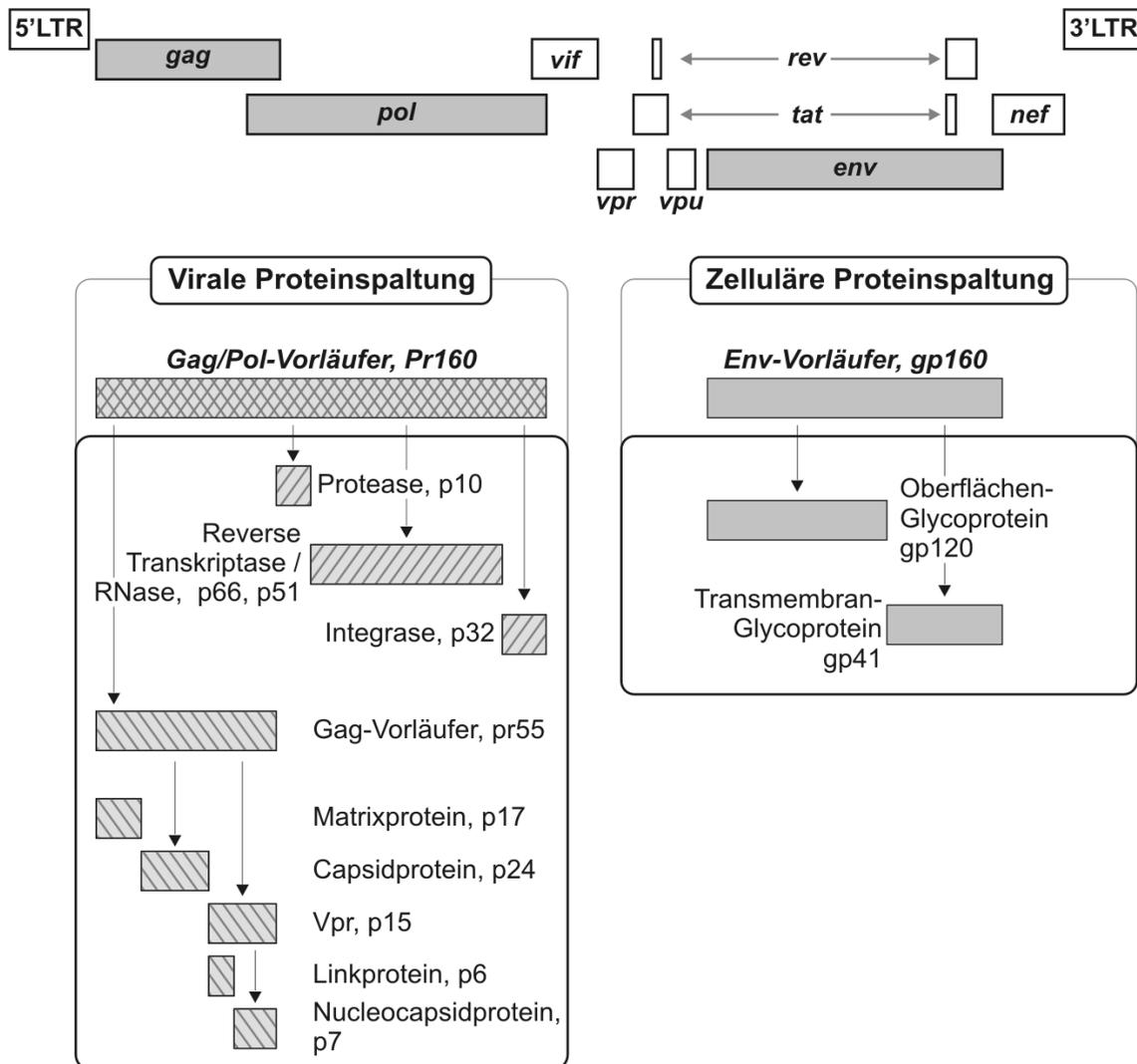
Das HIV-1 Genom besteht aus einer ca. 9 kb großen (+)-Strang RNA. Das integrierte provirale Genom ist am 5'- und am 3'-Ende von identischen regulatorischen Sequenzbereichen, dem 5'- und dem 3'-LTR (*long terminal repeat*) flankiert. Zwischen den beiden LTRs befinden sich die offenen Leserahmen, die für die Strukturproteine, die regulatorischen und akzessorischen Proteine sowie für die viralen Enzyme kodieren (Abb. 2). Die Strukturproteine werden von den beiden Genen *gag* und *env* kodiert, die viralen Enzyme von dem *pol*-Gen. Weitere sechs Leserahmen kodieren für die regulatorischen Proteine Tat und Rev, sowie für die akzessorischen Proteine Vif, Vpu, Vpr und Nef<sup>1</sup>. Die Funktionen dieser akzessorischen Proteine sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei dem Genprodukt des *tat*-Gens, dem Tat-Protein (*transactivator of transcription*) handelt es sich je nach HIV Isolat um ein 9-14 kD großes Protein, das die virale Transkription aktiviert. Das *rev*-Gen codiert für das Rev-Protein (*regulator of expression of virion proteins*), das für den Transport von einfach gespleisster und ungespleisster RNA aus dem Zellkern verantwortlich ist.

Das HIV-1 *gag*-Gen kodiert für den 55 kD Polyprotein-Vorläufer. Dabei handelt es sich um ein gruppenspezifisches Antigen (Gag, *group-specific antigen*), das bei der Reifung des Virus von der viralen Protease in die Strukturproteine gespalten wird. Bei dieser proteolytischen Prozessierung bildet sich das p17-Matrix-, das p24-Capsid-, das p7-Nucleocapsid- sowie das p6-Linkprotein. Das *pol*-Gen (Pol, *polymerase*) kodiert für die viralen Enzyme HIV-Protease, HIV-Reverse Transkriptase und HIV-Integrase. Das *pol*-Gen wird zusammen mit dem *gag*-Gen abgelesen. Aufgrund einer Leserasterverschiebung wird das Stop-Codon, das normalerweise die Translation der Gag-Proteine beendet, überlesen, und es kommt zur Synthese des Gag/Pol-Polyproteins. Dies geschieht in etwa 5% der Translationsvorgänge. Das so erhaltene Polyprotein wird am aminoterminalen Ende myristyliert und ist so mit der Innenseite der Zytoplasmamembran verbunden. Das Gag/Pol-Vorläuferprotein bildet die Grundlage für die Produktion der viralen Enzyme. Die Spaltung des Gag/Pol-Vorläuferproteins in die einzelnen Bestandteile findet erst nach der Freisetzung des Viruspartikels durch eine virale Protease statt (siehe auch 1.4). Das *env*-Gen kodiert für die viralen

---

<sup>1</sup> Vif: *virus infectivity factor*; Vpu: *virus protein U*; Vpr: *viral protein r*; Nef: *negative factor*

Oberflächenproteine gp41 und gp120. Beide Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein gp160 gebildet. Dieser Vorläufer wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat der Zelle prozessiert. Das gp160 Vorläuferprotein wird in die Proteine gp41 und gp120 gespalten. Weiterhin findet hier die N- und O-Glycosylierung statt. Im Unterschied zu den Strukturproteinen von HIV werden die beiden Hüllproteine durch eine zelluläre Furin-Protease aus dem gp160-Vorläufer gebildet (Allan *et al.*, 1985, Veronese *et al.*, 1985). Nach Einbau des gp41 in die Membran wird der trimere gp41/gp120-Komplex zur äußeren Zellmembran transportiert und liegt dort über das gp41 in der Membran verankert vor.



**Abb. 2 Genomstruktur des HIV-1**

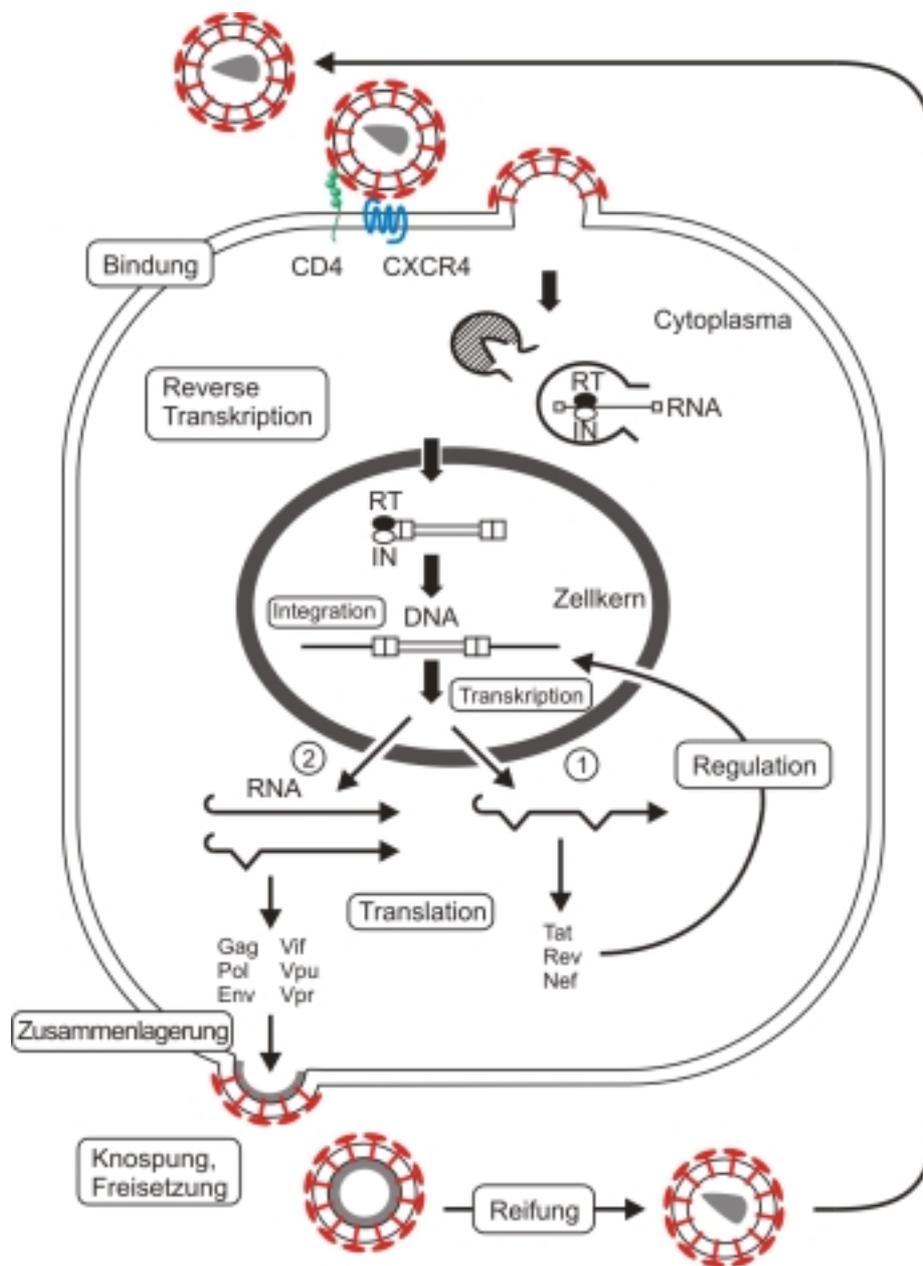
Das HIV Genom hat eine Länge von ca. 9800 Basenpaaren. Es ist unterteilt in die Bereiche LTR, *gag*, *pol*, *env* und die sechs regulatorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat* und *nef*. Das *gag*-Gen kodiert für die vier Strukturproteine p17, p24, p6 und p7. Das *pol*-Gen kodiert die Enzyme Protease, Integrase und Reverse Transkriptase. Das *env*-Gen kodiert für die beiden Hüllproteine gp41 und gp120.

#### 1.4 Der Replikationszyklus des HIV-1

Um eine Zelle zu infizieren, interagiert HIV-1 mit zwei Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Bei dem primären HIV-Rezeptor handelt es sich um das CD4-Protein (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984b; Maddon *et al.*, 1986). Dieses Membranprotein findet sich auf T-Zellen, Makrophagen sowie dendritischen Zellen und wird von gp120 gebunden. Als sekundärer Rezeptor dient eine Gruppe von Chemokinrezeptoren, die zur Familie der 7-Transmembranproteine gehören (siehe Kapitel 1.6).

Wenn das Virus eine Zelle infiziert, bindet im ersten Schritt das gp120-Trimer an CD4 auf der Zellmembran. Dies führt zu strukturellen Änderungen im gp120, wodurch die Interaktion zwischen gp120 und dem Korezeptor möglich wird. Nach der Bindung des Korezeptors führen weitere strukturelle Änderungen in den viralen Glycoproteinen dazu, dass die aminoternale hydrophobe Fusionsdomäne des Transmembranproteins gp41 in die Membran der Zielzelle inseriert wird. Dadurch fusioniert die Virusmembran mit der Membran der Zellen und das Capsid gelangt in das Zytoplasma der Zielzelle. Dort wird das virale RNA-Genom von der viralen Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA transkribiert. Die Nukleinsäuren bleiben während des gesamten Vorgangs mit den Capsidkomponenten assoziiert und werden anschließend in Form eines DNA-Protein-Komplexes in den Zellkern transportiert. Im Zellkern bewirkt die mitgeführte HIV-Integrase den Einbau des doppelsträngigen DNA-Moleküls in das Genom der Wirtszelle (Brown *et al.*, 1987; Bushman *et al.*, 1990). Als integriertes Provirus persistiert HIV-1 in der Zelle. Für die Produktion neuer Viruspartikel dient die provirale DNA als Vorlage. Wird die Virusproduktion aktiviert, kommt es zunächst zur Bildung kurzer mRNA Fragmente, die u.a. für den viralen Transaktivator Tat kodieren. Das Tat-Protein gelangt nach seiner Bildung im Zytoplasma in den Zellkern, wo es die Transkriptionsrate um das hundertfache steigert. Es kommt im Anschluss daran zur Bildung verschieden gespleisster mRNA-Moleküle. In der frühen Phase der Transkription werden mehrfach gespleiste mRNAs gebildet, die für die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef kodieren. Diese werden im Zytoplasma translatiert und gelangen wieder in den Zellkern. Dort regulieren sie die Transkription und führen zur Bildung von einfach- und ungespleißten mRNAs, die zum einen für die Strukturproteine und die akzessorischen Polyproteine kodieren und zum anderen als Virusgenom dienen.

Ausgehend von diesen mRNAs werden die Gag und Gag/Pol-Polyproteinvorläufer gebildet. Diese lagern sich mit der vollständigen, ungespleissten RNA an der Zellmembran an und es kommt zur Zusammenlagerung von unreifen Viruskomponenten, dem sog. *assembly*. Die entstehenden unreifen Viruspartikel beinhalten die beiden Vorläuferproteine und die genomischen RNA-Kopien. Nach der Ausknospung dieses unreifen Komplexes aus der Membran der Zelle vollzieht sich der eigentliche Reifungsprozess. Die Reifung zum infektiösen Partikel erfolgt durch die autokatalytische Proteolyse des Gag/Pol-Polyproteins. Dabei bildet sich in einem ersten Schritt die HIV-Protease, die sich aus dem Vorläuferprotein herausschneidet. Im Anschluß daran spaltet die HIV-Protease die Gag- und Gag/Pol-Polyproteine in die funktionellen Virusproteine. Aus den beiden Vorläuferproteinen entstehen die Strukturproteine und die beiden Enzyme HIV-RT und HIV-Integrase. Die austretende Form des Virus ist somit von der infektiösen Struktur des Viruspartikel, der eintretenden Form, strukturell verschieden (Abb. 3).



**Abb. 3 Replikationszyklus des HIV-1.**

*Modifiziert nach Modrow und Falke, 1997*

HIV-1 bindet mit dem gp120/gp41-Komplex (rot) an CD4 (grün) und einen der Korezeptoren, z.B. CXCR4 (blau). Nach Fusion der Virus- und Zellmembran gelangt das Capsid in die Zelle. Dort erfolgt die reverse Transkription. Die erzeugte DNA wird in den Zellkern transportiert. Der Einbau der HIV-DNA in das Zellgenom erfolgt durch die virale HIV-Integrase. Bei der Virusvermehrung werden zuerst die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef exprimiert. Diese Proteine regulieren die Bildung der Gag-, Pol-, Env-, Vif-, Vpu- und Vpr-Genprodukte. Das gp41 und das gp120 werden aus dem gemeinsamen gp160-Vorläufer gebildet und in die Zellmembran eingebaut. Die Prozessierung der Vorläuferproteine Gag und Gag/Pol erfolgt nach der Freisetzung durch die HIV-Protease.

## 1.5 Der Zelltropismus des HIV-1

Schon früh nach Entdeckung des HIV-1 wurde beobachtet, dass aus dem Blut von Patienten isolierte HI-Viren *in vitro* unterschiedliche Replikationseigenschaften zeigten. So zeigten manche Viren langsame Replikationskinetiken. Diese langsamen Viren konnten sowohl in T-Zellen als auch in Makrophagen kultiviert werden. Diese Eigenschaft unterschied sie von den schnell wachsenden Viren, die nur in T-Zellkulturen replizieren konnten. Daher wurde in einer ersten Nomenklatur zwischen T-tropen und M-tropen Virusvarianten unterschieden (Cheng-Mayer *et al.*, 1988; Connor *et al.*, 1994; Fenyö *et al.*, 1988). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal war die Bildung von mehrkerniger Riesenzellen, den Synzytien. T-trope Viren verursachten in Zellkulturen die Bildung von Synzytien, während bei M-tropen Viren dieses Phänomen nicht beobachtet wurde. Sie wurden daher als NSI (*non syncytium inducing*)-Viren bezeichnet. Die von den T-tropen SI (*syncytium inducing*)-Viren induzierten Riesenzellen dienten *in-vitro* als ein sehr leichtes Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Phänotypen. Interessant war die Beobachtung, dass zu Beginn der HIV-1 Infektion die M-tropen, NSI Virustypen dominieren (Scarlatti *et al.*, 1997). Nach einer 2 bis 10 Jahre andauernden asymptomatischen Phase findet ein Wechsel des viralen Phänotyps statt, und es finden sich neben den NSI-Viren auch die T-tropen SI-Viren in Patienten (Scarlatti *et al.*, 1997, Björndal *et al.*, 1997, Tersmette *et al.*, 1989). Einige M-trope Viren verlieren die Fähigkeit, Makrophagen zu infizieren und verändern sich zu einem rein T-tropen Virustyp. Im allgemeinen ist aber der dualtrope Virustyp in der späten Phase der HIV-Infektion vorherrschend. Das Auftreten von schnellen Viren des SI-Typ korreliert mit dem Fortschreiten der Erkrankung und dem Beginn der AIDS-Phase (Connor *et al.*, 1993). Aufgrund der Eigenschaft von HIV, verschiedene Korezeptoren für die Infektion von Zellen nutzen zu können, hat sich die Nomenklatur der HIV-Typen grundlegend geändert. Man bezeichnet heute HI-Viren, die nur CXCR4 nutzen können, als X4-trope Virusvarianten und Viren, die ausschließlich CCR5 nutzen können, als R5-trop. Viren, die beide Korezeptoren nutzen, gelten als dual- oder R5X4-trop (Murphy *et al.*, 2000). Zusätzlich sind auch multitrope Viren bekannt, die neben CCR5 und CXCR4 noch weitere Chemokinrezeptoren nutzen können (siehe auch Kap. 1.6). CXCR4 und CCR5 gelten jedoch als die beiden wichtigsten Korezeptoren, die von jedem bislang bekannten HIV-1-Isolat genutzt werden können.

Zusammenfassend ergibt sich das folgende Bild:

Virustyp	Korezeptor-Nutzung	Riesenzell-Bildung	Replikations-Kinetik
R5-trop/NSI	CCR5	-	langsam
X4-trop/SI	CXCR4	+	schnell

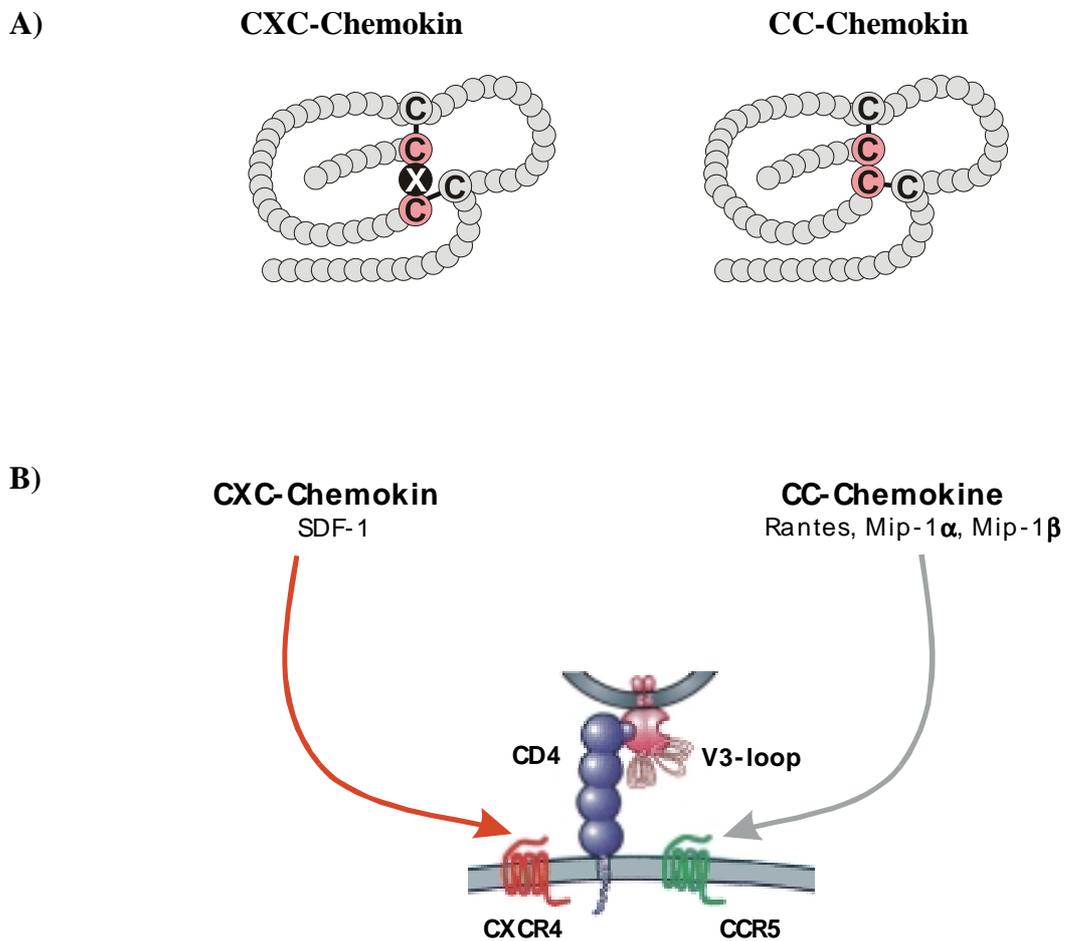
## 1.6 Die HIV-1 Rezeptoren

Als primärer HIV-Rezeptor wurde das CD4 Molekül in der Membran der T<sub>H</sub>-Zellen identifiziert (Klatzmann *et al.*, 1984a). CD4 gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie und ist ein Oberflächenmarker der T-Helferzellen

Als sekundäre HIV-Rezeptoren wurden eine Anzahl von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aus der Familie der 7-Transmembranproteine identifiziert. Dabei handelt es sich um die Proteinfamilie der Chemokinrezeptoren. Diese Familie besteht aus über 200 verschiedenen Membranproteinen, deren Funktion die Bindung von Chemokinen ist (*chemoattractant cytokines*) (Berger *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2000). Diese, aus ca. 60-75 Aminosäuren bestehenden Proteine gehören zur Familie der Cytokine. Die Nomenklatur der Chemokine leitet sich aus der Aminosäuresequenz ab, in der zwei Cysteinreste entweder direkt nebeneinander (CC-Chemokin) oder durch ein oder drei beliebige Aminosäuren voneinander getrennt liegen (CXC- bzw. CX<sub>3</sub>C-Chemokine). Der erste Chemokinrezeptor, der als HIV-1 Korezeptor identifiziert wurde, ist CXCR4, das auf T-Lymphozyten lokalisiert ist (Feng *et al.*, 1996; Berson *et al.*, 1996) (Abb. 4). Der natürliche Ligand des CXCR4 ist das CXC-Chemokin SDF-1. *In vitro* wurde gezeigt, dass sich die Infektion von CXCR4-positiven Zellen durch die Gabe von SDF-1 verhindern lässt. Bald darauf beobachteten Alkhatib und seine Mitarbeiter (1996), dass die CC-Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES, die die Liganden für CCR5 sind (Abb. 4), die HIV-Infektion mit R5-tropen Viren inhibieren. Diese Ergebnisse führten zur Identifikation von CCR5 als einem weiteren HIV-1 Korezeptor (Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996).

Neben diesen beiden Chemokinrezeptoren, die von allen bislang identifizierten HIV-1 Isolaten genutzt werden können, wurden bislang 15 weitere Chemokinrezeptoren identifiziert, die als zusätzliche HIV-Korezeptoren fungieren können (Abb. 5). Diese Rezeptoren werden von HIV jedoch niemals als alleiniger Korezeptor, sondern immer in Zusammenhang mit den beiden Haupt-Korezeptoren genutzt. Zu diesen Chemokinrezeptoren zählen die CC-Chemokinrezeptoren CCR2b (Chen *et al.*, 1998; Doranz *et al.*, 1996), CCR3 (Choe *et al.*, 1996), CCR8 (Rucker *et al.*, 1997) und CCR9 (Choe *et al.*, 1998), die Rezeptoren GPR15 (BOB) und STRL33 (BONZO) (Deng *et al.*, 1997) sowie der CX<sub>3</sub>C-Chemokinrezeptor CX<sub>3</sub>CR1 (Reeves *et al.*, 1997; Rucker *et al.*, 1997). Die *in vivo* Funktion und die Bedeutung dieser Chemokinrezeptoren ist bislang noch nicht bekannt.

Entscheidend dafür, welcher Korezeptor bzw. welche Korezeptoren von HIV-1 gebunden werden, ist die dritte variable Region des Oberflächenproteins gp120, der sogenannte V3-Loop (Shioda *et al.*, 1991; Cheng-Mayer *et al.*, 1990; Cocchi *et al.*, 1996). Der V3-Loop ist eine Schleife aus 35-37 Aminosäuren, die von einer Disulfidbrücke gebildet wird. Diese Region des gp120 bestimmt, welcher Korezeptor genutzt werden kann. Tauscht man den V3-Loop eines R5-tropen Virus gegen die eines X4-tropen Virus aus, so besitzt das resultierende Virus die X4-trope Eigenschaft des Virus, aus dem der V3-Loop stammt (Cocchi *et al.*, 1996). Der V3-Loop kann nicht nur gegen andere V3-Loops ausgetauscht werden, es lassen sich auch die Sequenzen der Chemokinliganden SDF-1 und MIP-1 $\alpha$  inserieren. Viren, die die 65 Aminosäuren des MIP-1 $\alpha$  anstelle des V3-Loops tragen, können CCR5-exprimierende Zellen infizieren. Analog dazu waren Viren, deren V3-Loop gegen Sequenzbereiche von SDF-1 ausgetauscht wurden, in der Lage, in CXCR4-positiven Zellen zu replizieren (Yonezawa *et al.*, 2001). Die direkte Interaktion des V3-Loops an die Korezeptoren konnte durch die Bindung von V3-Loop-Peptiden an CCR5 bzw. CXCR4 gezeigt werden (Sakaida *et al.*, 1998; Rabehi *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, unveröffentlichte Daten).



**Abb. 4 HIV-Korezeptoren und deren Liganden**

- A) Die Chemokine werden aufgrund der Aminosäuresequenz der beiden benachbarten Cysteine in die CXC- (links) oder CC-Chemokine (rechts) unterteilt.
- B) Das CXC-Chemokin SDF-1 ist der Ligand von CXCR4. Die CC-Chemokine RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  sind Liganden von CCR5. Die Chemokinrezeptoren werden analog hierzu als CC- und CXC-Rezeptoren bezeichnet. Die beiden Haupt-Korezeptoren für HIV-1 sind der CC-Rezeptor CCR5 (grün) und der CXC-Rezeptor CXCR4 (rot).

Korezeptoren	Liganden	Vorkommen
CCR2b	MCP-1, -2, -3, -4	PBL, Mo, Ma
CCR3	Eotaxin-1, -2, RANTES MCP-2, -3, -4	PBL, Mo, Ma primZ
CCR5	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , MCP-2	PBL, Mo, Ma primZ
CCR8	I-309	Mo, Ma
CCR7	cc119	PBL
CCR9	TECK	?
CXCR4	SDF-1 $\alpha$ , -1 $\beta$	PBL, Mo, Ma primZ
CX <sub>3</sub> CR1	Fractalkine	PBL, Mo, Ma
APJ	?	?
RDC-1	?	PBL
ChemR23	?	PBL, Mo, Ma
GPR15/BOB	?	PBL, Mo, Ma
STRL33/Bonzo	?	PBL
BLTR	Leukotriene B <sub>4</sub>	PBL
US28	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , MCP-1	(PBL, Mo, Ma)*

**Abb. 5 Mögliche HIV-1 Korezeptoren**

Neben dem CD4 Protein benötigt HIV einen Korezeptor für die Infektion von Zellen. Als Korezeptor konnten 15 verschiedene Chemokinrezeptoren identifiziert werden, die sich auf Periphere Blutlymphozyten oder Monozyten/Makrophagen befinden. Die Eigenschaft, als Korezeptor für HIV zu fungieren, ist entweder durch die Expression des rekombinanten Proteins in CD4-positiven Zellen oder direkt in primären Zellen gezeigt worden.

PBL: Periphere Blutlymphozyten,

Mo: Monozyten,

Ma: von Monozyten abstammende Makrophagen,

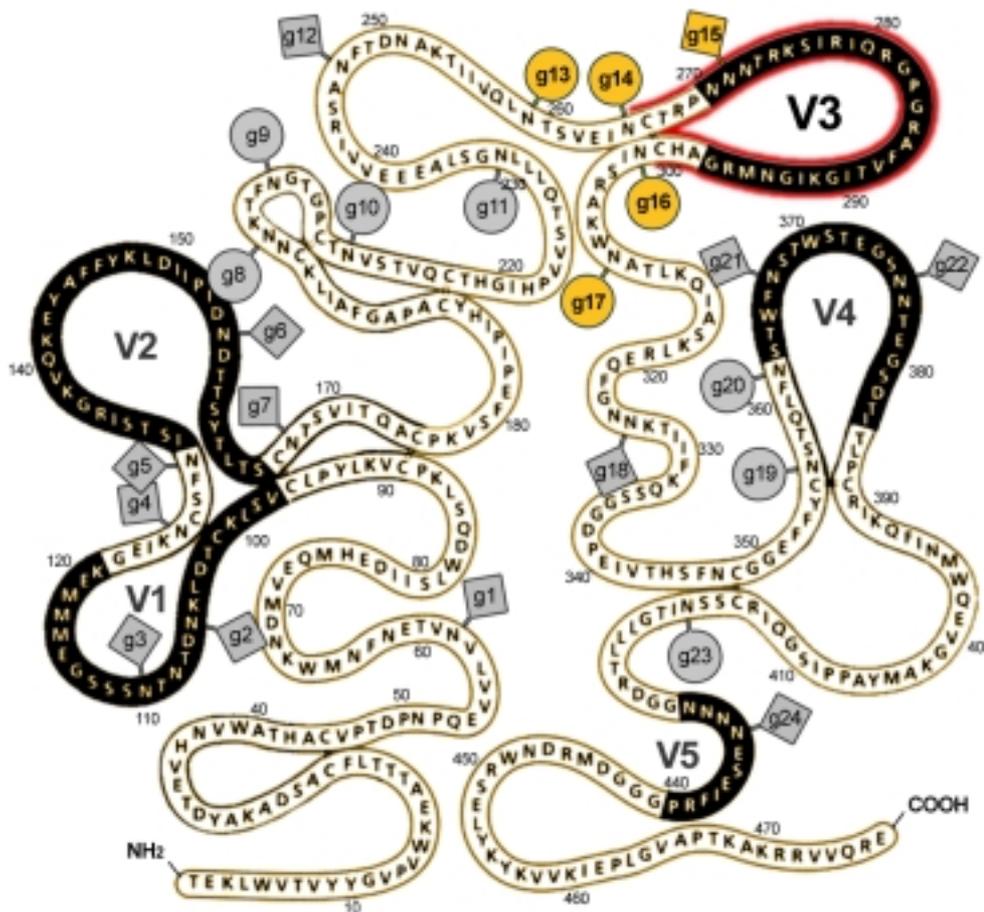
primZ: primäre Zellen,

\*: finden sich nur in Cytomegalovirus infizierten Zellen

## 1.7 Die Struktur des HIV-1 Oberflächenproteins gp120

Das HIV-1 Oberflächenprotein gp120 besteht je nach HIV-Variante aus ca. 470-500 Aminosäuren und trägt ca. 25 Erkennungssequenzen für N-Glycosylierungen (siehe auch Kapitel 1.8). Besonders wichtig für die viralen Eigenschaften und die Virusneutralisation sind die variablen Bereiche des gp120. Im gp120 befinden sich fünf variable Regionen V1 bis V5, von denen die Bereiche V1, V2, V3 und V4 durch Disulfidbrücken zu Schleifen, den sogenannten Loops, geschlossen sind (Abb. 6). Diese variablen Regionen werden von Bereichen unterbrochen, die innerhalb der verschiedenen HIV-Typen konserviert sind (C1-C5) (Modrow *et al.*, 1987). Die Kristallstruktur von gp120 konnte teilweise aufgeklärt werden. Kwong und seinen Mitarbeitern gelang es 1998, ein modifiziertes gp120-Molekül zusammen mit Teilen des CD4-Moleküls sowie einem Antikörper-Fab-Fragment zu kristallisieren. Um das gp120 kristallisieren zu können, mussten die variablen Bereich V1/2 und V3 entfernt und die N-Glycane des gp120 enzymatisch entfernt werden. In dieser, dem Kokristall zugeordneten Struktur bildet das modifizierte gp120 eine innere und eine äußere Domäne, die durch ein viersträngiges  $\beta$ -Faltblatt (*bridging sheet*) verbunden sind. Die Struktur des V3-Loops, der einen entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften des Virus hat, konnte durch dieses Modell nicht aufgeklärt werden, da dieser Bereich des gp120 in diesem Modell fehlte. Für die Replikationsfähigkeit von HIV ist aber gerade der V3-Loop von entscheidender Bedeutung. HIV-Varianten, in deren gp120 der V3-Loop deletiert wurde, waren nicht replikationsfähig (Chiou *et al.*, 1992).

Aufgrund von Antikörperbindungsstudien geht man davon aus, dass die variablen Bereiche des gp120 an der Oberfläche exponiert sind, während die konservierten Regionen einen zentralen Kern bilden (Moore und Sodroski, 1996). Die exponierten Bereiche des gp120 werden dabei durch N-Glycane verdeckt, was die Zugänglichkeit dieser Bereiche für Antikörper beeinträchtigt (Wyatt *et al.*, 1998).



**Abb. 6 Das HIV-1 Hüllprotein gp120**

Dargestellt ist das gp120 des HIV-Stammes IIIB. Das Hüllprotein besteht aus 476 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz des gp120 läßt sich in fünf variable (schwarz unterlegt) und sechs konservierte (weiß unterlegt) Bereiche unterscheiden. Die variablen Bereiche V1 bis V4 sind über Disulfidbrücken zu Schleifen, den sog. Loops geschlossen. Zwischen den variablen Bereichen liegen die konservierten Regionen C1-C6. Eine besondere Bedeutung für die Eigenschaften von HIV-1 hat die dritte variable Region, der sog. V3-Loop. Die Sequenz des V3-Loops beeinflußt die Korezeptornutzung und stellt das wichtigste immunogene Epitop des gp120 dar, welches in Patienten eine dominante Immunantwort induziert.

In der Sequenz des gp120 findet man 24 Erkennungssequenzen für die N-Glycosylierung, NXS und NXT, an die 24 N-Glycane angehängt werden, die hier mit ,g1' bis ,g24' bezeichnet sind. Man unterscheidet zwischen verschiedenen N-Glycanen, den hochmannosidischen Polysacchariden (○) und den Polysacchariden vom Komplex-Typ (◇). Der V3-Loop (rot) besteht aus 35 Aminosäuren und einem N-Glycan vom komplexen Typ. Die flankierenden N-Glycane sind vom hochmannosidischen Typ.

