

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. SCHMITZ
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. G. ADAM
Tag der Disputation: 03. Februar 2006

Hamburg, den 11. Januar 2006



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Die Bedeutung der N-Glykane im V3-Bereich des gp120 für die Infektiosität der HIV-1-Subtypen A und C

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für
Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften

Department Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Heiko Hauser
aus Solingen

Hamburg 2006

1	Einleitung	5
1.1	Glykane in biologischen Systemen	5
1.2	HIV-Subtypen	8
1.3	Die HIV-Glykoproteine gp120 und gp41	9
1.3.1	Struktur und Funktion des gp120 und gp41	10
1.4	Virus Entry	12
1.4.1	Anlagerung des Virus an die Zelle ("attachment")	12
1.4.2	Interaktion des gp120 mit CD4	13
1.4.3	Die gp120-Korezeptor-Interaktion	14
1.4.4	Fusion des Virus mit der Zelle	16
1.5	Funktion der N-Glykosylierung des HIV-Glykoproteins bei der spezifischen Antikörper-Antwort	16
1.6	Funktion der N-Glykosylierung des HIV-Glykoproteins bei der Interaktion mit der Wirtszelle	18
1.7	Ziel der Arbeit	19
2	Ergebnisse	21
2.1	Häufigkeit der N-Glykane g12-g17 im V3-Bereich des gp120	21
2.1.1	Häufigkeit der N-Glykane g12-g17 bei HIV-Sequenzen geordnet nach Subtyp	22
2.1.2	Häufigkeit der N-Glykane g12-g17 bei HIV-Sequenzen geordnet nach Korezeptornutzung	24
2.1.3	Häufigkeit der N-Glykane g12-g17 bei HIV-Sequenzen geordnet nach V3-Loop-Nettoladung	26
2.2	Herstellung von rekombinanten Viruschimären und Glykosylierungsmutanten	28
2.2.1	Herstellung der NL-V3-A-Viruschimäre und deren Glykosylierungsmutanten	30
2.2.2	Herstellung der NL-A _{X4} -Viruschimäre und deren Glykosylierungsmutanten	32
2.2.3	Herstellung der NL-A _{R5} -Viruschimäre und deren Glykosylierungsmutanten	34
2.2.4	Herstellung der NL-C-Viruschimäre und deren Glykosylierungsmutanten	36
2.3	Expression von gp120/gp160 Proteinen	38
2.4	Das N-Glykan g15 unterstützt die CCR5-Korezeptornutzung	41
2.4.1	Untersuchungen mit den NL-V3-A-Viren	41
2.4.2	Das N-Glykan g15 blockiert antigene Epitope des NL-V3-A Virus	49
2.5	Die Bedeutung der N-Glykane im V3-Bereich und der Aminosäuresequenz an der Position g15 für die Interaktion mit CXCR4	53
2.5.1	Untersuchungen mit NL-A _{X4}	53

2.6	Auswirkung des freien gp120 auf die Virusinfektion	58
2.6.1	Neutralisation von R5-tropen -g15-Glykosylierungsvarianten durch freies gp120 der +g15-Glykosylierungsvarianten	58
2.6.1.1	Konzentrationsabhängige Hemmung von NL-V3-A -g15 Glykosylierungsvarianten durch freies gp120 von NL-V3-A +g15 Glykosylierungsvarianten	59
2.6.1.2	Neutralisation von R5-tropen -g15 Glykovarianten mit gp120 von +g15 Glykovarianten	64
2.6.1.3	HIV-spezifische Antikörper blockieren die Neutralisation durch freies gp120	68
2.6.2	Steigerung der Infektiosität von X4-tropen Viren durch Zugabe von freiem gp120 X4-troper Viren	70
2.6.3	Die Infektionssteigerung durch freies X4-tropes gp120 wird durch neutralisierende Antikörper aufgehoben	74
2.6.4	Heparan-Sulfate auf der Zielzelle sind notwendig für die Steigerung der Infektion durch X4-tropes gp120	76
2.6.5	Neutralisation einer X4-tropen +g15 Glykosylierungsvariante durch freies gp120 von -g15 Glykosylierungsvarianten	80
2.6.6	Steigerung der Infektion R5-troper Viren mit gp120 Zellkulturüberstand von X4-tropen Viren	82
3	Diskussion	87
3.1	Die Bedeutung der N-Glykane im V3-Bereich für die Infektiosität der R5-tropen Viren	87
3.1.1	Das N-Glykan g12 maskiert ein neutralisationssensitives Epitop in den CCR5-tropen NL-V3-A-Viren	87
3.1.2	Die Bedeutung des N-Glykans g13 bei HIV-Subtyp-A-Viren	88
3.1.3	Die Bedeutung des N-Glykans g14 in CCR5-tropen-Subtyp-A- und Subtyp-C-Viren	88
3.1.4	Das N-Glykan g15 unterstützt die Interaktion CCR5-troper Subtyp-A und Subtyp-C-Viren	90
3.1.5	Das N-Glykan g15 moduliert die Neutralisationssensitivität der CCR5-tropen Glykosylierungsvarianten	93
3.2	Die Bedeutung des N-Glykans g15 für CXCR4-trope HIV-Subtyp-A-Viren	96
3.2.1	Das N-Glykan g15 vermindert die Infektiosität der CXCR4-tropen HIV-Subtyp-A-Viren	96
3.2.2	Die Bedeutung des N-Glykans g15 bei der Neutralisation von CXCR4-tropen HIV-Subtyp-A Viren	98
3.2.3	Die Aminosäuresequenz an der Position g15 moduliert die Affinität zu CXCR4 und die Neutralisation X4-troper HIV-Subtyp-A Viren	99
3.3	Auswirkung des freien gp120 auf die Virusinfektion	100
3.3.1	Neutralisation CCR5-troper Glykovarianten mit gp120 Zellkulturüberständen	101
3.3.2	Aktivierung CXCR4-troper Viren durch X4-tropes gp120	103
3.3.3	Aktivierung CCR5-troper Viren durch X4-tropes gp120	106