## 1.8 Die N-Glycosylierungen des gp120

Zu den zahlreichen posttranslationalen Modifikationen, die bei der Proteinsynthese erfolgen können, gehört auch die N-Glycosylierung des Proteins. Die Glycosylierung der Proteine erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat. Als N-Glycosylierungssignal werden die Aminosäuremotive NXS und NXT erkannt, wobei X jede Aminosäure außer Prolin und Asparaginsäure sein kann. Das N-Glycan wird über eine N-glycosidische Bindung an das Asparagin (N) des N-Glycosylierungsmotives angehängt. N-Glycane an dem gp120 machen mehr als 50% des Molekulargewichtes aus (Lasky *et al.*, 1986; Mizuochi *et al.*, 1988; Geyer *et al.*, 1988). Es ist bekannt, dass in eukaryotischen Zellen durchschnittlich 90% der Erkennungssequenzen für die N-Glycosylierung genutzt werden (Gavel und von Heijne, 1990). Untersuchungen zur N-Glycosylierung des gp120 haben gezeigt, dass alle vorhandenen N-Glycosylierungsstellen genutzt werden. In Eukaryoten findet man verschiedene Formen von N-Glycanen, hauptsächlich vom hochmannosidischen, komplexen und hybriden Typ (Abb. 7). Alle Formen haben ein identisches Kern-Oligosaccharid, das sich aus zwei N-Acetylglucosamin- und drei Mannoseeinheiten zusammensetzt. An die Mannoseeinheiten sind dann, je nach N-Glycosylierungstyp, verschiedene Zuckerbausteine angehängt. Der hochmannosidische Typ besteht ausschließlich aus Glucose- und Mannoseeinheiten, die in zwei bis drei Antennen an das Kern-Pentasaccharid angehängt sind. Der komplexe Typ weist dagegen Strukturen mit bis zu vier Antennen auf, die neben Mannose und Glucose auch N-Acetylglucosamin und Fucose, sowie endständige Sialinsäuren tragen. Bei der hybriden Form handelt es sich um eine Mischform von komplexen und hochmannosidischen Glycanen (Abb. 7). Innerhalb dieser Hauptformen findet man eine Vielzahl von Varianten, die sich vor allem in der Zusammensetzung und Verzweigung der Oligosaccharide unterscheiden. Dadurch ergibt sich eine Vielzahl von verschiedenen N-Glycanen auf einem Protein, weswegen man auch von einer Mikroheterogenität der N-Glycosylierung spricht. Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung der Mikroheterogenität von N-Glycanen, wie sie auf rekombinantem und virus-assoziiertem gp120 gefunden wurden. Analysen haben gezeigt, dass sich auf gp120, das in der embryonalen Stammzelllinie H9 exprimiert wurde, mehr als 50 verschiedene Varianten der drei Hauptformen der N-Glycane befinden (Abb. 8). Die enorme Variabilität der

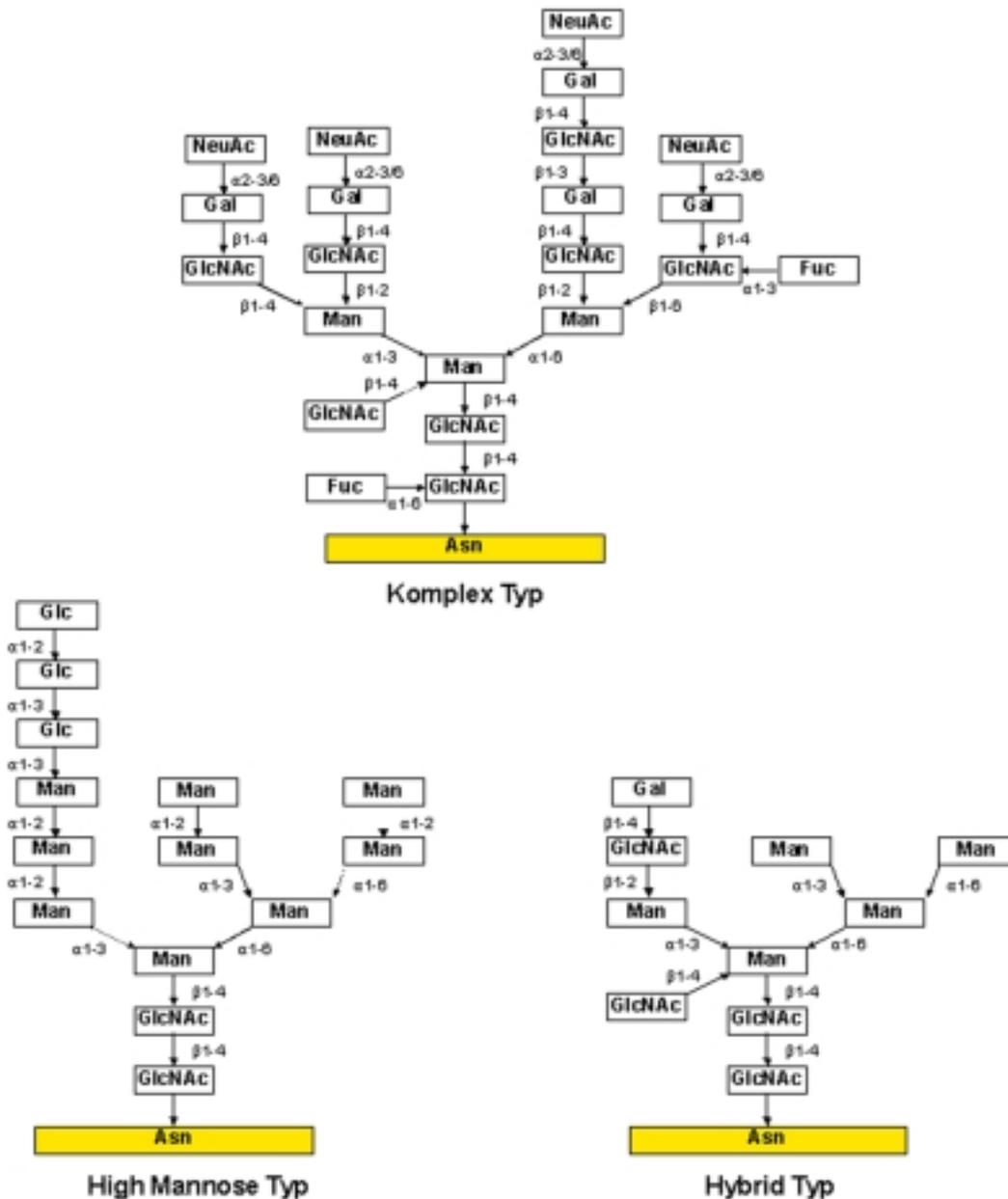
Aminosäuresequenz, die die verschiedenen HIV-Varianten und Subtypen auszeichnet, wird durch die Komplexität der N-Glycosylierung weiter gesteigert.

Viren verfügen nicht über eigene Enzyme für die Prozessierung ihrer Hüllproteine, sondern benutzen den Syntheseparat der Wirtszellen. Die viralen Oberflächenproteine gp41 und gp120 sind die einzigen HIV-Proteine, die das ER und den Golgi-Apparat der Wirtszelle durchlaufen. Sie werden wie die zellulären Proteine prozessiert und modifiziert. Die Zusammensetzung und Mikroheterogenität der N-Glycane auf den Virusproteinen unterscheidet sich somit nicht von denen der zellulären Proteine.

Für das HIV-1 Oberflächenprotein wurde ein Einfluß der N-Glycosylierung auf die korrekte Faltung und damit auf die CD4-Bindung beschrieben (Li *et al.*, 1993). Wurde gp120 von Zellen gebildet, die Proteine nicht glycosylieren konnten, war gp120 nicht in der Lage, an CD4 zu binden. Enzymatisch deglycosyliertes gp120 dagegen bindet in gleichem Maße an CD4, wie die glycosylierte Form (Fenouillet *et al.*, 1989, 1990, 1991; Li *et al.*, 1993). Der Einfluß von einzelnen N-Glycanen des gp120 auf die Replikationsfähigkeit der Viren konnte für CXCR4-trope HIV-1 Laborstämme gezeigt werden. Elimination von N-Glycanen V1/2 und V3 Bereich des gp120 von HIV-1<sub>NL4-3</sub> und HIV-1<sub>HXB2</sub> führten zu einer verminderten Replikationsfähigkeit dieser Viren (Willey *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1992).

Die Funktion der N-Glycane des gp120 war zu Beginn der Arbeit nur wenig untersucht. Es gab jedoch Hinweise darauf, dass diese Zuckerstrukturen eine wichtige Rolle für die Funktion der Immundefizienzviren haben. Für das Hüllprotein gp130 des SIV konnte gezeigt werden, dass die Entfernung der N-Glycosylierung im V1/V2 Bereich des SIV gp130 zu einer drastischen Abnahme der Virämie im Affen führte (Reitter *et al.*, 1998). Viren ohne diese N-Glycosylierung waren hochimmunogen und die induzierte humorale Immunantwort war in den infizierten Tieren entsprechend stark ausgeprägt. Nach einiger Zeit wurde jedoch ein Ansteigen der Viruslast in diesen Tieren beobachtet. Die Analyse ergab, dass sich in den infizierten Tieren eine Virusvariante gebildet hatte, welche im Bereich des eliminierten N-Glycans wieder eine N-Glycosylierungsstelle besaß. Dies verursachte einen Schutz vor der humoralen Immunantwort. Diese Arbeiten zeigten zum ersten Mal eine Bedeutung der N-Glycane für die Infektion mit Immundefizienzviren. Bei SIV scheint der V1/V2-Bereich immundominant zu sein und

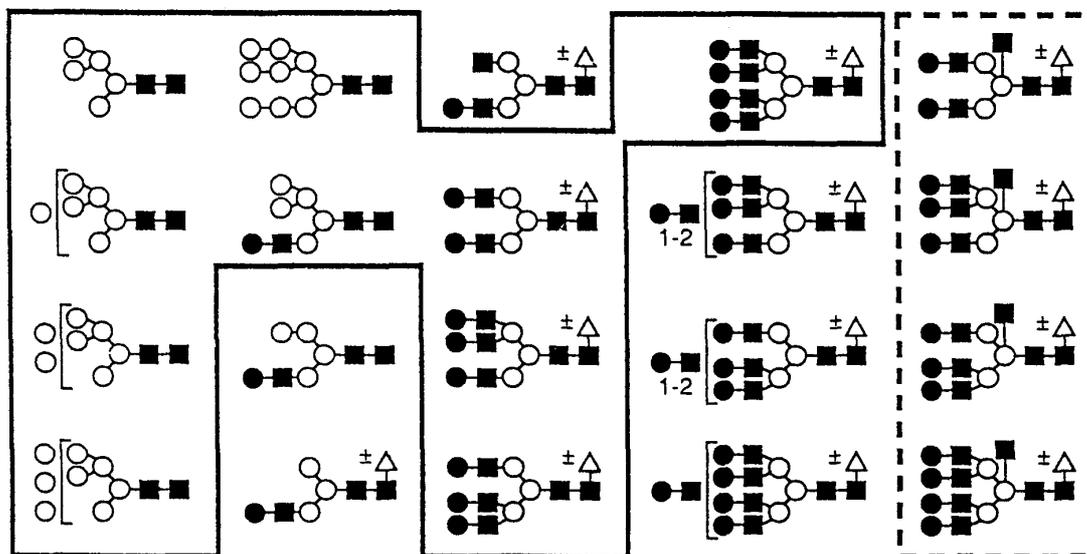
übernimmt bei diesem Immundefizienzvirus die Rolle, die der V3-Loop für das HIV-1 spielt. Um die Rolle der immunogenen Bereiche von HIV-1 *in vivo* untersuchen zu können, wurden Virus-Chimären generiert, die unter anderem *env*-Bereiche des HIV-1 Gens in dem Hintergrund der SI-Viren trugen. Untersuchungen mit diesen sog. SHIV-Varianten haben gezeigt, dass bei humanem gp120 der V3-Loop das Epitop für neutralisierende Antikörper ist. N-Glycane im V3-Bereich blockieren neutralisierende Antikörper, so dass SHIV-Varianten, die in diesem Bereich N-Glycane tragen, im Tierexperiment der Immunantwort entkommen (Cheng-Mayer *et al.*, 1999).



**Abb. 7 Formen der N-Glycosylierungen**

Bei der N-Glycosylierung unterscheidet man prinzipiell drei Formen: Den High Mannose- oder hochmannosidischen Typ, den Hybrid-Typ und den komplexen Typ. Die Darstellung gibt die möglichen Verknüpfungen der Zucker an. Ausgehend von einem Kern-Pentasaccharid, das aus zwei N-Acetylglucosamin- und drei Mannoseeinheiten besteht, werden die verschiedenen Zuckerstrukturen aufgebaut.

Asn: Asparagin; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; Man: Mannose;  
Gal: Galaktose; NeuAc: Neuraminsäure; Fuc: Fucose



**Abb. 8 Die verschiedenen Formen der N-Glycosylierung des gp120**

Dargestellt sind die verschiedenen Formen der N-Glycane wie sie auf rekombinantem gp120 aus CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen und virusassoziiertem gp120 aus H9-Zellen identifiziert wurden.

- |                      |   |
|----------------------|---|
| Schwarzer Rahmen     | Glycane, die auf rekombinantem und virus-assoziiertem gp120 gefunden wurden.  |
| Gestrichelter Rahmen | Glycane auf virus-assoziiertem gp120.   |
| Alle anderen         | gefunden auf rekombinantem gp120 (Abb. aus Ten Feizi <i>et al.</i> , 1990).   |
| ■                    | N-Acetylglucosamin  |
| ○                    | Mannose   |
| ●                    | Galaktose   |
| △                    | Fucose  |
| ±                    | bezeichnet Zucker, die zu 90% Fucose tragen   |
| [                    | bei den mit Klammern markierten Glycanen konnte die Position der Monosaccharide (Mannose) oder der Disaccharide (Galaktose/N-acetylglucosamin) nicht exakt bestimmt werden. |

## 1.9 V3-Loop Glycosylierung von Primären HIV-1 Isolaten

In früheren Arbeiten von Harm Müller (Müller, 1999) wurden verschiedene Primärisolate aus peripherem Blut von HIV-Infizierten angezüchtet. Der Phänotyp dieser Varianten wurde durch Infektionsstudien in GHOST-Indikatorzellen, die neben CD4 jeweils einen der bekannten HIV-Korezeptoren exprimierten, bestimmt. Zusätzlich wurde die Aminosäuresequenz des V3-Loops der angezüchteten Viren durch Sequenzierung ermittelt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die V3-Loop-Sequenzen und die Korezeptornutzung der verschiedenen Primärisolate.

Die isolierten Viren wurden aufgrund ihres Phänotyps in zwei Gruppen aufgeteilt. Die CCR5-monotropen Viren konnten neben CCR5 keine weiteren Korezeptoren nutzen. Alle anderen Viren konnten CXCR4 als Korezeptor nutzen. Eines der Primärisolate (PI-930) war CXCR4-monotrop und konnte ausschliesslich Zellen infizieren, die CXCR4 exprimierten. Weitere vier Isolate waren R5X4-dual- oder multitrop. Neben Unterschieden im viralen Phänotyp wurden auch deutliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz des V3-Loops gefunden. Ein besonderes Merkmal der Viren, die CXCR4 nutzen konnten, war die Häufung von Mutationen, die die Glycosylierungsstelle im V3-Loop betrafen. Bei allen CCR5-monotropen Isolaten war die N-Glycosylierungsstelle an Position g15 hochkonserviert. Dagegen wiesen die CXCR4 nutzenden Viren Mutationen im Bereich der N-Glycosylierungsstelle an Position g15 auf, die zu einer Zerstörung des N-Glycosylierungsmotives führte. Dieser Zusammenhang zwischen N-Glycosylierung und CCR5-Korezeptornutzung ließ darauf schließen, dass die N-Glycane im Bereich des V3-Loop eine Rolle für die Korezeptornutzung spielen.

**Tabelle 1 Aminosäuresequenzen und Korezeptornutzung von HIV-1 Primärisolaten**

HIV-Isolat <sup>a</sup>	Korezeptornutzung	V3-Loop-Aminosäuresequenz			
		CTRPNNNTRK	SI.HI..GPG	RAFYATGAI	GDI.RQAHC
PI-903	CCR5	-----	G-.I.---	STN-----	---S----
PI-918	CCR5	----S-----	--.I.---	-----E--	---.-----
PI-970	CCR5	----S-----	--.I.---	-----E--	---.-----
PI-991	CCR5	-----R	--.PI.---	----T-D--V	---.-----
PI-990	CCR5	-----	--.NI.---	--V-T-----	---.-----
PI-951	CCR5	----H-----	--.NI.---	--W-T-----	---.-----
PI-952	CCR5, CXCR4	-I-----	R-.TL.---	-VL-T--E--	---.K---
PI-932	CCR5, CCR3, CXCR4, Bob, Bonzo	-I--H-TVTD	R-.I.---	-S-HT-RK-K	---.-----
PI-930	CXCR4	----YR-AKH	R-M-I.---	-----NVKG	NIK..-----
PI-910	CCR5, CCR3, CXCR4,	----SIQK-R	-V.RI.---	-S-I-AR-AT	---.K-Q-
PI-911	CCR5, CCR3, CXCR4	----SIQK-R	-V.RI.---	-S-I--RA-T	---.K-Q-

<sup>a</sup> bei den HIV-1 Isolaten handelte es sich um Primärisolate (PI), die aus dem peripheren Blut von HIV-1 infizierten Personen angezüchtet werden konnten (Müller, 1999)

### **1.10 Ziel dieser Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der N-Glycosylierung im V3-Bereich des HIV-1 Hüllproteins gp120 für die Korezeptornutzung und Neutralisierbarkeit von HIV-1 zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten zunächst NL4-3-Chimären hergestellt werden, die CXCR4, CCR5 bzw. beide Korezeptoren nutzen konnten. Dazu sollten die V3-Bereiche von charakterisierten X4-, R5-, und R5X4-tropen HIV-1 Primärisolaten in den Hintergrund des gut charakterisierten X4-tropen HIV-1 Laborstammes NL4-3 kloniert werden.

Die resultierenden NL4-3 Chimären mit unterschiedlicher Korezeptornutzung sollten verwendet werden, um rekombinante Virusvarianten herzustellen, die sich in der N-Glycosylierung des V3-Bereiches unterscheiden. Die Aminosäuresequenz des V3-Bereiches sollte dafür durch zielgerichtete Mutagenese derart verändert werden, dass die N-Glycosylierungsmotive NXS und NXT eliminiert oder eingefügt werden. Die Eigenschaften der so hergestellten V3-Glycovarianten sollten anhand von Korezeptor-exprimierenden GHOST- und U87-Indikatorzelllinien untersucht werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, welche Rolle die Aminosäuremutationen YRNA, SIQK, und HTNV spielen, die bei CXCR4-nutzenden Primärisolaten an der Position g15 gefunden wurden. Dazu sollten NL4-3 Mutanten hergestellt werden, die anstelle der Sequenz NNNT an Position g15 des Laborstammes NL4-3 die Aminosäuremotive der CXCR4-nutzenden Primärisolate trugen. Diese Viren sollten ebenfalls auf ihre Replikationseigenschaften und ihre Neutralisierbarkeit durch HIV-1 neutralisierende Antikörper untersucht werden.

Durch diese Vorgehensweise sollte geklärt werden, welche Bedeutung die N-Glycosylierung im V3-Bereich des gp120 für die HIV-Infektion hat.

## 2 Materialien

### 2.1 Bakterien und Zellen

#### 2.1.1 Bakterien

Bakterienstamm	Phänotyp	Medium	Herkunft/Referenz
<i>E.coli</i> XL-1 Blue	( <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]	LB-Medium	Stratagene, (Heidelberg)

#### 2.1.2 Zellen

Zelllinie	Charakterisierung	Medium	Herkunft/Referenz
HeLaP4-CCR5	humane Zervixkarzinom Zelllinie	DMEM	zur Verfügung gestellt von M. Dittmar
GHOST/parental	humane Osteosarkom-Zelllinie stabil transfiziert mit CD4 und CXCR4 bzw. CCR5	DMEM	Cecilia <i>et al.</i> , 1998
GHOST/CXCR4			
GHOST/CCR5			
U87/parental	humane Gliom-Zelllinie stabil transfiziert mit CD4 und CXCR4 bzw. CCR5	DMEM	Deng <i>et al.</i> , 1996
U87/CXCR4			
U87/CCR5			

## 2.2 Enzyme

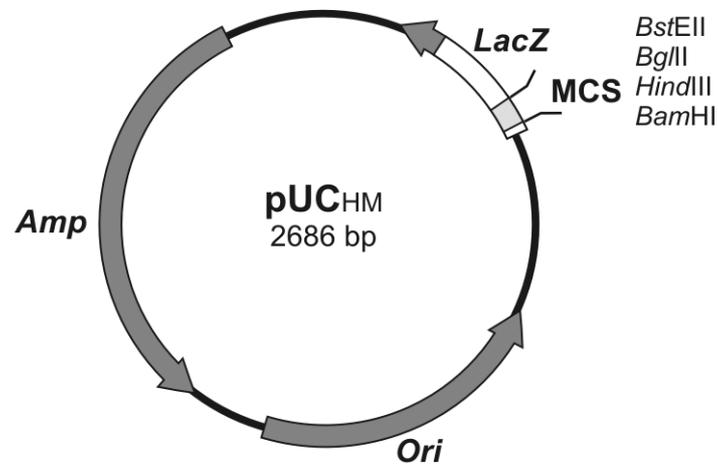
<i>Bst</i> EII, <i>Bam</i> HI	Roche, Mannheim
<i>Nhe</i> I, <i>Bgl</i> III , <i>Xba</i> I	MBI-Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> DNA Polymerase	MBI-Fermentas, Vilnius
HotStar- <i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
T4 DNA Ligase	MBI-Fermentas, Vilnius
Proteinase K	Merck, Darmstadt

Für alle Enzymreaktionen wurden die jeweils mitgelieferten Reaktionspuffer nach Angaben des Herstellers verwendet.

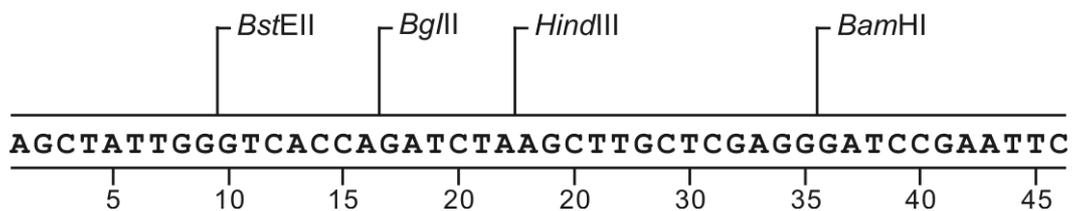
## 2.3 Plasmide

pNL4-3 mit modifiziertem <i>env</i> -Gen	Adachi <i>et al.</i> , 1986, modifiziert zur Verfügung gestellt von H.-G. Kräusslich
pUC <sub>HM</sub>	Zur Verfügung gestellt von H. Müller

A)



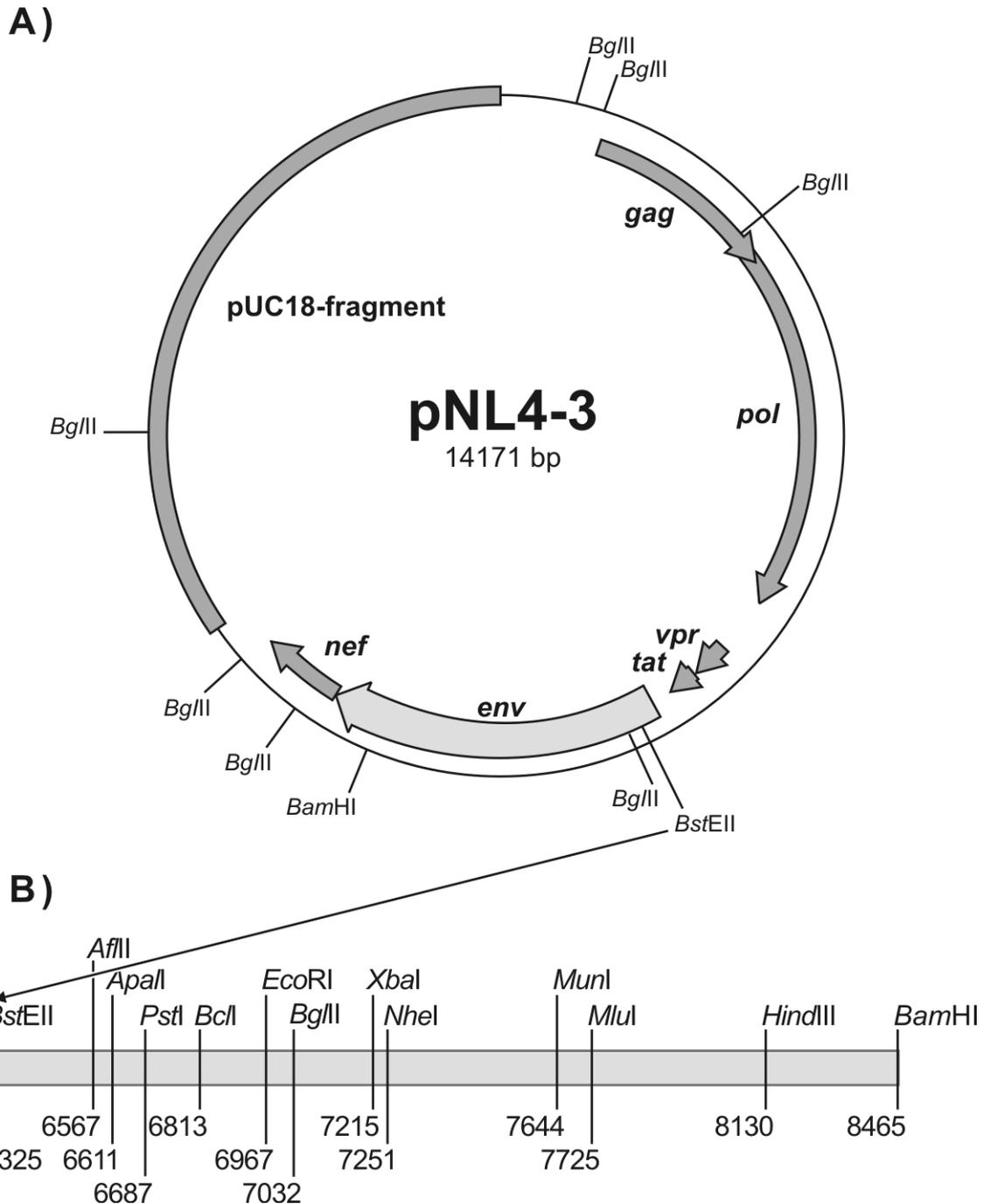
B)



### Abb. 9 Schematische Darstellung des Vektors pUC<sub>HM</sub>

Der Vektor pUC18<sub>HM</sub> wurde für die Insertion des *env*-Bereiches von NL4-3 in einen Vektorhintergrund benötigt, in dem die Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Nhe*I, die für die Herstellung der V3-Glycomutanten benötigt wurden, nicht vorhanden waren.

- A) Vektorkarte des Vektors pUC<sub>HM</sub>. Die *multiple cloning site* ist modifiziert, so dass das *env*-Gen von NL4-3 in diesen Vektor übertragen werden konnte. *Amp*: Ampicillin-Resistenzgen, *Ori*: Replikationsursprung (*Origin*)
- B) modifizierter Klonierungsbereich (MCS, *multiple cloning site*), des Vektors pUC<sub>HM</sub> der sich für die Übertragung des NL4-3 *env*-Bereiches über die Restriktions-Schnittstellen *Bst*EII und *Bam*HI eignete.



**Abb. 10 Vektor pNL4-3**

Der Vektor pNL4-3 hatte das gesamte Genom des HIV-1 Laborstammes NL4-3 in einen pUC18-Vektor inseriert. Der Vektor verfügte über das Ampicillin-Resistenzgen und den Replikationsursprung (*Origin, Ori*) des pUC18 Vektors (nicht gezeigt). Das *env*-Gen von NL4-3 konnte über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Bst*EII ausgetauscht werden.

A) Vektorkarte des Vektors pNL4-3, die Bereiche der HIV-1 Gene sind als Pfeile dargestellt.

B) modifizierter *env*-Bereich mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen.

## 2.4 Seren

Anti-p24-Kaninchenserum	zur Verfügung gestellt von H.-G. Kräusslich
HIV-1 Positivserum	Serumgemisch aus 40 Seren HIV-1 infizierter Personen
HIV-1 Negativserum	Serumgemisch aus 40 Seren HIV-1 negativer Personen

Alle Seren wurden für 30 min. auf 56°C erhitzt, um die enthaltenen Komplementfaktoren zu inaktivieren. Vor dem Gebrauch wurden die Seren außerdem über einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

## 2.5 Antikörper

Anti-HIV-1-p24, D7320 (Schaf)	Biochrom, Berlin
Anti-HIV-1-p24, monoklonal (Maus)	Aalto, Dublin, Irland
Anti-Maus IgG, β-Galaktosidase konjugiert (Ziege)	Southern Biotech, Birmingham
Anti-Kaninchen IgG, alkalische Phosphatase konjugiert (Ziege)	Sigma-Aldrich, München

## 2.6 Chemokine

SDF-1	Strathmann, Hamburg
-------	---------------------

## 2.7 verwendete Reaktionssysteme

NucleoSpin-Plasmid Minipräp Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel, Düren
PCR-Purification Kit	Roche, Mannheim
CEQ2000 DTCS-QuickstartKit	Beckmann Coulter, Fichtenheim
GeneRuler™ 100 bp-plus DNA Leiter	MBI-Fermentas, Vilnius
GeneRuler™ 1000 bp-plus DNA Leiter	MBI-Fermentas, Vilnius
Alkalische Phosphatase Substrat Kit	Bio Rad, München
Fugene® 6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim

## 2.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Erstellung des Klonierungsvektors  $\Delta V3$ -pUCenv

#6883 5'-GATCTATAGGCGCGCCATT

#6884 5'-CTAGAATGGCGCGCCTATA

Oligonukleotide zur Erstellung des Klonierungsvektors  $\Delta env$ -pNL4-3

#8603 5'-GTCACCGGCGCGCCG

#8604 5'-GATCCGGCGCGCCG

Oligonukleotide für die V3-Loop Amplifikation und Sequenzierung

#8693 5'-CCAATCCCATACATTATTGTGCC

#8694 5'-ATACATTGCTTTTCCTACTTCCTGC

Oligonukleotide für die Einführung der Restriktionsschnittstellen *Bgl*III und *Nhe*I (*f*-forward Primer, *r*-reverse-Primer)

NL4-3 *f* 5'-AAGATGTAGTAATTAGATCTGCCAAT

NL4-3 *r* 5'-AAATTGTTCTCTTAATTTGCTAGCTAT

PI-918 *f* 5'-GAAGAGATAGTAAATAGATCT

PI-918 *r* 5'-TCCTAATTTGCTAGCTATGTG

PI-930 *f* 5'-GAAGAGATAGTAATTAGATCT

PI-930 *r* 5'-CTCTTAATTTGCTAGCTATCTG

PI-952 *f* 5'-GGTAGTAATTAGATCTGCCAATTTCTCG

PI-952 *r* 5'-CCTCTTAATTTGCTAGCTACCTG

PI-991 *f* 5'-GAGATAGTAATTAGATCTGAAAATT

PI-991 *r* 5'-AAATTGTTCTCTTAATTTGCTAGCTAT

## Oligonukleotide zur Substitution von N-Glycosylierungsstellen

**NL4-3**

<i>g13 f</i>	5'-GTACAGCTGCAAACATCTGTAGAAATT
<i>g13 r</i>	5'-AATTTCTACAGATGTTTGCAGCTGTAC
<i>g15<sub>GSTT</sub> f</i>	5'-TGTACAAGACCCGGATCTACAACAAGA
<i>g15<sub>GSTT</sub> r</i>	5'-TCTTGTTGTAGATCCGGGTCTTGTACA
<i>g15<sub>HNTV</sub> f</i>	5'-TGTACAAGACCCCACAACACTGTAAGA
<i>g15<sub>HNTV</sub> r</i>	5'-TCTTACAGTGTTGTGGGGTCTTGTACA
<i>g15<sub>SIQK</sub> f</i>	5'-TGTACAAGACCCTCCATCCAAAAAAGA
<i>g15<sub>SIQK</sub> r</i>	5'-TCTTTTTTGGATGGAGGGTCTTGTACA
<i>g15<sub>YRNA</sub> f</i>	5'-TGTACAAGACCCTACAGGAATGCAAGA
<i>g15<sub>YRNA</sub> r</i>	5'-TCTTGCATTCCTGTAGGGTCTTGTACA
<i>g15<sub>NNI</sub> f</i>	5'-TGTACAAGACCCAACAACAATATAAGA
<i>g15<sub>NNI</sub> r</i>	5'-TCTTATATTGTTGTTGGGTCTTGTACA
<i>g15<sub>NNK</sub> f</i>	5'-TGTACAAGACCCAACAACAATAAAAAGA
<i>g15<sub>NNK</sub> r</i>	5'-TCTTTTATTGTTGTTGGGTCTTGTACA
<i>g17 r</i>	5'-CTCTTAATTTGCTAGCTATCTGTTTTAAAGTGGCTTGCCATT

**NL-918**

<i>g15 f</i>	5'-CAGCCAAAATACAAGAAAAAGT
<i>g15 r</i>	5'-ACTTTTTCTTGTATTTTGGCTG

**NL-930**

<i>g13 f</i>	5'-GTACAACTGCAACAATCTGTAAC
<i>g13 r</i>	5'-GTTACAGATTGTTGCAGTTGTAC
<i>g15<sub>NNT</sub> f</i>	5'-CAAGGCCCTACAATAATACAAAACAC
<i>g15<sub>NNT</sub> r</i>	5'-GTGTTTTGTATTATTGTAGGGCCTTG

*g15<sub>QNT</sub>f* 5'-CAAGGCCCTACCAAAATACAAAACAC

*g15<sub>QNT</sub>r* 5'-GTGTTTTGTATTTTGGTAGGGCCTTG

*g17f* 5'-AGCATGGCAAAACACTTTAAAACAG

*g17r* 5'-CTGTTTTAAAGTGTTTTGCCATGCT

### **NL-952**

*g13f* 5'-GTACAGCTGAAAGAAAGTATA

*g13r* 5'-TATACTTTCTTTCAGCTGTAC

*g14f* 5'-CTATAAAAATTAATTGTACAAGACC

*g14r* 5'-GGTCTTGTACAATTAATTTTATAG

*g15<sub>Q</sub>f* 5'-GACCCAACCAAAATACAAGAAAACG

*g15<sub>Q</sub>r* 5'-CGTTTTCTTGTATTTTGGTTGGGTC

*g15<sub>I</sub>f* 5'-GACCCAACAACAATATAAGAAAACG

*g15<sub>I</sub>r* 5'-CGTTTTCTTATATTGTTGTTGGGTC

*g17<sub>Q</sub>f* 5'-TGGCAAAACACTTTATAACCAG

*g17<sub>Q</sub>r* 5'-CTGGTATAAAGTGTTTTGCCA

*g17<sub>A</sub>f* 5'-TGGAATAACGTCTTATAACCAG

*g17<sub>A</sub>r* 5'-CTGGTATAAAGCGTTATTCCA

### **NL-991**

*g13f* 5'-GTACAGCTGCAAGAATCTGTAG

*g13r* 5'-CTACAGATTCTTGCAGCTGTAC

*g15f* 5'-GACCCAACCAAAATACAAGAAGAAG

*g15r* 5'-CTTCTTCTTGTATTTTGGTTGGGTC

*g17f* 5'-CAATGGCAAAACACTCTAGAGCAGATAGCTAGCAAATTAAGAG

*g17r* 5'-CTCTTAATTTGCTAGCTATCTGCTCCTCTAGAGTGTTTTGCCATTG

## Oligonukleotide für die pUC-env PCR-Analyse (3.1.10.3)

#8693 5'-CCAATTCCCATACATTATTGTGCC

#8694 5'-ATACATTGCTTTTCCTACTTCCTGC

## Oligonukleotide für die pNL4-3 PCR-Analyse (3.1.10.3)

#8724 5-AGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAG

#8694 5'-ATACATTGCTTTTCCTACTTCCTGC

Alle Oligonukleotide wurden mit einem Multipla Oligo Synthesis System (PE Biosystems, Weiterstadt) mit Chemikalien der Firma Prologo (Hamburg) synthetisiert.

## 2.9 Chemikalien

Agarose, ultrapure	Gibco BRL, Eggenstein
Ampicillin-Dinatriumsalz	Roth
Bacto Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	MBI Fermentas, Vilnius
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Boehringer, Mannheim
Glycerol	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> O ad inject	Braun
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Penicillin	Gibco, BRL, Eggenstein
Streptomycin	Gibco, BRL, Eggenstein
Tween 20	Serva, Heidelberg

Weitere verwendete, nicht aufgeführte Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“ und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

## 2.10 Plastikwaren

Plastikwaren für die molekularbiologischen Arbeiten und die Kultivierung von Bakterien und Zellen wurden den Firmen Greiner (Solingen), Eppendorf (Hamburg), Nunc (New York) USA und TPP (Trasadingen, CH) bezogen. Für die Zellkultur wurden steril verpackte Einwegmaterialien verwendet.

## 2.11 Medien

### 2.11.1 Medien für die Zellkultur

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (Gibco, BRL, Eggenstein)
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640 (Gibco, BRL, Eggenstein)

### 2.11.2 Medien für die Bakterienkultur

YT-Medium	8 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl ; pH 7,0
dYT-Medium	16 g/l Bacto-Trypton; 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl ; pH 7,0
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl ; pH 7,0
LB-Agar	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Bacto-Agar; pH 7,0
SOB-Medium	20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; pH 6,7- 7,0

Die Medium wurden mit H<sub>2</sub>O ad inject. angesetzt und bei 121 °C und 1,5 bar für 20 Minuten autoklaviert. Nach Bedarf wurde nach dem Abkühlen 200 mg/l Ampicillin - Dinatriumsalz zugesetzt.

## 2.12 Verwendete Puffer

TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-base, 0,25 M Essigsäure, 0,05 M EDTA
PBS-Puffer (10x)	120 mM NaCl, 17 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
PBS/Tween	1xPBS-Puffer, 0,5 % Tween 20
<i>Coating</i> -Puffer	150mM Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 8,5-9
<i>Blocking</i> -Puffer	PBS, 0,5 % Tween 20, 10 % FKS
TB-Puffer	10 mM Pipes, 55 mM MnCl <sub>2</sub> , 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl, pH 6,7 mit 5N KOH vor der Zugabe des MnCl <sub>2</sub> einstellen.
DNA-Ladepuffer für Agarosegele	0.09 % Bromphenolblau, 0.09 % Xylencyanol, 60 % Glycerol, 60 mM EDTA
X-Gal Substratlösung	PBS, 0,5 mg/ml X-Gal, 3 mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> , 3 mM K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> , 1 mM MgC <sub>2</sub>
Lysispuffer	1x PCR Puffer, 1% Tween 20, 10 mg/ml Proteinase K

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Bakterienkulturen wurden aus Einzelkolonien gewonnen. Dazu wurde eine flüssige Bakterienkultur in Form eines Vereinzlungsausstriches auf eine LB-Agarplatte verteilt und 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit sind aus den vereinzelt Bakterien Kolonien entstanden. Die Platte konnte für einen begrenzten Zeitraum mit Parafilm verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Für eine langfristige Lagerung wurde eine Glycerol-Gefrierkultur angelegt. Dafür wurde eine einzelne Bakterienkolonie in LB-Medium für 12-16 h bei 37°C im Bakterienrührer inkubiert. In einem sterilen Einfrierröhrchen wurden 0,75 ml der Flüssigkultur mit 0,25 ml sterilem Glycerol vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kultur wurde bei -70°C gelagert.

##### 3.1.2 Präparation chemisch kompetenter Bakterien (Inoue *et al.*, 1990)

Von einer am Vortag ausgestrichenen XL-1 Bakterienkultur wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterienrührer inkubiert. Mit 2,5 ml dieser Vorkultur wurde eine 250 ml Kultur in SOB Medium angeimpft und bis zu einer  $OD_{600} = 0,6$  bei 37°C im Bakterienrührer inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in vorgekühlten Zentrifugenbechern sedimentiert (2500 x g, 10 min, 4°C, Heraeus Sepatech Suprafuge 22), vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min. auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2500 x g, 10 min., 4°C Heraeus Sepatech Suprafuge 22) wurden die Bakterien in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % zugegeben. Nach 10 min. Inkubation auf Eis wurde die Bakterien suspension in sterile, vorgekühlte 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### **3.1.3 Transformation von *E. coli* (Hanahan, 1983)**

Es wurden 100 µl auf Eis aufgetaute kompetente Bakterien mit Plasmid-DNA (0,1-100 ng) für 30 min. auf Eis inkubiert. Nach einem 90 s Hitzeschock bei 42°C wurden die Zellen weitere 2 min. auf Eis inkubiert. Es wurden dann 500 µl LB-Medium dazugegeben. Nach der Resistenzentwicklung (45 min. bei 37°C) wurden die Bakterien sedimentiert (5 min. 3800 upm, Heraeus Tischzentrifuge), das Medium bis auf 100-200 µl abgenommen, die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert und auf einer YT-Agarplatte, der das Selektionsantibiotikum (Ampicillin-Dinatriumsalz, 200 mg/l) zugegeben war, ausgestrichen. Die Klone konnten nach 16 h Inkubation bei 37°C in die analytische PCR (3.1.10.3) eingesetzt werden.