3.3.4	Die Bedeutung des N-Glykans g15 für den Verlauf der HIV-1-Pathogenese	108
3.4	Ausblick	113
4	Zusammenfassung	114
5	Methoden	117
5.1	Molekularbiologische Methoden	117
5.2	Amplifizierung, Modifizierung, Klonierung und Analyse von DNA	117
5.2.1	Verwendete Bakterienstämme	117
5.2.2	Ausstrich von Bakterien	117
5.2.3	Präparation chemisch kompetenter Bakterien	117
5.2.4	Transformation von Bakterien	118
5.2.5	Einfrieren von Bakterien	118
5.2.6	Präparation von Plasmid-DNA	118
5.2.7	Phenol/Chloroform-Extraktion	118
5.2.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	119
5.2.9	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen	119
5.2.10	Dephosphorylierung von DNA	120
5.2.11	Kinasierung von DNA-Fragmenten	120
5.2.12	Ligationen	120
5.2.13	Sonderprotokoll für die Klonierung in den pNL Δ env Vektor	120
5.2.14	PCR-Kettenreaktion	121
5.2.15	“ <i>nested</i> “-PCR	121
5.2.16	“ <i>Touchdown</i> “-PCR	121
5.2.17	SOE (“ <i>single overlap extension</i> “-PCR	122
5.2.18	Positionsspezifische-Mutagenese (“ <i>site directed Mutagenesis</i> “)	122
5.2.19	TA-Klonierung	123
5.2.20	Sequenzierung von DNA	123
5.2.21	Synthetische Oligodesoxyribonukleotide	123
5.3	Arbeiten mit RNA	123
5.3.1	Isolierung von RNA aus Blut und Serum [Qiagen]	123
5.3.2	RT-PCR	124
5.4	Gelelektrophorese	124
5.4.1	Elektrophorese von DNA-Molekülen in Agarosegelen	124
5.4.2	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	124
5.4.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	125
5.4.4	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	125
5.4.5	Western-Blot zum Nachweis der HIV-Hüllproteine	125
5.4.6	Dot Blot zur Quantifizierung von gp120	126
5.5	Zellkultur & Proteinbiochemische Methoden	128
5.5.1	Verwendete Zellen	128
5.5.2	Kultivierung von Zellen	128
5.5.3	Trypsinieren von adhärenenten Zellen	129
5.5.4	Lagerung von Zellen	129

5.5.5	Bestimmung der Zellzahl in einer Zellkultur	129
5.5.6	Transfektion	129
5.5.7	Lyse von Zellen	130
5.5.8	Immunopräzipitation von gp120	130
5.6	Virologische Methoden	131
5.6.1	Anzucht von Viren	131
5.6.2	Replikationskinetik	131
5.6.3	p24-Antigen Nachweis mittels ELISA	132
5.6.4	“ <i>Single Round</i> “-Infektion	132
5.6.5	Synzytientest	133
5.6.6	Kompetitionsanalysen, Inhibitionsanalysen	133
5.6.7	β -Glactosidase-Reportergen-Nachweis	134
5.6.8	GFP-Reportergen-Nachweis	134
6	Material	134
6.1	Chemikalien und Enzyme	134
6.2	Antikörper	137
6.3	Seren	137
6.4	Verwendete Puffer und Medien	138
7	Literaturverzeichnis	139
8	Anhang	151
8.1	Abkürzungsverzeichniss	151
8.2	Geräte	153
8.3	Aminosäuren	154
8.4	Oligonukleotide	155
8.5	Sequenzen	157
8.6	Lebenslauf	169
8.7	Veröffentlichungen	170
8.8	Danksagungen	171

1. Einleitung

"Glycobiology, the study of the biological activity of sugars, is the last remaining uncovered frontier in medicine", May, 2001

Dr. John Axford President of the Royal Society of Allergy and Immunology

1.1 Glykane in biologischen Systemen

Die Erforschung der menschlichen Gene, ihre Übersetzung in Proteine und die Regulation dieser Prozesse sind gut untersuchte Kerngebiete der Forschung. Es hat sich in den letzten Jahrzehnten ein neues Forschungsgebiet entwickelt, welches sich mit der biologischen Aktivität von Kohlenhydraten beschäftigt: die Glykobiologie. Kohlenhydrate sind in der Lage, komplexe Strukturen zu bilden, welche als Glykane definiert werden. Dies können einfache Polysaccharide sein, aber auch verzweigte Moleküle, deren strukturelle Diversität die von Proteinen, DNA und RNA um ein Vielfaches überragt. Die Diversität von Glykanen beruht auf den verschiedenen Zuckerbausteinen und dem Zusammenspiel der verschiedensten Glykosidasen, die die Bausteine auf unterschiedliche Weise zusammenfügen. Die Existenz und Aktivität der Glykosidasen variiert von Zelle zu Zelle. Zudem können Glykane nach erfolgter Synthese weiter modifiziert werden, z.B. durch Sulfatierung oder durch Synthese von Sialinsäuren an die Enden der komplexen Zuckerstrukturen. Durch die Vielzahl an Strukturen und Konformationen, welche die Glykane einnehmen können, sind ihre Funktionen in biologischen Systemen, wie z.B. die Virus-Zell-Interaktion, bisher nur in Teilen bekannt.

Die komplexen Kohlenhydratstrukturen auf den Zellen können Ziele für Pathogene darstellen, denn Parasiten (z.B. *Plasmodium falciparum*) und Bakterien (z.B. *Mycobacterium-tuberculosis*) sowie auch Viren (z.B. Herpes-Simplex, Gelbfieber, HIV (1.4.1)) können mit Glykoproteinen oder Glykoprotein-Rezeptoren interagieren, um ihre Zielzellen zu infizieren. Viren, wie Influenza und HIV, benutzen den Glykosylierungsapparat der Wirtszelle für die Modifikation der Virus-Hüllproteine. Dabei handelt es sich meistens um eine N-Glykosylierung. In eukaryontischen Zellen ist die N-Glykosylierung die häufigste posttranslationale Modifikation sezernierter und membrangebundener Proteine. Die Glykosylierung der Virus-Hüllproteine findet im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat statt. Als N-Glykosylierungssignal werden

zwei Aminosäuremotive genutzt, NXT oder NXS, wobei X jede Aminosäure sein kann, mit Ausnahme der Aminosäure Prolin. Die N-Glykane werden über eine N-glykosidische Bindung an das Asparagin des Aminosäuremotives im ER angehängt und im Golgi-Kompartiment in komplexe, hybride oder mannosereiche N-Glykane umgewandelt (Abb. 1).

Die Glykoproteine der Viren spielen bei der viralen Adsorption, der Membranfusion und dem viralen "Entry" eine Rolle. Häufig reicht für diese Prozesse ein einfaches Glykoprotein, z.B. Hemagglutinin (HA) bei Influenza A, dessen N-Glykane das HA in metastabiler, fusionskompetenter Form halten. Manchmal sind aber auch zwei Glykoproteine wie bei HIV-1 (gp120/gp41) involviert. Im Vergleich zu Influenza zeichnet sich HIV-1 durch eine größere Vielfalt aus, sowohl in Bezug auf die Anzahl der N-Glykane, als auch auf die genetischen Sequenzvariationen. Für HIV-Subtyp-B wurde gezeigt, dass N-Glykane die Interaktion des Hüllproteins mit den Korezeptoren des HIV modulieren [Polzer *et al.*, 2000]. Durch die teilweise extensive N-Glykosylierung der Hüllproteine, gerade bei Influenza und HIV, werden die viralen Proteine durch humane Strukturen maskiert und das Virus wird schlechter vom humoralen Immunsystem identifiziert. Ein weiterer Effekt den die N-Glykosylierung bewirkt ist der sterische Schutz vor neutralisierenden Antikörpern, den die je ca. 2 kDa großen Glykane bieten [Back *et al.*, 1994]. Sowohl Influenza als auch HIV (1.5) sind wahre Meister darin, der Immunantwort zu entgehen. Durch den hohen Grad an Glykosylierung des HIV-Hüllproteins ist das Virus als Modell zur Untersuchung der Funktionen von N-Glykane in einem Virus-Zell-System ideal geeignet.