### **3.1.4 Präparation von Plasmid-DNA**

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

### **3.1.5 Reinigung von DNA**

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

### **3.1.6 DNA-Konzentrationsbestimmung (Sambrook *et al.*, 1989)**

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

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

Bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  entspricht eine Extinktion von  $E_{260 \text{ nm}}=1$  einer Konzentration von 35  $\mu\text{g/ml}$  für einzelsträngige DNA und einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  für doppelsträngige DNA.

### 3.1.7 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Sambrook *et al.*, 1989)

Das Schneiden der DNA erfolgte mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen. Die enzymatischen Reaktionen wurden in den für die jeweiligen Enzyme vom Hersteller vorgegebenen Puffern durchgeführt.

Für einen 10  $\mu\text{l}$  Ansatz wurden

1 $\mu\text{l}$	10 x Puffer
1-2 $\mu\text{g}$	DNA
2 U	Restriktionsenzym/ $\mu\text{gDNA}$
ad 10 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O ad inject.

zugegeben.

Der Ansatz wurde bei der jeweils optimalen Reaktionstemperatur 15-60 min. inkubiert. Die geschnittene DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (3.1.13.1) überprüft.

### 3.1.8 Ligation von DNA (Bolivar *et al.*, 1977)

T4-Ligase katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat- und einer benachbarten 3'-Hydroxylgruppe, wodurch DNA-Fragmente mit glatten oder überstehenden Enden miteinander verknüpft werden können.

Die Ligation des linearisierten Vektors mit dem entsprechenden DNA Fragment wurde in einem 10  $\mu\text{l}$  Ansatz durchgeführt: Hierzu wurden

1 $\mu\text{l}$	10x Ligase Puffer
1 $\mu\text{l}$	T4 Ligase
2 $\mu\text{l}$	linearisierter Vektor(100 ng/ $\mu\text{l}$ )
3 $\mu\text{l}$	DNA Fragment
ad 10 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O ad inject.

zusammengegeben.

Das molare Verhältnis von Fragment zu Vektor betrug 1:3 bis 1:5. Der Ansatz wurde über Nacht bei 8°C im Kühlschrank inkubiert und in die Transformation von *E. Coli* (3.1.3) eingesetzt.

### 3.1.9 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Für die Herstellung kurzer DNA-Fragmente wurden komplementäre Oligonukleotide synthetisiert (2.8). Die Oligonukleotide wurden in gleichen Konzentrationen zusammengegeben und für 5 min. auf 70°C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz langsam (über ca. 1h) auf RT abgekühlt. Die hybridisierten Oligonukleotide konnten dann in die Ligation (3.1.8) eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt werden.

### 3.1.10 Polymerase Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988)

#### 3.1.10.1 Polymerase Kettenreaktion von cDNA

Für einen 100 µl Ansatz wurden

10 µl	10 x PCR-Puffer
10 µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
10 µl	Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
8 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
2 µl	dNTPs (10 mM) und
5 µl	<i>Taq</i> -DNA Polymerase/ <i>Pfu</i> -Polymerase-Mix (8:2 Units)
ad 100 µl	H <sub>2</sub> O ad inject

zusammengegeben. Zu diesem Ansatz wurden 1 µl (ca. 50-100 ng) der zu amplifizierenden DNA gegeben. Die Amplifikation erfolgte nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 94°C für 2 min. in 25 Zyklen:

Denaturierung	60 s	94°C	} 24x
Annealing (Primeranlagerung)	60 s	52°C	
Elongation	90 s	72°C	

Nach einem abschließenden Elongationsschritt von 5 min. bei 72°C wurden die Proben aufgereinigt (3.1.5) und standen so für weitere Anwendungen zur Verfügung.

### 3.1.10.2 Polymerase Kettenreaktion proviraler HIV-1 DNA aus HIV-1 infizierten Zellen

Für die Amplifikation von proviraler DNA aus HIV-1 infizierten Zellen wurden die Zellen zunächst lysiert (3.2.1). Die in dem Lysat enthaltene DNA wurde als Matrize in die PCR-Reaktion eingesetzt. Es wurde die HotStar DNA-Polymerase der Firma Qiagen verwendet. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Der PCR Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl	Zelllysat
2 µl	10x PCR-Puffer
4 µl	„Lösung Q“
2 µl	Vorwärts-Primer #8693 (10 pmol/µl)
2 µl	Rückwärts-Primer #8694 (10 pmol/µl)
2 µl	dNTPs (10 mM)
0,5 µl	HotStar® DNA Polymerase
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O ad inject.

Bei der „Lösung Q“ handelt es sich um eine vom Hersteller mitgelieferte Lösung, welche die Amplifikation unspezifischer Nebenprodukte reduzieren soll.

Nach einer initialen Denaturierung (15 min, 95°C), durch die der Antikörper, der die Aktivität der Polymerase blockiert und so unspezifische Interaktionen mit der DNA verhindert, von der HotStar-*Taq*-DNA Polymerase abgespalten wurde, fand die Amplifikation in 40 Zyklen statt.

Denaturierung	120 s	95°C	} 39x
Annealing	90 s	60°C	
Elongation	90 s	72°C	

Nach einem abschließenden Elongationsschritt (10 min, 72°C) wurde der Ansatz aufgereinigt (3.1.5) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.1.10.3 Analytische Polymerase Kettenreaktion von cDNA aus *E. coli*

Die analytische PCR diente dazu, Bakterienklone daraufhin zu überprüfen, ob eine Insertion des gewünschten DNA-Fragments durch die Ligation (3.1.8) erfolgreich war. Da sich der Vektor nach der Ligation mit dem gewünschten Fragment von dem vor der Ligation in der Größe unterschied, wurden die Oligonukleotidprimer so gewählt, dass der Erfolg der Ligation anhand der Größe des PCR-Amplifikates unterschieden werden konnte. Es wurden

1 µl	10x PCR-Puffer
1 µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
1 µl	Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
0,8 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0,2 µl	dNTPs (10 mM)
0,3 µl	Taq-DNA Polymerase (1 Unit/µl)
5,7 µl	H <sub>2</sub> O ad inject.

zusammengegeben. Bakterienkolonien wurden einzeln von der LB-Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze sowohl in ein ebenfalls steriles 200 µl PCR-Reaktionsgefäß überführt als auch auf eine Referenzplatte übertragen, wobei die überimpften Bakterienklone auf dem Plattenboden numeriert wurden. Jeweils 10 µl des Reaktionsgemisches wurden in die PCR Reaktionsgefäße gegeben. Nach einem initialen Denaturierungsschritt für 2 min. bei 94°C, durch den auch die Bakterien aufgeschlossen wurden, fand die Amplifikation der in den Bakterien enthaltenen Plasmid-DNA in 25 Zyklen statt:

Denaturierung	25 s	94°C	} 24x
Annealing	25 s	52°C	
Elongation	40 s	72°C	

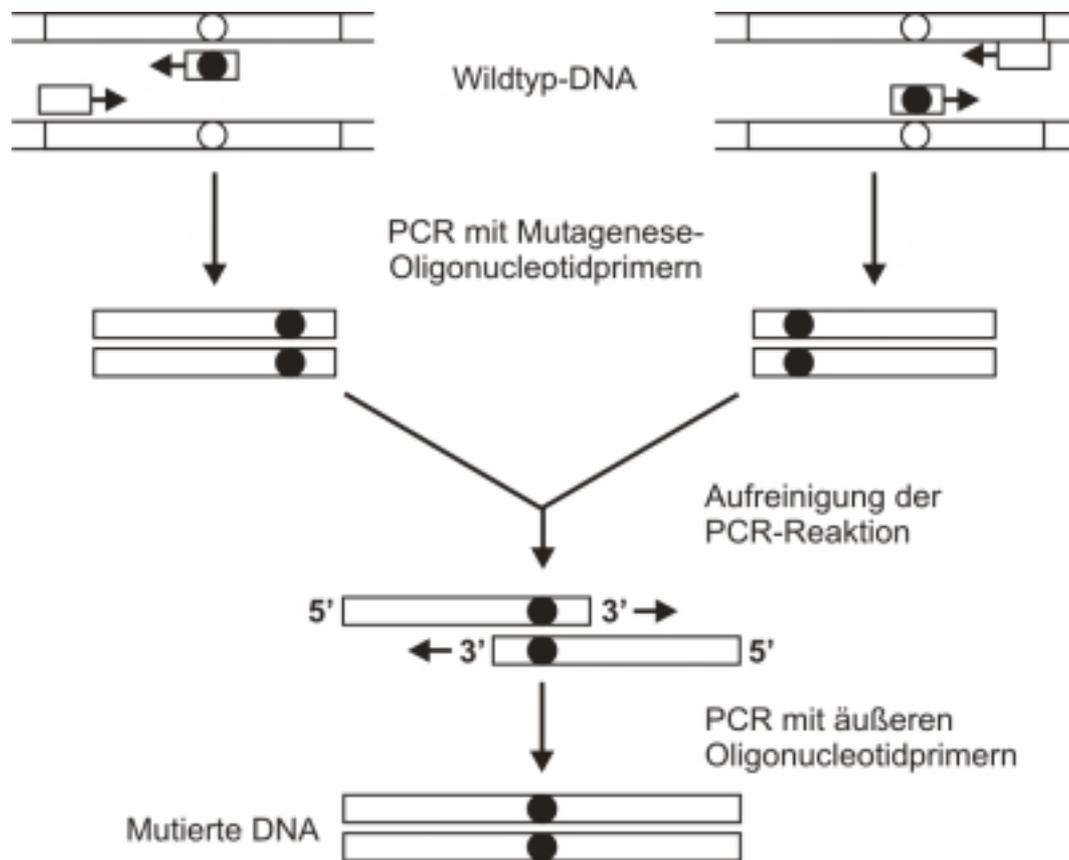
Die Größe der erhaltenen Produkte wurde mit Hilfe eines Agarosegels (3.1.11.1) bestimmt.

### 3.1.11 Zielgerichtete Mutagenese

Für den Austausch bestimmter Aminosäuren bzw. kurzer Sequenzmotive wurde die Methode *PCR-Overlap Extension* (Higuchi *et al.*, 1988) verwendet. Dabei findet die Reaktion zunächst in zwei getrennten PCR-Ansätzen statt, wobei jeweils an einem Ende des zu amplifizierenden Fragments der Mutageneseprimer und am anderen Ende ein sequenzspezifischer Gegenprimer verwendet wird (Abb. 11). Die resultierenden Fragmente werden anschließend in einem gemeinsamen Reaktionsansatz aneinandergelagert, was durch die komplementären Bereiche in der mutierten Region möglich ist. In einer PCR-Reaktion wird das gesamte Fragment, das sich aus den überlappenden PCR-Amplifikaten der ersten Reaktionen gebildet hat, amplifiziert (Landt *et al.*, 1990).

Das resultierende DNA-Fragment trägt in der Region, in der sich die PCR-Amplifikate aus den ersten Reaktionen überlappen, die Basenaustausche, die durch die Mutageneseprimer eingeführt wurden.

Für die Herstellung von Mehrfachmutanten wurden die Positionen jeweils nacheinander mutiert, wobei mutierten Fragmente als Matrize in die neuen PCR Reaktionen eingesetzt wurden und so zusätzlich Mutationen eingeführt wurden.



**Abb. 11** Zielgerichtete Mutagenese durch die ‚*overlap extension PCR*‘

Im ersten Schritt werden in zwei getrennten PCR Reaktionen durch entsprechende Oligonucleotidprimer Fragmente erzeugt, die jeweils im 3' Bereich die gewünschte Mutation tragen. Diese Fragmente werden in einer zweiten Reaktion hybridisiert und amplifiziert. Das resultierende DNA Fragment trägt die gewünschte Mutation, die als schwarzer Punkt dargestellt ist.

### **3.1.12 DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977)**

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

### **3.1.13 Gelelektrophoresen**

#### **3.1.13.1 Analytische Gelelektrophorese**

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

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

#### **3.1.13.2 Präparative Gelelektrophorese**

Zur Isolierung wurden die DNA-Fragmente in einem geeigneten Agarosegel (0,75-1,5%) elektrophoretisch aufgetrennt und auf einem UV-Durchlichttisch sichtbar gemacht. Die entsprechende DNA-Bande wurde mit Hilfe eines DNA-Größenstandards identifiziert und mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA aus dem Gel extrahiert (3.1.5).

## **3.2 Zellbiologische Methoden**

### **3.2.1 Lyse von HIV-1-infizierten Zellen**

Es wurden  $1 \times 10^5$  infizierte Zellen sedimentiert (2 min. max upm, Eppendorf Tischzentrifuge) und in 100  $\mu$ l Lysispuffer resuspendiert. Der Ansatz wurde 2 h bei 56°C inkubiert, wodurch es zu einer Lyse der Zellen kam. Die in dem Lysispuffer enthaltene Proteinase K wurde anschließend für 10 min. bei 96°C inaktiviert. Das Zelllysate wurde entweder direkt in eine PCR eingesetzt (3.1.10.2) oder bei -20°C gelagert.

### **3.2.2 Kultivierung adhärenter Zellen**

Die adhärenth wachsenden Zelllinien wurden in dafür geeigneten Zellkulturschalen und -flaschen (Greiner) kultiviert. Als Wachstumsmedium wurde DMEM verwendet, welches mit 50 U/ml Penicillin, 50  $\mu$ g/ml Streptomycin sowie FKS supplementiert war. Die Menge des zugegebenen FKS richtete sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien, wobei bei den schnell wachsenden GHOST und HeLa Zellen 5 % FKS und bei den langsamer wachsenden U87 Zellen 15 % FKS zugesetzt wurde.

Die Zellen wurden alle 3-4 Tage mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und mit Trypsin/EDTA (Gibco) von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst (5 min. 37°C). Es wurden ca 5-10 ml Kulturmedium hinzugegeben, 1/20 (GHOST und HeLa-Zellen) bzw. 1/5 (U87-Zellen) der Suspension wurden zurückbehalten und mit frischem Medium in die Zellkulturflasche zurückgegeben, um die Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> weiter zu kultivieren.

Bei Bedarf wurde durch Zugabe von 500  $\mu$ g/ml Neomycin auf CD4 und über 1  $\mu$ g/ml Puromycin auf den Korezeptor selektioniert.

### **3.2.3 Bestimmung von Zellzahl und Zustand der Kultur**

Um Anzahl und Zustand von Zellen in einer Suspension zu ermitteln, wurde eine kleine Portion die Zellsuspension in Trypanblau 1:5-1:20 verdünnt. Durch den Einbau von Trypanblau in die Membran abgestorbener Zellen konnte das Verhältnis lebender Zellen zu toten Zellen ermittelt werden und so der Zustand der Kultur kontrolliert werden. Die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Hierbei wurden in der Kammer eingravierte Zählfelder zur Hilfe genommen, deren Volumen jeweils 0,1 µl betrug.

### 3.2.4 Transfektion von Zellen

Um aus HIV-1 codierender DNA funktionelle Viren zu erhalten, wurden die pNL4-3 Vektoren, welche die gewünschten Veränderungen im V3-Bereich trugen, in HeLa-Zellen transfiziert. Hierfür wurde das FuGene-Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben verwendet. In Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen (6-well-Zellkulturplatte) wurden  $1-3 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach 16-20 h konnten die Zellen mit der Plasmid-DNA transfiziert werden. Dazu wurde zunächst die FuGene-Transfektionsreagenz in ca. 100µl RPMI-Medium ohne Zusätze gelöst. Zu dieser Lösung wurden 1-2µg Plasmid DNA gegeben. Nach 30 min. Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz in den vorbereiteten HeLa-Zellkulturen verteilt. Die Zellen wurden 3 Tage inkubiert (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nach dieser Zeit war in den Kulturen nach erfolgreicher Transfektion im Lichtmikroskop ausgeprägte Synzytienbildung zu sehen. Der virushaltige Kulturüberstand wurde abgenommen und Zellreste sedimentiert. Der virushaltige Überstand wurde in Einfrierröhrchen (Nunc, USA) in 0,5-0,8 ml Portionen aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 3.3 Virologische Methoden

#### 3.3.1 Infektion von Zellen mit HIV-1 Varianten

Die Zellen wurden in 96-well Zellkulturplatten ausgesät und für 18-20h inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Virushaltige Transfektionsüberstände (3.2.4) wurden in geeignetem Zellkulturmedium auf die gewünschte Viruskonzentration eingestellt.

Für die Infektion der Zellen wurde das Kulturmedium gegen das virushaltige Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden 18 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend dreimal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen. Den Zellen wurde frisches Kulturmedium ohne Virus zugesetzt. Die infizierten Zellen wurden für die Untersuchung der Virusreplikation (3.3.4), der Virusneutralisation (3.3.5) oder für Untersuchungen der Infektiosität (3.3.2) eingesetzt.

#### 3.3.2 Messung der Infektiosität von HIV-Varianten

Zur Quantifizierung von HIV-Infektionsereignissen in Zellkulturen wurden GHOST- oder U87-Indikatorzellen in 48-well Zellkulturplatten ausgesät ( $5 \times 10^3$  Zellen/well). Die Zellen wurden 16-20 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Infektion erfolgte mit virushaltigen Zellkulturüberständen, die für 18 h auf den Zellen verblieben. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und weiter inkubiert. Die Zahl der Infektionsereignisse wurde nach 48 h durch Immunfärbung (3.3.3) ermittelt.

#### 3.3.3 Detektion infizierter Zellen durch Immunfärbung

Zur Detektion der infizierten Zellen wurde intrazelluläres p24 nachgewiesen (Sonza et al., 1991). Die Zellen wurden mit -20°C kaltem Methanol/Aceton 1:1 fixiert und mit PBS/1% FKS gewaschen. Die Detektion von p24 erfolgte mit einem monoklonalen anti-p24-Antikörper (Aalto; 1:2000 in PBS/1% FKS). Es wurden 200 µl der Antikörperlösung pro Kavität eingesetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und zweimal mit PBS/1 % FKS gewaschen. Als Detektionsantikörper wurde ein β-Galaktosidase-konjugierter anti-Maus Antikörper (Southern Biotech) verwendet. Der Ansatz wurde 1 h inkubiert (37°C) und anschließend zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Substratreaktion erfolgte durch Zugabe einer X-Gal Färbelösung (2.12).

Nach 2-4 h Inkubation bei 37°C färbten sich die infizierten Zellen blau. Die infizierten Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

### 3.3.4 HIV-1 Replikationskinetik

In einer 96-well Zellkulturplatte wurden  $1-3 \times 10^4$  Zellen pro Kavität ausgesät und 16-20 h bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es wurden dann virushaltige Zellkulturüberstände der Virusvarianten, die in Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt wurden (0,25-5 ng p24/ml), zu den Zellen gegeben. Nach 18 h wurden die Zellen dreimal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und virus-freies Medium zugegeben. Ab Tag 1 wurden im Abstand von 1-3 Tagen Überstände abgenommen und die Virusmenge in einem p24-Antigen-ELISA (3.3.7) ermittelt.

### 3.3.5 HIV-1 Neutralisationstest

In einer 96-well Zellkulturplatte wurden  $1-3 \times 10^4$  U87 Zellen pro Kavität ausgesät und 24 h bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. HIV-1 Positivserum und HIV-1 Negativserum (2.4) wurden 15 min. bei 56°C inaktiviert und anschließend in Zellkulturmedium 1:100 verdünnt. Die rekombinanten HIV-1-Varianten wurden in Zellkulturmedium auf eine p24 Konzentration von 0,1–5 ng/ml verdünnt und mit dem HIV-1 Positivserum inkubiert (1 h, 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Anschließend wurden je 200 µl des Serum-Virusgemisches auf die Zellen gebracht, von denen zuvor das Medium abgenommen wurde. Es ergab sich somit eine Virusmenge von 0,05-1 ng p24 pro Kavität. Nach 18 h Inkubation bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> wurde die Zellkulturplatte dreimal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde 200 µl Zellkulturmedium pro Kavität, welches HIV-1 Serum enthielt, zugegeben. Als Kontrolle wurden alle Ansätze parallel mit HIV-1-Negativserum in einer Verdünnung von 1:100 durchgeführt. Ab Tag 1 nach der Infektion wurden im Abstand von 1-3 Tagen Kulturüberstände abgenommen und pro Kavität 150 µl in eine 96-well Platte, in welcher pro Kavität 16 µl Empigen (10 % in Zellkulturmedium) zur Virus-Inaktivierung vorgelegt waren, überführt. Nach 30 min. Inkubation bei RT konnten die Überstände zur Virusbestimmung mittels eines p24-Antigen-ELISA eingesetzt werden (3.3.7).

### 3.3.6 HIV-1 Inhibitionstest mit SDF-1

Zur Quantifizierung von HIV-Infektionsereignissen in Zellkulturen in Gegenwart des CXCR4-Liganden SDF-1 wurden GHOST-CXCR4-Zellen in 48-well Zellkulturplatten ausgesät ( $5 \times 10^3$  Zellen/well). Die Zellen wurden 16-20 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die virushaltigen Zellkulturüberstände wurden vor der Infektion für 2 h mit SDF-1 in unterschiedlichen Verdünnungen bei 37°C vorinkubiert und dann zu den Indikatorzellen gegeben. Die Infektion erfolgte für 18 h. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und mit Kulturmedium ohne SDF-1-Zusatz weiter inkubiert. Die Zahl der Infektionsereignisse wurde nach 48 h durch Immunfärbung (3.3.3) ermittelt.

### 3.3.7 p24-Antigen ELISA

Zunächst wurde der anti-p24 *Catching*-Antikörper (D7320, Biochrom) an eine MAXIsorp Platte (Nunc, USA) mit 96 Kavitäten (96-well Platte) gebunden. Der Antikörper wurde in *Coating*-Puffer in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. In jede Kavität wurden 100 µl der Antikörperlösung gegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und nach der Bindung des *Catching*-Antikörpers sechsmal mit PBS/Tween gewaschen. Die Platte wurde trocken geschlagen und mit 300 µl Blockpuffer pro Kavität für 1-2 Stunden inkubiert, um freie Bindungsstellen abzublocken und so unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Nach der Inkubation wurde die Platte einmal gewaschen, getrocknet und 100 µl der zu untersuchenden Zellkulturüberstände je Kavität zugegeben. Die Bindung des p24-Antigens erfolgte für 2 h bei RT oder ÜN bei 8°C. Nach der Antigen-Bindung wurde die Platte sechsmal gewaschen und trocken geschlagen. Der zweite Antikörper, ein anti-HIV Kaninchenserum wurde in einer Verdünnung von 1:2000 auf die trockene Platte gebracht (100 µl je Kavität). Die Platte wurde für 1 h bei RT inkubiert. Es wurde erneut sechsmal gewaschen und die Platte trocken geschlagen. Der dritte Antikörper (anti-Kaninchen-IgG, Alkalische Phosphatase gekoppelt, Sigma) wurde in einer Verdünnung von 1:2000 auf die trockene Platte aufgebracht (100 µl je Kavität). Nach 1h Inkubation bei RT wurde die Platte wieder gewaschen und trocken geschlagen, jedoch wurde für die letzten drei Waschschrte H<sub>2</sub>O bidest. verwendet. Es wurden 100 µl p-Nitrophenylphosphat-Substratlösung (*Alkaline Phosphatase Substrate Kit*, BioRad), die

zuvor nach Herstellerangaben angesetzt wurde, auf die trockene Platte gebracht. Die Reaktion wurde nach 5-10 min. mit 100  $\mu$ l 0,4 M NaOH gestoppt und die Enzym-Substratreaktion, die mit der Menge an p24-Antigen korreliert, mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei einer OD von 405 nm ausgewertet. Der p24-Gehalt der Proben wurde anhand einer Standardkurve ermittelt. Diese ergab sich aus der Messung der OD<sub>405nm</sub> einer halblogarithmischen Verdünnung von standardisiertem p24-Protein.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Erstellung der rekombinanten Virusvarianten

Mit Hilfe rekombinanter Virusvarianten wurde der Einfluß der N-Glycosylierung im Bereich des V3-Loops des HIV-1 Hüllproteins gp120 auf die Infektiosität und Neutralisierbarkeit der Viren untersucht. Dazu wurden zunächst die V3-Bereiche von HIV-1 Primärisolaten mit unterschiedlicher Korezeptornutzung in den genetischen Hintergrund des NL4-3 Virus übertragen. Diese NL4-3/V3-Loop-Chimären wurden in einem zweiten Schritt modifiziert, so dass eine Reihe von Virusvarianten erhalten wurde, die sich hinsichtlich der N-Glycosylierung im V3-Bereich unterschieden. Dadurch wurden Viren mit unterschiedlicher Korezeptornutzung und unterschiedlicher V3-Loop Glycosylierung erzeugt, die sich nur in der V3-Region unterscheiden.

In dieser Arbeit wurden die verwendeten Vektoren und Viruskonstrukte wie folgt benannt:

pUCenv	pUC18-Derivat mit dem 2129 bp <i>BstEII/BamHI env</i> -Fragment
pUC $\Delta$ V3	pUCenv ohne den V3-Loop-Bereich zwischen <i>BglIII</i> und <i>XbaI</i>
pNL $\Delta$ env	pNL4-3 ohne das 708 bp <i>BstEII/BglIII</i> Fragment im 5'-Bereich des <i>env</i> -Gens
pSVATGrev	Expressionsvektor für gp160
PI-952:	Primärisolat Nummer 952
NL4-3:	HIV-1-Laborstamm NL4-3. Das vollständige Genom des Virus liegt in dem Vektor pNL4-3 vor
NL4-3-g15 <sub>YRNA</sub>	NL4-3 Virus mit einem veränderten V3-Loop. Diese vier Aminosäuren ersetzen die Aminosäuresequenz NNNT im Bereich der N-Glycosylierungsstelle an Position g15 von NL4-3
NL-952 <sub>PI</sub>	NL4-3 Viren mit dem V3-Loop-Bereich des PI-952 zwischen <i>BglIII</i> und <i>NheI</i>
NL-952-g15	Virus-Chimäre aus dem NL4-3 Virus mit dem PI-952 V3-Bereich zwischen den Restriktionsschnittstellen <i>BglIII</i> und <i>NheI</i> mit zerstörter N-Glycosylierungsstelle an Position g15

#### 4.1.1 Herstellung der Klonierungsvektoren

##### 4.1.1.1 Herstellung des Vektors pUC<sub>env</sub>

Im Vektor pNL4-3 waren die beiden Restriktionsschnittstellen *NheI* und *BglIII*, über die der V3-Loop ausgetauscht werden kann, mehrfach vorhanden. Daher wurde der V3-Loop nicht direkt in den Vektor pNL4-3 kloniert. Um den V3-Bereich auszutauschen, musste ein Vektorkonstrukt hergestellt werden, das diese beiden Schnittstellen nur einmal enthielt. Außerdem sollten die *env*-Schnittstellen *BstEII* und *BamHI* ebenfalls nur einmal in diesem Vektor vorhanden sein. Durch die Schnittstellen *BstEII* und *BamHI* sollte das vollständige *env*-Gen nach dem V3-Loop-Austausch in den pNL4-3 Vektor übertragen werden. Dieser Vektor diente zur Produktion der infektiösen Viren. Zunächst wurde der Vektor pUC<sub>env</sub> mit den benötigten Eigenschaften hergestellt.

Hierfür wurde die *env*-Genkassette aus dem Vektor pNL4-3 in den Vektor pUC18<sub>HM</sub> übertragen. Das gesamte 2129 bp große *env*-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *BstEII* und *BamHI* in die *multiple cloning site* des Vektors pUC18<sub>HM</sub> übertragen (Abb 12). In dem resultierenden Vektorkonstrukt pUC<sub>env</sub> waren die Restriktionsschnittstellen *BstEII*, *BamHI*, *BglIII* und *NheI* jeweils nur einmal vorhanden. Dabei befinden sich die Schnittstellen *BstEII* und *BamHI* im 5'- bzw. 3'-Bereich des *env*-Gens, während die Schnittstellen *BglIII* und *NheI* den V3-Bereich einschließen. Der resultierende Vektor pUC<sub>env</sub> konnte dadurch zum einen für die Veränderung des *env*-Gens im V3-Bereich genutzt werden, zum anderen konnte das gesamte *env*-Gen in andere Vektoren für die Virusproduktion oder die gp120 Expression übertragen werden. Voraussetzung war, dass diese Vektoren ebenfalls die Restriktionsschnittstellen *BstEII* und *BamHI* nur einmal und an der entsprechenden *env*- Position enthalten.

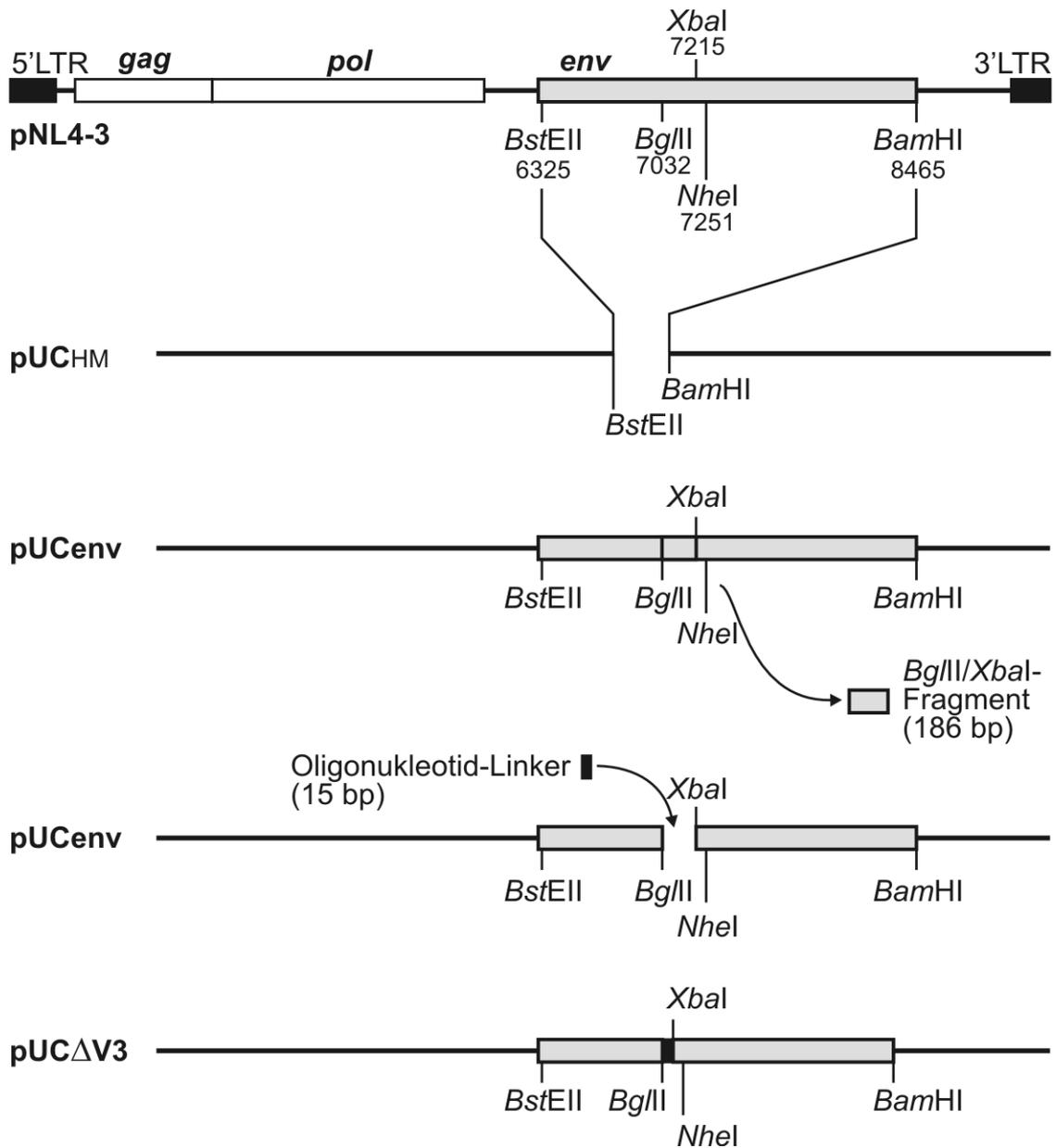
##### 4.1.1.2 Herstellung des Vektors pUC $\Delta$ V3

Die Klonierung der verschiedenen V3-Glycomutanten erfolgte in den genetischen Hintergrund des NL4-3 *env*-Gens, das in dem Klonierungsvektor pUC<sub>env</sub> inseriert war (Abb. 12). Der V3-Bereich wurde jeweils über die Restriktionsschnittstellen *BglIII* und *NheI* ausgetauscht. Um die Herstellung der Virusvarianten zu erleichtern, wurde zunächst der Vektor pUC $\Delta$ V3 erstellt (Abb. 12). Dazu wurde der 186bp große V3-Bereich zwischen *BglIII* und *XbaI* gegen ein 15 bp DNA-Fragment (3.1.9) ausgetauscht. Dieses bestand aus zwei Oligonukleotiden (#6883, #6884), die nach Hybridisierung am

5' und 3' Ende zu den verwendeten Schnittstellen komplementäre Überhänge aufwiesen. Das so hergestellte DNA-Fragment wurde mit dem *BgIII/XbaI* geschnittenen Vektor pUC*env* ligiert. In dem resultierenden Vektorkonstrukt pUCΔV3 konnte der deletierte V3-Bereich durch eine PCR-Analyse von dem vollständigen V3-Bereich unterschieden werden (3.1.10.3). Die Amplifikation des V3-Bereichs mit dem Oligonucleotidprimerpaar #8693/ #8694 ergab für den Vektor pUCΔV3 ein 505 bp großes Fragment, während der vollständige V3-Bereich des pUC*env* ein Amplifikat von 671 bp zeigte (Abb. 13). Der Vektor pUCΔV3 war der Klonierungsvektor für die Konstruktion aller V3-Varianten.

#### 4.1.1.3 Herstellung des Vektors pNLΔ*env*

Für die Produktion der rekombinanten Virusvarianten als infektiöse Viruspartikel sollte das *BstEII/BamHI env*-Fragment aus dem pUC-Vektor in den pNL4-3 Vektor übertragen werden. In pNL4-3 ist das gesamte Virusgenom des HIV-1 Laborstammes NL4-3 inseriert. Um auch hier die Herstellung der pNL4-3 Varianten mit modifizierten *env*-Genen zu erleichtern, wurde zunächst der Teil des *env*-Gens zwischen den Restriktionsschnittstellen *BstEII* und *BgIII* gegen ein 10bp DNA-Fragment ausgetauscht (Abb. 14). Das Fragment wurde wie unter 4.1.1.2 durch Hybridisierung von zwei komplementären Oligonukleotiden (#8603 und #8604) gebildet (3.1.9), die durch entsprechende Überhänge am 3' und 5' Ende mit dem *BstEII/BgIII* geschnittenen Vektor ligiert wurden (3.1.8). Es entstand der Vektor pNLΔ*env*, der im 5' Bereich des *env*-Gens eine 708 bp große Deletion trug (Abb. 14). In diesen Vektor konnte nun der *env*-Bereich aus dem pUC*env* als *BstEII/BamHI* Fragment übertragen werden. Durch eine PCR-Amplifikation (3.1.10.3) wurden die Konstrukte überprüft. Das vollständige *env*-Gen ergibt in der PCR ein 1321 bp Amplifikat im Unterschied zum Δ*env* (631 bp) (Abb. 15). Für die weitere Arbeit ergab sich wie für den unter 4.2.1 beschriebenen Vektor pUCΔV3 der Vorteil, durch die PCR-Analyse (3.1.10.3) eine große Zahl an Bakterienkolonien direkt nach der Transformation auf das Vorhandensein des gewünschten Fragments untersuchen zu können.



**Abb. 12 Herstellung des Vektors pUC $\Delta$ V3**

Aus dem Vektor pUC<sub>env</sub>, der das NL4-3 env-Gen in einem pUC18-Vektorderivat pUC<sub>HM</sub> trägt, wurde der V3-Bereich durch die Restriktionsendonukleasen BglII und XbaI entfernt und gegen ein 15 bp großes DNA-Fragment ausgetauscht. Dieses Fragment wurde durch Hybridisierung zweier Oligonukleotide (# 6883 und #6884) hergestellt und trug für die Klonierung in den BglII/XbaI geschnittenen Vektor Überhänge am 5' und 3' Ende.



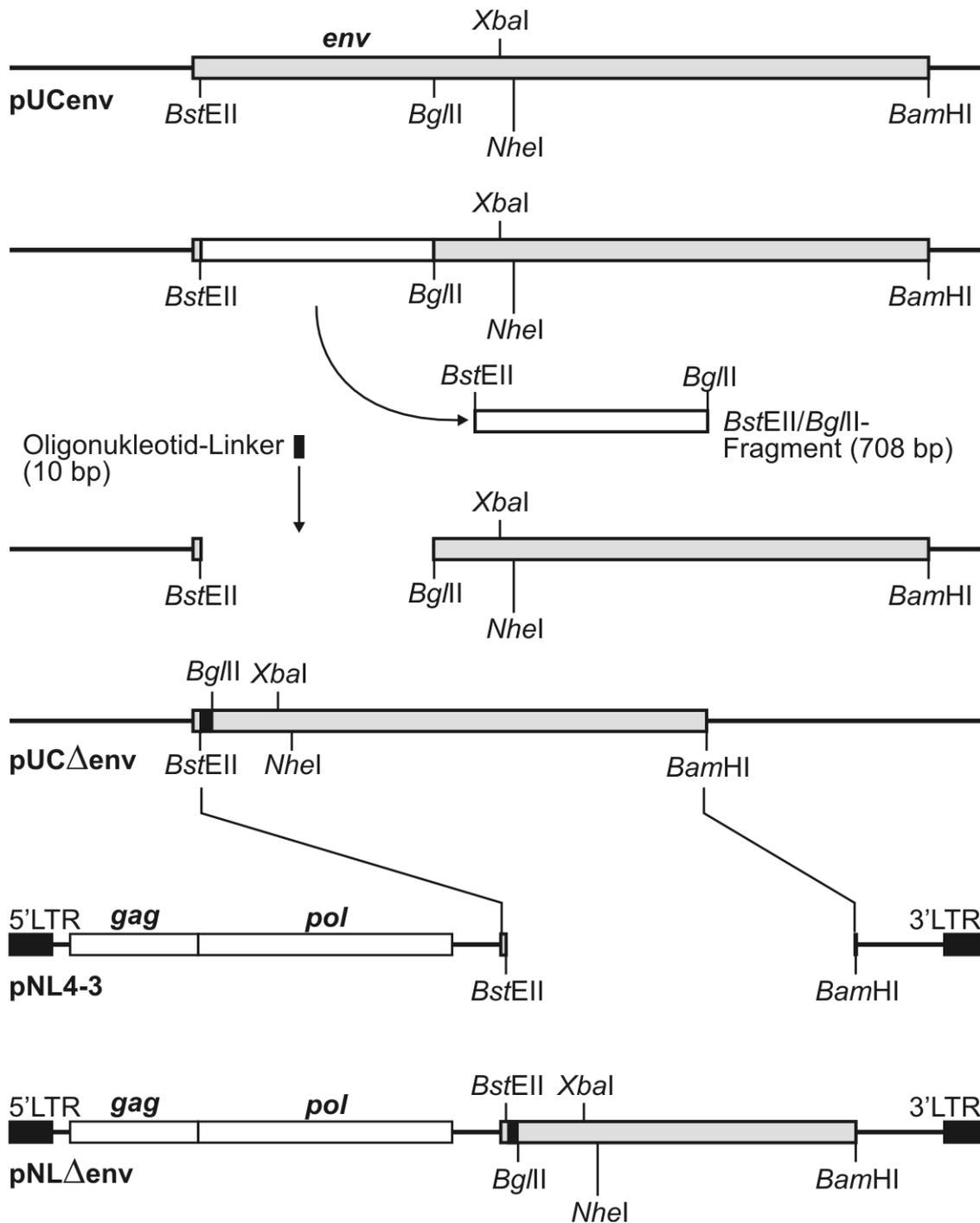
**Abb. 13** Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Amplifikate des V3-Bereiches von pUCenv und pUCΔV3

Der V3-Bereich der Vektoren pUCenv und pUCΔV3 wurden mit den Oligonukleotidprimern #8693 und #8694 amplifiziert. Die DNA-Banden laufen in dem 1%igen Agarosegel in unterschiedlicher Höhe. Ein Vergleich mit dem DNA-Längenstandard (Spalte 1) zeigt, dass es sich um Banden von ca. 670 bp (Spalte 2) und 500 bp (Spalte 3) handelt. Die Differenz entspricht dem deletierten V3-DNA Fragment.

Spalte 1: DNA-Längenstandard

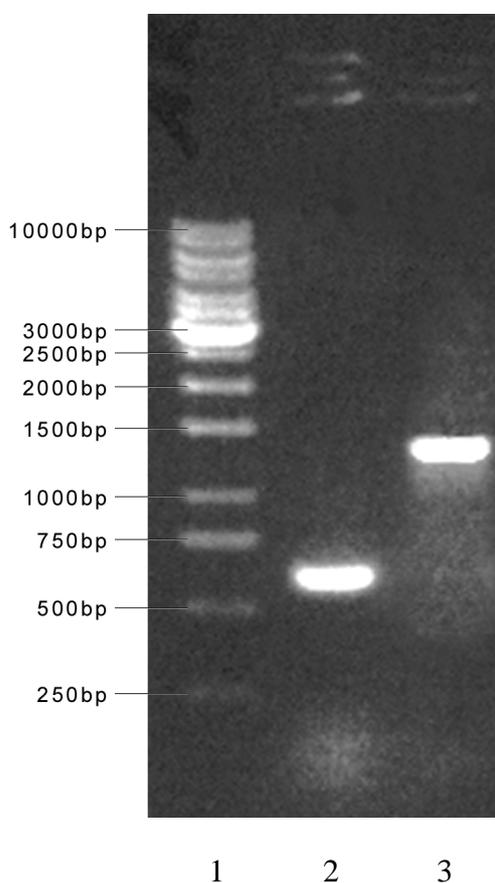
Spalte 2: PCR-Amplifikat des V3-Bereiches von pUCenv

Spalte 3: PCR-Amplifikat des V3-Bereiches von pUCΔV3



**Abb. 14 Herstellung des Vektors pNL $\Delta$ env**

Der 708 bp große *env*-Bereich zwischen den Restriktionsschnittstellen *BstEII* und *BglIII* wurde durch ein 10 bp großes DNA-Fragment ersetzt, das durch Hybridisierung zweier Oligonukleotide (#8603 und #8604) hergestellt wurde und Überhänge am 5' und 3' Ende trug, die die Ligation mit dem *BstEII/BglIII* geschnittenen Vektor erlaubten. Das *env*-Fragment mit dem deletierten Bereich zwischen *BstEII* und *BglIII* wurde dann über die Restriktionsschnittstellen *BstEII* und *BamHI* gegen das *env*-Fragment des Vektors pNL4-3 ausgetauscht.



**Abb. 15** Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Amplifikate des V3-Bereiches von pNL4-3 und pNL $\Delta$ *env*

Der 5' *env*-Bereich der Vektoren pNL4-3 und pNL $\Delta$ *env* wurden mit den Oligonukleotidprimern #8724 und #8694 amplifiziert. Die beiden erhaltenen DNA-Produkte zeigen in einem 1%igen Agarosegel unterschiedliche Fragmentlängen. Ein Vergleich mit dem DNA-Längenstandard (Spalte 1) zeigt, dass es sich um Banden von ca. 650 bp (Spalte 2) und 1350 bp (Spalte 3) handelt. Die Differenz entspricht dem deletierten *env*-DNA-Fragment.

Spalte 1: DNA-Längenstandard

Spalte 2: um 708 bp deletiertes *env*-Gen (PCR-Amplifikat)

Spalte 3: vollständiges *env*-Gen, (PCR-Amplifikat)

#### 4.1.2 Konstruktion von NL4-3 Chimären mit unterschiedlicher Korezeptornutzung

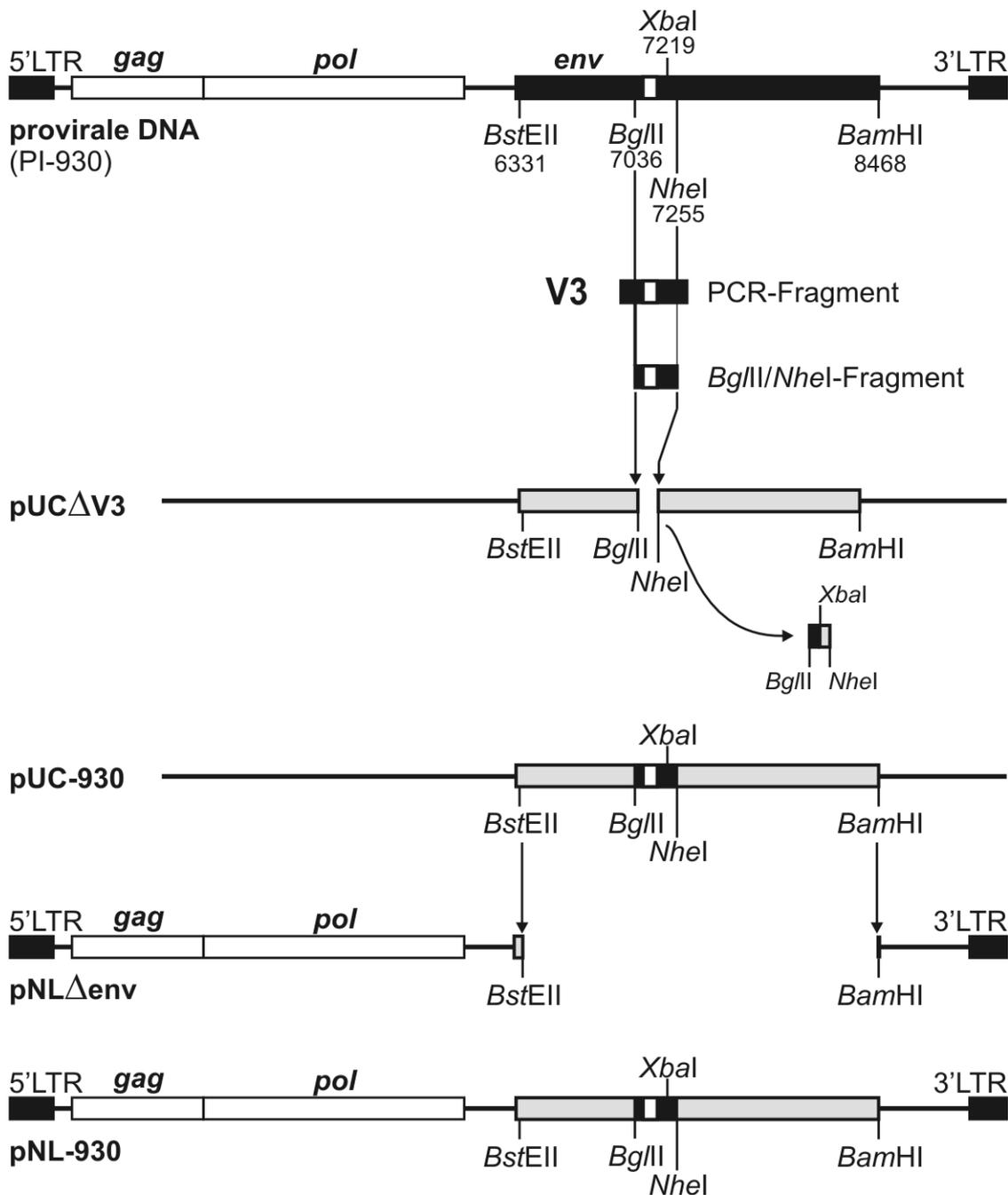
Um den Einfluß der V3-Loop-Glycosylierung auf die Eigenschaften unterschiedlicher Virusvarianten zu untersuchen, wurden zunächst Virusvarianten erstellt, die im Bereich des V3-Loops Sequenzen aus HIV-1 Primärisolaten mit unterschiedlicher Korezeptornutzung trugen. Dazu wurden in den genetischen Hintergrund des HIV-1 Laborstammes NL4-3 V3-Loop-Sequenzen der verschiedenen HIV-1 Primärisolate übertragen. Alle anderen Bereiche des Virus stammten von dem HIV-1 Laborstamm NL4-3 und waren für alle Virusvarianten identisch.

Die verwendeten Primärisolate wurden in früheren Arbeiten aus dem peripheren Blut HIV-1 infizierter Personen angezüchtet (Müller, 1999). Neben den Sequenzen der V3-Bereiche war zu Beginn dieser Arbeit auch die Korezeptornutzung der Isolate bekannt (Tab.1). Von elf isolierten Virusstämmen wurden vier Isolate ausgewählt, die für die weiteren Untersuchungen eingesetzt wurden.

Als X4-monotroper Stamm wurde das Primärisolat PI-930 ausgewählt, da es als einziges Primärisolat ausschließlich CXCR4 als Korezeptor nutzte. Alle anderen CXCR4-nutzenden Primärisolate waren in der Lage, Zellen durch weitere Korezeptoren wie z.B. CCR5 und CCR3 zu infizieren. Unter diesen Viren wurde das Primärisolat PI-952 als R5X4-dualtropes Isolat ausgewählt, da es beide Korezeptoren mit gleicher Effizienz nutzen konnte. Unter den R5-monotropen Viren wurde das Isolat PI-991 ausgewählt, da es in CCR5-Indikatorzellen sehr gut replizierte. Das R5-trope Primärisolat PI-918 wurde ausgewählt, da die V3-Loop-Sequenz dieses Isolates der Konsensussequenz des HIV-1 Subtyp B sehr ähnlich ist. Bindungsstudien von V3-Peptiden mit der Sequenz von PI-918 ließen außerdem auf einen Einfluss der N-Glycosylierung dieses Virus schließen (Meyer *et al.*, persönliche Mitteilung).

Zur Herstellung der rekombinanten Virusvarianten mit der V3-Sequenz der Primärisolate wurden zunächst Zellen mit virushaltigen Zellkulturüberständen infiziert (3.3.1). Aus den infizierten Zellen wurde nach Zelllyse der V3-Bereich der proviralen HIV-DNA mittels einer PCR amplifiziert (3.1.10.2). Das Amplifikat wurde anschließend sequenziert (3.1.12). Aufgrund der erhaltenen Sequenz wurde für jedes Primärisolat ein Set von Oligonukleotidprimern konstruiert, die an den zu NL4-3

homologen Positionen die Restriktionsschnittstellen *Bgl*III und *Nhe*I enthielten (2.8). Durch eine erneute PCR-Amplifikation mit diesen Oligonukleotidprimern wurden die Restriktionsschnittstellen in die DNA-Fragmente, die die Sequenzen der verschiedenen Primärisolate repräsentierten, inseriert. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und konnten mit dem ebenfalls *Bgl*III und *Nhe*I geschnittenen Vektor pUC $\Delta$ V3 ligiert werden. So wurden die V3-Bereiche der HIV-1 Primärisolate gegen den V3-Bereich von NL4-3 ausgetauscht (Abb. 16). Die Sequenz des V3-Bereiches wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft (3.1.12). Durch den Austausch des V3-Bereiches von NL4-3 gegen die V3-Bereiche der Primärisolate PI-918, PI-930, PI-952 und PI-991 wurden die pUC-Klone pUC-918, pUC-930, pUC-952 und pUC-991 hergestellt. Diese pUC-Vektoren waren die Grundlage für die Herstellung der rekombinanten Virusvarianten mit unterschiedlicher Glycosylierung im V3-Bereich.



**Abb. 16 Herstellung der NL4-3 Varianten mit den V3-Bereichen von X4-, R5-, und R5X4-tropen HIV-1 Primärisolaten**

Nach PCR-Amplifikation der V3-Bereiche wurden die Restriktionsschnittstellen *BglIII* und *NheI* durch eine zweite PCR-Amplifikation mit entsprechend konstruierten Oligonukleotiden (2.8) eingefügt. Die amplifizierten DNA-Fragmente repräsentierten den V3-Bereich der Primärisolate und wurden über die beiden Restriktionsschnittstellen *BglIII* und *NheI* in das NL4-3 *env*-Gen inseriert. Die Herstellung des Vektors pUC-930 ist exemplarisch dargestellt. Die V3-Loop Bereiche der Primärisolate PI-918, PI-952 und PI-991 wurden entsprechend umkloniert und in das NL4-3 *env*-Gen inseriert.

### 4.1.3 Konstruktion von Virusvarianten mit unterschiedlicher N-Glycosylierung des V3-Loop

Basierend auf den in 4.1.2 hergestellten NL4-3 V3-Chimären wurden weitere Virusvarianten erstellt, die sich hinsichtlich der fünf N-Glycosylierungsstellen im Bereich des V3-Loop unterschieden. Um die Bedeutung dieser fünf N-Glycane für die Infektiosität und Neutralisierbarkeit der verschiedenen HIV-1 Isolate zu untersuchen, wurden diese fünf Motive im V3-Sequenzhintergrund der HIV-1 Isolate PI-918, PI-930, PI-952 und PI-991 substituiert. Dabei wurde durch den gezielten Austausch bestimmter DNA-Codons an den gewünschten Positionen die entsprechenden Aminosäuren verändert (3.1.11). So konnten Erkennungsmotive für N-Glycosylierung eliminiert oder eingefügt werden. Durch Veränderungen im Bereich der N-Glycosylierungsstellen im Sequenzhintergrund der vier verschiedenen HIV-1 Primärisolate PI-918, PI-930, PI-952 und PI-991 sowie dem HIV-1 Laborstamm NL4-3 wurde eine Reihe von V3-Glycovarianten mit unterschiedlicher Korezeptornutzung hergestellt.

#### 4.1.3.1 Herstellung der NL4-3 V3-Loop Glycovarianten

Der X4-trope HIV-1 Laborstamm NL4-3 verfügt im V3-Bereich an allen fünf Positionen, g13 bis g17, über eine Erkennungssequenz für die N-Glycosylierung. Dabei werden die N-Glycosylierungsmotive an den Positionen g13 bis g17 durch die Aminosäuresequenzen NTS, NCT, NNT, NIS und NAT gebildet. Diese fünf Motive wurden durch Austausch von Aminosäuren so modifiziert, dass eine N-Glycosylierung nicht mehr möglich war. Für den Austausch der DNA-Codons wurden Oligonukleotidprimer verwendet, durch die die gewünschten Aminosäureaustausche in die *env*-Gensequenz eingeführt wurden (2.8). An den Positionen g13 und g17 wurde jeweils das Asparagin (N) gegen Glutamin (Q) ausgetauscht. Das Glutamin (Q) unterscheidet sich in seinen chemischen Eigenschaften nicht von dem Asparagin (N) kann aber nicht als Teil des N-Glycosylierungsmotives erkannt werden. An Position g15 wurde das Motiv NNNT durch die Sequenz GSTT ersetzt. Diese Aminosäuresequenz wurde eingeführt, da sie an der Position g15 bei einem der HIV-1 Primärisolate gefunden wurde (Müller H., 1999). Es handelt sich demnach um eine Mutation der V3-Loop-Sequenz, die auch *in vivo* in Primärisolaten vorkommt. Des Weiteren wurde an Position g15 das Motiv NNT gegen NNI und NNK ausgetauscht, um den Einfluss zu berücksichtigen, den die Aminosäuren haben können. Durch eine artifizielle Mutation im Bereich der N-

Glycosylierungsstelle g14 (NCT), bei der ein Asparagin (N) gegen ein Tyrosin (Y) ausgetauscht wurde, entstand außerdem die Variante NL4-3-g14<sub>Y</sub>/15<sub>GSTT</sub>. Zusätzlich zu den NL4-3 Glycovarianten NL4-3-g13, NL4-3-g15 und NL4-3-g17, die an der Position g13, g15 und g17 mutiert waren, wurden durch Kombination der drei Positionen die Doppelmutanten NL4-3-g13/15, NL4-3-g13/17 und NL4-3-g15/17 hergestellt. Eine weitere NL4-3 Glycomutante, die Dreifachmutante NL4-3-g13/15/17, ist nur noch an den Positionen g14 und g16 glycosyliert.

Zusätzlich zu den NL4-3-Glycovarianten NL4-3-g15, NL4-3-g15<sub>NNI</sub> und NL4-3-g15<sub>NNK</sub>, wurden im Hintergrund von NL4-3 noch drei weitere Mutanten erstellt, die an Position g15 nicht glycosyliert waren und sich in der Aminosäuresequenz an Position g15 unterschieden. Bei dem Sequenzvergleich der HIV-1 Primärisolate (Tab.1) fiel auf, dass die Aminosäuresequenzen im Bereich der N-Glycosylierungsstelle an Position g15 bei CXCR4-nutzenden Primärisolaten im Vergleich zu den CCR5-tropen Viren deutliche Unterschiede aufwiesen. Während bei CCR5-monotropen Viren die Sequenz NNNT hochkonserviert ist, wurden bei den CXCR4-nutzenden Viren PI-910, PI-930 und PI-932 an der Position g15 die Aminosäuresequenzen SIQK, YRNA und HNTV gefunden.

Um den Einfluß dieser Sequenzvariationen auf die Replikationsfähigkeit und die Neutralisierbarkeit der Virusisolate zu untersuchen, wurden die kurzen Sequenzmotive in die V3-Loop Sequenz von NL4-3 übertragen. Diese NL4-3 Klone mit den Sequenzen der CXCR4-nutzenden Primärisolate PI-910, PI-930 und PI-932 wurden NL4-3<sub>SIQK</sub>, NL4-3<sub>YRNA</sub> und NL4-3<sub>HNTV</sub> genannt.

Für die zielgerichtete Mutagenese (3.1.11) wurde das Vektorkonstrukt pUC<sub>env</sub> verwendet. Nachdem die gewünschten Mutationen im V3-Bereich durch DNA-Sequenzierung bestätigt waren, wurden die *env*-Gene über die Restriktionsschnittstellen *BstEII* und *BamHI* in den Vektor pNLΔ<sub>env</sub> übertragen. Durch den Austausch des deletierten *env*-Gens gegen das vollständige *env*-Gen konnte das resultierende Vektorkonstrukt pNL4-3 mit den veränderten N-Glycosylierungsstellen im V3-Bereich für die Produktion infektiöser Viruspartikel verwendet werden. Die Virusvarianten konnten dann nach Transfektion der pNL4-3 Plasmid-DNA in HeLa-Zellen als infektiöse Viren geerntet und quantifiziert werden (3.2.4, 3.3.7). Durch Lagerung in

flüssigem Stickstoff blieben die Viren monatelang infektiös. Die so hergestellten NL4-3 Glycovarianten (Abb. 17) konnten in die Infektionsstudien (4.2.2) eingesetzt werden und so der Einfluß der N-Glycosylierung im V3-Bereich auf die Eigenschaften von NL4-3 untersucht werden.

#### 4.1.3.2 Herstellung der Glycovarianten von NL-930

Im Bereich des V3-Loop des X4-tropen Primärisolates PI-930 sind vier der fünf Erkennungssequenzen für N-Glycosylierung, g13, g14, g16 und g17 vorhanden. Die Aminosäuresequenzen an diesen Positionen, NQS, NCT, NIS und NNT werden als N-Glycosylierungsmotive erkannt. An Position g15 findet sich dagegen die Aminosäuresequenz YRNA, die stark von der bei R5-tropen Viren konservierten Sequenz NNNT abweicht und entsprechend nicht als N-Glycosylierungssequenz erkannt wird.

Ausgehend von dem unter 4.1.2 beschriebenen Vektorkonstrukt pUC-930, wurden verschiedene Varianten erstellt, die sich an den Positionen g13, g14, g15 und g17 hinsichtlich der N-Glycosylierung unterschieden (Abb 18). Zunächst wurde an Position g15 eine N-Glycosylierungsstelle eingebracht. Zu diesem Zweck wurde das Aminosäuremotiv YRNA durch das Sequenzmotiv YNNT ersetzt. Die resultierende Glycomutante mit vollständiger N-Glycosylierung im V3-Bereich wurde NL-930 genannt. Ausgehend von dieser Variante wurden die N-Glycosylierungsstellen an den Positionen g13, g14, g15 und g17 verändert. Dabei wurde jeweils die erste Aminosäure des N-Glycosylierungsmotives, das Asparagin (N) gegen ein Glutamin (Q) ausgetauscht. Das Motiv für N-Glycosylierung an Position g13 wurde von NQS nach QQS, an Position g14 von NCT nach QCT und an Position g17 NNT nach QNT verändert. Die nachträglich eingebrachte N-Glycosylierungsstelle an Position g15 wurde ebenfalls durch einen Aminosäureaustausch von NNT nach QNT eliminiert. Zusätzlich zu dieser Mutante stand auch die ursprüngliche PI-930-pUC<sub>env</sub> Variante als g15-Glycomutante zur Verfügung. Die beiden unterschiedlichen g15-Glycomutanten wurden NL-930-g15<sub>QNT</sub> und NL-930-g15<sub>YRNA</sub> genannt. Neben diesen g15-Varianten wurden Einzelmutanten erstellt, die jeweils an Position g13 und Position g17 nicht glycosyliert wurden. Diese Mutanten wurden NL-930-g13 und NL-930-g17 genannt. Zusätzlich zu diesen Einzelmutanten wurde eine Variante erstellt, die an allen N-Glycosylierungsstellen im V3 Bereich mit Ausnahme von Position g16 mutiert war. Bei

dieser Vierfachmutante waren bei den N-Glycosylierungsmotiven g13, g14, g15 und g17 jeweils die erste Aminosäure, das Asparagin (N), gegen Glutamin (Q) ausgetauscht. Diese Variante wurde als NL-930-g13/14/15/17 bezeichnet. Nach Überprüfung der V3-Sequenz durch DNA-Sequenzierung (3.1.12) wurde der *env*-Bereich aus dem pUC<sub>env</sub> Hintergrund in den Vektor pNL $\Delta$ *env* übertragen. Dieser konnte dann für die Produktion (3.2.4) der sechs rekombinanten NL-930 Glycovarianten verwendet werden, die für die nachfolgenden Infektionsstudien zur Verfügung standen (4.2.3).

#### **4.1.3.3 Herstellung der Glycovarianten von NL-918**

Das R5-trope Primärisolat PI-918 trägt an den Positionen g13, g14, g15 und g16 die Aminosäuresequenzen NES, NCT, NNT und NVS, die als N-Glycosylierungsmotive erkannt werden. Das Sequenzmotiv NTL an Position g17 wird dagegen nicht als N-Glycosylierungsmotiv erkannt. Zu dem Zeitpunkt der Arbeit, als diese Variante kloniert wurde, zeichnete sich bereits eine Bedeutung des N-Glycanes an Position g15 für die CCR5-vermittelte Infektion ab. Aus diesem Grunde wurde nur das N-Glycosylierungsmotiv an Position g15 eliminiert, indem das Sequenzmotiv NNT durch QNT ersetzt wurde. Die Sequenz des V3-Bereichs von NL-918 und der Variante NL-918-g15 wurde durch DNA-Sequenzierung (3.1.12) überprüft. Anschließend wurden die *env*-Gene in den Vektor pNL $\Delta$ *env* übertragen, der dann für die Produktion der rekombinanten Virusvarianten verwendet werden konnte (3.2.4). Die hergestellten Glycovarianten NL-918-g15 und NL-991 (Abb. 19) wurden in Infektionsstudien verglichen, um den Einfluß der N-Glycosylierung an Position g15 für die Interaktion zwischen dem V3-Loop CCR5-troper Viren und CCR5 zu untersuchen (4.2.4).

#### **4.1.3.4 Herstellung der Glycovarianten von NL-991**

Im V3-Bereich des R5-tropen Primärisolates PI-991 werden an den fünf konservierten Positionen g13 bis g17 die Sequenzmotive NES, NCT, NNT, NIS und NNT als Sequenzmotive für N-Glycosylierung erkannt. Um den Einfluß dieser drei N-Glycosylierungsstellen auf die Interaktion des V3-Loop von PI-991 mit dem Korezeptor zu untersuchen, wurde eine Reihe von Glycomutanten im Sequenzhintergrund von PI-991 erstellt. Ausgehend von dem Vektorkonstrukt pUC-991, das den V3-Bereich des Primärisolates PI-991 im NL4-3 Hintergrund des Vektors pUC<sub>env</sub> trägt (4.1.2), wurden die Erkennungssequenzen für N-Glycosylierung substituiert. Ausgehend von der

Variante NL-991, die an allen fünf Positionen N-Glycosylierungsmotive trug, wurden Mutanten generiert, die sich hinsichtlich der N-Glycosylierung an den Positionen g13, g15 und g17 unterschieden (Abb. 20). An den drei konservierten Positionen g13, g15 und g17 wurde jeweils die erste Aminosäure des N-Glycosylierungsmotives, das Asparagin (N), durch ein Glutamin (Q) ersetzt. Die resultierenden Aminosäuremotive QES an Position g13 bzw. QNT an den Positionen g15 und g17 wurden nicht mehr als N-Glycosylierungssequenzen erkannt. Durch Kombination der drei Positionen g13, g15 und g17 wurden neben den Einzelmutanten NL-991-g13, -g15 und -g17 die Doppelmutanten NL-991-g13/15, -g13/17 und -g15/17 sowie die Dreifachmutante NL-g13/15/17 erstellt. Die *env*-Gene dieser 991-Glycovarianten wurden aus dem Vektor pUC*env* in den Vektor pNL4-3 übertragen. Die hergestellten NL-991-Glycovarianten (3.2.4) konnten in Infektionsstudien verglichen werden, um so den Einfluß der N-Glycosylierung an Position g15 für die Interaktion zwischen dem V3-Loop CCR5-troper Viren und dem Korezeptor zu untersuchen (4.2.5).

#### **4.1.3.5 Herstellung der Glycovarianten von NL-952**

Um die Bedeutung der N-Glycosylierung im V3-Bereich einer R5X4-dualtrophen Virusvariante zu untersuchen, wurden verschiedene Glycovarianten im V3-Sequenzhintergrund des R5X4-dualtrophen Primärisolates PI-952 rekombinant hergestellt. Dazu wurde das Vektorkonstrukt pUC-952 verwendet, das den V3-Bereich des Primärisolates PI-952 in dem *env*-Hintergrund von NL4-3 trägt (4.1.2). An den Positionen g13 und g14 des Primärisolates PI-952 wurden die Aminosäuresequenzen KET und DCI gefunden, die nicht als Erkennungsmotiv für N-Glycosylierung dienen konnten. Es wurden zunächst an diesen Positionen Erkennungssequenzen für N-Glycosylierung eingeführt. An Position g13 wurde die Aminosäuresequenz KET gegen NET ausgetauscht. An Position g14 wurde die DNA-Sequenz DCI durch die Sequenz NCT ersetzt. So wurde die Virusvariante NL-952 erstellt, die an allen fünf konservierten Positionen im V3-Bereich N-Glycosylierungsmotive trug. Darüber hinaus wurde eine Reihe von Glycovarianten erstellt, die an den Positionen g13, g14, g15 und g17 in unterschiedlicher Kombination glycosyliert waren. Dabei wurde für die Herstellung der Einzelmutante NL-952-g13 im Hintergrund des ursprünglichen Primärisolates PI-952, bei dem an den Positionen g13 und g14 keine N-Glycosylierung stattfand, die Aminosäuresequenz an Position g14 von DCI nach NCT (s.o.) ausgetauscht.

Entsprechend entstand die Einzelmutante g14. Hier wurde ebenfalls im Hintergrund der ursprünglichen V3-Sequenz an Position g13 das Motiv NET anstelle der nicht-glycosylierten Sequenz KET eingeführt. An Position g13 findet man bei CCR5-tropen Viren die Aminosäure Serin konserviert an der dritten Position der N-Glycosylierungsstelle. Es wurde daher die Mutante NL-952-14/15<sub>SQ</sub> erstellt, die anstelle des Aminosäuremotivs NET das Motiv NES enthielt. An Position g15 wurde bei einigen Mutanten das N-Glycosylierungsmotiv NNT durch QNT ausgetauscht. Alternativ wurde an Position g15 NNT durch NNI ersetzt. An Position g17 wurde das Sequenzmotivs NNT durch NNA ersetzt. Im Falle der Vierfachmutante NL-952-g13<sub>Q</sub>/14/15<sub>Q</sub>/17<sub>Q</sub> wurde an allen Positionen für N-Glycosylierung im V3-Bereich mit Ausnahme von Position g16 das erste Asparagin des Erkennungsmotivs gegen Glutamin ausgetauscht. Durch Kombination der veränderten Sequenzen im Bereich der vier Erkennungsmotive für N-Glycosylierung im V3 Bereich g13, g14, g15 und g17 wurden elf verschiedene Glycomutanten im Sequenzhintergrund von NL-952 hergestellt (Abb. 21). Die *env*-Gene mit den veränderten N-Glycosylierungsstellen wurden in das HIV-1 Genom des Vektorkonstruktes pNL $\Delta$ *env* übertragen. Die damit hergestellten Viren (3.2.4) standen für Infektionsstudien zur Verfügung und konnten hinsichtlich ihrer Infektionseigenschaften und ihrer Neutralisationseigenschaften untersucht werden (4.2.6).

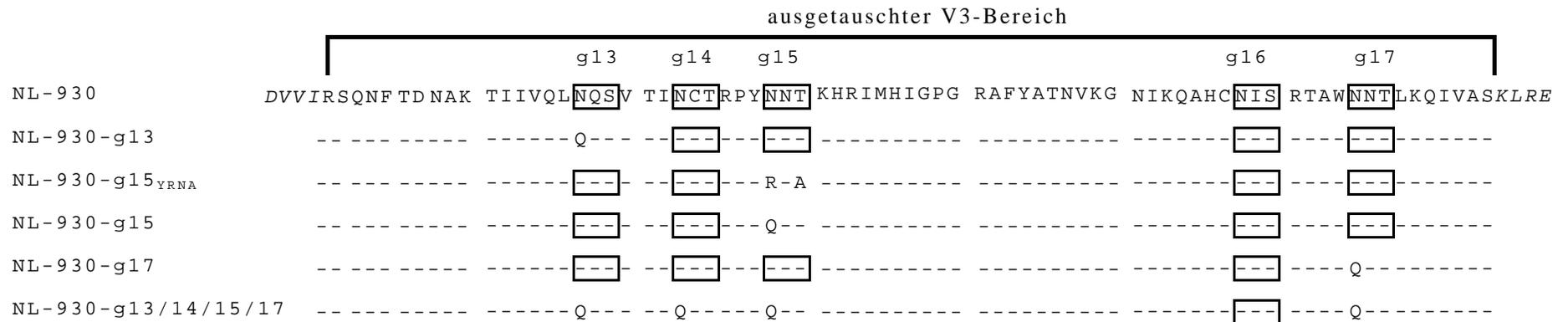
V3-Bereich

	g13	g14	g15	g16	g17
NL4-3	EDVV I R S A N F T D N A K	T I I D Q L <b>N T S</b> V E I <b>N C T</b> R P N <b>N N T</b>	R K S I R I Q R G P G R A F V T I G K I G N M R Q A H C <b>N I S</b>	R A K W <b>N A T</b> L K Q I A S K L R E	
NL4-3-g13	-----	----- Q -----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----
NL4-3-g14 <sub>y</sub> /15 <sub>GSTT</sub>	-----	----- <b>---</b> -----	----- Y ----- G S T T	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----
NL4-3-g15 <sub>GSTT</sub>	-----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> ----- G S T T	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----
NL4-3-g15 <sub>NNI</sub>	-----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> ----- I	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----
NL4-3-g15 <sub>NNK</sub>	-----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> ----- K	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----
NL4-3-g17	-----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----	----- Q -----
NL4-3-g13/15	-----	----- Q -----	----- <b>---</b> ----- G S T T	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----
NL4-3-g13/17	-----	----- Q -----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----	----- Q -----
NL4-3-g15/17	-----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> ----- G S T T	----- <b>---</b> -----	----- Q -----
NL4-3-g13/15/17	-----	----- Q -----	----- <b>---</b> ----- G S T T	----- <b>---</b> -----	----- Q -----
NL4-3-g15 <sub>YRNA</sub>	-----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> ----- Y R - A	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----
NL4-3-g15 <sub>HNTV</sub>	-----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> ----- H - T V	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----
NL4-3-g15 <sub>SIQK</sub>	-----	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> ----- S I Q K	----- <b>---</b> -----	----- <b>---</b> -----

**Abb. 17 Glycomutanten des NL4-3 Virus**

Dargestellt ist der V3-Loop-Bereich des NL4-3 im Vergleich mit den hergestellten NL4-3 Glycovarianten. Durch zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe von sequenzspezifischen Oligonukleotiden wurden die Aminosäurecodons im V3-Loop verändert und so die Erkennungssequenzen für N-Glycosylierung eliminiert.

- (-) Strich: Identische Aminosäuren,
- Kasten:** N-Glycosylierungsstellen



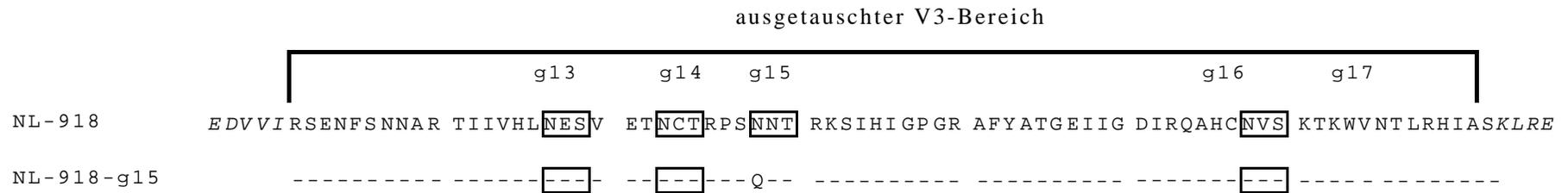
**Abb. 18 Glycomutanten des NL-930 Virus**

Dargestellt ist der V3-Bereich, der aus dem Primärisolat PI-930 in das NL4-3 Virus übertragen wurde. Die Aminosäuren der NL4-3 Sequenz sind kursiv dargestellt. Die Erkennungsmotive für die N-Glycosylierung wurden durch zielgerichtete Mutagenese verändert. Dabei wurde an den Positionen g13, g14, g15 und g17 jeweils die erste Aminosäure N (Asparagin) der Erkennungssequenz gegen Q (Glutamin) ausgetauscht. Auf diesem Wege wurden die Einzelmutanten NL-930-g13, -g15 und -g17 erstellt. Die Einzelmutante NL-930-g15<sub>YRNA</sub> entspricht der Originalsequenz des PI-930 V3-Loop.

(-) Strich: Identische Aminosäuren,

Kasten: N-Glycosylierungsstellen,

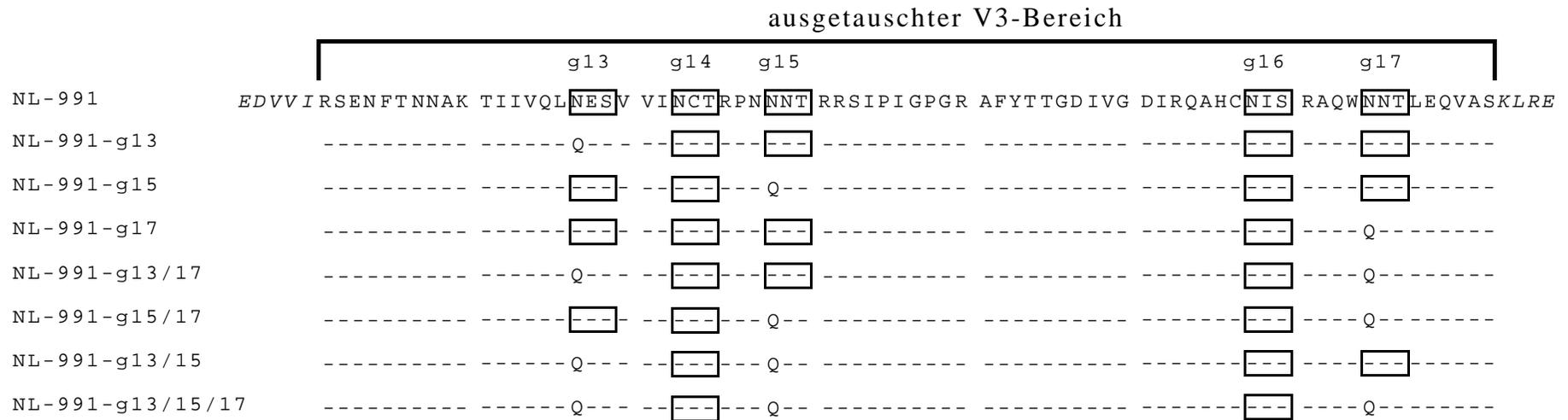
Klammer: Ausgetauschter V3-Bereich



**Abb. 19 Glycomutanten des NL-918 Virus**

Dargestellt ist die Sequenz des V3-Bereiches des Primärisolates PI-918, der in den Hintergrund des Laborstammes NL4-3 übertragen wurde. Die flankierenden NL4-3 Sequenzen sind kursiv dargestellt. Durch zielgerichtete Mutagenese wurde die N-Glycosylierungsstelle an Position g15 eliminiert. Alle anderen N-Glycosylierungsstellen blieben unverändert.

- (-) Strich: identische Aminosäuren,
- [Kasten]: N-Glycosylierungsstellen,
- Klammer: ausgetauschter V3-Bereich



**Abb. 20 Glycomutanten des NL-991 Virus**

Dargestellt ist die Sequenz des V3-Bereiches des Primärisolates PI-991, der in den Hintergrund des Laborstammes NL4-3 übertragen wurde. Die flankierenden NL4-3 Sequenzen sind kursiv dargestellt. Durch zielgerichtete Mutagenese wurde die N-Glycosylierungsstelle an den Positionen g13, g15 und g17 eliminiert. Durch Kombination der eliminierten N-Glycosylierungsstellen wurden neben den Einzelmutanten NL-991-g13, -g15 und -g17 drei Doppel- und eine Dreifachmutante erhalten.