N-Glykane:

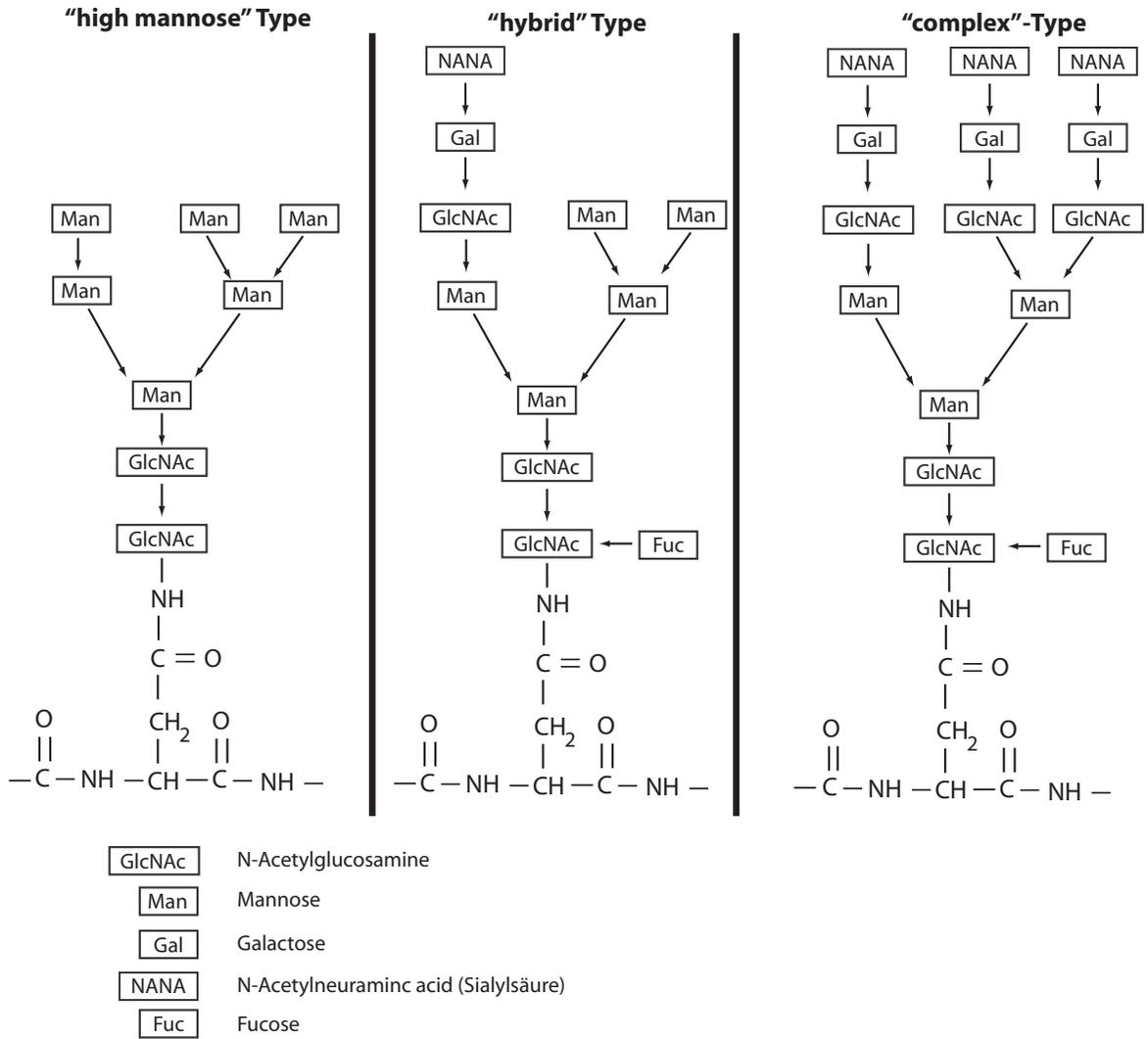


Abb. 1 Die drei Grundstrukturen der N-Glykane

1.2 HIV-Subtypen

HIV-1 wird in drei verschiedene Gruppen unterteilt, O (*outlier*), N (*new*) und M (*major*), wobei mehr als 90% der Infektionen durch Viren der Gruppe M verursacht werden. Diese Gruppe wird in weitere Subtypen unterteilt (A, B, C, D, E, G, H, J und K). Die meisten Infektionen werden durch die Subtypen B (Amerika, Europa, Asien, mittlerer Osten und Australien), A (Afrika, mittlerer Osten und Russland) und C (Afrika und Asien) verursacht.

Während die Anzahl der HIV-Subtyp-B infizierten Patienten seit Jahren in den USA (ca. 1 Millionen) und in Europa (ca. 600,000) stagniert, kam es in Afrika zu einer massiven Ausbreitung der HIV-Subtypen A und C. Von weltweit ca. 40 Millionen infizierten Menschen sind ca. 28 Millionen mit HIV-Subtyp A oder C infiziert. Jährlich kommt es zu 5 Millionen Neuinfektionen (WHO, 2004). Damit sind die Subtypen A und C die weltweit häufigsten HI-Viren. CXCR4-trope Viren (1.4.1) treten bei HIV-Subtyp-C Patienten selbst nach der Progression zu AIDS selten auf. Dies und Berichte aus Russland, dass HIV-Subtyp-A-V3-Loop-Sequenzen andere Charakteristika in Bezug auf die Korezeptornutzung aufweisen als HIV-Subtyp-B Viren [Papuashvili *et al.*, 2005] sind Hinweise darauf, dass es möglicherweise nicht erforschte, phänotypische Unterschiede zwischen den HIV-Subtypen geben könnte. Bei diesen phänotypischen Unterschieden könnten auch die N-Glykane im V3-Loop des gp120 eine Rolle spielen.

1.3 Die HIV-Glykoproteine gp120 und gp41

Virale Partikel des HIV-1 sind sphärisch mit einem Durchmesser von ca. 100 nm. Ihre Membranhülle stammt von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. In diese sind die viralen *Spikes* (Glykoproteinkomplexe), bestehend aus dem viralen Transmembran Protein gp41 und dem externen Glykoprotein gp120, eingebettet. Diese sind miteinander

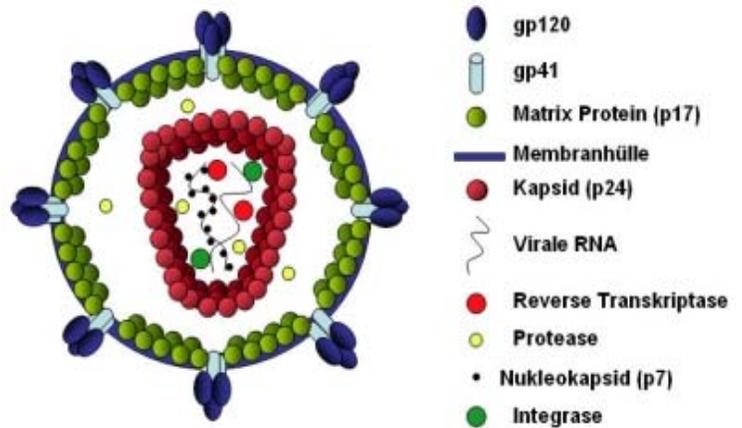


Abb. 2 schematischer Aufbau des HIV-Partikels

nicht kovalent verbunden und über die hydrophobe, 20 Aminosäure lange, Transmembrandomäne des gp41, in Form von Heterotrimeren in der Membranhülle verankert. Die Matrixproteine (p17) sind über Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden und bilden eine netzähnliche Proteinschicht aus, die den Virionen eine isometrische Struktur verleiht. Im Partikelinneren findet man im Zentrum das konische Viruskapsid, welches vom Kapsidprotein (p24) gebildet wird. Das Virusgenom, welches in den Kapsiden eingelagert ist, besteht aus zwei identischen Molekülen einzelsträngiger RNA. Diese sind weder kovalent noch durch Basenpaarung an einer Dimerisierungsstelle miteinander assoziiert. Die beiden RNA-Stränge sind mit Nukleokapsidproteinen (p7) komplexiert. Das Genom kann man grob in drei Segmente unterteilen, das *gag* Gen (codiert für Strukturproteine), das *pol* Gen (codiert für die Enzyme) und das *env* Gen (codiert für die Hüllproteine gp120 und gp41). Innerhalb des Kapsides findet man weitere virale Komponenten wie die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), die das einzelsträngige, positiv-orientierte RNA-Genom in doppelsträngige, lineare DNA umschreibt und die Integrase (IN), welche die umgeschriebene, doppelsträngige DNA in die Wirtszell-DNA integriert. Die Protease (PR) prozessiert die *gag/pol*-Vorläuferproteine, man findet sie sowohl im als auch außerhalb des Kapsides. Weitere virale Komponenten, die im Viruspartikel verpackt werden, sind die viralen Proteine p6, Vpr, Nef und Vif.

1.3.1 Struktur und Funktion des gp120 und gp41

Das gp160 *env*-Vorläuferprotein wird am rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert und posttranslational im Lumen modifiziert (Glykosylierung, Disulfidbrückenbildung). Die Vorläuferproteine trimerisieren im Lumen [Earl *et al.*, 1991] und werden anschließend in den Golgi-Komplex transportiert, wo sie von einer oder mehreren zellulären Proteasen (z.B. Furin) [Hallenberger *et al.*, 1997] in das Glykoprotein gp120 und das Transmembran-Glykoprotein gp41 gespalten werden [Freed *et al.*, 1989, 1995; McCune *et al.*, 1988]. Die beiden Glykoproteine sind nicht kovalent assoziiert und über die Transmembrandomäne von gp41 in der Zellmembran verankert. Von dem Golgi-Apparat aus werden die trimeren Hüllproteine zur Plasmamembran transportiert und dort in die knospenden Viren eingebaut. Je ein Trimer aus drei gp120- und drei gp41-Monomeren bildet einen *Spike*. Nach den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Gelderblom haben die Viren 72 *Spikes* [Gelderblom *et al.*, 1991]). Bei HIV-1 findet man aber oft Viren, welche nur 7-17 *Spikes* haben, wobei R5-trope Viren meist mehr *Spikes* besitzen als X4-trope Viren [Zhu *et al.*, 2003; Chertova *et al.*, 2002]. Da man im Überstand von HIV infizierten Zellen hohe Mengen des freien Hüllproteins nachweisen konnte, wurden zwei Theorien postuliert, die erklären sollen, wie es zur Freisetzung des gp120 kommt. Die eine geht davon aus, dass gp120 nur selten in die Virionen eingebaut wird, dann aber sehr stabil auf der Virusmembran verankert ist [Chertova *et al.*, 2002; Layne *et al.*, 1992], die andere Theorie verfolgt den Ansatz, dass alles gp120 in die Virionen inkorporiert wird, dann aber durch äußere Einflüsse abdissoziiert (*shedding*) [Schneider *et al.*, 1986].

Das Oberflächenprotein gp120 enthält fünf variable Regionen (V1-V5), welche zwischen konservierten Domänen liegen [Modrow *et al.*, 1987]. Die variablen Regionen V1-V4 bilden Schleifen, die an ihrer Basis durch Disulfidbrücken geschlossen sind [Leonard *et al.*, 1990]. Die modifizierte Kristallstruktur (ohne variable Schleifen) von gp120 zeigt eine innere und eine äußere Domäne, welche über ein viersträngiges β -Faltblatt, dem "*bridging sheet*", miteinander verbunden sind [Kwong *et al.*, 1998]. Alle drei Strukturelemente und die variablen Regionen tragen zur CD4- und Korezeptorbindung bei [Kwong *et al.*, 1998]. Bei der Korezeptorbindung spielt insbesondere der V1/V2-Loop und der V3-Loop eine große Rolle (1.4.3). Der V3-Loop hat eine β -*Hairpin*-, α -Helix-Struktur [Vranken *et al.*, 2001], doch kann seine freie Konformation wahrscheinlich zwischen drei verschiedenen Strukturen variieren [Rosen *et al.*, 2005]. Ein großer

Teil der im “*Spike*” exponierten Oberfläche des gp120 ist stark glykosyliert und besteht aus den variablen Regionen. Dadurch sind die Bereiche, welche die Bindung an CD4 und den Korezeptor vermitteln, vor der spezifischen Immunantwort geschützt. Durch “*Epitope Mapping*” mit monoklonalen Antikörpern wurden die Bereiche für die CD4-Bindung (CD4bs) identifiziert und weitere Epitope charakterisiert, die erst nach CD4-Bindung exponiert werden. Diese CD4-induzierten (CD4i) Epitope liegen im Bereich des “*bridging sheet*” und binden in Kooperation mit dem V3-Loop, der die Korezeptor Spezifität [Choe *et al.*, 1996; Cocchi *et al.*, 1996, Wu *et al.*, 1996] determiniert, an den jeweiligen Korezeptor. Die Oberfläche des gp120 kann aufgrund seiner Neutralisationseigenschaften in drei Bereiche aufgeteilt werden, die im Trimer verdeckte Oberfläche, die mit dem gp41 assoziiert ist (*non-neutralizing face*), die Oberfläche, welche zwar exponiert ist, aber durch Glykosylierung und durch variable Regionen geschützt wird (*silent face*) und die dem Korezeptor zugewandte Oberfläche, gegen die neutralisierende Antikörper gefunden werden (*neutralizing face*).