- (-) Strich: identische Aminosäuren,
- Kasten**: N-Glycosylierungsstellen,
- Klammer: ausgetauschter V3-Bereich

ausgetauschter V3-Bereich

	g13	g14	g15	g16	g17
NL-952	<i>EDVVI</i> <i>RSANFC</i> <i>NAK</i> T I I V Q L <span style="border: 1px solid black;">NET</span> I K I <span style="border: 1px solid black;">NCT</span> R P N <span style="border: 1px solid black;">NNT</span> R K R I T L G P G R V L Y T T G E I I G D I R K A H C <span style="border: 1px solid black;">NIS</span> R E K W <span style="border: 1px solid black;">NNT</span> L Y Q V A S <i>KLRE</i>				
NL-952-g13	-----K-----	<span style="border: 1px solid black;">---</span>	<span style="border: 1px solid black;">---</span>	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----
NL-952-g14	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	--D-I--	<span style="border: 1px solid black;">---</span>	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----
NL-952-g13/14	-----K-----	--D-I--	<span style="border: 1px solid black;">---</span>	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----
NL-952-g14/17	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	--D-I--	<span style="border: 1px solid black;">---</span>	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	-----A-----
NL-952-g13/14/17	-----K-----	--D-I--	<span style="border: 1px solid black;">---</span>	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	-----A-----
NL-952-g15 <sub>Q</sub>	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	<span style="border: 1px solid black;">---</span>	--Q--	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----
NL-952+g13 <sub>T</sub> -g14/15 <sub>Q</sub>	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	--D-I--	--Q--	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----
NL-952+g13 <sub>S</sub> -g14/15 <sub>Q</sub>	----- <span style="border: 1px solid black;">--S</span> -----	--D-I--	--Q--	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----
NL-952-g15/17	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	<span style="border: 1px solid black;">---</span>	-----I	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	-----A-----
NL-952-g14/15/17	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	--D-I--	-----I	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	-----A-----
NL-952-g13/14/15	-----K-----	--D-I--	-----I	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----
NL-952-g13/14/15/17	-----K-----	--D-I--	-----I	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	-----A-----
NL-952-g13 <sub>Q</sub> /14/15 <sub>Q</sub> /17 <sub>Q</sub>	-----Q-----	--D-I--	--Q--	----- <span style="border: 1px solid black;">---</span> -----	-----Q-----

**Abb. 21 Glycomutanten des NL-952 Virus**

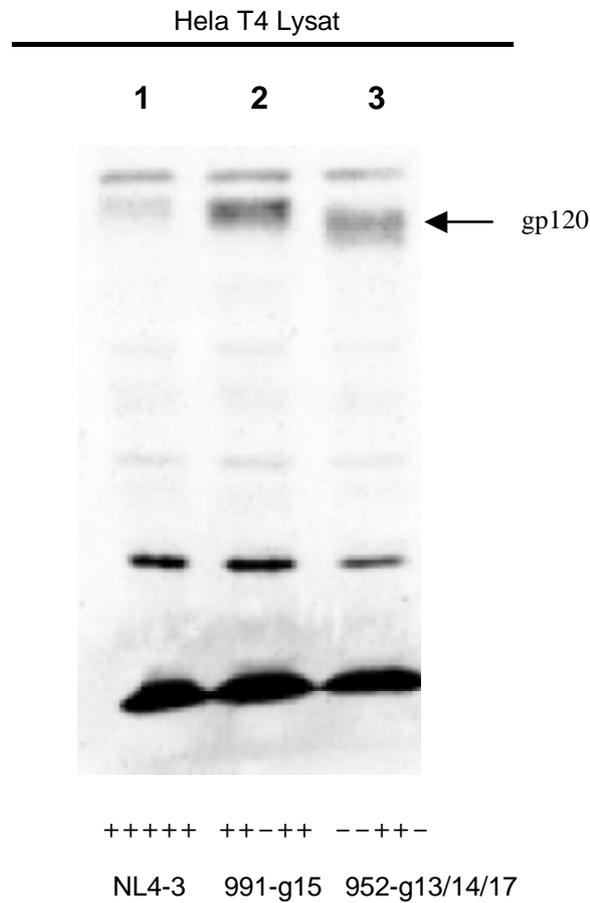
Dargestellt sind die Sequenzen der V3-Glycovarianten im Hintergrund von NL-952. NL-952 trägt den V3-Bereich des Primärisolates PI-952 in dem Hintergrund von NL4-3. Die flankierenden Aminosäuresequenzen von NL4-3 sind kursiv dargestellt. Durch zielgerichtete Mutagenese wurden die Erkennungssequenzen für N-Glycosylierung modifiziert. Die resultierenden Varianten sind im Vergleich zu den vollständig glycosylierten Varianten NL-952 dargestellt.

- (-) Strich: identische Aminosäuren,
- Kasten: N-Glycosylierungsstellen,
- Klammer: ausgetauschter V3-Bereich

## 4.2 Charakterisierung der NL-Glycovarianten

### 4.2.1 Expression von rekombinantem gp120 in HeLa-T4-Zellen

Die Expression des *env*-Gens mit ausgetauschten V3-Bereichen ist Voraussetzung für die Charakterisierung der verschiedenen V3-Glycomutanten. Es wurde deshalb überprüft, ob die Sequenzveränderungen der N-Glycosylierungsmotive dazu führten, dass diese Motive nicht mehr glycosyliert wurden. Die rekombinanten *env*-Gene wurden dafür in HeLa-T4-Zellen exprimiert und das gp120 anschließend mit Hilfe eines Immuno-Blots mit anti-gp120 Antikörpern nachgewiesen. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Heiner Schaal (Universität Düsseldorf) durchgeführt. Exemplarisch für X4- und R5-trope Viren wurden die *env*-Gene von NL4-3 und NL-991-g15 und NL-952-g13/14/17 exprimiert. Dazu wurden die *env*-Bereiche über die Schnittstellen *Bst*EII und *Bam*HI aus dem Vektor pUC*env* in den Expressionsvektor pSVATG*rev* übertragen. Dieser Vektor kontrolliert über einen SV40- Promotor die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen. Das exprimierte gp120 konnte in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Zelllysate wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteinbanden nach einer Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die dann mit einer anti-gp120-Antikörperlösung behandelt wurde. Durch einen Meerrettich-Peroxidase gekoppelten gp120-Detektionsantikörper wurde die gp120-Bande sichtbar gemacht. In Abbildung 22 ist der Immuno-Blot zum Nachweis der gp120 Proteine der Viren NL4-3, NL-991-g15 und NL-952-g13/14/17 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Banden eines gp120, das an allen fünf N-Glycosylierungsstellen im V3-Bereich N-Glycane trägt, weniger weit in dem Gel lief als die gp120-Moleküle, die ein oder drei N-Glycane weniger tragen. Durch die fehlenden Zucker kommt es zu einer geringeren Molekülmasse, was sich in den unterschiedlichen Laufweiten der Proteine im SDS-Gel widerspiegelt. Daraus kann man schlußfolgern, dass die Mutation der N-Glycosylierungsstellen zu einem Verlust von N-Glycanen führt. Darüber hinaus konnte ausgeschlossen werden, dass sich die Veränderungen in den N-Glycosylierungsstellen negativ auf die Expression des gp120 auswirken.




---

**Abb. 22 Immuno Blot zum Nachweis des gp120 und von gp120 mit fehlender N-Glycosylierung im V3-Loop Bereich**

Hela-T4-Zellen wurden mit gp160 Expressionsvektoren transfiziert, die *env*-Gene von verschiedenen NL-Glycovarianten enthielten. Die transfizierten Zellen exprimierten gp120/gp41 der Virusvarianten NL4-3 (Spalte 1), NL-991-g15 (Spalte 2) und NL-952-g13/14/17 (Spalte 3). Nach 2 Tagen wurden die Zellen geerntet und in SDS-Probenpuffer lysiert. Die Detektion des gp120 erfolgte mit einem Kaninchen anti-gp120-Antikörper und einem Chemilumineszenz-Detektionssystem (Amersham). Die Experimente wurden zusammen mit Dr. Heiner Schaal (Universität Düsseldorf) durchgeführt.

---

#### 4.2.2 Infektion von CXCR4-Indikatorzellen mit NL4-3 Glycovarianten

Um den Einfluß der Glycosylierung im V3-Bereich auf die Infektiosität von NL4-3 zu ermitteln, wurden die unter 4.1.3 aufgeführten rekombinanten Viren mit veränderten Glycosylierungsmustern in einem Infektionstest eingesetzt (3.3.2). Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Matthias Dittmar am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg durchgeführt.

Die Infektionsereignisse in Korezeptor-Indikatorzellen (2.1.2) wurden durch eine Immunfärbung (3.3.3) sichtbar gemacht, und anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Infektiosität der verschiedenen Glycovarianten wurde als Anzahl gefärbter Zellen (*focus forming units, ffu*) pro 10 ng p24 dargestellt. Die Werte ergeben sich aus Doppelbestimmungen. Das Virus wurde jeweils in drei Verdünnungen eingesetzt (entsprechend 1, 10, und 100 ng p24-Virusantigen pro Ansatz).

##### 4.2.2.1 Infektion von GHOST-Indikatorzellen ohne Inhibitor

Die Korezeptor-Indikatorzellen GHOST-parental, GHOST-CXCR4 und GHOST-CCR5 wurden in Zellkulturplatten mit 48 Kavitäten (48-well-Zellkulturplatten) mit verschiedenen Virusmengen (1, 10 und 100 ng p24/Kultur) der unterschiedlichen NL4-3-Glyco-varianten infiziert und die Infektionsereignisse nach 3 Tagen durch die Immunfärbung (3.3.3) detektiert. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Infektion der GHOST-Korezeptorzellen mit den verschiedenen NL4-3-Glycomutanten dargestellt. Keine der untersuchten NL4-3-Glycovarianten konnte die GHOST-CCR5-Zelllinie infizieren. Im Falle der GHOST-CXCR4-Zelllinie zeigten sich Unterschiede in der Infektiosität bei den verschiedenen NL4-3 Glycovarianten. Die Mutanten NL4-3-g14<sub>Y</sub>/15<sub>GSTT</sub>, NL4-3-g15<sub>GSTT</sub>, NL4-3-g15/17 und NL4-3-g13/15/17 waren in der Lage, die parentale GHOST-Zelllinie zu infizieren. Dabei war die Zahl der Infektionsereignisse jedoch deutlich geringer als bei den GHOST-CXCR4-Zellen. Die parentale GHOST-Zelllinie exprimiert einen geringen CXCR4-Hintergrund, der von einigen X4-tropen Virusvarianten genutzt werden kann (Vödrös *et al.*, 2001). Von dem im V3-Bereich vollständig glycosylierten NL4-3 Wildtyp konnte dieser CXCR4-Hintergrund jedoch nicht für die Infektion genutzt werden. Die Virusvarianten, die die parentale Linie infizieren konnten, zeigten verglichen mit dem NL4-3 Wildtyp in GHOST-CXCR4-Zellen ebenfalls eine gesteigerte Anzahl von Infektiosereignissen. Die

Mutanten NL4-3-g14<sub>Y</sub>/15<sub>GSTT</sub> und NL4-3-g15<sub>GSTT</sub> zeigten eine Erhöhung der Anzahl an Infektionsereignissen um das zwei- bzw. dreifache. Die Mutante NL4-3-g13/15/17 zeigte eine Erhöhung der Infektiosität um das siebenfache. Die Variante NL4-3-g15/17 weist in GHOST-CXCR4-Zellen eine 11-12-fach höhere Anzahl an Infektionsereignissen gegenüber der NL4-3 Wildtyp-Variante auf.

Auch die Mutanten, die die parentale GHOST-Linie nicht infizieren konnten, zeigten verglichen mit der NL4-3 Variante auf der GHOST-CXCR4-Linie Unterschiede in der Infektiosität. Die Mutante NL4-3-g13/17 zeigte eine Steigerung der Infektionsereignisse um das zweieinhalbfache. Die Mutanten NL4-3-g15<sub>NNI</sub> und NL4-3-g15<sub>NNK</sub> zeigten dagegen eine um etwa 30% verringerte Infektiosität gegenüber dem NL4-3 Wildtyp. Bei diesen Varianten konnten 20 Infektionsereignisse pro 10 ng p24 gezählt werden, während der NL4-3 Wildtyp 30 Infektionsereignisse pro 10 ng p24 verursachte. Die Mutanten NL4-3-g13 und NL4-3-g17 zeigten ebenfalls eine verringerte Infektiosität um 30 bzw. 60 %. Sie verursachten 20 bzw. 10 Infektionsereignisse pro 10 ng p24.

Die Doppelmutante NL4-3-g13/15 zeigte gegenüber dem NL4-3-Wildtyp keine Änderung in der Infektiosität. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigte, dass bei dem HIV-1 Laborstamm NL4-3 die Eliminierung der N-Glycosylierungsstelle an Position g15 im V3-Loop zu einer Steigerung der Infektiosität in GHOST-CXCR4-Zellen führte. Die Eliminierung der N-Glycosylierungsstelle g15 alleine führte dabei zu einer geringen Steigerung der Infektiosität, die jedoch weiter gesteigert wurde, wenn zusätzlich das N-Glycan an Position g17 fehlte, wie es bei den Mutanten NL4-3-g15/17 und NL4-3-g13/15/17 der Fall war. Es konnte gezeigt werden, dass besonders das N-Glycan an Position g15 von Bedeutung für die Infektiosität des X4-tropen NL4-3 war. Elimination dieses N-Glycans konnte die Infektiosität der Viren steigern. Für die N-Glycane an Position g14 und g17 wurde gezeigt, dass sie eine modulierende Funktion haben. Fehlte das Glycan an Position g15, wurde die Infektiosität durch zusätzliche Elimination von g14 und g17 weiter gesteigert. Die N-Glycane im V3-Bereich, besonders an Position g15, haben demnach eine störende Wirkung auf die Interaktion des gp120 mit CXCR4.

#### 4.2.2.2 Infektion von GHOST-Indikatorzellen in Gegenwart des CXCR4-Liganden SDF-1

Um zu untersuchen, ob der Einfluß der N-Glycosylierung von der Interaktion von HIV-1 mit dem Korezeptor abhängig ist, wurde SDF-1, der natürliche Ligand des Korezeptors CXCR4, als Inhibitor eingesetzt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen SDF-1 vorinkubiert und anschließend mit den verschiedenen NL4-3 Glycovarianten infiziert (3.3.6). Dabei wurde eine Virusmenge eingesetzt, die ohne SDF-1 etwa 100 Infektionsereignisse (*ffu*) hervorruft. So war gewährleistet, dass sich die Zahl der Infektionsereignisse vergleichbar auswerten ließ. Die Infektionsereignisse pro Kultur wurden durch Immunfärbung detektiert (3.3.3). Tabelle 3 zeigt die konzentrationsabhängige Inhibition der verschiedenen NL4-3-Glycovarianten durch SDF-1. Daraus ging hervor, dass sich die verschiedenen NL4-3-Glycovarianten unterschiedlich gut mit SDF-1 inhibieren ließen. Die Mutanten NL4-3-g14<sub>Y</sub>/15<sub>GSTT</sub>, NL4-3-g15<sub>GSTT</sub>, NL4-3-g15/17 und NL4-3-g13/15/17 lassen sich auch mit der höchsten SDF-1 Konzentration von 1000 ng/ml nicht vollständig inhibieren. Die NL4-3 Wildtyp-Variante zeigt dagegen bereits mit 500 ng/ml SDF-1 keine Infektion mehr. Bei 250 ng/ml SDF-1 zeigten alle Varianten eine Infektion der CXCR4-Indikatorzellen. Die resistenten Mutanten zeigten bei dieser Konzentration eine Inhibition um 5 bis 50 % , während die sensitiveren Varianten, verglichen mit dem Ansatz ohne SDF-1, bei dieser Konzentration im Schnitt um 80 % inhibiert waren.

Allen SDF-1-resistenten Varianten gemein ist das Fehlen der Glycosylierung an Position g15 durch den Austausch von NNNT nach GSTT. Die Varianten, die NNT gegen NNI oder NNK ausgetauscht hatten, zeigten ohne SDF-1 eine deutlich geringere Infektion und ließen sich bereits mit 250 ng SDF-1/ml um 60 bzw. 87 % inhibieren. Der Austausch der Aminosäuresequenz an Position g15 von NNNT nach GSTT führte bei den Mutanten NL4-3-g14<sub>Y</sub>/15<sub>GSTT</sub>, NL4-3-g15<sub>GSTT</sub>, NL4-3-g15/17 und NL4-3-g13/15/17 zu einer verminderten Inhibition der CXCR4-vermittelten Infektion. Dabei zeigt die Mutante NL4-3-g14<sub>Y</sub>/15<sub>GSTT</sub> den stärksten Effekt. Die Mehrfachmutanten NL4-3-g15/17 und NL4-3-g13/15/17 lassen sich in geringerem Maße durch SDF-1 neutralisieren als die Einzelmutante NL4-3-g15<sub>GSTT</sub>. Diese Einzelmutante zeigt verglichen mit dem NL4-3 Wildtyp ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber SDF-1 vermittelter Inhibition. Die N-Glycane im V3-Bereich haben einen Einfluß auf die

Inhibition der Infektion durch den CXCR4-Liganden SDF-1. Dabei führt vor allem die Elimination des N-Glycanes an Position g15 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber SDF-1, die durch zusätzliche Elimination der N-Glycane an Position g14 und g17 noch gesteigert werden konnte. Diese Ergebnisse gemeinsam mit den unter 4.2.2.1 gefundenen Effekten lassen darauf schließen, dass die NL4-3 Varianten, die an Position g15 deglycosyliert sind, CXCR4-Indikatorzellen effektiver infizierten und in geringerem Maße durch den CXCR4-Liganden SDF-1 inhibiert werden können.

**Tabelle 2 Infektion von GHOST-CXCR4-Zellen mit X4-monotropen NL4-3 Varianten mit unterschiedlicher V3-Loop Glycosylierung**

Virus-Mutanten	GHOST-Zell-Infektion ( <i>ffu</i> /10 ng p24) <sup>a</sup>		
	parental	CXCR4	CCR5
NL4-3	-	30	-
NL4-3-g13	-	20	-
NL4-3-g14 <sub>Y</sub> /15 <sub>GSTT</sub>	0,7	60	-
NL4-3-g15 <sub>GSTT</sub>	0,8	90	-
NL4-3-g15 <sub>NNI</sub>	-	20	-
NL4-3-g15 <sub>NNK</sub>	-	20	-
NL4-3-g17	-	10	-
NL4-3-g15/17	0,5	350	-
NL4-3-g13/17	-	80	-
NL4-3-g13/15	-	30	-
NL4-3-g13/15/17	1	210	-

<sup>a</sup> Die Infektionsereignisse wurden in einem Infektionstest durch Immunfärbung nachgewiesen und quantifiziert. Die Anzahl der Infektionsereignisse (*ffu*, *foci forming units*) wurden jeweils in Doppelbestimmungen für drei Virusverdünnungen (1, 10 und 100 ng p24 /Ansatz) ermittelt und auf 10 ng/p24 bezogen.

**Tabelle 3 SDF-1-Inhibition der Infektion von GHOST-CXCR4-Zellen mit X4-monotropen NL4-3 Glycovarianten.**

Virus-Mutanten	Infektionsraten in GHOST-CXCR4-Zellen ( <i>ffu</i> ) (SDF-1, ng/ml)			
	0	250	500	1000
NL4-3	87 <sup>a</sup>	24	0	0
NL4-3-g13	82	17	0	0
NL4-3-g14 <sub>Y</sub> /15 <sub>GSTT</sub>	100	95	60	35
NL4-3-g15 <sub>GSTT</sub>	89	45	24	4
NL4-3-g15 <sub>NNI</sub>	10	4	0	0
NL4-3-g15 <sub>NNK</sub>	15	2	0	0
NL4-3-g17	67	12	0	0
NL4-3-g15/17	85	60	35	15
NL4-3-g13/17	60	5	0	0
NL4-3-g13/15	75	15	0	0
NL4-3-g13/15/17	95	60	40	10

<sup>a</sup> Infektionsereignisse pro Kultur wurden als *ffu* (*foci forming units*) ermittelt. Es wurde jeweils soviel Virus eingesetzt, dass ohne SDF-1 ca. 100 *ffu* zu erwarten waren. Die Anzahl der Infektionsereignisse (*ffu*) wurden in Doppelbestimmungen ermittelt und bezieht sich jeweils auf eine Kulturschale mit gleichen Zellzahlen.

#### 4.2.2.3 Infektion von CXCR4-Indikatorzellen mit NL4-3-g15 Mutanten

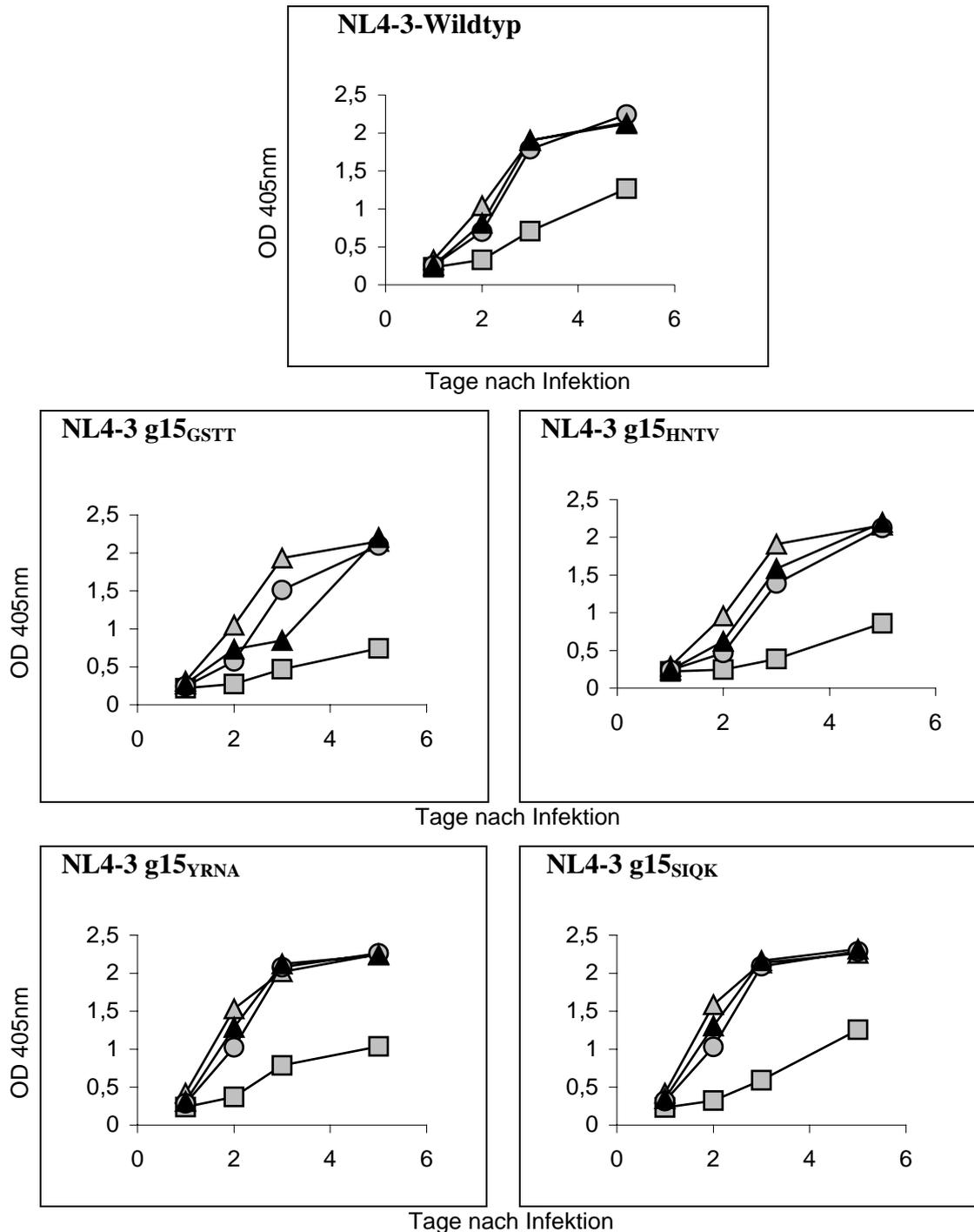
Bei den Primärisolaten PI-910 und PI-911 war das bei R5-tropen Viren konservierte Sequenzmotiv NNNT durch die Aminosäuresequenz SIQK ersetzt, bei PI-930 durch YRNA und bei PI-932 durch HNTV. In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass neben der N-Glycosylierung an dieser Position die Aminosäuresequenz ebenfalls einen Einfluß auf die Infektiosität der Viren hat (4.2.2.1). Im folgenden wurde die Bedeutung dieser Aminosäuresequenzen an Position g15 untersucht. Zu diesem Zweck wurden zusätzlich zu den Mutanten NL4-3-g15, NL4-3-g15<sub>NNI</sub> und NL4-3-g15<sub>NNK</sub> Mutanten erstellt, die an Position g15 die Aminosäuresequenzen der Primärisolate PI-910, PI-930 und PI-932 trugen (Abb. 17). Die resultierenden Varianten NL4-3-g15<sub>YRNA</sub>, NL4-3-g15<sub>SIQK</sub>, NL4-3-g15<sub>HNTV</sub> sowie die Varianten NL4-3-g15, NL4-3-g15<sub>NNK</sub> und NL4-3-g15<sub>NNI</sub> wurden hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit in CXCR4-Indikatorzellen und ihrer Neutralisierbarkeit durch humanes HIV-1 neutralisierendes Serum (HIV-1 Positivserum, 2.4) untersucht. Die rekombinanten Viren wurden zur Infektion von GHOST-CXCR4-Indikatorzellen (3.3.5) verwendet. Dem Kulturmedium wurde humanes Serum von HIV-1 infizierten Personen in verschiedenen Verdünnungen zugesetzt. Als Kontrolle wurde HIV-1 Negativserum eingesetzt. Bei dem HIV-1 Negativserum handelt es sich um eine Mischung von 40 Patientenseren ohne nachweisbare HIV-spezifische Antikörper. Die Zellkulturüberstände wurden über die Dauer von 7 Tagen in Abständen von 1 bis 2 Tagen abgenommen und der Virusgehalt ermittelt (3.3.7).

In Abbildung 23 sind die Replikationskinetiken der g15-Sequenzvarianten NL4-3-g15, NL4-3-g15<sub>HNTV</sub>, NL4-3-g15<sub>YRNA</sub> und NL4-3-g15<sub>SIQK</sub> sowie des NL4-3-Wildtyps dargestellt. Alle Varianten replizierten in den Kulturen, denen das HIV-1 Negativserum zugesetzt war mit vergleichbaren Kinetiken und erreichten an Tag 7 vergleichbare Virustiter bei einer OD<sub>405nm</sub> von ca. 2,25. Durch Zugabe des HIV-1 Positivserums in der Verdünnung 1:100 wurden alle Viren um ca. 50 % inhibiert, sie erreichten im Vergleich zu der Kinetik, die mit HIV-1 Negativserum erhalten wurde, nur noch eine OD<sub>405nm</sub> von ca. 0,8-1,2. Dabei war innerhalb dieser vier NL4-3 Sequenzvarianten kein signifikanter Unterschied zu sehen.

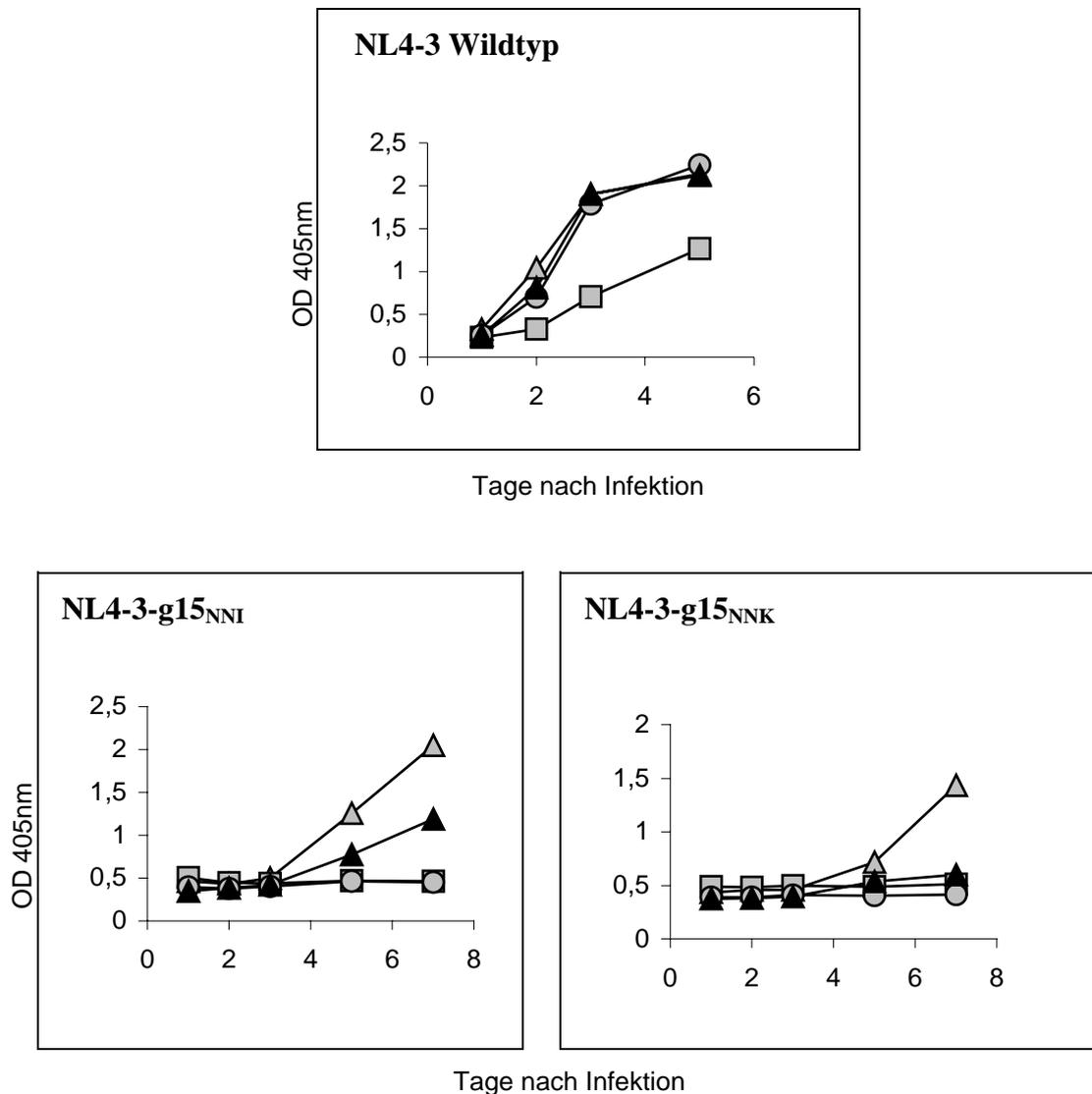
Die Zugabe des HIV-1 Positivserums von 1:500 und 1:1000 hatte keinen inhibitorischen Effekt auf die Replikation. Alle Mutanten erreichten an Tag 7 identische Virustiter, wie sie mit HIV-1 Negativserum erreicht wurden. Der Aminosäureaustausch im NL4-3-Hintergrund von NNNT an Position g15 gegen Sequenzen aus CXCR4-nutzenden Primärisolaten hatte keinen Einfluß auf die Neutralisierbarkeit dieser Viren.

Anders verhielt es sich, wenn an Position g15 das Sequenzmotiv NNNT gegen NNNI oder NNNK ausgetauscht wird. Die Virusmenge war jeweils so gewählt, dass die Replikationskinetiken mit HIV-1 Negativserum vergleichbar waren. Zugabe von HIV-1 Positivserum in den Verdünnungen 1:100 und 1:500 führte bei den beiden Varianten NL4-3-g15<sub>NNI</sub> und NL4-3-g15<sub>NNK</sub> zu einer vollständigen Neutralisation der Viren (Abb. 24). Das HIV-1 Positivserum in der Verdünnung 1:1000 führte bei der Variante NL4-3-g15<sub>NNK</sub> ebenfalls zu einer vollständigen Inhibition, während NL4-3-g15<sub>NNI</sub> an Tag 7 eine OD<sub>405nm</sub> von 1,0 erreichte, was in etwa 50 % der OD<sub>405nm</sub> entsprach, die in Gegenwart des HIV-1 Negativserum erreicht wurde.

Zusammengenommen waren die beiden Varianten NL4-3-g15<sub>NNI</sub> und NL4-3-g15<sub>NNK</sub>, bei denen durch geringe Veränderungen der Aminosäuresequenzen das N-Glycan an Position g15 eliminiert worden war, deutlich sensitiver gegenüber dem HIV-1 Positivserum. Selbst bei einer Serumverdünnung von 1:1000 wurden sie vollständig bzw. zu 50% inhibiert. Dagegen wurden die NL4-3 Glycovarianten, bei denen an Position g15 die Erkennungssequenz für N-Glycosylierung durch Sequenzmotive aus CXCR4-nutzenden HIV-1 Primärisolaten eliminiert war, nur bei der geringsten Verdünnung des HIV-1 Positivserums von 1:100 zu 50% inhibiert. Eine weitere Verdünnung des Serums führte dazu, dass keine Neutralisation mehr stattfand. Diese Viren waren deutlich resistenter gegenüber der Neutralisation durch HIV-1 neutralisierendes Serum.



**Abb. 23 - Infektion von GHOST-CXCR4-Indikatorzellen mit NL4-3-g15-Sequenzvarianten:** GHOST-CXCR4-Indikatorzellen wurden mit jeweils 0,25 ng/ml rekombinantem Virus infiziert. In den Kulturen lag HIV-1 Negativserum in der Verdünnung 1:100 (▲) und HIV-1 Positivserum in den Verdünnungen 1:100 (■), 1:500 (●) und 1:1000 (▲) vor. Die Infektion erfolgte in 96-well Zellkulturplatten. Nach 1, 2, 3, 5, und 7 Tagen wurden die Kulturüberstände abgenommen und der Virusgehalt mittels eines p24-Antigen ELISA als OD<sub>405nm</sub> quantifiziert. Die Werte ergeben sich aus Doppelbestimmungen. Die Standardabweichung lag unter 5 %.



**Abb. 24 Infektiosität und Neutralisierbarkeit der NL4-3-g15 Mutanten mit konservativen Aminosäureaustauschen.**

GHOST-CXCR4-Indikatorzellen wurden mit rekombinantem Virus infiziert NL4-3: 0,25 ng/ml, NL4-3-g15<sub>NNI</sub>, NL4-3-g15<sub>NNK</sub>: 12,5 ng/ml. In den Kulturen lag HIV-1 Negativserum in der Verdünnung 1:100 (-▲) und HIV-1 Positivserum in den Verdünnungen 1:100 (-□), 1:500 (-●) und 1:1000 (-▲) vor. Die Infektion erfolgte in 96-well Zellkulturplatten. Nach 1, 2, 3, 5, und 7 Tagen wurde der Virusgehalt mittels eines p24-Antigen ELISA als OD<sub>405nm</sub> quantifiziert. Die Werte ergeben sich aus Doppelbestimmungen. Die Standardabweichung lag unter 5 %.

### **4.2.3 Infektion von CXCR4-Indikatorzellen mit NL-930 Mutanten**

#### **4.2.3.1 Replikation in Gegenwart von HIV-1 Negativserum**

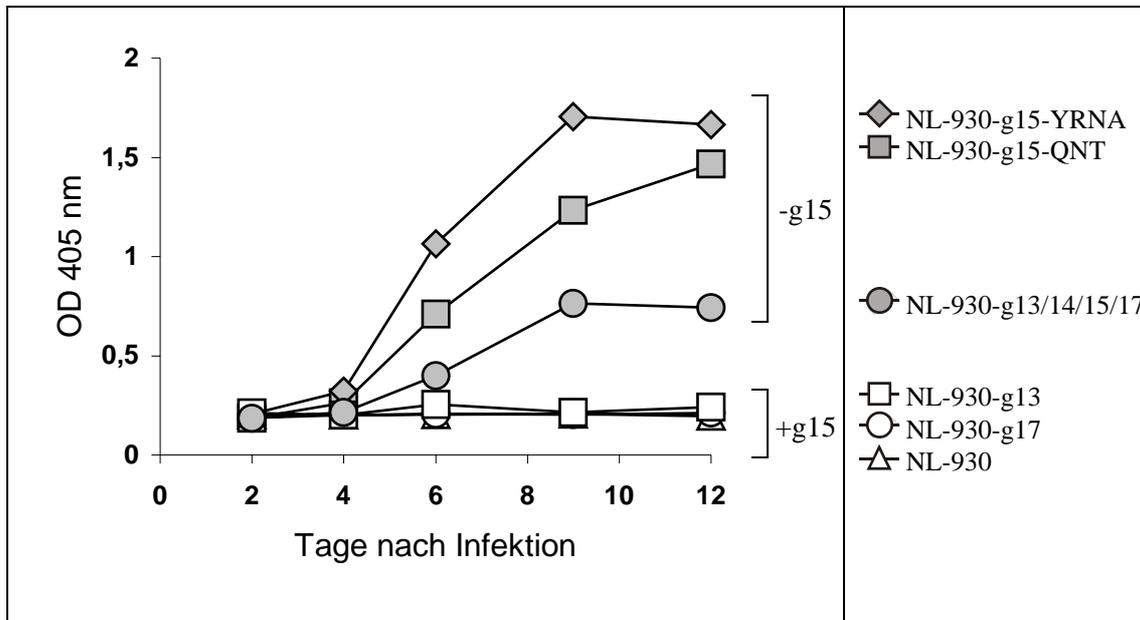
Mit den unter 4.1.3.2 beschriebenen NL-930 Einzelmutanten NL-930-g13, NL-930-g15<sub>YRNA</sub>, NL-930-g15<sub>QNT</sub>, NL-930-g17 sowie der Vierfachmutante NL-930-g13/14/15/17 wurden GHOST-CXCR4-Indikatorzellen infiziert (3.3.1) und die Virusreplikation über 12 Tage verfolgt. Dem Kulturmedium war über die gesamte Zeit HIV-1 Negativserum zugesetzt. Die Zellkulturüberstände wurden im Abstand von 2-3 Tagen über einen Zeitraum von 12 Tagen abgenommen und der Virusgehalt als OD<sub>405nm</sub> ermittelt (3.3.7). Die Varianten NL-930-g15<sub>QNT</sub> und -g15<sub>YRNA</sub> replizierten in den GHOST-Indikatorzellen und erreichten an Tag 12 bei einer OD<sub>405nm</sub> von ca. 1,6-1,7 nahezu gleiche Virustiter (Abb. 25). Die Vierfachmutante NL-930-g13/14/15/17 replizierte etwas schlechter als die NL-930-g15-Mutanten, sie erreichte an Tag 12 mit einer OD<sub>405nm</sub> von 0,6 nur etwa ein Drittel des Wertes der beiden NL-930-g15 Mutanten. Die Varianten NL-930, NL-930-g13 und NL-930-g17 replizierten nicht in den CXCR4-Indikatorzellen. Hier war auch nach 12 Tagen kein Virus in den Kulturüberständen nachweisbar. Die Infektion von CCR5-Indikatorzellen mit diesen Viren war trotz hoher eingesetzter Virusmengen nicht möglich (nicht gezeigt).