Das Transmembran-Glykoprotein gp41 besteht aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer C-terminalen intrazellulären Domäne. Die intrazelluläre Domäne spielt eine Rolle bei der Assoziation der Hüllproteine in *lipid rafts*, der basolateralen Sortierung und bei der Knospung der Virionen. Die extrazelluläre Domäne vermittelt die Fusion. Am N-Terminus der extrazellulären Domäne befindet sich das Fusionspeptid, eine stark hydrophobe, glycinreiche Domäne. Zwei hydrophobe Helices in der extrazellulären Domäne sind am Fusionsmechanismus beteiligt (1.4.4). Eine Helix befindet sich an dem aminoterminalen Ende der extrazellulären Domäne, die andere befindet sich an dem carboxyterminalen Ende. In einem gp41-Trimer liegen sowohl die aminoterminalen Helices als auch die carboxyterminalen Helices in “*coiled-coil*”-Strukturen vor.

1.4 Virus Entry

1.4.1 Anlagerung des Virus an die Zelle (“attachment”)

Der Zelltropismus des HIV wird durch den Rezeptor CD4 (1.4.2) und einen Korezeptor (1.4.3), entweder CXCR4 (X4-trop) oder CCR5 (R5-trop) oder durch beide Korezeptoren (R5X4-trop), bestimmt. Die monomere, lösliche Form des Hüllproteins sgp120 (soluble gp120) hat eine hohe Affinität (1-10 nM) zu CD4 [Moore *et al.*, 1998]. Die Beobachtung, dass oligomeres gp120 eine bis zu 200-fach geringere Affinität zu CD4 hat [Moore *et al.*, 1992; Fouts *et al.*, 1997, Sattentau *et al.*, 1995], zusammen mit der Beobachtung, dass MDM (monocyte derived macrophages), Mikroglia und dendritische Zellen wenig CD4 im Gegensatz zu T-Zellen exprimieren [Saphire *et al.*, 2001; Dick *et al.*, 1997; Sonza *et al.*, 1995; Sattentau *et al.*, 1995], lässt den Schluß zu, dass noch andere Faktoren bei der Anlagerung des Virus an die Zelloberfläche eine Rolle spielen.

MDM, Mikroglia und dendritische Zellen haben gemeinsam, dass sie hohe Mengen an Glykosaminoglykanen (GAG, polymere Karbohydrate) exprimieren, während T-Zellen kaum oder gar keine GAGs auf der Zelloberfläche präsentieren [Saphire *et al.*, 2001; Bobardt *et al.*, 2003]. Zu den Glykosaminoglykanen gehören Heparan-Sulfate (z.B. Syndecane), Keratan-Sulfate, Dermatan-Sulfate und Chondroitin-Sulfate [Bernfield *et al.*, 1999].

Heparan-Sulfate (HSPG, Heparan-Sulfat-Proteoglykane) spielen eine Rolle bei der Anlagerung des Virus an die Zelle [Saphire *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Mondor *et al.*, 1998]. Moulard *et al.* und Zhang *et al.* konnten zeigen, dass die Anlagerung des Virus an Zellen über HSPG von der Ladung des V3-Loops abhängt [Zhang *et al.*, 2002; Moulard *et al.*, 2000, Mondor *et al.*, 1998]. Dies steht im Gegensatz zu der Beobachtung von Saphire *et al.*, dass die Anlagerung des HIV an Makrophagen gp120 unabhängig ist [Saphire *et al.*, 2001]. Die Hypothese der Interaktion von HSPG mit dem positiv geladenen V3-Loop wird gestützt durch die Beobachtung, dass HIV neutralisierende Polyanionen, wie z.B. Dextran-Sulfat oder Heparan-Sulfat, auch die Bindung von V3-Loop Antikörpern inhibieren [Callahan *et al.*, 1991; Moulard *et al.*, 2000, Harrop *et al.*, 1994]. Die genannten Polyanionen interferieren aber nicht mit der gp120-CD4 Interaktionen [Callahan *et al.*,

1998; Moulard *et al.*, 2000, Mbemba *et al.*, 1996]. Zudem interagieren R5-trope Viren meist schlechter mit HSPG als X4-trope Viren. Dieses Phänomen scheint aber nicht direkt mit der Korezeptor-Nutzung zu korrelieren, sondern mit der Tatsache, dass X4-trope Viren in der Regel einen positiv geladenen V3-Loop aufweisen [Zhang *et al.*, 2002, Moulard *et al.*, 2000]. Ein positiv geladener V3-Loop ist daher wichtig für die Bindung an HSPG und CXCR4.

Die Bindung von HIV an GAG, Lektine (wie DC-Sign) oder andere Adhäsionsmoleküle kann in zweifacher Weise eine Rolle spielen. Einerseits scheint die Menge des angelagerten HIV an die Zelloberfläche ein mitbestimmender Faktor für die Infektiosität des Virus zu sein [O'Doherty *et al.*, 2000], andererseits wurde gezeigt, dass HIV-Virionen über die Adsorption an Syndecane (eine Form von HSPG) auf Endothelzellen lange "überleben" können und die Endothelzellen so die *trans*-Infektion von T-Zellen vermitteln [Bobardt *et al.*, 2003]. Ähnliches wurde auch für dendritischen Zellen (DCs, dendritic cells) gezeigt, deren C-Lektin Rezeptor DC-Sign (*dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*) HIV bindet und so die *trans*-Infektion von HIV permissiven Zellen unterstützt [Geijtenbeek *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2002]. Zudem scheint die Bindung des HIV an Heparansulfate auf den mikrovesikulären Endothel-Zellen des Gehirns die Transcytose durch die Blut-Hirn Schranke zu vermitteln [Argyris *et al.*, 2003; Bobardt *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2000].

1.4.2 Interaktion des gp120 mit CD4

Der primäre Rezeptor des HIV ist CD4, ein Protein, welches zur Immunglobulin-Superfamilie gehört und hauptsächlich auf T-Helfer Zellen exprimiert wird. Dort interagiert es mit den MHC-Klasse-II-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen. CD4 bildet einen Teil des T-Zellrezeptor-Komplexes und ist an der Antigenerkennung beteiligt. Das Hüllprotein gp120 bindet über diskontinuierliche Epitope (CD4bs) an einen 20 Aminosäure langen Loop in der ersten (N-terminalen) von vier extrazellulären, Immunglobulin-ähnlichen Domänen des CD4 [Sweet *et al.*, 1991]. Die Bindung an CD4 induziert im gp120 Konformationsänderungen, welche eine Exposition des "*bridging sheet*" und des V3-Loops zur Folge haben [Rizzuto *et al.*, 1998]. Beide gp120-Bereiche sind an der Korezeptorbindung beteiligt (1.4.3). CD4 wird neben T-Zellen auch auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, welche alle permissiv für HIV sind. Es sind zwar wenige HIV-Isolate bekannt, die "*in vitro*" Zellen auch CD4-unabhängig

infizieren, aber keine Viren, die dies auch “*in vivo*” tun [Reeves *et al.*, 1999]. Solche Viren scheinen im Wirt keine Überlebenschance zu besitzen.

1.4.3 Die gp120-Korezeptor-Interaktion

Als sekundäre HIV-Rezeptoren wurden hauptsächlich zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus der Familie der 7-Transmembranproteine identifiziert, CXCR4 und CCR5 [Feng *et al.*, 1996; Alkhatib *et al.*, 1996]. Diese Rezeptoren sind Chemokinrezeptoren. Chemokine sind ca. 65-75 Aminosäure große Proteine, die als Botenstoffe eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsprozessen spielen. Der natürliche Ligand des CXCR4 ist das CXC-Chemokin SDF-1. Die Beobachtung, dass eine hohe Konzentration der CC-Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES in Patienten mit markant verlangsamten Krankheitsverlauf nachgewiesen wurde, führte zu der Identifizierung eines zweiten Korezeptors: CCR5 [Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996]. Neben diesen beiden Hauptkorezeptoren wurden noch weitere Chemokinrezeptoren identifiziert, welche als HIV-Korezeptoren fungieren können, jedoch werden diese nur von multitropen R5- oder X4-HI-Viren genutzt.

Interessanterweise korreliert der Korezeptor-Phänotyp des Virus mit dem Krankheitsverlauf der HIV-Infektion. Zu Beginn der HIV-Infektion dominieren R5-trope Viren [Scarlati *et al.*, 1997] und nach einer 2-10 jährigen asymptomatischen Phase finden sich in Patienten neben den R5-tropen auch X4-trope und dualtrope Viren [Scarlati *et al.*, 1997; Bjorndal *et al.*, 1997]. Nach der Progression zu AIDS dominieren die X4-tropen Viren, zumindest bei HIV-Subtyp-B Patienten [Conner *et al.*, 1993], über die R5-tropen Viren. Die Korezeptorbindestelle (“*bridging sheet*”, V3-Loop) des gp120, welche nach CD4-Bindung exponiert wird (siehe 1.4.3), liegt an der Basis zwischen den variablen Schleifen V1/V2 und V3. Die Korezeptorspezifität wird von dem V3-Loop, einer Schleife aus 35-37 Aminosäuren, festgelegt [Bron *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997]. Der Austausch des V3-Loops eines R5-tropen Virus gegen den eines X4-tropen ist ausreichend, um die Eigenschaften des Virus für die CXCR4-Bindung zu übertragen [Cocchi *et al.*, 1996]. Zudem lassen sich auch die Sequenzen der natürlichen Chemokinliganden der Korezeptoren, SDF-1 und MIP1- β , statt des V3-Loops in das Virus integrieren. Die resultierenden Viren haben dann die Eigenschaften von X4-tropen Viren (SDF-1 insertierte Sequenz) bzw. R5-tropen Viren

(Mip1- β insertierte Sequenz) [Yonezawa *et al.*, 2001]. Das Glykoprotein von R5-tropen Viren bindet an sulfatierte Tyrosine am N-Terminus und an den zweiten extrazellulären Loop des CCR5, während das gp120 X4-troper Viren nur an den zweiten extrazellulären Loop des CXCR4-Korezeptors bindet [Labrosse *et al.*, 2001].

Noch ist nicht geklärt, welche Sequenz oder Teilstruktur des V3-Loops die Korezeptorspezifität festlegt. Wahrscheinlich interagiert der V3-Loop direkt mit dem CCR5-Korezeptor [Kwong *et al.*, Symposium, Keystone, 2005]. Für die Bindung von gp120 an CCR5 sind besonders die N-terminalen und die C-terminalen Aminosäuren des V3-Loops (V3-stem) wichtig [Cormier *et al.* 2002; Suphaphiphat *et al.*, 2003]. Auffällig ist, dass der Tropismus des Virus mit der durchschnittlichen V3-Loop-Nettoladung des Virus korreliert. M-trope Viren haben meist eine geringe Nettoladung von +1 bis +5 und T-trope Viren sind kationisch mit einer Nettoladung von +6 bis +10 [Chesebro *et al.*, 1992; Kwong *et al.*, 2000]. Bei HIV-Subtyp-B korrelieren vor allem zwei Positionen im V3 Loop auffällig mit der Korezeptornutzung:

- Ist an Position 11 eine basische Aminosäure und an Position 25 keine saure oder eine basische, ist der Virus meist X4-trop.
- Ist an Position 11 keine basische und an Position 25 eine saure Aminosäure ist der Virus mit hoher Wahrscheinlichkeit R5-trop.

Dies lässt nicht nur auf eine ladungsabhängige Bindung des V3-Loops an den Korezeptor schließen, sondern auch auf eine strukturelle, da an Position 25 die erste Aminosäure der α -Helix des V3-Loops liegt und in dieser eine saure Aminosäure bevorzugt wird [Vranken *et al.*, 2001]. Eine basische Aminosäure an dieser Position würde die amphiphatische Helix destabilisieren. Zudem sind Sequenzen des V3-Loops von M-tropen Viren im Gegensatz zu T-tropen Viren recht homolog, was ein Hinweis auf eine weniger variable Struktur sein könnte. Wahrscheinlich binden T-trope Viren hauptsächlich über elektrostatische Interaktionen des V3-Loops an den Korezeptor bzw. die Bindung an den Korezeptor wird verstärkt, während bei M-tropen Viren die Konformation des V3-Loops wichtig ist. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass die beiden Korezeptoren eine unterschiedliche Ladung haben, während CXCR4 eine anionische Nettoladung von -11 in den extrazellulären Loops aufweist, hat der CCR5-Korezeptor eine Nettoladung von +1 (neutral). Neben dem V3-Loop ist auch der V1/V2-Loop an der Modulation

der Korezeptorbindung beteiligt. Der V1/V2-Loop überlappt im gp120 Trimer mit dem V3-Loop [Kwong *et al.*, 1998], kann also mit diesem interagieren und die Korezeptorspezifität modulieren.

1.4.4 Fusion des Virus mit der Zelle

Die Konformationsänderung des gp120 bei der Korezeptorbindung induziert eine Konformationsänderung im gp41. Das hydrophobe aminoternale Fusionspeptid wird exponiert und in die Wirtszellmembran eingelagert. Die N-terminalen hydrophoben, im Trimer "coiled-coil" vorliegenden, Helices enthalten hydrophobe Taschen, in die sich die carboxyterminalen Helices (ebenfalls *coiled coil*) antiparallel einpassen. Dadurch bilden die Helices der drei gp41-Domänen ein "sechs-Helix-Bündel". Durch die Konformationsänderung werden die virale und die zelluläre Membran einander angenähert. Die Senkung des Energieniveaus, die durch diese Strukturänderung erreicht wird, reicht aus, um eine Fusionspore zu bilden [Melikyan *et al.*, 2000]. Bei der Bildung der Fusionspore sind wahrscheinlich vier bis sechs CCR5-/CXCR4-Rezeptoren [Kuhmann *et al.*, 2000], einige CD4-Moleküle [Layne *et al.*, 1990] und bis zu sechs gp120/gp41 Trimere beteiligt.