Alle Viren, die an Position g15 N-glycosyliert waren, waren nicht in der Lage, in CXCR4-Indikatorzellen zu replizieren.

#### **4.2.3.2 Replikation in Gegenwart von HIV-1 Positivserum**

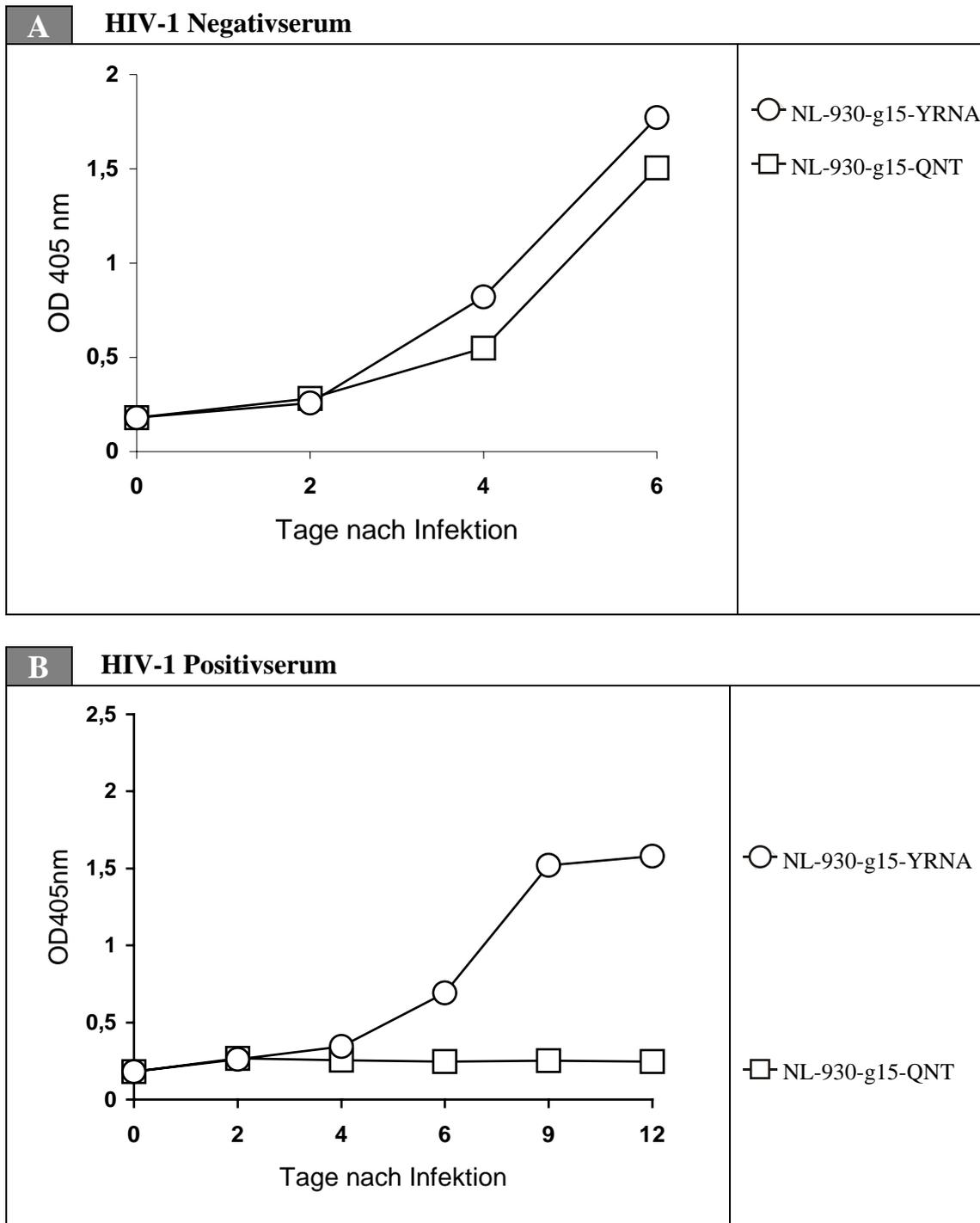
Für die NL4-3 Glycovarianten konnte bereits gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz an der Position g15 im V3-Loop eine Bedeutung für die Neutralisierbarkeit der Varianten hat (4.2.3). Wurde die Aminosäuresequenz eines CXCR4-nutzenden Primärisolates an Position g15 des HIV-1 Laborstammes NL4-3 inseriert und die N-Glycosylierungsstelle dadurch eliminiert, verhielten sich diese Viren hinsichtlich der Neutralisierbarkeit durch HIV-1 Positivserum wie der NL4-3 Wildtyp (Abb. 23). Wurde die N-Glycosylierungsstelle durch Aminosäuresequenzen NNI oder NNK eliminiert, wurden sie auch mit hochverdünntem Serum neutralisiert (Abb. 24). Um auch das X4-trope Primärisolat PI-930 auf einen solchen Einfluß der Aminosäuresequenz an Position g15 zu untersuchen, wurden die g15-Mutanten NL-930-g15<sub>QNT</sub> und NL-930-g15<sub>YRNA</sub> hinsichtlich ihrer Neutralisierbarkeit durch HIV-1

neutralisierendes Serum untersucht. Mit den rekombinanten Viren NL-930-g15<sub>QNT</sub> und NL-930-g15<sub>YRNA</sub> wurden GHOST-CXCR4-Indikatorzellen infiziert. Den Zellkulturen wurde HIV-1 Positivserum zugegeben (3.3.5). Als Kontrolle dienten identische Ansätze, denen HIV-1 Negativserum als Kontrollserum zugesetzt war. Die Replikationskinetiken wurden anhand der Virusmenge im Zellkulturüberstand über 12 Tage aufgenommen, wobei die Probenentnahme im Abstand von 2 bzw. 3 Tagen erfolgte. In Anwesenheit von HIV-1 Negativserum konnten die beiden Varianten NL-930-g15<sub>QNT</sub> und NL-930-g15<sub>YRNA</sub> replizieren (Abb. 26A). In Anwesenheit des HIV-1 Positivserums replizierte nur die Variante NL-930-g15<sub>YRNA</sub>, die an Position g15 die Aminosäuresequenz des ursprünglichen Primärisolates PI-930 trug. Die Variante NL-930-g15<sub>QNT</sub> wurde in Anwesenheit des HIV-1 Positivserums in der Verdünnung von 1:100 vollständig neutralisiert (Abb. 26B). Somit konnte gezeigt werden, dass bei den g15-Glycomutanten im Hintergrund des X4-tropen Primärisolat PI930 die Aminosäuresequenz an Position g15 einen Einfluss auf die Neutralisierbarkeit der Viren durch HIV-1 Positivserum hatte, während die Replikationseigenschaften durch die Unterschiede in der Aminosäuresequenz an Position g15 nicht beeinflusst wurden.



**Abb. 25 Replikation der NL-930 Mutanten auf GHOST-CXCR4-Zellen.**

GHOST-CXCR4-Indikatorzellen wurden mit jeweils 2,5 ng/ml rekombinatem Virus infiziert. In den Kulturen lag HIV-1 Negativserum in der Verdünnung 1:100 vor. Die Infektion erfolgte in 96-well Zellkulturplatten. Nach 2, 4, 6, 9, und 12 Tagen wurde der Virusgehalt mittels p24-Antigen ELISA als OD<sub>405nm</sub> ermittelt.



**Abb. 26 Replikation und Neutralisation der NL-930 Mutanten in GHOST-CXCR4-Zellen.**

GHOST-CXCR4-Indikatorzellen wurden mit jeweils gleichen Mengen (2,5 ng/ml) rekombinantem Virus infiziert. Nach 2, 4, 6, 9 und 12 Tagen wurde die Virusmenge im Zellkulturüberstand im p24-Antigen ELISA als OD<sub>405nm</sub> ermittelt.

**A)** Replikation der NL-930 Varianten mit HIV-1 Negativserum (Verd. 1:100).

**B)** Replikation der NL-930 Varianten mit HIV-1 Positivserum (Verd. 1:100).

#### **4.2.4 Infektion von CCR5-Indikatorzellen mit NL-918 Mutanten**

##### **4.2.4.1 Infektion mit NL-918 Mutanten in Gegenwart von HIV-1 Negativserum**

Um den Einfluß der N-Glycosylierung an Position g15 auf die Infektionseigenschaften des R5-monotropen Primärisolates PI-918 zu untersuchen, wurden mit den unter 4.1.3.3 beschriebenen Varianten NL-918 und NL-918-g15 die CCR5-Indikatorzelllinien GHOST-CCR5 und U87-CCR5 infiziert. Dem Kulturmedium war HIV-1 Negativserum in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt. Die Virusmenge im Zellkulturüberstand wurde nach 12 Tagen quantifiziert (3.3.7). In den beiden CCR5-Indikatorzellen verhielten sich die Varianten unterschiedlich hinsichtlich der Infektionseigenschaften.

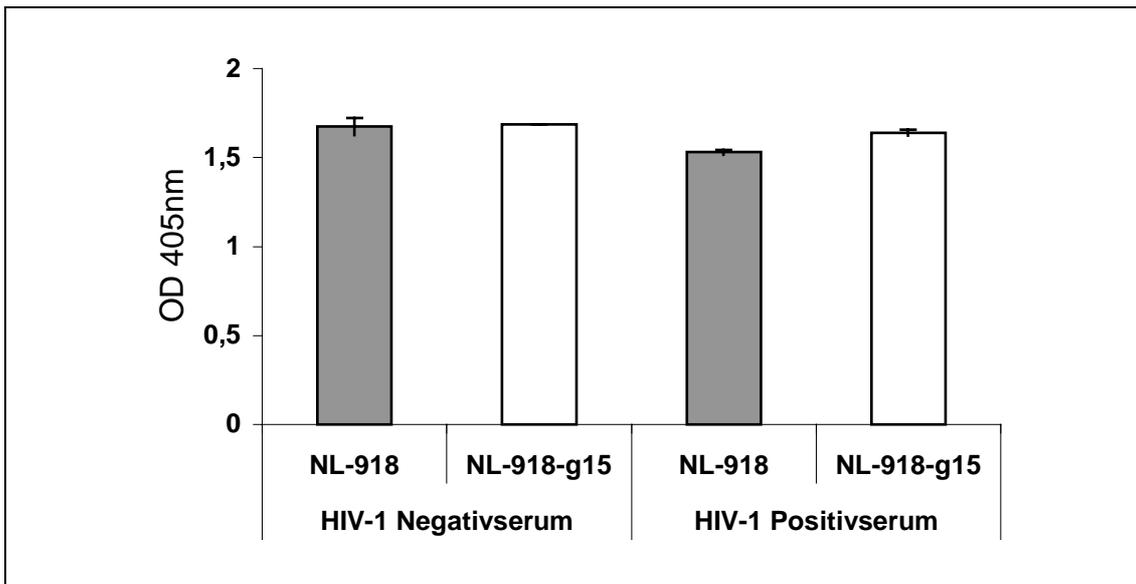
In den U87-CCR5 Zellen konnte nach 12 Tagen kein Unterschied in der Virusmenge festgestellt werden. Sowohl die an Position g15 glycosylierte als auch die an g15 unglycosylierte Variante erreichten nach 12 Tagen Virusmengen, die einer OD<sub>405nm</sub> von ca. 1,6 entsprachen (Abb. 27). In den GHOST-CCR5-Kulturen konnte dagegen nach 12 Tagen ein Unterschied in der Virusmenge beobachtet werden. Die Variante NL-918 erreichte eine Virusmenge, die einer OD<sub>405nm</sub> von ca. 1,6 entsprach, während die an Position g15 nicht glycosylierte Variante NL-918-g15 nur eine OD<sub>405nm</sub> von 1,0 erreicht (Abb. 28). Bei der Infektion der GHOST-CCR5-Zelllinie konnten Unterschiede zwischen den NL-918 Varianten gezeigt werden. Die an Position g15 unglycosylierte Variante infizierte die Zellen effektiver als die an dieser Position glycosylierte Variante.

##### **4.2.4.2 Infektion mit NL-918 Mutanten in Gegenwart von HIV-1 Positivserum**

Um zu untersuchen, ob die N-Glycosylierung im Fall der R5-tropen NL-918 Varianten einen Einfluß auf die Neutralisationseigenschaften hat, wurden mit den unter 4.1.3.3 beschriebenen Varianten NL-918 und NL-918-g15 die CCR5-Indikatorzellen GHOST-CCR5 und U87-CCR5 infiziert. Dem Kulturmedium wurde HIV-1 Positivserum in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt (3.3.5). Die Virusmenge im Zellkulturüberstand wurde nach 12 Tagen quantifiziert (3.3.7). Auf die Infektion der U87-CCR5 Zellen hatte das HIV-1 Positivserum keinen Einfluss. Beide Viren erreichten an Tag 12 eine OD<sub>405nm</sub> von ca. 1,5. Damit entsprachen sie in etwa der Virusmenge, die in Anwesenheit des HIV-1 Negativserums erreicht wurde (Abb. 27). Bei den beiden NL-918-Varianten in der GHOST-CCR5-Indikatorzelllinie führte das

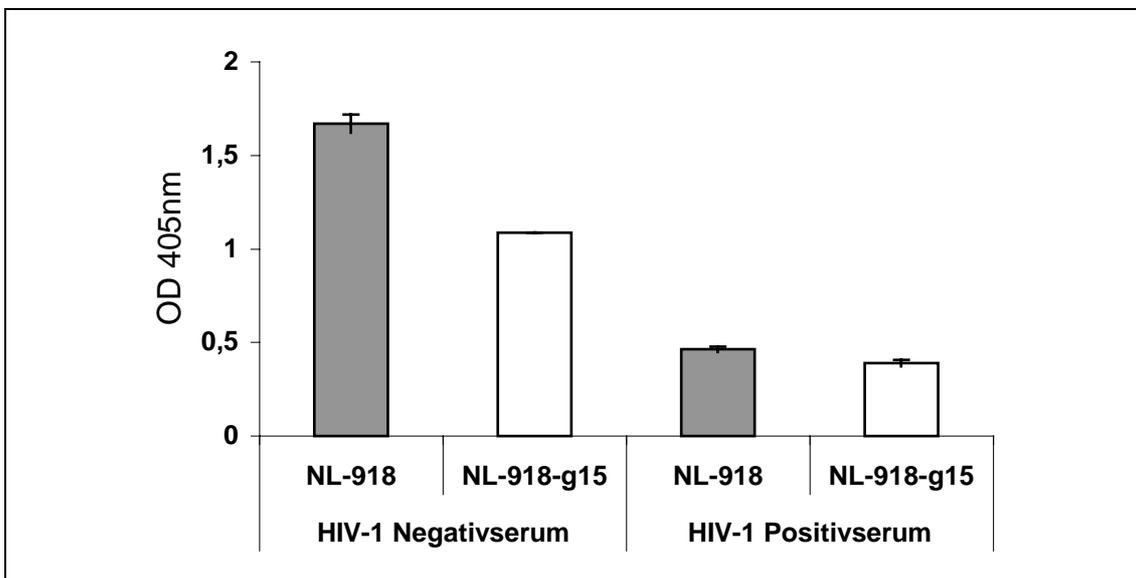
HIV-1 Positivserum an Tag 12, verglichen mit der Kultur, der HIV-1 Negativserum zugesetzt war, zu einer Reduktion der Virusmenge. Im Vergleich erreichten beide 918-Glycovarianten in Anwesenheit des HIV-1 Positivserums eine Virusmenge, die einer  $OD_{405nm}$  von ca. 0,5 entsprach (Abb. 28). Hinsichtlich der Neutralisationseigenschaften der beiden NL-918 Varianten konnte aufgrund dieser Beobachtungen keine endgültigen Aussagen gemacht werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass die an g15 unglycosylierte Variante die GHOST-CCR5 Zelllinie stärker infizierte, als die an Position g15 glycosylierte Variante.

Das N-Glycan an Position g15 hat im Falle der R5-tropen NL-918 Varianten einen Einfluß auf die Nutzung von CCR5, spielte aber in diesem Fall für die Neutralisation durch humanes HIV-1 Positivserum eine untergeordnete Rolle.



**Abb. 27 Infektion von U87-CCR5-Zellen mit NL-918 Varianten**

U87-CCR5-Zellen wurden mit jeweils 2,5 ng/ml rekombinantem Virus infiziert. Nach 12 Tagen wurde der Virusgehalt im Zellkulturüberstand in einem p24-Antigen-ELISA als OD<sub>405nm</sub> ermittelt. HIV-1 Negativserum und HIV-1 Positivserum wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.



**Abb. 28 Infektion von GHOST-CCR5-Zellen mit NL-918 Varianten**

GHOST-CCR5-Zellen wurden mit jeweils 2,5 ng/ml rekombinantem Virus infiziert. Nach 12 Tagen wurde der Virusgehalt im Zellkulturüberstand in einem p24-Antigen-ELISA als OD<sub>405nm</sub> ermittelt. HIV-1 Negativserum und HIV-1 Positivserum wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

## **4.2.5 Replikation von R5-monotropen NL-991-Varianten**

### **4.2.5.1 Replikation in unterschiedlichen CCR5-Indikatorzellen**

Es wurde untersucht, welchen Einfluss die N-Glycosylierung im V3-Bereich auf die Replikation der R5-tropen NL-991-Varianten in unterschiedlichen CCR5-Indikatorzellen hat. Dazu wurden die Indikatorzelllinien U87-CCR5 und GHOST-CCR5 mit den Glycovarianten NL-991 und NL-991-g15 infiziert (3.3.1). Über einen Zeitraum von 6 Tagen wurden im Abstand von 2 Tagen Kulturüberstände abgenommen und die darin enthaltenen Virusmengen quantifiziert (3.3.7). Die Varianten NL-991 und NL-991-g15 replizierten in den beiden CCR5-Indikatorzellen U87-CCR5 und GHOST-CCR5 mit unterschiedlichen Kinetiken (Abb. 29). In der GHOST-Zelllinie verlief die Replikationskinetik wesentlich flacher als in der U87-CCR5-Zelllinie. In beiden Zelllinien replizierte die Variante NL-991 geringfügig besser als die an g15 nicht glycosylierte Variante NL-991-g15.

### **4.2.5.2 Replikation in Gegenwart von HIV-1 Negativserum**

Aufgrund der Unterschiede in den Replikationskinetiken der NL-991 Varianten auf den beiden Indikatorzelllinien wurden die NL-991 Varianten mit unterschiedlichen V3-Glycosylierungsmustern in beiden Zelllinien hinsichtlich ihrer Replikationseigenschaften untersucht. In den GHOST-CCR5-Zellen wurden alle acht NL-991-Varianten getestet. Die U87-CCR5-Zelllinie wurde mit den drei Varianten NL-991, NL-991-g15 und NL-991-g13/15/17 infiziert. Die Virusreplikation wurde in der GHOST-CCR5-Zelllinie über 12, in der U87-CCR5-Zelllinie über 6 Tage verfolgt. Die Indikatorzellen wurden in 96-well Zellkulturplatten infiziert (3.3.4). Dem Kulturmedium war über die gesamte Zeit HIV-1 Negativserum in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben. Von den U87-CCR5 und GHOST-CCR5 Kulturen wurde im Abstand von 2 bis 3 Tagen Überstände abgenommen und die darin enthaltene Virusmenge quantifiziert (3.3.7). Alle NL-991 Varianten, die an Position g15 nicht glycosyliert waren (NL-991-g15, NL-991-g15/17, NL-991-g13/15 und NL-991-g13/15/17), replizierten in den GHOST-CCR5-Zellen deutlich schlechter als die Varianten, die an Position g15 ein N-Glycan trugen (NL-991, NL-991-g13, NL-991-g17 und NL-991-g13/17) (Abb. 30A). Für die U87-CCR5-Zellen ergab sich ein analoges Bild. Die im V3-Bereich vollständig glycosylierte Variante NL-991 replizierte besser

als die an Position g15 unglycosylierten Varianten NL-991-g15 und NL-991-g13/15/17 (Abb. 31A). Die Wachstumskurven dieser Viren waren im Vergleich zu der von NL-991 nach rechts verschoben.

Der Effekt der N-Glycosylierung an Position g15 ist in der Zelllinie GHOST-CCR5 in Anwesenheit des HIV-1 Negativserums (Abb. 30A) wesentlich deutlicher zu erkennen als in Abwesenheit des Serums (Abb. 29). In Anwesenheit des HIV-Negativserums replizierten NL-991 Varianten besser als in Abwesenheit des Serums. Dadurch stellte sich der Unterschied in der Replikationsfähigkeit der beiden Varianten NL-991 und NL-991-g15 deutlicher dar (Abb. 30 A).

Es wurde gezeigt, dass R5-trope NL-991 Varianten effizienter in den CCR5-Indikatorzellen replizieren, wenn das N-Glycan an Position g15 vorhanden ist.

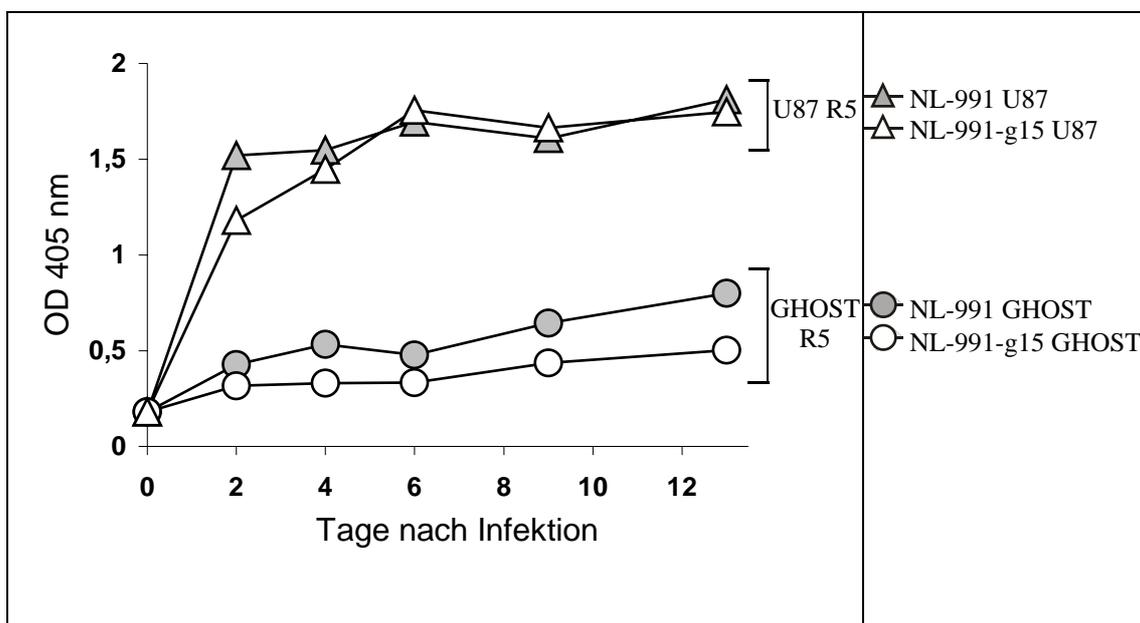
#### **4.2.5.3 Replikation in Gegenwart von HIV-1 Positivserum**

Es wurde überprüft, ob Veränderungen der N-Glycosylierung im V3-Bereich der NL-991 Varianten einen Einfluß auf die Sensitivität gegenüber humanem HIV-1 Positivserum haben.

Zu diesem Zweck wurden CCR5-Indikatorzellen mit den rekombinanten NL-991 Varianten infiziert. Wie unter 4.2.6.1 wurden die GHOST-CCR5-Zellen mit allen acht NL-991-Glycovarianten infiziert. Die U87-CCR5-Zellen wurden mit den drei Varianten NL-991, NL-991-g15 und NL-991-g13/15/17 infiziert. Die Zellen wurden in Anwesenheit des HIV-1 Positivserums in 96-well Zellkulturplatten infiziert (3.3.5). Über einen Zeitraum von 6 Tagen wurden im Abstand von 2 Tagen Kulturüberstände abgenommen und die darin enthaltene Virusmenge quantifiziert (3.3.7). Alle NL-991 Varianten wurden durch das HIV-1 Positivserum in einer Verdünnung von 1:100 neutralisiert. Die an Position g15 glycosylierten Varianten zeigten in Gegenwart des HIV-1 Positivserums verglichen mit den Varianten, die an Position g15 nicht glycosyliert waren, eine etwas stärkere Replikation (Abb. 30B).

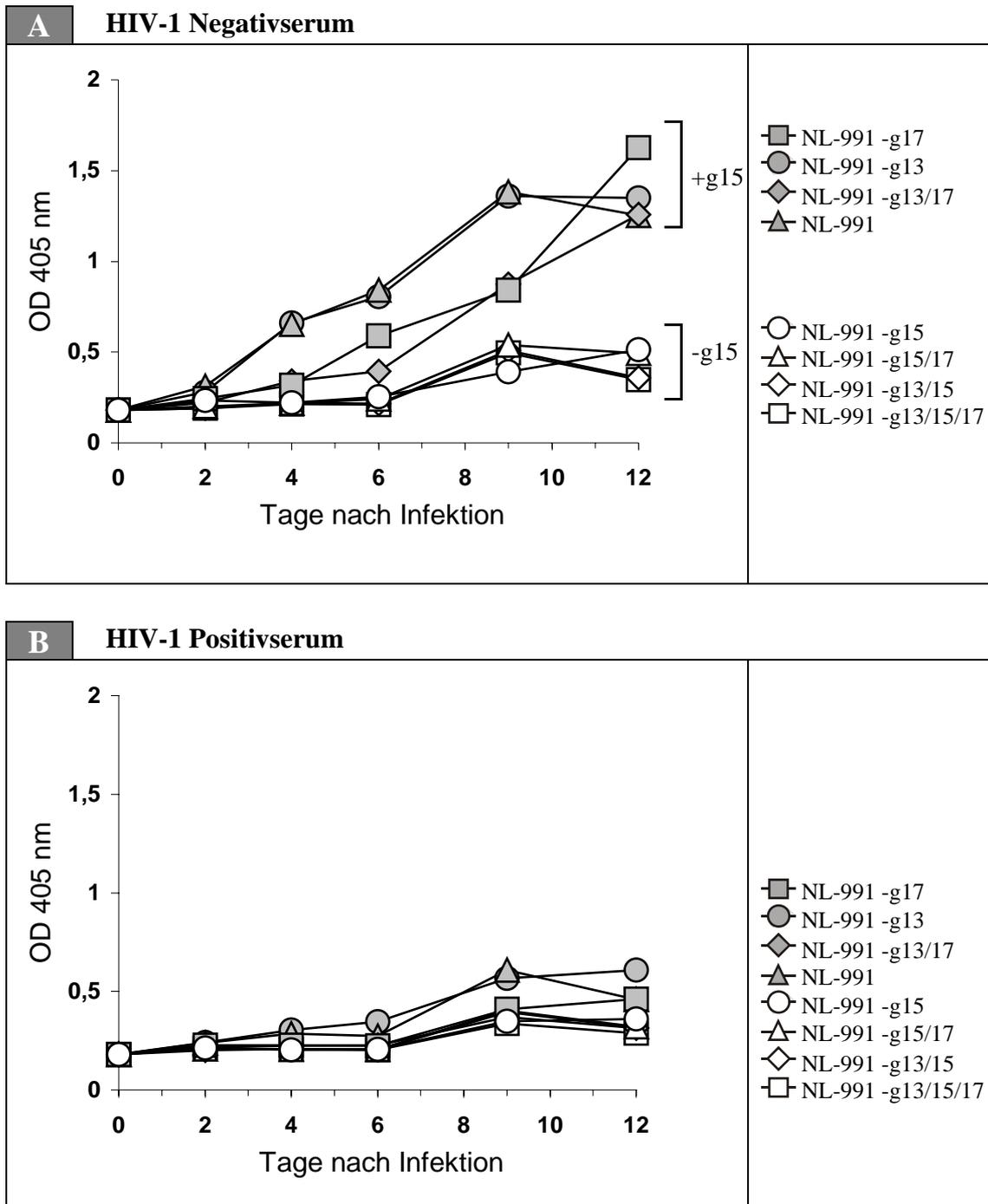
In den U87-CCR5-Zellen replizierten die an Position g15 glycosylierten NL-991 Varianten in Gegenwart des HIV-1 Positivserums besser als die Varianten, denen das N-Glycan an dieser Position fehlte (Abb 31B). Der Effekt des g15 N-Glycans auf die Sensitivität der NL-991 Varianten gegenüber HIV-1 Positivserum war in diesem System deutlich zu sehen.

Für die CCR5-vermittelte Infektion der Virusvariante NL-991 hatte das N-Glycan einen Einfluß auf die Replikation und Sensitivität der Viren gegenüber dem HIV-1 Positivserum. Alle Varianten, die an Position g15 glycosyliert waren, replizierten besser in CCR5-Indikatorzellen und zeigten eine höhere Resistenz gegenüber HIV-1 neutralisierendem Serum als die Varianten, denen das N-Glycan an Position g15 fehlte.

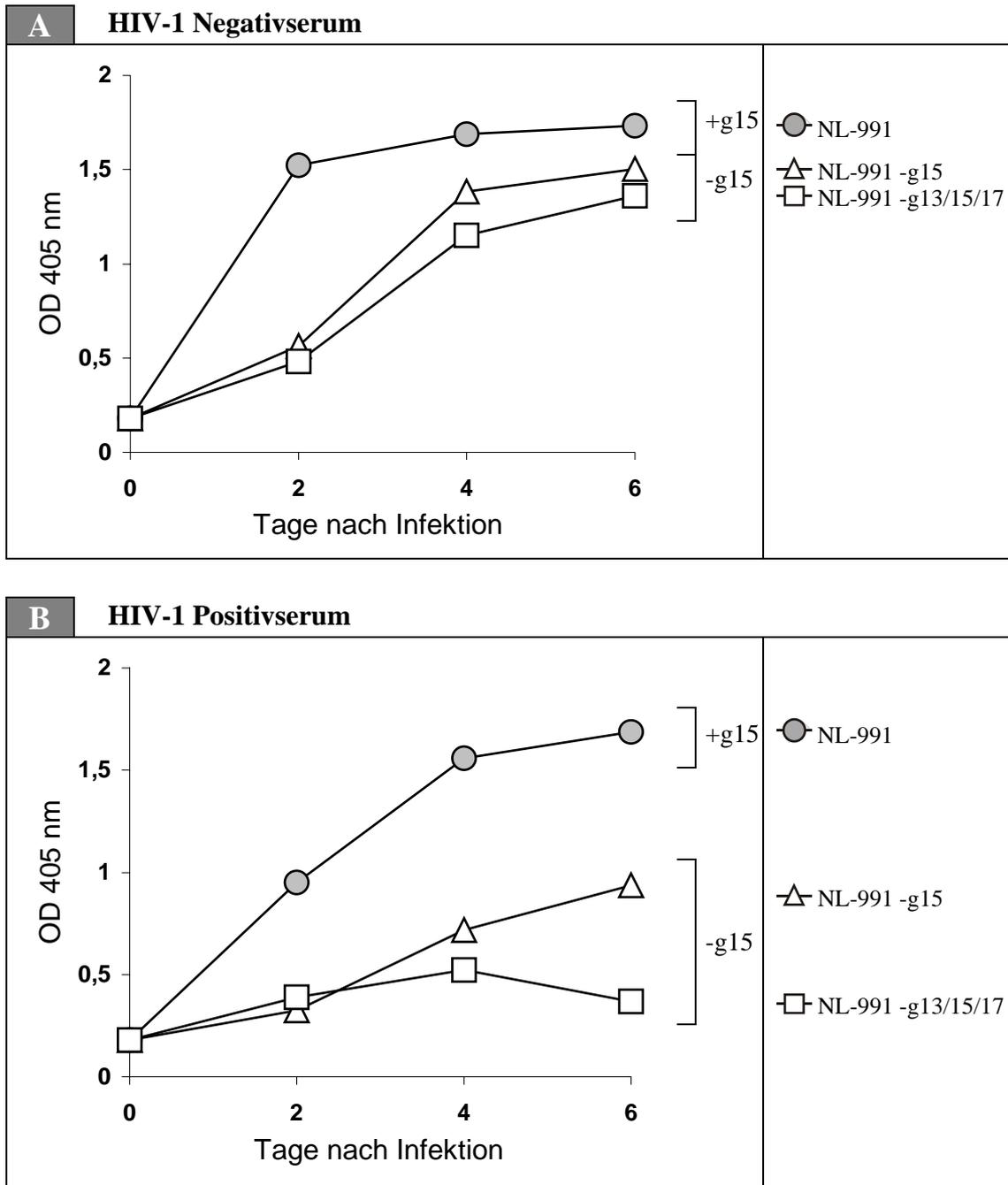


**Abb. 29** Replikation der R5-tropen Varianten NL-991 und NL-991-g15 in GHOST-CCR5 und U87-CCR5-Indikatorzellen.

Die CCR5-Indikatorzelllinien U87-CCR5 und GHOST-CCR5 wurden mit jeweils 2,5 ng/ml infiziert. Nach 2, 4 und 6 Tagen wurde der Virusgehalt im Zellkulturüberstand unter Verwendung des p24-Antigen-ELISA als OD<sub>405nm</sub> ermittelt.



**Abb. 30 Infektiosität und Neutralisierbarkeit der NL-991 Glycovarianten.**  
 GHOST-CCR5-Indikatorzellen wurden mit jeweils 2,5 ng/ml rekombinantem Virus infiziert. Nach 2, 4 und 6 Tagen wurde die Virusmenge im Zellkulturüberstand im ELISA als OD<sub>405nm</sub> ermittelt.  
 A) Replikationskinetik der NL-991 Varianten mit HIV-1 Negativserum (Verd. 1:100)  
 B) Replikationskinetik der NL-991 Varianten mit HIV-1 Positivserum (Verd. 1:100)



**Abb. 31 Infektiosität und Neutralisierbarkeit der NL-991 Glycovarianten NL-991, NL-991-g15 und NL-991-g13/15/17.**

U87-CCR5-Indikatorzellen wurden mit jeweils 2,5 ng/ml rekombinatem Virus infiziert. Nach 2, 4 und 6 Tagen wurde die Virusmenge im Zellkulturüberstand im ELISA als OD<sub>405nm</sub> ermittelt.

**A)** Replikationskinetik der NL-991 Varianten mit HIV-1 Negativserum (Verd. 1:100)

**B)** Replikationskinetik der NL-991 Varianten mit HIV-1 Positivserum (Verd. 1:100)

## 4.2.6 Infektion von Indikatorzellen mit NL-952 Mutanten

### 4.2.6.1 Infektion von CCR5- und CXCR4-Indikatorzellen

Die NL-952 Varianten mit verändertem V3-Glycosylierungsmuster wurden für die Infektion von GHOST-CCR5-, GHOST-CXCR4- und parentalen GHOST-Indikatorzellen eingesetzt. Die Zellen wurden in 48-*well* Zellkulturplatten infiziert (3.3.1) und nach 3 Tagen fixiert. Durch eine anschließende Immunfärbung (3.3.3) konnten infizierte Zellen angefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Matthias Dittmar am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg durchgeführt.

Die Indikatorzellen wurden in Doppelbestimmungen mit verschiedenen Virusverdünnungen (1, 10 und 100 ng p24-Virusantigen/Kultur) infiziert. Nach 3 Tagen wurden die Infektionsereignisse (*ffu*) ausgezählt und auf 10 ng p24 normiert. In Tabelle 4 sind die Ergebnissen aus den Infektionsstudien der verschiedenen NL-952 Varianten sowie deren Glycosylierungsmuster im V3-Bereich dargestellt. Alle untersuchten Viren waren unabhängig von der V3-Glycosylierung in der Lage, CXCR4 zur Infektion zu nutzen. Es wurde kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Infektionsereignisse und dem Vorhandensein bzw. Fehlen von N-Glycosylierungsstellen im V3-Bereich gefunden. Bei allen NL-952 Varianten fanden sich Infektiositäten für die GHOST-CXCR4-Zellen, die zwischen 5 und 15 *ffu*/10 ng p24 lagen. Anders verhielt es sich mit der Infektion der GHOST-CCR5-Indikatorzellen. Von den 11 untersuchten NL-952 Glycomutanten waren nur die vier Varianten NL-952-g14, NL-952-g13/14, NL-952-g14/17 und NL-952-g13/14/17 in der Lage, die CCR5-exprimierenden Zellen zu infizieren. Alle anderen Viren konnten die CCR5-Indikatorzellen nicht infizieren. Ein Vergleich dieser Varianten, die CCR5-Indikatorzellen nicht infizieren konnten, zeigte, dass alle diese Varianten an Position g15 unglycosyliert sind. Dabei war das Fehlen der N-Glycosylierung alleine ausreichend, um die CCR5-Nutzung zu verhindern, wie am Beispiel der Mutanten NL-942-g15 zu sehen ist. Dagegen konnte die Mutante NL-952-13/14/17, die lediglich an Position g15 und g16 glycosyliert ist, die CCR5-Indikatorzelle infizieren. Das N-Glycan an Position g15 war alleine entscheidend, ob die NL-952 Varianten die CCR5-Indikatorzellen infizieren konnten oder nicht.

#### **4.2.6.2 Replikation von NL-952-Varianten in CCR5- und CXCR4-Indikatorzellen in Gegenwart von HIV-1 Negativserum**

Um die Bedeutung der N-Glycosylierung im V3-Bereich für die Replikationseigenschaften des R5X4-tropen Primärisolates PI-952 zu untersuchen, wurden U87-CCR5- und U87-CXCR4-Indikatorzellen mit den NL-952-Glycovarianten NL-952 NL-952-g15<sub>Q</sub> und NL-952-g13<sub>Q</sub>/14/15<sub>Q</sub>/17<sub>Q</sub> infiziert. Dem Zellkulturmedium war über die gesamte Dauer HIV-1 Negativserum in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt (3.3.4). Über einen Zeitraum von 6 Tagen wurden im Abstand von 2 Tagen Kulturüberstände abgenommen und die darin enthaltene Virusmenge quantifiziert (3.3.7). In der U87-CXCR4-Indikatorzelllinie replizierten alle Varianten mit vergleichbaren Kinetiken, wobei mit abnehmender V3-Glycosylierung eine leichte Rechtsverschiebung der Wachstumskurven zu erkennen war (Abb. 32A). In der U87-CCR5-Zelllinie konnten die Varianten NL-952-g15 und NL-952-g13/14/15/17 nicht replizieren (Abb. 32B). Die im V3-Bereich vollständig glycosylierte Variante NL-952 zeigt dagegen auf beiden Zelllinien vergleichbare Wachstumskurven. Der Verlust der N-Glycosylierung an Position g15 führte zu einem Verlust der Replikationsfähigkeit in den U87-CCR5-Zellen.