1.5 Funktion der N-Glykosylierung des HIV-Glykoproteins bei der spezifischen Antikörper-Antwort

Das gp120 hat je nach Isolat und Subtyp zwischen 18 und 30 N-Glykosylierungssignale (durchschnittlich 24) für eine große Variabilität an hochmannosidischen, hybrid und komplexen Karbohydraten, deren Masse ca. die Hälfte des gp120 ausmachen [Leonard *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 2000]. Da die Glykosylierung des HIV durch den zelleigenen Syntheseapparat erfolgt, unterscheidet sich die Zusammensetzung und Mikroheterogenität der N-Glykane nicht von der ihrer Wirtszelle.

Neben der Rolle der N-Glykosylierung für die Faltung [Li *et al.*, 1993] und Expression bzw. Prozessierung des gp160 [Reynard *et al.*, 2004] können die N-Glykane auch eine Rolle in der Maskierung des gp120 spielen. Erste Hinweise, dass N-Glykane eine wichtige Rolle für den "Immune Escape" des Virus spielen könnten, wurden im Jahre 1993 beobachtet. Für SIV wurde gezeigt wurde, dass bei der Infektion von immunisierten *Cynomolgus* Makaken eine Veränderung des Glykosylierungsmusters im V1-Loop von resistenten Viren stattfand [Almond *et al.*, 1993]. In der Tat stehen auch bei der Entstehung neutralisationsresistenter HIV-Subtyp-B Viren bestimmte gp120 Bereiche mit benachbarten N-Glykanen unter Selektionsdruck. Die Glykosylierungsmuster

der Viren in einem Patienten verschieben sich im Verlauf der Erkrankung [Wei *et al.*, 2003; Dacheux *et al.*, 2004], wahrscheinlich bedingt durch ein wechselndes Antikörperrepertoire. Man spricht deshalb auch von einem “*evolving glycan shield*”. Interessanterweise liegen die N-Glykosylierungsstellen, welche ihre “Position wechseln”, im Monomer nicht in direkter Nähe zu den immundominanten Domänen V1/V2 und V3. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass diese “wechselnden” N-Glykane nur im Trimer mit den immundominanten Regionen überlappen

Die Anwesenheit eines Glykans kann zum einen die Zugänglichkeit eines neutralisierenden Epitops sterisch vermindern, aber auch über indirekte konformelle Veränderungen des gp120 ein anderes Epitop exponieren. Dasselbe gilt für den Verlust eines N-Glykans: Ein neutralisierendes Epitop kann exponiert werden oder durch eine verstärkte Faltung des Proteins unzugänglicher für Antikörper werden. Die Positionen der Glykosylierungsstellen “verschieben” sich oft nur um 1-2 Basenpaare. Oder eine potentielle Glykosylierungsstelle entsteht, während eine andere deletiert wird. Zusätzlich konnte für HIV-Subtyp-B gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Glykanen im und neben dem V3-Loop die CD4bs, den V3-Loop selbst und die Korezeptor Bindungsstelle abschirmen [McCaffrey *et al.*, 2004; Polzer *et al.*, 2002, Malenbaum *et al.*, 2000/2001]. Dies wurde auch für N-Glykane in der V1/V2-Region postuliert, welche im Trimer mit dem V3-Loop überlappen [McCaffrey *et al.*, 2004; Pinter *et al.*, 2004]. Die hohe Mikroheterogenität der N-Glykosylierung und die variierenden N-Glykosylierungsstellen des HIV-Hüllproteins sind mit der Aminosäureflexibilität der variablen Regionen der Hauptfaktor für den erfolgreichen “*Immune escape*” der HI-Viren.

1.6 Funktion der N-Glykosylierung des HIV-Glykoproteins bei der Interaktion mit der Wirtszelle

Neben der Rolle der N-Glykosylierung bei der humoralen Immunantwort (siehe 1.5) können N-Glykane auch die Korezeptorspezifität modulieren. So konnte für HIV-Subtyp-B gezeigt werden, dass nach dem Verlust eines N-Glykans im V3-Loop ein R5/X4-tropes Virus einen rein X4-tropen Phänotyp aufwies [Polzer *et al.*, 2002]. Allerdings hängt die Änderung der Korezeptorspezifität durch Verlust des N-Glykans mit der Ladung des V3-Loops (basische V3-Loops werden in X4-tropen Viren bevorzugt) und dem N-Glykosylierungskontext des V1/V2-Loops zusammen [Nabatov *et al.*, 2004, Pollakis *et al.*, 2001]. Zudem sinkt die Infektiosität eines R5-tropen Virus durch die Deletion des V3-Loop Glykans, während sie bei X4-tropen Viren steigt [Polzer *et al.*, 2002]. Das N-Glykan im V3-Loop beeinflusst daher wahrscheinlich dessen Korezeptoraffinität. Dieselben Strukturen scheinen auch die Bindung an CD4 und die Abschirmung des CD4bs-Epitops gegenüber Antikörpern zu modulieren [Nabatov *et al.*, 2004]. Bei einem Virusisolat konnte durch den Verlust eines N-Glykans sogar ein CD4 unabhängiger Phänotyp erzielt werden [Kolchinsky *et al.*, 2001]. Bei der Interaktion mit den Wirtszellrezeptoren spielt also die N-Glykosylierung im V3-Loop und in der V1/V2-Region eine modulierende Rolle.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der N-Glykane im V3-Bereich der HIV-Subtypen-A und -C, im Bezug auf die Infektiosität, Korezeptornutzung und Neutralisation zu erforschen.

Dafür sollten vier neue *env*-Genkassetten kloniert werden, welche die Herstellung von infektiösen HIV-Glykosylierungsvarianten mit HIV-Subtyp A und C-Hüllproteinen erlauben:

- Eine Subtyp-B-Genkassette, in welcher nur ein CCR5-troper V3-Loop von HIV-Subtyp A insertiert werden sollte
- Eine CXCR4-trope Subtyp-A-Genkassette
- Eine CCR5-trope Subtyp-A-Genkassette
- Eine CCR5-trope Subtyp-C-Genkassette.