#### **4.2.6.3 Replikation von NL-952 Varianten in CCR5- und CXCR4-Indikatorzellen in Gegenwart von HIV-1 Positivserum**

Neben dem Einfluß der N-Glycosylierung im V3-Bereich auf die Replikationsfähigkeit der Viren in den beiden Indikatorzelllinien U87-CXCR4 und U87-CCR5 wurde untersucht, in wie weit die V3-Glycosylierung die Neutralisierbarkeit der Varianten beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden U87-CXCR4-Indikatorzellen mit den rekombinanten Virusvarianten NL-952, NL-952-g15<sub>Q</sub> und NL-952-g13<sub>Q</sub>/14/15<sub>Q</sub>/17<sub>Q</sub> infiziert (3.3.5). Dem Kulturmedium war HIV-1 Positivserum in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt. Über einen Zeitraum von 6 Tagen wurden im Abstand von 2 Tagen Kulturüberstände abgenommen und die darin enthaltene Virusmenge quantifiziert (3.3.7). Es zeigte sich, dass in Anwesenheit von HIV-1 Positivserum lediglich die Variante NL-952 replizieren konnte (Abb. 33). Diese Variante war als einzige der getesteten Mutanten im V3-Bereich vollständig glycosyliert. Die Varianten NL-952-g15 und NL-952-g13/14/15/17 waren nicht in der Lage, in Anwesenheit des HIV-1 Positivserums zu replizieren. Auch nach 6-tägiger Kultivierung war kein Virus im

Zellkulturüberstand nachweisbar. Das Fehlen des N-Glycans an Position g15 korrelierte mit der Neutralisierbarkeit der Viren durch HIV-1 Positivserum.

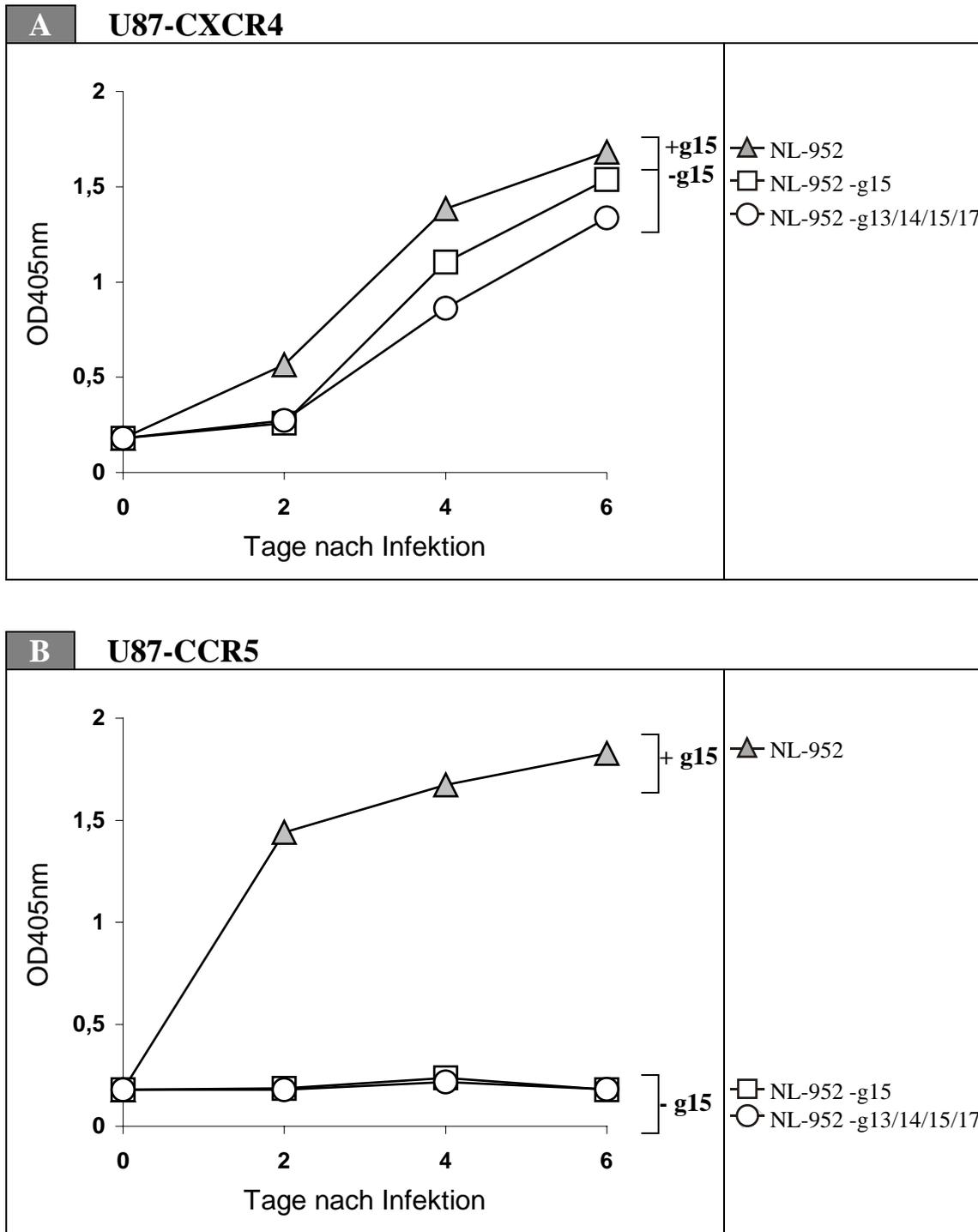
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das N-Glycan der dualtropen NL-952-Varianten von entscheidender Bedeutung für die Replikation in CCR5-exprimierenden Zellen ist. Das g15-N-Glycan beeinflusst außerdem die Neutralisationseigenschaften der NL-952 Varianten.

**Tabelle 4** Infektion von GHOST-CXCR4- und GHOST-CCR5-Zellen mit NL-952 Mutanten mit einer unterschiedlichen N-Glycosylierung im V3-Bereich.

Virusmutanten	Glycosylierung im V3-Loop Bereich <sup>a</sup>					GHOST-Zell Infektion ( <i>ffu</i> /10 ng p24) <sup>b</sup>	
	g13	g14	g15	g16	g17	CXCR4	CCR5
NL-952-g14	+	-	+	+	+	9,3	12,3
NL-952-g13/14	-	-	+	+	+	10	9,4
NL-952-g14/17	+	-	+	+	-	9,5	5,9
NL-952-g13/14/17	-	-	+	+	-	11,5	9,5
NL-952-g15 <sub>Q</sub>	+	+	-	+	+	3	-
NL-952-g14/15 <sub>Q</sub>	+	-	-	+	+	15	-
NL-952-g14/15 <sub>SQ</sub>	+	-	-	+	+	5	-
NL-952-g15/17	+	+	-	+	-	13	-
NL-952-g14/15/17	+	-	-	+	-	5,8	-
NL-952-g13/14/15	-	-	-	+	+	12	-
NL-952-g13/14/15/17	-	-	-	+	-	13,4	-

<sup>a</sup> Angegeben ist, ob die Aminosäuresequenz an den Positionen g13 bis g17 eine N-Glycosylierungssequenz darstellt. +, N-Glycosylierungssequenz, -, keine funktionelle N-Glycosylierungssequenz

<sup>b</sup> Die Infektionsereignisse wurden in einem Infektionstest durch Immunfärbung nachgewiesen und quantifiziert. Die Anzahl der Infektionsereignisse (*ffu*, *foci forming units*) wurden jeweils in Doppelbestimmungen für drei Virusverdünnungen ermittelt und auf die eingesetzte Virusmenge von jeweils 10 ng/p24 bezogen.

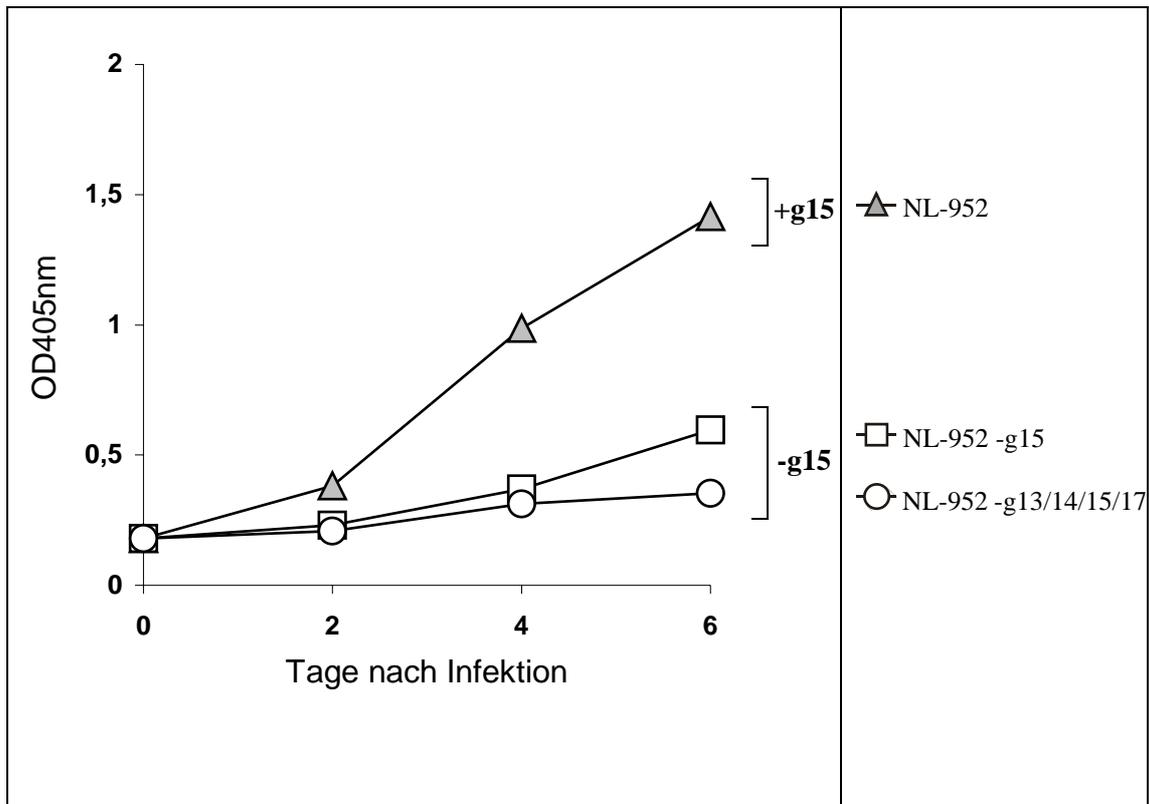


**Abb. 32 Replikation der NL-952 Glycovarianten.**

U87-CXCR4- und U87-CCR5-Indikatorzellen wurden mit NL-952, NL-952-g15 und NL-952-g13/14/17 Viren (1,25 ng/ml) infiziert. Nach 2, 4 und 6 Tagen wurde die Virusmenge im Zellkulturüberstand als OD<sub>405nm</sub> ermittelt. Dem Kulturmedium wurde HIV-1 Negativserum zugesetzt (Verd. 1:100).

**A)** Replikation der NL-952 Varianten in U87-CXCR4-Zellen.

**B)** Replikation der NL-952 Varianten in U87-CCR5-Zellen.



**Abb. 33 Neutralisation der NL-952 Mutanten.**

U87-CXCR4-Indikatorzellen wurden mit NL-952, NL-952-g15 und NL-952-g13/14/17 Viren (1,25 ng/ml) infiziert. Nach 2, 4 und 6 Tagen wurde die Virusmenge im Zellkulturüberstand als OD<sub>405nm</sub> ermittelt.

Dem Kulturmedium wurde HIV-1 Positivserum in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Auswahl der HIV-1 Primärisolate und der V3-Sequenzen für die Herstellung rekombinanter NL4-3 Chimären.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die N-Glycosylierung des gp120 V3-Loop einen bedeutenden Einfluss auf die Replikationseigenschaften des HIV-1 hat. Dabei spielt das N-Glycan an Position g15 eine entscheidende Rolle. Diese Beobachtung ergab sich aus den vorgestellten Infektionstudien mit rekombinanten HIV-1-Varianten, die sich in der N-Glycosylierung des V3-Loop unterschieden. Zur Herstellung von HIV-Varianten mit einer unterschiedlichen Glycosylierung im V3-Bereich des Hüllproteins gp120 wurden zuerst die V3-Bereiche von verschiedenen HIV-1 Primärisolaten in den Hintergrund des genetisch gut untersuchten HIV-1 Laborstammes NL4-3 übertragen. Durch die Klonierung des V3-Bereiches gelang es, den Phänotyp des X4-tropen NL4-3 Virus gegen die ursprünglichen Phänotypen der untersuchten Primärisolate auszutauschen. Diese Arbeiten bestätigen die Bedeutung des V3-Loop für die Korezeptornutzung. Cocchi und Mitarbeiter (1992) zeigten, dass der alleinige Austausch des V3-Loop einen Wechsel der Korezeptornutzung von CCR5 nach CXCR4 bewirken kann. Durch Austausch des V3-Loop eines R5-monotropen Virus gegen den V3-Loop eines X4-monotropen Virus wurde gezeigt, dass dieser Bereich des Hüllproteins gp120 für die Korezeptornutzung verantwortlich ist. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass auch der V3-Loop eines R5X4-dualtropen Virus in NL4-3 inseriert werden kann und dadurch das NL4-3 Virus den dualtropen Phänotyp erhält. Bislang herrschte die Meinung vor, dass für die CCR5 Nutzung von dualtropen Viren auch gp120 Bereiche außerhalb des V3-Loop notwendig sind. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass der Austausch des V3-Loop ausreicht, um die Eigenschaften von dualtropen Primärisolaten auf rekombinante Laborisolate wie z.B. das NL4-3 zu übertragen. Alle im Rahmen dieser Arbeit konstruierten gp120-Chimären zwischen NL4-3 und den unterschiedlichen Primärisolaten hatten den Phänotyp des ursprünglichen Primärisolates.

Insgesamt wurden in der Arbeit die V3-Loop Bereiche von vier Primärisolaten in das *env*-Gen des NL4-3 Laborstammes inseriert. Die zwei Primärisolate PI-918 und PI-991 wurden ausgewählt, da sie R5-monotrop waren und sich in der Effizienz der CCR5 Korezeptornutzung stark unterschieden. PI-991 zeigte zehnmal höhere Infektionsraten

auf GHOST-CCR5 Zellen im Vergleich zu PI-918 (Müller, 1999). Das dualtrophe Primärisolat PI-952 war in seinen CCR5 Eigenschaften beiden R5-monotropen Viren unterlegen, konnte jedoch auch GHOST-CXCR4 Zellen mit gleicher Effizienz wie die GHOST-CCR5 Zellen infizieren. Aufgrund der gleichen Effizienz für CCR5 und CXCR4 war dieses Virus ein geeigneter dualtroper Kandidat für die Untersuchungen bezüglich des Einflusses der N-Glycosylierung auf einen Korezeptorwechsel. Das Primärisolat PI-930 war X4-monotrop und zeigte eine Mutation im V3-Loop, die zu einem Fehlen der Glycosylierung an Position g15 im gp120 führte. Damit war ein Primärisolat vorhanden, welches *in vivo* das N-Glycan g15 durch Mutationen verloren hatte. Es eignete sich daher besonders für Untersuchungen über den Einfluss von Rückmutationen, die zu einer Regeneration der N-Glycosylierungsstellen führen.

Durch Übertragung des V3-Bereiches dieser vier Primärisolate in den Hintergrund von NL4-3 wurden Mutanten des NL4-3 mit veränderten Korezeptornutzung hergestellt. Dadurch waren Viren für die Studien zugänglich, die sich nur in der Sequenz des V3-Bereiches unterschieden und gleichzeitig die wichtigsten Korezeptoren nutzten. Basierend auf diesen NL4-3 Mutanten wurden die Glycosylierungsmutanten hergestellt. Es waren Austausche der Aminosäuresequenzen notwendig, um die Erkennungssequenz für die N-Glycosylierung zu zerstören. Bei allen vier X4-, R5- und R5X4-tropen Mutanten des NL4-3 sowie dem originalen NL4-3 Laborstamm wurden durch zielgerichtete Mutagenese die Erkennungssequenzen für N-Glycosylierung im V3-Bereich des gp120 (g13 bis g17) verändert, so dass eine Reihe von Glycomutanten erhalten wurden, die sich in dem Glycosylierungsmuster des V3-Bereiches unterschieden. Eine in der Literatur häufig verwendete Mutation der N-Glycosylierungsstellen ist die Mutation von Asparagin (N) nach Glutamin (Q). Hierdurch wird die Sequenz des N-Glycosylierungsmotives NX(T/S) in die Sequenz QX(T/S) geändert. Eine Glycosylierung an dieser Stelle ist dann nicht mehr möglich, die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren bleiben jedoch weitgehend erhalten. Solch ein Austausch von Asparagin nach Glutamin ist eine oft angewandte Methode zur Untersuchung antigener Epitope, T-Zellepitopen oder für funktionelle Studien, die beweisen wollen, ob eine postulierte Region in einem Protein für dessen Funktion verantwortlich ist. Für die Untersuchungen der Eigenschaften des HIV-1 V3-Loops ergeben sich jedoch Einschränkungen für diese N nach Q Austausch. V3-Loop

Sequenzanalysen, die auf den Sequenzdaten der in dieser Arbeit beschriebenen Primärisolate basieren, sowie von V3-Loop Sequenzen aus der LosAlamos HIV-Datenbank haben gezeigt, dass solch ein Austausch von N nach Q *in vivo* bisher noch nicht gefunden wurde. Es scheint sich bei einem solchen Austausch um eine Aminosäuremutation zu handeln, die in natürlichen HIV-Sequenzen nicht oder nur sehr selten vorkommt. In den von uns charakterisierten Primärisolaten finden sich andere Mutationen, die ebenfalls zu einem Verlust der N-Glycosylierungsstelle an Position g15 führen. Bei diesen Mutationen handelt es sich nicht um konservierte Mutationen, sondern es zeigen sich starke Abweichungen von der NX(T/S)N-Glycosylierungssequenz (z.B. NNNT>YRNA; NNNT>GSTT; NNNT>SIQK; NNNT>HNTV). Aus diesem Grund wurden im NL4-3 Hintergrund Mutanten mit einer fehlenden N-Glycosylierung konstruiert, die diese Aminosäureaustausche besitzen. Die resultierenden NL4-3 Mutanten unterscheiden sich demzufolge nur in der Sequenz der N-Glycosylierungsstelle an g15. Die vier Aminosäuren im Bereich der Glycosylierungsstelle wurden ausgewählt, da Mutationen in diesem Bereich das N-Glycosylierungsmotiv NNT an g15 zerstören können, und gleichzeitig eine neue Sequenz an dieser Position eingefügt werden kann (z.B. NNNT>NNSA). Analysiert man diesen V3-Bereich in der Datenbank, findet sich an Position g15 mit einer Häufigkeit von über 99% eine N-Glycosylierungsstelle. Damit gehört diese N-Glycosylierungsstelle zu den am besten konservierten Glycosylierungsstellen im V3-Bereich.

Alle konstruierten HIV-1 Mutanten wurden in Infektionsstudien mit standardisierten GHOST- oder U87-Indikatorzellen charakterisiert. Darüber hinaus wurde die Neutralisierbarkeit der verschiedenen Glycomutanten durch ein HIV-neutralisierendes Serumgemisch untersucht.

## 5.2 Die N-Glycosylierung des V3-Loops beeinflusst die Interaktion mit den Korezeptoren CXCR4 und CCR5

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die N-Glycosylierung des gp120-V3-Bereiches die Interaktion von HIV-1 mit den Korezeptoren CXCR4 und CCR5 beeinflusst. Dabei zeigte sich, dass vor allem das V3-Loop-Glycan an Position g15 eine unterschiedliche Bedeutung für die CXCR4- und CCR5-Interaktion hat. Die untersuchten CXCR4-tropen Viren NL4-3 und PI-930, konnten CXCR4-exprimierende Zellen effizienter infizieren, wenn das N-Glycan an Position g15 fehlte. Für die CCR5-tropen Viren NL-918 und NL-991 hatte das Fehlen des g15 N-Glycans einen nachteiligen Effekt auf die Replikationsfähigkeit. Das untersuchte R5X4-dualtrophe Virus NL-952 verlor die Fähigkeit, CCR5 als Korezeptor zu nutzen, vollständig, wenn das N-Glycan an Position g15 eliminiert wurde.

Der Laborstamm NL4-3 infizierte CXCR4-Indikatorzellen effizienter, wenn an Position g15 die N-Glycosylierungssequenz NNNT durch die Sequenz GSTT ersetzt wurde. Alle Varianten, denen das N-Glycan an dieser Position fehlte, zeigten außerdem eine Resistenz gegenüber SDF-1, dem natürlichen Liganden von CXCR4. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die Effizienz, mit der das deglycosylierte gp120 CXCR4 nutzen kann, erhöht, während die Anwesenheit des N-Glycans an Position g15 die Interaktion mit CXCR4 zu behindern scheint. Für das untersuchte X4-monotrophe Virus NL-930, das den V3-Bereich des X4-tropen Primärisolates PI-930 trägt, war die Auswirkung des g15-Glycans sehr viel deutlicher. In dem ursprünglichen Primärisolat PI-930, das als CXCR4-trope Variante aus dem Blut eines HIV-1 Patienten isoliert wurde, war die Erkennungssequenz für die N-Glycosylierung an Position g15 durch eine Mutation von NNNT nach YRNA nicht vorhanden. Durch Einführung der YNNT Sequenz in den V3-Loop des NL-930 Virus wurde das N-Glycan an Position g15 eingeführt. Das resultierende, an Position g15 glycosylierte NL-930 Virus, war nicht mehr in der Lage, CXCR4 zur Infektion zu nutzen. Das zeigt, dass das N-Glycan an Position g15 die Interaktion mit dem Korezeptor behindert und zwar so stark, dass die Replikation in CXCR4-Indikatorzellen nicht mehr möglich ist. Wurde die N-Glycosylierungsstelle durch ein Motiv, das dem Motiv für N-Glycosylierung sehr ähnlich ist, aber nicht glycosyliert wird, eliminiert, konnte für die Variante NL-930-g15<sub>QNT</sub> die CXCR4-vermittelte Replikationsfähigkeit wieder hergestellt werden. Dies

zeigt, dass im Fall der NL-930 Varianten nicht die Sequenz an Position g15 diesen deutlichen Einfluß auf die Replikationsfähigkeit hat, sondern vielmehr das N-Glycan die Interaktion mit dem Korezeptor stört.

Das bedeutet, dass sich die g15-Glycosylierung negativ auf die Replikation X4-monotroper Viren auswirkt. Dieser Befund wurde durch andere Arbeiten bestätigt (Li *et al.*, 2001). Die Replikationsfähigkeit des CXCR4-tropen HIV-1-Stammes BRU konnte durch Elimination des g15-Glycans infolge Aminosäureaustausches von NNT nach QNT um 50 % gesteigert werden.

Anders verhält es sich bei der Interaktion zwischen dem V3-Loop und dem zweiten Haupt-Korezeptor, dem CCR5. Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur CCR5-spezifischen Infektion konnte gezeigt werden, dass das N-Glycan an Position g15 die Replikation CCR5-troper Viren steigert. Die untersuchten R5-tropen Virusvarianten NL-918 und NL-991 konnten sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des g15-Glycans auf CCR5-Indikatorzellen replizieren. Im Falle der R5-monotropen Varianten NL-991 wurde die CCR5-spezifische Replikationsfähigkeit durch Elimination des g15-Glycans jedoch reduziert. Verglichen mit diesen NL-991-Varianten konnte bei der CCR5-tropen Variante NL-918 kein Effekt der N-Glycosylierung an Position g15 gezeigt werden. Nakayama *et al.* (1998) und Li *et al.* (2001) konnten für das R5-trope Isolat SF162 ebenfalls keinen Einfluß der N-Glycosylierung im V3-Loop zeigen. Da die in diesen Studien hinsichtlich der V3-Loop-Glycosylierung untersuchten Virusvarianten von unterschiedlichen HIV-1 Isolaten stammten, liegt der Grund für die Unterschiede in den beobachteten Effekten wahrscheinlich in der unterschiedlichen V3-Loop Sequenz der untersuchten Isolate.

Im Gegensatz dazu stellte sich die Bedeutung des N-Glycans an Position g15 für die CCR5-spezifische Infektion besonders deutlich im Falle der R5X4-dualtropen Variante NL-952 dar. Die Infektion von GHOST-CCR5 Zellen mit dem R5X4-dualtropen Virus NL-952 war nur möglich, wenn der V3-Loop an Position g15 glycosyliert war. Fehlte dieses N-Glycan, dann war keine CCR5-spezifische Infektion nachweisbar. Das NL-952-g15 Virus war nur noch in GHOST-CXCR4 Zellen replikationsfähig. Es wurden Arbeiten veröffentlicht, die ebenfalls zeigen, dass ein Fehlen des g15-Glycans zu einem Verlust der CCR5-spezifischen Infektion bei dualtropen Viren führt (Ogert *et al.*, 2001;

Pollakis *et al.*, 2001). In diesen Arbeiten wurde das g15-Glycan bei dem dualtropen HIV-1 Isolat DH12 sowie einer HXB2-Varianten, die V1/2 und V3 Bereiche von Patientenisolaten enthielten, entfernt. Diese Viren waren nach Elimination des g15-Glycans nicht mehr in der Lage, GHOST-CCR5 Zellen zu infizieren. Anders als bei den an g15 mutierten Varianten von NL-952, die CXCR4 unverändert nutzen konnten, war die CXCR4-vermittelte Infektiosität bei den beschriebenen HIV-1 Isolaten um ca. 50% reduziert, wenn dieses N-Glycan eliminiert war. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass das N-Glycan an Position g15 die Interaktion mit CCR5 unterstützt.

Dass sich dieser Effekt des g15-Glycans auf die CCR5-spezifische Infektion bei den untersuchten R5-monotropen Virusvarianten NL-991 und besonders bei NL-918, bei dem nahezu kein Effekt des N-Glycans beobachtet werden konnte, nicht derart ausgeprägt darstellt, kann daran liegen, dass diese Viren besonders gut an CCR5 adaptiert sind, da sie diesen Rezeptor als alleinigen Korezeptor nutzen. Der Einfluss des g15-Glycans auf die CCR5-Interaktion scheint daher weniger stark zu sein.

Die Ergebnisse zeigen, dass das N-Glycan an Position g15 für die Infektion über CCR5 eine völlig andere Bedeutung hat als für die CXCR4 spezifische Infektion. Ein Grund für den beobachteten Effekt kann sein, dass das g15-Glycan direkt an der Bindung mit CCR5 beteiligt ist. In der Arbeitsgruppe von Bernd Meyer an der Universität Hamburg (SFB470, Teilprojekt B2) wurde gezeigt, dass V3-Peptide besser an CCR5 binden, wenn sie glycosyliert sind (unveröffentlichte Ergebnisse).

Neben dem N-Glycan an Position g15 konnte für die CXCR4-spezifische Infektion modulierende Effekte anderer N-Glycane im V3-Bereich gezeigt werden. Wie oben beschrieben, führte die Elimination der N-Glycosylierung an Position g15 zu einer Steigerung der Infektiosität X4-troper Viren. Die zusätzliche Elimination der N-Glycosylierungsstelle an Position g17 führte zu einer weiteren Steigerung der CXCR4-vermittelten Infektiosität. Gleichzeitig wurde auch die Resistenz gegenüber dem CXCR4-Liganden SDF-1 erhöht. Den stärksten Einfluss in Zusammenhang mit dem Fehlen des g15-Glycans hatte die Elimination des Glycans an Position g14. Mutanten ohne die g14/15 Glycane zeigten hohe Infektionsraten und gleichzeitig die höchsten Resistenzwerte gegen die neutralisierende Wirkung des CXCR4-Liganden SDF-1. Dagegen hatte die Elimination des N-Glycans an Position g13 weder alleine noch in

Kombination mit g15 oder g17 einen Einfluß auf die Infektiosität. Auch zeigte g17 alleine keinen Effekt. Die beobachteten Effekte waren immer abhängig von einem Fehlen des N-Glycans an Position g15. Diese Beobachtungen lassen auf einen zusätzlichen Einfluss der N-Glycosylierung an den Positionen g14 und g17 auf die Interaktion mit dem Korezeptor schließen. Die Ergebnisse in dieser Arbeit lassen den Schluß zu, dass der V3-Loop durch das Fehlen des g15-Glycans demaskiert wird und besser mit dem Korezeptor CXCR4 interagieren kann. Eine weitere Demaskierung durch das Fehlen der N-Glycane an den Positionen g14 und g17 kann diesen Effekt noch verstärken.

In der vorliegenden Arbeit führte der Austausch des N-Glycosylierungsmotives NNNT an g15 gegen GSTT zu einer Steigerung der Infektiosität. Wurden die Aminosäuremotive NNI oder NNK eingeführt, wurde eine Verschlechterung der Replikation beobachtet. Dies wurde auch von Nakayama *et al.* (1998) gezeigt. In der Studie von Nakayama und Mitarbeitern wurden ebenfalls HIV-Mutanten mit einer NNI Mutation an Position g15 untersucht und eine leichte Abschwächung der Replikationsfähigkeit festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass für NL4-3 nicht nur die N-Glycosylierung im V3-Bereich sondern auch die Aminosäuresequenz an dieser Position einen Einfluß auf die Infektiosität haben kann. Die negativen Effekte der NNI und NNK-Mutationen an Position g15 können sich damit erklären lassen, dass der V3-Loop durch diese Aminosäuremotive Konformationen einnimmt, die sich negativ auf die Interaktion mit CXCR4 auswirken und die Viren so in ihrer Replikationsfähigkeit einschränken. Für die g15-Mutanten, die an der Position g15 Sequenzmotive von Primärisolaten trugen, die CXCR4 nutzten und an Position g15 nicht glycosyliert waren, wurde kein negativer Effekt der Aminosäuresequenz an Position g15 beobachtet. Die Sequenzmotive an Position g15 bei diesen Viren sind offenbar für die Nutzung des CXCR4-Rezeptor optimiert. Der Effekt, den die Elimination des g15-Glycans auf die Replikationsfähigkeit CXCR4-troper Viren hat, war bei den untersuchten Varianten NL4-3 und CXCR4 unterschiedlich stark ausgeprägt.

Eine Ursache für diese unterschiedlich stark ausgeprägten Effekte von X4-monotropen Viren kann in der Nettoladung des V3-Loops begründet sein. Die Mutante NL-930-g15<sub>QNT</sub>, die in CXCR4-Zellen replizieren konnte, verfügt über eine Nettoladung im V3-Loop von +6, während NL4-3 in diesem Bereich eine Nettoladung von +8 hat. Es

ist bekannt, dass ein stärker positiv geladener V3-Loop mit dem CXCR4-tropen Phänotyp korreliert (Donaldson *et al.*, 1994, Chesebro *et al.*, 1996). Aminosäureaustausche im V3-Loop, durch die die positive Nettoladung erhöht wird, können zu einem Wechsel des viralen Phänotyps von CCR5- zu CXCR4-Tropismus führen (De Jong *et al.*, 1992). Das N-Glycan an Position g15 ist vom komplexen Typ und trägt endständig negativ geladene Sialinsäuren (Zhu *et al.*, 2001). Es ist vorstellbar, dass das N-Glycan durch diese negativen Ladungen Teile der positiven Ladung des V3-Loops maskiert und so die Interaktion mit dem Korezeptor beeinträchtigt. Die Interaktion von CXCR4 mit gp120 findet über Bereiche des N-Terminus und der ersten und zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors statt, die bei CXCR4 eine stärkere negative Ladung aufweisen als bei CCR5 (Chabot *et al.*, 1999). Elektrostatische Wechselwirkungen dieser negativen Bereiche mit dem positiven V3-Loop CXCR4-troper Viren könnten notwendig für die Interaktion sein. Eine Maskierung der positiven Ladung des V3-Loop von NL-930 zerstört unter Umständen die Fähigkeit zur Interaktion zwischen dem V3-Loop und CXCR4. Der V3-Loop von NL4-3 hat verglichen mit dem von NL-930 eine um +2 positivere Nettoladung. Diese zusätzlichen Ladungen könnten dazu beitragen, dass die Interaktion mit CXCR4 trotz des maskierenden N-Glycans möglich ist, eine Elimination des N-Glycans die Interaktion aber noch verstärkt, was sich in der erhöhten Replikationsfähigkeit der an Position g15 unglycosylierten Varianten zeigte.

Für die Interaktion mit CCR5 konnte in dieser Arbeit ein positiver Einfluß des g15-Glycans auf die Infektiosität der dualtropen Variante NL-952 sowie der CCR5-monotropen Varianten NL-991 gezeigt werden. Für die CCR5 Nutzung dualtroper HIV-1 Isolate hat das N-Glycan an Position g15 eine entscheidende Bedeutung. Der dualtrope Phänotyp tritt bei dem Wechsel des viralen Phänotypen im Verlauf der HIV-1 Infektion auf. Dabei spielen Sequenzveränderungen im Bereich des V3-Loops eine entscheidende Rolle (Hu *et al.*, 2000). In diesem Übergangszustand kann das N-Glycan von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der CCR5-Bindung sein, bis eine V3-Sequenz erreicht ist, die eine ausreichend gute CXCR4-Nutzung ermöglicht. Auch Pollakis *et al.*, (2001) konnten anhand der sequentiellen Primärisolate HIV-1<sub>168.1</sub> (CCR5-trop) und HIV-1<sub>168.10</sub> (CXCR4-trop), die in der frühen und der späten Phase der HIV-1 Infektion aus einem Patienten isoliert wurden, zeigen, dass mit zunehmend positiver V3-Ladung der CXCR4-trope Phänotyp unterstützt wird und die Elimination

des g15-Glycans zu einer Zerstörung der CCR5-Nutzung des dualtropen Phänotypen führt.

Bei den untersuchten CCR5-monotropen Isolaten konnte nur für die NL-991 Varianten ein Einfluß der N-Glycosylierung an Position g15 gezeigt werden. Die NL-991-Mutanten, denen das N-Glycan an Position g15 fehlte, zeigten eine deutlich schlechtere Replikation in den GHOST-CCR5-Indikatorzellen als die an Position g15 glycosylierten NL-991. Die NL-918 Varianten replizierten dagegen unabhängig von der V3-Loop Glycosylierung in CCR5-Indikatorzellen. Die in dieser Arbeit untersuchten CCR5-tropen Varianten verfügten beide über eine V3-Loop Nettoladung von +3, weswegen es neben der Ladung des V3-Loops weitere Faktoren geben muss, die die Korezeptornutzung beeinflussen. Neben der Nettoladung beeinflusst auch die Aminosäuresequenz des V3-Loop die Interaktion mit dem Korezeptor. CCR5 interagiert über verschiedene Bereiche der extrazellulären Schleifen mit CCR5-tropen Viren (Doranz *et al.*, 1997). Dies könnte die Unterschiede in den Effekten zwischen NL-991 und NL-918 erklären. Bei NL-991 beeinflusst das N-Glycan die Interaktion mit CCR5. Dabei kann es Konformationen stabilisieren, die für die Interaktion wichtig sind oder negative Ladungen für die Interaktion bzw. zur Abschirmung störender positiver Ladung beitragen. NL-918 interagiert im Gegensatz zu NL-991 offenbar unabhängig von dem N-Glycan an Position g15 mit dem Korezeptor.

In diesem Zusammenhang soll schon einmal auf die Experimente zur Neutralisation eingegangen werden. Im Falle der CCR5-spezifischen Infektion kann man einen Zusammenhang zwischen dem Einfluss des g15-Glycans auf die CCR5 Bindung und der Wirkung neutralisierender Antikörper feststellen: Wenn das g15-Glycan, wie bei NL-952, einen Einfluß auf die Infektiosität hat, dann kann auch ein Einfluß auf die Blockade neutralisierender Antikörper festgestellt werden. Wenn das N-Glycan dagegen, wie bei den NL-918 Varianten, eine geringere Bedeutung für die CCR5-Bindung hatte, dann konnten auch keine Unterschiede im Neutralisationsverhalten gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung könnten Wechselwirkungen des, aufgrund endständiger Sialinsäuren negativ geladenen, N-Glycans mit positiv geladenen Aminosäuren des V3-Loop sein. Es ist bekannt, dass eine hohe Anzahl an positiv geladenen Aminosäuren wie Lysin und Arginin die CXCR4-Bindung fördern (Donaldson *et al.*, 1994). Gerade dualtrophe Viren besitzen meist ca. 4-5 Lysine und

Arginine im V3-Loop. Dies würde eine Interaktion des Zuckers mit den im V3-Loop vorhandenen positiv geladenen Aminosäuren nahelegen. Diese Bindung könnte dann auch verantwortlich für die Blockade der neutralisierenden Antikörper sein. Bei den CCR5-adaptierten Viren ist der V3-Loop meist nur mit 2-3 Lysin- und Arginin-Residuen besetzt. Der Einfluss des g15-Glycans auf die CCR5-Bindung wäre hier geringer. Da es in diesem Fall keine Interaktion zwischen dem N-Glycan und positiven Aminosäuren gibt, wäre auch keine Maskierung des V3-Loop und infolgedessen keine Blockade neutralisierender Antikörper möglich. Diese Theorie deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit und mit den Daten zur CCR5-Bindung aus der neueren Literatur (Malenbaum *et al.*, 2000). Sie muss aber durch weitere Untersuchungen mit NL-Mutanten mit unterschiedlicher Lysin- oder Arginin-Zusammensetzung experimentell gefestigt werden. Bei den CXCR4-spezifischen Viren hat sich ebenfalls gezeigt, dass die Mutanten ohne das N-Glycan an Position g15 sehr gut neutralisiert werden. Diese Daten würden sich ebenfalls mit dem vorgeschlagenen Modell erklären lassen, da bei allen diesen X4-tropen Mutanten eine hohe positive Ladung im V3-Loop vorhanden war. Damit könnte auch bei den X4-tropen Viren das g15-Glycan eine bedeutende Rolle für die Wechselwirkungen zwischen dem g15-Glycan und dem V3-Loop und für den Schutz vor neutralisierenden Antikörpern besitzen.

Zusammenfassend betrachtet ist die Rolle des N-Glycans an Position g15 für die CXCR4-spezifische Infektion grundlegend verschieden von der der CCR5-spezifischen Infektion. Bei der Bindung an CXCR4 scheint das g15-Glycan die Korezeptor-Interaktion zu behindern, während die Bindung an CCR5 durch das N-Glycan an Position g15 verstärkt wird.

### **5.3 Einfluss des g15-Glycans auf die Bindung neutralisierender Antikörper**

Neben dem Korezeptor binden auch Antikörper an den V3-Loop des gp120. Der V3-Loop stellt die Haupt-Neutralisationsdomäne des HIV-1 Oberflächenproteins gp120 dar (Javaherian *et al.*, 1989). Ein Großteil (ca. 40 %) der in Serum von HIV-1 infizierten Patienten auftretenden HIV-1 spezifischen Antikörper ist gegen das V3-Epitop gerichtet (Spear *et al.*, 1994). Die von diesem Epitop induzierten Antikörper wurden als die anti-HIV Antikörper mit dem größten Neutralisationspotential identifiziert (D'Souza *et al.*, 1991). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion, ähnlich

der Interaktion mit dem Korezeptor, durch das N-Glycan an Position g15 beeinflusst wird. Für NL4-3, NL-952 und NL-991 konnte ein protektiver Effekt des N-Glycans an Position g15 gezeigt werden. Diese Virusvarianten konnten in Anwesenheit von HIV-1 neutralisierenden Antikörpern besser replizieren, wenn sie an Position g15 glycosyliert waren, während die an Position g15 nicht glycosylierten Mutanten wesentlich schlechter oder überhaupt nicht replizierten. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen aus verschiedenen Studien, in denen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die schützende Wirkung des g15 N-Glycans gezeigt werden konnte (Schonning *et al.*, 1996a/b; Malenbaum *et al.*, 2000; Cheng-Mayer *et al.*, 1999). Es wird postuliert, dass das N-Glycan zum einen die antigenen Epitope des V3-Loops maskiert, zum anderen aber auch die Konformation des V3-Loop beeinflusst. Eine infolge von Änderungen in der N-Glycosylierung veränderte V3-Konformation kann dazu führen, dass die V3-Antikörper besser an ihre Epitope binden können (Back *et al.*, 1994).

Der Umstand, dass es sich bei den untersuchten Varianten um Viruschimären handelte, die lediglich den V3-Bereich der CCR5-tropen Primärisolate in dem Hintergrund des Laborstammes NL4-3 enthielten, zeigt, dass die beobachteten Effekte V3-spezifisch sind. CCR5-trope Viren haben eine Konformation, in der der V3-Loop verborgener liegt als bei T-Zell-adaptierten HIV-1 Stämmen (Bou-Habib *et al.*, 1994). Die hier verwendeten CCR5-tropen Viruschimären haben in dem Hintergrund des T-Zell adaptierten Laborstammes NL4-3 vermutlich einen exponierteren V3-Loop als CCR5-trope Primärisolate, weswegen antigene Epitope, die in der Konformation des Primärisolates PI-918 verdeckt liegen und durch das N-Glycan maskiert sind, in der offeneren Konformation der NL-918 Chimäre trotz des N-Glycans zugänglich sind. Dies kann, neben der in Kapitel 5.2 beschriebenen fehlenden Wechselwirkung zwischen dem N-Glycan und dem V3-Loop von NL-918, erklären, warum bei diesen Varianten kein Einfluß des N-Glycans auf die Neutralisierbarkeit durch HIV-1 Positivserum beobachtet werden konnte. Für das Virus spielt N-Glycosylierung im Bereich des V3-Loop eine wichtige Rolle für den Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *in vivo* und *in vitro* unter selektivem Druck von Antikörpern Virusvarianten selektiert werden, die eine erhöhte Anzahl an N-Glycosylierung im V3-Loop haben (Wolfs *et al.*, 1990; Cheng-Mayer *et al.*, 1999, Schonning *et al.*, 1996). Auch für SIV konnte eine Rückmutation von N-

Glycosylierungsstellen in der Hauptneutralisationsdomäne des SIV, dem V1-Loop, wenige Wochen nach der Infektion der Affen beobachtet werden (Chackerian *et al.*, 1997; Reitter *et al.*, 1998). Die Abwesenheit dieser N-Glycosylierungsstellen steigert die Immunogenität dieser Viren *in vivo* deutlich (Reitter *et al.*, 1998). Neben SIV ist auch für Influenza- und Rotaviren der Einfluss von N-Glycosylierungen auf die Sensitivität gegenüber Neutralisation beschrieben (Caust *et al.*, 1987; Skehel *et al.*, 1984).

#### 5.4 N-Glycosylierung und Pathogenese

Bei HIV-1 ist das g15-Glycan der CCR5-tropen Viren verglichen mit CXCR4- und dualtropen Viren hochkonserviert (LaRosa *et al.*, 1990; Hung *et al.*, 1999; Trouplin *et al.*, 2000). In der frühen Phase der HIV-1 Infektion findet man im peripheren Blut vor allem CCR5-trope Virusvarianten. Erst in der späten Phase der Erkrankung kommt es zum Auftreten R5X4-dualtroper und X4-monotroper Virusvarianten (Scarlatti *et al.*, 1997, Björndal *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich Viren ohne das g15-Glycan wesentlich besser neutralisieren ließen. Dies bedeutet, dass Antikörper durch die N-Glycosylierung an Position g15 blockiert werden. Dies kann erklären, warum die Erkennungssequenz für die g15-Glycosylierung gerade bei R5-tropen Viren so stark konserviert ist. Viren, die ein N-Glycan im V3-Loop tragen, schützen sich vor der humoralen Immunabwehr. Die Rolle, die die N-Glycosylierung des V3-Loop für die HIV-Pathogenese haben kann, könnte wie folgt beschrieben werden:

In einem neu HIV-infizierten Patienten ist das Immunsystem noch nicht geschädigt. Innerhalb der übertragenen Viruspopulation, die sich aus einer Vielzahl von verschiedenen Varianten, der sog. Quasispezies zusammensetzt, können daher nur solche Viren frei im Organismus zirkulieren, die sich dem Immunsystem entziehen oder sich entsprechend schützen. Diese Viren haben einen selektiven Vorteil. Dabei spielt das N-Glycan im V3-Loop eine wesentliche Rolle. Es schützt die Viren vor der Neutralisation durch Antikörper. Viren, deren V3-Loop nicht durch N-Glycane maskiert ist, haben außerdem eine stärkere immunogene und antigene Wirkung. Dies würde gerade im noch symptomfreien HIV-Infizierten, der noch über ein funktionierendes Immunsystem verfügt, eine Immunabwehr gegen die unmaskierten (-)g15 Mutanten

induzieren. Das bedeutet, dass (-)g15-Mutanten durch exponierte Epitope zum einen in höherem Maße die Antikörperantwort induzieren und zum anderen leichter neutralisiert werden. Solange das Immunsystem in der Lage ist, die Infektion zu kontrollieren, haben diese Viren im Vergleich zu den maskierten, V3-glycosylierten Viren, keine Chance, zu replizieren. Für den Verlauf der HIV-Erkrankung bedeutet das, dass erst mit zunehmender Schwächung des Immunsystems und dem Verlust der zellulären und humoralen HIV-spezifischen Immunabwehr die CXCR4- und dualtropen Phänotypen eine Chance haben. Es ist bekannt, dass es in der späten Phase der Infektion zum Verlust HIV-neutralisierender Antikörper im Patienten kommt (Schreiber et al., 1994, 1996, 1997). In dieser späten Phase können die Viren, deren V3-Loops nicht durch N-Glycane maskiert sind, frei replizieren. Da sie aufgrund des unmaskierten V3-Loops besser mit CXCR4 interagieren können, haben diese innerhalb der viralen Quasispezies einen selektiven Vorteil gegenüber den Viren, deren V3-Loop durch N-Glycane maskiert sind. Die Selektion erfolgt nach Zerstörung des Immunsystems nicht mehr über die antigenen Eigenschaften der Viren, sondern über die Rezeptoraffinität und zunehmende Replikationsfähigkeit.

Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtungen, die in dieser Arbeit mit deglycosylierten Viren gemacht wurden, die an Position g15 Aminosäuresequenzen verschiedener CXCR4-nutzender Viren trugen. Diese Virusvarianten, die an Position g15 nicht glycosyliert waren und deren Aminosäuresequenzen an Position g15 deutlich unterschiedlich von der konservierten Sequenz NNNT war, replizierten in Anwesenheit HIV-1 neutralisierender Antikörper besser als die an Position g15 unglycosylierten Varianten, deren Aminosäuresequenzen an Position sich kaum von dem konservierten Motiv NNT unterschieden. So wurde die Mutanten NL4-3-g15<sub>NNI</sub> und -g15<sub>NNK</sub> auch mit hohen Serumverdünnungen zu 50 % bzw. vollständig neutralisiert, während die Mutanten NL4-3-g15<sub>GSTT</sub>, NL4-3-g15<sub>HNTV</sub>, NL4-3-g15<sub>SIQK</sub> und NL4-3-g15<sub>YRNA</sub> auch durch 10-fach höhere Serumkonzentrationen nur teilweise neutralisiert werden konnten. Im Hintergrund des V3-Loop von PI-930 wird der Einfluß der Sequenz an Position g15 noch deutlicher. Die Elimination der N-Glycosylierung an Position g15 durch den Aminosäureaustausch NNT nach QNT führte zu einer vollständigen Neutralisation, während Varianten mit dem Sequenzmotiv YRNA an Position g15 resistent gegenüber Neutralisation durch das HIV-1 Positivserum waren. Dies zeigt, dass sich in HIV-

Patienten bestimmte Viren, die im V3-Loop nicht glycosyliert sind, dem Immunsystem entziehen können. Die Daten aus der Dissertation von Harm Müller (1999) zeigen, dass solche Viren aus dem peripheren Blut von HIV-1-Patienten angezüchtet werden konnten. Vor allem die Viren, die CXCR4 nutzen konnten und auffällige Aminosäureaustausche in der V3-Loop Region zeigten, wurden nicht mehr von autologem Serum neutralisiert. Es handelt sich also um eine Demaskierung des V3-Loops, die zu einer besseren CXCR4-Bindung führt und gleichzeitig um eine Sequenzvariationen in den antigenen Epitopen, gegen die keine Antikörper mehr gebildet werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die N-Glycosylierung des V3-Loop sowohl die Interaktion mit den HIV-1 Korezeptoren als auch die Neutralisation der Viren durch V3-gerichtete Antikörper beeinträchtigt. Die Bedeutung der Aminosäuresequenz an der Position g15 für den ‚*Immune-escape*‘ konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden.

Durch die Möglichkeit, V3-Bereiche von verschiedenen Primärisolaten problemlos in den genetisch stabilen Hintergrund eines gut charakterisierten HIV-1 Laborstammes zu übertragen und damit den Phänotypen des jeweiligen Primärisolates zu erhalten, konnte eine Reihe von Virusvarianten auf den Einfluß der N-Glycosylierung hin untersucht werden. Diese Methode hat den Vorteil, dass die beobachteten Effekte spezifisch den definierten Veränderungen im V3-Loop zugeordnet werden können, da die Varianten in allen anderen Bereichen identisch sind.

Mit diesen Virusvarianten ist es gelungen, die Bedeutung der N-Glycosylierung im Bereich des V3-Loops in weiten Teilen aufzuklären. Die hergestellten rekombinanten Virusvarianten stehen zur Verfügung, um auch anderen Fragestellungen, die die Interaktion zwischen dem gp120 und den HIV-1 Korezeptoren betreffen, nachzugehen. Die Interaktion zwischen gp120 und dem Korezeptor ist ein elementarer Schritt der HIV-Infektion und ein vielversprechender Ansatzpunkt um neue HIV-1 Inhibitoren, die die Infektion auf dieser Ebene verhindern können, zu identifizieren.

## 6 Zusammenfassung

Die dritte variable Schleife des HIV-1 Oberflächenproteins gp120, der V3-Loop, spielt eine wichtige Rolle für die HIV-1 Infektion. Der V3-Loop determiniert die Nutzung der beiden Haupt-Korezeptoren CXCR4 und CCR5 und bestimmt somit den viralen Phänotyp. Der V3-Loop stellt darüber hinaus die Haupt-Neutralisationsdomäne des gp120 dar.

Die Funktionen des gp120 werden von N-Glycanen auf dem Hüllprotein beeinflusst. Fünf der ca. 25 potentiellen N-Glycosylierungsstellen des gp120 befinden sich im Bereich des V3-Loop (g13 bis g17). In der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung der V3-Glycane für die Infektiosität und Neutralisationseigenschaften von HIV-1 in weiten Teilen aufgeklärt werden. Es wurden zunächst rekombinante Virusvarianten mit unterschiedlicher Korezeptornutzung hergestellt. Diese Varianten trugen in dem genetischen Hintergrund des HIV-1 Laborstammes NL4-3 die V3-Bereiche von HIV-1 Primärisolaten (PI) mit unterschiedlichen Phänotypen. Die Varianten NL-918 und NL-991 waren R5-trop, die Variante NL-930 X4-trop. Die Variante NL-952 war R5X4-dualtrop. Durch zielgerichtete Mutagenese wurden die Erkennungssequenzen der N-Glycosylierung NXS und NXT im V3-Bereich dieser NL-Varianten modifiziert und so eine Reihe von Glycomutanten hergestellt. Mit diesen Glycomutanten wurden standardisierte GHOST- und U87-Korezeptorzelllinien infiziert und die Infektions- und Replikationseigenschaften in Abhängigkeit von der V3-Glycosylierung untersucht. Die Viren wurden außerdem auf Neutralisierbarkeit durch ein HIV-1 neutralisierendes Serumgemisch untersucht.

Anhand der X4-tropen Virusvarianten NL4-3 und NL-930 konnte gezeigt werden, dass das N-Glycan an Position g15 die Interaktion zwischen dem V3-Loop und CXCR4 stört. Dagegen wurde bei den R5-tropen NL-991 Varianten und den R5X4-dualtropen NL-952 Varianten die Interaktion zwischen CCR5 und dem V3-Loop durch das g15-Glycan unterstützt. Für die Variante NL-918 konnte kein deutlicher Unterschied der Infektiosität in Abhängigkeit von der V3-Loop Glycosylierung beobachtet werden. Durch Untersuchungen mit dem HIV-1 neutralisierenden Serum konnte gezeigt werden, dass an g15 glycosylierte Varianten schlechter neutralisiert wurden, als Varianten, denen das N-Glycan an Position g15 fehlt. Neben der Maskierung der antigenen Epitope durch das g15-Glycan konnte auch der ‚immune Escape‘ infolge von Mutationen in der

Aminosäuresequenz an Position g15 gezeigt werden. Dafür wurden an Position g15 in NL4-3 kurze Aminosäuresequenzen, die an Position g15 von CXCR4-nutzenden, neutralisationsresistenten Primärisolaten auftraten, inseriert. Diese Mutanten konnten trotz fehlender g15-Glycosylierung durch das HIV-1 neutralisierende Serum wesentlich schlechter inhibiert werden, als Varianten, deren N-Glycosylierungsmotiv an Position g15 durch Aminosäuresequenzen eliminiert wurden, die dem konservierten Motiv NNNT ähnlich waren.

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die N-Glycosylierung an Position g15 die Replikationseigenschaften von CXCR4 und CCR5-tropen Viren in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das N-Glycan und die Aminosäuresequenz an Position g15 die Neutralisierbarkeit von HIV-1 beeinflussen. Die N-Glycosylierung des V3-Bereiches hat somit eine wichtige Bedeutung für die HIV-1 Infektion.

## 7 Literatur

- Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59:284-91
- Allan JS, Coligan JE, Barin F, McLane MF, Sodroski JG, Rosen CA, Haseltine WA, Lee TH, Essex M. 1985. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* 228:1091-4
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272:1955-8
- Balter M. 1999. HIV. French-led therapy fund kicks off in Africa. *Science* 284:1101
- Back NK, Smit L, De Jong JJ, Keulen W, Schutten M, Goudsmit J, Tersmette M. 1994. An N-glycan within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop affects virus neutralization. *Virology* 199:431-8
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-71
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657-700
- Berson JF, Long D, Doranz BJ, Rucker J, Jirik FR, Doms RW. 1996. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 70:6288-95
- Bjorndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, Albert J, Scarlatti G, Littman DR, Fenyo EM. 1997. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* 71:7478-87

- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*;2:95-113
- Bou-Habib DC, Roderiquez G, Oravec T, Berman PW, Lusso P, Norcross MA. 1994. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J Virol* 68:6006-13
- Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM. 1987. Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* 49:347-56
- Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. 1990. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* 249:1555-8
- Caust J, Dyall-Smith ML, Lazdins I, Holmes IH. 1987. Glycosylation, an important modifier of rotavirus antigenicity. *Arch Virol* 96:123-34
- Cecilia D, KewalRamani VN, O'Leary J, Volsky B, Nyambi P, Burda S, Xu S, Littman DR, Zolla-Pazner S. 1998. Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates in the context of coreceptor usage. *J Virol* 72:6988-96
- Chabot DJ, Zhang PF, Quinnan GV, Broder CC. 1999. Mutagenesis of CXCR4 identifies important domains for human immunodeficiency virus type 1 X4 isolate envelope-mediated membrane fusion and virus entry and reveals cryptic coreceptor activity for R5 isolates. *J Virol* 73:6598-609
- Chackerian B, Rudensey LM, Overbaugh J. 1997. Specific N-linked and O-linked glycosylation modifications in the envelope V1 domain of simian immunodeficiency virus variants that evolve in the host alter recognition by neutralizing antibodies. *J Virol* 71:7719-27

- Chen Z, Kwon D, Jin Z, Monard S, Telfer P, Jones MS, Lu CY, Aguilar RF, Ho DD, Marx PA. 1998. Natural infection of a homozygous delta24 CCR5 red-capped mangabey with an R2b-tropic simian immunodeficiency virus. *J Exp Med* 188:2057-65
- Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, Levy JA. 1988. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* 240:80-2
- Cheng-Mayer C, Brown A, Harouse J, Luciw PA, Mayer AJ. 1999. Selection for neutralization resistance of the simian/human immunodeficiency virus SHIVSF33A variant in vivo by virtue of sequence changes in the extracellular envelope glycoprotein that modify N-linked glycosylation. *J Virol* Jul;73:5294-300
- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85:1135-48
- Choe H, Farzan M, Konkel M, Martin K, Sun Y, Marcon L, Cayabyab M, Berman M, Dorf ME, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. 1998. The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72:6113-8
- Cheng-Mayer C, Quiroga M, Tung JW, Dina D, Levy JA. 1990. Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 T-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity, and CD4 antigen modulation. *J Virol* 64:4390-8
- Chiou SH, Freed EO, Panganiban AT, Kenealy WR. 1992. Studies on the role of the V3 loop in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein function. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8:1611-8
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P. 1996. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 2:1244-7

- Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD. 1993. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 67:1772-7
- Connor RI, Ho DD. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virol* 68:4400-8
- Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-7
- De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 66:6777-80
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661-6
- Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. 1997. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 388:296-300
- Donaldson YK, Bell JE, Holmes EC, Hughes ES, Brown HK, Simmonds P. 1994. In vivo distribution and cytopathology of variants of human immunodeficiency virus type 1 showing restricted sequence variability in the V3 loop. *J Virol* 68:5991-6005
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85:1149-58

- Doranz BJ, Lu ZH, Rucker J, Zhang TY, Sharron M, Cen YH, Wang ZX, Guo HH, Du JG, Accavitti MA, Doms RW, Peiper SC. 1997. Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71:6305-14
- Feizi T, Larkin M. 1990. AIDS and glycosylation. *Glycobiology* 1:17-23
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-7
- Fenouillet E, Clerget-Raslain B, Gluckman JC, Guetard D, Montagnier L, Bahraoui E. 1989. Role of N-linked glycans in the interaction between the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its CD4 cellular receptor. Structural enzymatic analysis. *J Exp Med* 169:807-22
- Fenouillet E, Gluckman JC, Bahraoui E. 1990. Role of N-linked glycans of envelope glycoproteins in infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 64:2841-8
- Fenouillet E, Gluckman JC. 1991. Effect of a glucosidase inhibitor on the bioactivity and immunoreactivity of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Gen Virol* 72 :1919-26
- Fenyö EM, Morfeldt-Manson L, Chiodi F, Lind B, von Gegerfelt A, Albert J, Olausson E, Asjo B. 1988. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol* 62:4414-9
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-3
- Gavel Y, von Heijne G. 1990. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* 3:433-42

- Geyer H, Holschbach C, Hunsmann G, Schneider J. 1988. Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. *J Biol Chem* 263:11760-7
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-80
- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK. 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16:7351-67
- Hu QX, Barry AP, Wang ZX, Connolly SM, Peiper SC, Greenberg ML. 2000. Evolution of the human immunodeficiency virus type 1 envelope during infection reveals molecular corollaries of specificity for coreceptor utilization and AIDS pathogenesis. *J Virol* 74:11858-72
- Hung CS, Vander Heyden N, Ratner L. 1999. Analysis of the critical domain in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 involved in CCR5 utilization. *J Virol* 73:8216-26
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-8
- Javaherian K, Langlois AJ, McDanal C, Ross KL, Eckler LI, Jellis CL, Profy AT, Rusche JR, Bolognesi DP, Putney SD, et al. 1989. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6768-72
- Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Nugeyre MT, Danquet C, Vilmer E, Griscelli C, Brun-Veziret F, Rouzioux C, Gluckman JC, Chermann JC, et al. 1984a. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science* 225:59-63
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. 1984b. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312:767-8

- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648-59
- Landt O, Grunert HP, Hahn U. 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* 96:125-8
- LaRosa GJ, Davide JP, Weinhold K, Waterbury JA, Profy AT, Lewis JA, Langlois AJ, Dreesman GR, Boswell RN, Shadduck P, et al. 1990. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* 249:932-5
- Lasky LA, Groopman JE, Fennie CW, Benz PM, Capon DJ, Dowbenko DJ, Nakamura GR, Nunes WM, Renz ME, Berman PW. 1986. Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein. *Science* 233:209-12
- Lee WR, Syu WJ, Du B, Matsuda M, Tan S, Wolf A, Essex M, Lee TH. 1992. Nonrandom distribution of gp120 N-linked glycosylation sites important for infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2213-7
- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 265:10373-82
- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225:840-2
- Levy, JA. 1998. HIV and the Pathogenesis of AIDS, Second Edition, ASM Press, Washington D.C., USA

- Li Y, Rey-Cuille MA, Hu SL. 2001. N-linked glycosylation in the V3 region of HIV type 1 surface antigen modulates coreceptor usage in viral infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:1473-9
- Li Y, Luo L, Rasool N, Kang CY. 1993. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J Virol* 67:584-8
- Liedtke S, Adamski M, Geyer R, Pfutzner A, Rubsamen-Waigmann H, Geyer H. 1994. Oligosaccharide profiles of HIV-2 external envelope glycoprotein: dependence on host cells and virus isolates. *Glycobiology* 4:477-84
- Liedtke S, Geyer R, Geyer H. 1997. Host-cell-specific glycosylation of HIV-2 envelope glycoprotein. *Glycoconj J* 14:785-93
- Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47:333-48
- Malenbaum SE, Yang D, Cavacini L, Posner M, Robinson J, Cheng-Mayer C. 2000. The N-terminal V3 loop glycan modulates the interaction of clade A and B human immunodeficiency virus type 1 envelopes with CD4 and chemokine receptors. *J Virol* 74:11008-16
- Mizuochi T, Spellman MW, Larkin M, Solomon J, Basa LJ, Feizi T. 1988. Carbohydrate structures of the human-immunodeficiency-virus (HIV) recombinant envelope glycoprotein gp120 produced in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem J* 254:599-603
- Modrow S, Hahn BH, Shaw GM, Gallo RC, Wong-Staal F, Wolf H. 1987. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol* 61:570-8
- Modrow S, Falke D. 1997. *Molekulare Virologie*, Spektrum Verlag GmbH, Heidelberg

- Moore JP, Sodroski J. 1996. Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *J Virol* 70:1863-72
- Müller, Harm, 1999. Geno- und Phänotypische Charakterisierung von neutralisationsresistenten HIV-1 Patienten-Isolaten und deren bedeutung für den Verlauf der Erkrankung Dissertation im Fachbereich der Universität Bremen,
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52:145-76
- Nakayama EE, Shioda T, Tatsumi M, Xin X, Yu D, Ohgimoto S, Kato A, Sakai Y, Ohnishi Y, Nagai Y. 1998. Importance of the N-glycan in the V3 loop of HIV-1 envelope protein for CXCR-4- but not CCR-5-dependent fusion. *FEBS Lett* 426:367-72
- Ogert RA, Lee MK, Ross W, Buckler-White A, Martin MA, Cho MW. 2001. N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J Virol* 75:5998-6006
- Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA. 2001. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* 276:13433-41
- Rabehi L, Seddiki N, Benjouad A, Gluckman JC, Gattegno L. 1998. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein V3 loop with CCR5 and CD4 at the membrane of human primary macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14:1605-15

- Reeves JD, McKnight A, Potempa S, Simmons G, Gray PW, Power CA, Wells T, Weiss RA, Talbot SJ. 1997. CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): use of the 7-transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3, and V28 for entry. *Virology* 231:130-4
- Reitter JN, Desrosiers RC. 1998. Identification of replication-competent strains of simian immunodeficiency virus lacking multiple attachment sites for N-linked carbohydrates in variable regions 1 and 2 of the surface envelope protein. *J Virol* 72:5399-407
- Rucker J, Edinger AL, Sharron M, Samson M, Lee B, Berson JF, Yi Y, Margulies B, Collman RG, Doranz BJ, Parmentier M, Doms RW. 1997. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 71:8999-9007
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91
- Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, Hattori T, Uchiyama T. 1998. T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J Virol* 72:9763-70
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*; 24:104-8
- Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, Fredriksson R, Colognesi C, Deng HK, Malnati MS, Plebani A, Siccardi AG, Littman DR, Fenyo EM, Lusso P. 1997. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* 3:1259-65

- Schonning K, Jansson B, Olofsson S, Hansen JE. 1996a. Rapid selection for an N-linked oligosaccharide by monoclonal antibodies directed against the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 77 :753-8
- Schonning K, Jansson B, Olofsson S, Nielsen JO, Hansen JS. 1996b. Resistance to V3-directed neutralization caused by an N-linked oligosaccharide depends on the quaternary structure of the HIV-1 envelope oligomer. *Virology* 218:134-40
- Schreiber M, Petersen H, Wachsmuth C, Muller H, Hufert FT, Schmitz H. 1994. Antibodies of symptomatic human immunodeficiency virus type 1-infected individuals are directed to the V3 domain of noninfectious and not of infectious virions present in autologous serum. *J Virol* 68:3908-16
- Schreiber M, Wachsmuth C, Muller H, Hagen C, Schmitz H, van Lunzen J. 1996. Loss of antibody reactivity directed against the V3 domain of certain human immunodeficiency virus type 1 variants during disease progression. *J Gen Virol* 77:2403-14
- Schreiber M, Muller H, Wachsmuth C, Laue T, Hufert FT, Van Laer MD, Schmitz H. 1997. Escape of HIV-1 is associated with lack of V3 domain-specific antibodies in vivo. *Clin Exp Immunol* 107:15-20
- Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. 1991. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* 349: 167-9
- Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, 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* 4:1032-7
- Skehel JJ, Stevens DJ, Daniels RS, Douglas AR, Knossow M, Wilson IA, Wiley DC. 1984. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1779-83

- Sonza S, Burgess SH, Crowe SM. 1991. Direct quantification of HIV-1 infectivity for monocyte-macrophages using an infectious focus assay. *AIDS* 5:571-4
- Spear GT, Takefman DM, Sharpe S, Ghassemi M, Zolla-Pazner S. 1994. Antibodies to the HIV-1 V3 loop in serum from infected persons contribute a major proportion of immune effector functions including complement activation, antibody binding, and neutralization. *Virology* 204:609-15
- Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, de Goede RE, Lange JM, Schellekens PT, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F. 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* 63:2118-25
- Trouplin V, Salvatori F, Cappello F, Obry V, Brelot A, Heveker N, Alizon M, Scarlatti G, Clavel F, Mammano F. 2001. Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J Virol* 75:251-9
- UNAIDS/WHO.2001. AIDS epidemic update December 2001. UNAIDS/01.74EWHO /CDS/CSR/NCS/2001.2 ISBN 92-9173-132-3
- Veronese FD, DeVico AL, Copeland TD, Oroszlan S, Gallo RC, Sarngadharan MG. 1985. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* 229:1402-5
- Vödrös D, Tscherning-Casper C, Navea L, Schols D, deClerq E and Fenyö M. 2001. Quantitative Evaluation of HIV-1 Coreceptor Use in the GHOST(3) Cell Assay. *Virology* 291:1-11
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ and Wiley DC. 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387:426 30

- Willey RL, Smith DH, Lasky LA, Theodore TS, Earl PL, Moss B, Capon DJ, Martin MA. 1988. In vitro mutagenesis identifies a region within the envelope gene of the human immunodeficiency virus that is critical for infectivity. *J Virol* 62:139-47
- Wolfs TF, de Jong JJ, Van den Berg H, Tijnagel JM, Krone WJ, Goudsmit J. 1990. Evolution of sequences encoding the principal neutralization epitope of human immunodeficiency virus 1 is host dependent, rapid, and continuous. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9938-42
- Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393:705-11
- Yonezawa A, Hori T, Takaori-Kondo A, Morita R, Uchiyama T. 2001. Replacement of the V3 region of gp120 with SDF-1 preserves the infectivity of T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75:4258-67
- Zhu X, Borchers C, Bienstock RJ, Tomer KB. 2000. Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry* 39:11194-204

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

<b>μ</b>	mikro
<b>A</b>	Adenin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AIDS</b>	Erworbenes Immunschwächesyndrom
<b>Amp.</b>	Ampicillin
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>C</b>	Cytosin
<b>cDNA</b>	revers transkribierte DNA
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DMEM</b>	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSA</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>E</b>	Extinktion
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
<b>engl.</b>	englisch
<b>Env, <i>env</i></b>	engl. <i>envelope</i> ; Hüllprotein, Gen für das Hüllprotein
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>et al.</b>	lat. <i>et alii</i> , und andere
<b>FACS</b>	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
<b>ffu</b>	engl. <i>foci forming unit</i>
<b>FKS</b>	Fötale Kälberserum
<b>g</b>	Gramm, Erdbeschleunigung
<b>G</b>	Guanin
<b>Gag, <i>gag</i></b>	engl. <i>group specific antigen</i> , virale Strukturproteine; Gen für virale Strukturproteine

<b>gp</b>	Glycoprotein
<b>h</b>	Stunde
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienzvirus
<b>IN</b>	Integrase
<b>l</b>	Liter
<b>lat.</b>	lateinisch
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>m</b>	milli
<b>M</b>	Molar
<b>MA</b>	Matrix
<b>min</b>	Minute
<b>mRNA</b>	engl. <i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
<b>M-trope</b>	Makrophagen-trope
<b>n</b>	nano
<b>NC</b>	Nucleocapsid
<b>Nef, nef</b>	engl. <i>negative factor</i> , Gen des Nef
<b>NSI</b>	nicht Synzytium induzierend
<b>NT</b>	Neutralisationstest
<b>p</b>	pico
<b>p24</b>	Kapsid Protein
<b>PBMC</b>	mononukleäre Zellen des periphären Blutes
<b>PBL</b>	Periphere Blutlymphozyten
<b>PBS</b>	engl. <i>Phosphate buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion
<b>PND</b>	Prinzipielle Neutralisations Domäne
<b>Pol, pol</b>	Polymeraseproteine PR, RT, IN, Gen der Polymeraseproteine
<b>Pos.</b>	Position
<b>PR</b>	Protease
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RPMI</b>	Rosewell Park Memorial Institute
<b>RT</b>	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase

<b>SI</b>	Synzytium-induzierend
<b>sog.</b>	sogenannt
<b>T</b>	Thymin
<b>Tat, tat</b>	engl. <i>transactivator of transcription</i> , Gen des Tat-Proteins
<b>TCID<sub>50</sub></b>	engl. <i>50%-Tissue Culture Infectious Dose</i>
<b>TM</b>	Transmembranglycoprotein
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>T-trope</b>	T-zell-trope
<b>U</b>	engl. <i>Unit</i> , Einheit
<b>ÜN</b>	Über Nacht
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>V1-V5</b>	variable Regionen 1-5 des gp120
<b>Verd.</b>	Verdünnung
<b>Viv</b>	engl. <i>viral infectivity factor</i>
<b>Vpr</b>	engl. <i>viral protein r</i>
<b>Vpu</b>	engl. <i>viral protein u</i>
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

### 8.1.1 Aminosäuren

<b>A</b>	<b>Ala</b>	Alanin	<b>M</b>	<b>Met</b>	Methionin
<b>C</b>	<b>Cys</b>	Cystein	<b>N</b>	<b>Asn</b>	Asparagin
<b>D</b>	<b>Asp</b>	Aspartat	<b>P</b>	<b>Pro</b>	Prolin
<b>E</b>	<b>Glu</b>	Glutamat	<b>Q</b>	<b>Gln</b>	Glutamin
<b>F</b>	<b>Phe</b>	Phenylalanin	<b>R</b>	<b>Arg</b>	Arginin
<b>G</b>	<b>Gly</b>	Glycin	<b>S</b>	<b>Ser</b>	Serin
<b>H</b>	<b>His</b>	Histidin	<b>T</b>	<b>Thr</b>	Threonin
<b>I</b>	<b>Ile</b>	Isoleucin	<b>V</b>	<b>Val</b>	Valin
<b>K</b>	<b>Lys</b>	Lysin	<b>W</b>	<b>Trp</b>	Tryptophan
<b>L</b>	<b>Leu</b>	Leucin	<b>Y</b>	<b>Tyr</b>	Tyrosin

## 8.2 Veröffentlichungen

S. Polzer, M.T. Dittmar, H.Schmitz, B.Meyer, H.Müller, H.-G. Kräusslich and M. Schreiber. 2001. Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology*.11:1-9.

S. Polzer, M.T. Dittmar, H.-G. Kraeusslich, B. Meyer, H. Schmitz and M. Schreiber. (2000). ,Analysis of HIV-1 NL4-3 mutants differing in gp120 glycosylation: The role of V3 loop carbohydrates on infectivity and CXCR4-dependent fusion‘ *Novel Biological Approaches to HIV-1 Infection Based on New Insights into HIV Biology*‘, Keystone, Colorado, im April 2000. (Posterbeitrag)

S. Polzer, M.T. Dittmar, H.-G. Kraeusslich, B. Meyer, H. Schmitz and M. Schreiber. (2001). ,Role of V3 loop carbohydrates for HIV-1 infectivity and coreceptor usage‘ *HIV-Pathogenesis*, Keystone, Colorado, im April 2001. (Posterbeitrag)

S. Polzer, M.T. Dittmar, H.-G. Kraeusslich, H. Schmitz, B. Meyer and M. Schreiber. (2000). ,Analysis of HIV-1 NL4-3 mutants differing in gp120 glycosylation: The role of V3 loop carbohydrates on infectivity and CXCR4-dependent fusion‘ *GfV-Jahrestagung in Wien* im April 2000. (Vortrag)

S. Polzer, M.T. Dittmar, H.-G. Kraeusslich, B. Meyer, H. Schmitz and M. Schreiber. (2001). Eine unterschiedliche Glycosylierung des gp120 V3 Loop verändert die Corezeptornutzung und Infektiosität eines X4R5-dualtropen Virusisolates.‘ *GfV-Jahrestagung in Dresden* im März 2001. (Vortrag)

S. Polzer, Dietrich M., Schmitz H. and Schreiber, M. ,Influence of N-Glycosylation of the HIV-1 gp120 V3 loop of CXCR4-specific viruses on viral replication and neutralisation.‘ *GfV-Jahrestagung in Erlangen* im April 2002. (Vortrag)

S. Polzer, Müller, H., Dittmar, MT., Kräusslich H.-G., Schmitz H. and Schreiber, M. (1999). ,High binding affinity of NL4-3 Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) gp120 to the HIV-1 coreceptor CXCR4 is due to the lack of V3 loop carbohydrates‘ *11th Joint Meeting of the 'Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biologische Chemie', the 'Netherlands Society for Glycobiology', and the 'Groupe Lillois de Glycobiologie'* in Bonn im November. (Vortrag)

### 8.3 Danksagungen

Herrn Dr. Michael Schreiber danke ich für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit, es selbständig zu bearbeiten und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Herbert Schmitz danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. E. Heinz danke ich für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Herrn Matthias Dittmar und Herrn Prof. Dr. H.-G. Kräusslich danke ich für die Unterstützung bei den ersten Arbeiten unter S3-Bedingungen, für die Bereitstellung der Seren, Zellen und des pNL4-3 Vektors sowie für die vorübergehende Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zur Durchführung der Arbeiten am Heinrich-Pette-Institut in Hamburg.

Prof. Dr. B. Meyer danke ich für die Organisation des „Graduiertenkollegs 464“, das mir das die Glykokonjugate in ihrer Gesamtheit näher brachte und mir die Teilnahme an zahlreichen Kongressen ermöglichte.

Herrn Dr. Heiner Schaal danke ich für die Unterstützung, die er mir bei der Erstellung der Immunoblots des rekombinanten gp120 zuteil werden ließ.

Meinen derzeitigen und ehemaligen Arbeitskollegen Ingo Thordsen, Tobias Wolk, Marcus Vossmann, Martin Kirst, Sibylle Resemann, Irina Grädner, Sonja Ziegelmeier, Harm Müller und Finn Zedler danke ich für das herzliche Arbeitsklima, ein immer offenes Ohr für interessante und weniger interessante Geschichten, ihre Gesellschaft beim Konsum ungezählter Tassen Kaffee und dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Frau Karin Rottengatter danke ich für die tatkräftige und moralische Unterstützung, etliche Tassen Kaffee und den Beweis, dass alles gut wird.

Meinen Eltern und meiner Schwester Imke möchte ich danken, dass sie an mich glauben und mich ideell und materiell unterstützten.

Ganz besonders möchte ich Herrn Heiko Bublitz danken, der mir immer den Rücken freigehalten und meine Launen ertragen hat und mir bei der Gestaltung der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Danke !!!

## 8.4 Lebenslauf

Name: Svenja Polzer

Geboren am 13.05.1971 in Langen/Hessen

### schulischer Werdegang / Bildungsweg

1977-1991	Schulausbildung
Sommer 1991	Abschluß mit Hochschulreife
1992-1994 Grundstudium der Biologie	J. W. - Goethe Universität, Frankfurt/M
1994- 1997 Hauptstudium der Biochemie	J. W. - Goethe Universität, Frankfurt/M
1997	Diplomprüfungen in den Hauptfächern Biochemie und Biophysikalische Chemie und den Nebenfächern Pharmakologie und Mikrobiologie
03/ 97-12/97	Diplomarbeit im MPI für Hirnforschung zum Thema "Gezielte Mutagenese und elektrophysiologische Charakterisierung der $\epsilon 2$ Untereinheit des NMDA Rezeptors zur Aufklärung von Mechanismen der Agonistenbindung"
05/98-07/02	Promotion am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in der Abteilung Virologie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Schmitz zum Thema: "Bedeutung von N-Glycanen im V3-Bereich des HIV-1 Hüllproteins gp120 für die Korezeptornutzung und Neutralisierbarkeit von HIV-1"