Die HIV-Glykosylierungsvarianten sollten mittels zielgerichteter Mutagenese der N-Glykosylierungsstellen g12-g16, in allen möglichen Kombinationen, hergestellt werden. Die mutierten *env*-Gene sollten anschließend in den HIV-Subtyp-B-Provirus-Vektor pNL4-3 kloniert werden, um infektiöse Viruspartikel zu produzieren. Zudem sollten die *env*-Gene in einen gp160-Expressionsvektor überführt werden, um einerseits die Nutzung der Glykosylierungssignale und die korrekte Prozessierung des gp160 zu verifizieren und andererseits freies gp120 für Virusinfektionsstudien zu produzieren. Besonders die Funktionen des N-Glykans g15, welches bei HIV-Subtyp-B die Korezeptornutzung, Korezeptoraffinität und Neutralisation beeinflusst, sollten für die HIV-Subtyp-A- und -C-Chimären erforscht werden.

Die Bedeutung der N-Glykane für die Infektiosität des Virus sollte in dem Biosystem Virus-Zelle, das heißt in Infektionsstudien, untersucht werden. Außerdem sollte ein neues System "Virus-freies gp120-Zelle" etabliert werden, um die "*in vivo*"-Situation besser "*in vitro*" nachzustellen. In dem neuen System sollte der Effekt von verschiedenen gp120-Varianten auf die Infektion von den Glykosylierungsvarianten untersucht werden.

2. Ergebnisse

2.1 Häufigkeit der N-Glykane g12-g17 im V3-Bereich des gp120

Zuerst sollte die Frage beantwortet werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von N-Glykanen im V3-Bereich des gp120 bei verschiedenen HIV-Subtypen, Viren mit unterschiedlicher Korezeptornutzung oder V3-Loop-Nettoladung besteht. Daher wurde eine V3-Loop-Sequenzanalyse von HIV-Patientenseren aus Neu-Guinea, Südafrika und Hamburg, sowie eine Analyse mit den existierenden Sequenzen der *Los Alamos National Laboratory* Sequenz Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Dabei wurde die Häufigkeit der N-Glykane g12-g17 bei HIV Sequenzen geordnet nach:

1. Subtyp A, B und C
2. Korezeptornutzung
3. V3-Loop-Nettoladung

bestimmt.

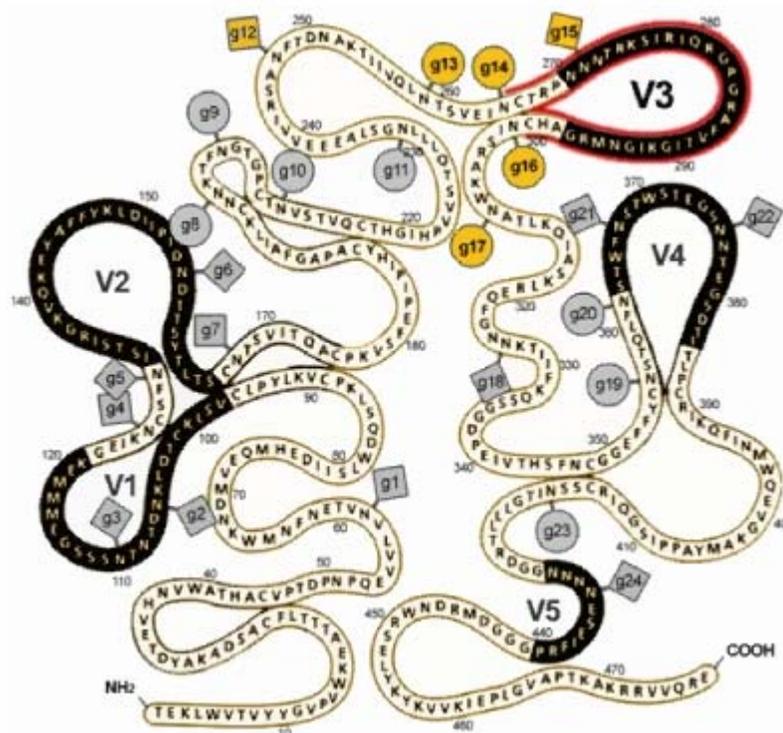


Abb. 3 Glykosylierungsstellen des HIV-Subtyp-B NL4-3 gp120
 Korrespondierend zum Laborstamm pNL4-3 wurden die Glykosylierungssignale an den Stellen g12-g17 ausgewertet.

2.1.1 Häufigkeit der N-Glykane g12-g17 bei HIV-Sequenzen geordnet nach Subtyp

Das Glykan g13 ist bei HIV-Subtyp-A Viren sehr selten vorhanden, bei den HIV-Subtyp-C Viren ist dagegen die Anwesenheit des Glykans g14 sehr selten (Abbildung 4).

Zuerst wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Häufigkeit der N-Glykane zwischen den CCR5-tropen HIV-Subtypen-A, -B und -C gibt. Dazu wurden je 50 V3-Loop-Sequenzen pro HIV-Subtyp analysiert. Für die Analyse wurde aus je 10 Patientenseren pro Subtyp (A: Neu-Guinea, C: Südafrika, B: Deutschland) die virale RNA aufgereinigt. Die cDNA wurde über RT-PCR erhalten und mit einer anschließenden "nested"-PCR der V3-Loop amplifiziert. Beim Auftreten mehrerer Banden bei der "nested"-PCR, wurde diese nach dem Prinzip der "Touchdown"-PCR durchgeführt. Die amplifizierte V3-Loop-DNA wurde über TA-Klonierung in den Vektor pT-Adv überführt und mit M13-Sequenzierprimern sequenziert. Die N-Glykosylierungssignale, bestehend aus dem Aminosäuremotiv NX(S/T), wobei X nicht Prolin sein darf, wurden korrespondierend zu den N-Glykosylierungssignalen des HIV-Subtyp-B Virus ausgewertet. Die HIV-Subtyp-B-V3-Loop-Sequenzen wurden von Ingo Thordsen kloniert und sequenziert. Die Korezeptornutzung der V3-Loop-Sequenzen wurden über die Methode von Fouchier (Fouchier et al.,1995) vorhergesagt. Die Sequenzen des V3-Loops wurden als CCR5-trop prognostiziert, wenn an Position 11 und/oder 25 des V3-Loops keine positiv geladene Aminosäure vorhanden war. Zudem wurden nur Sequenzen analysiert, welche eine Gesamtnettoladung von +4 oder weniger aufwiesen.

An Position g15 und g16 sind bei allen drei Subtypen in 90% der Sequenzen Glykosylierungssignale vorhanden. Auffallend ist bei Subtyp-B das Glykan g12, welches nur in 60% der Sequenzen von HIV-B gegenüber 94 und 97% von HIV-A und -C gefunden wird. Bei HIV-A findet man an Position g13 nur in 10% der Sequenzen ein Glykosylierungssignal. Bei HIV-B findet man nur bei der Hälfte der Sequenzen ein Glykosylierungssignal an dieser Stelle und bei HIV-C in 73% der Sequenzen. Bei HIV-C ist an Position g14 nur in 22% der Sequenzen ein Glykosylierungssignal vorhanden, gegenüber 81% bei HIV-Subtyp-B und 88% bei HIV-Subtyp-A-Sequenzen.

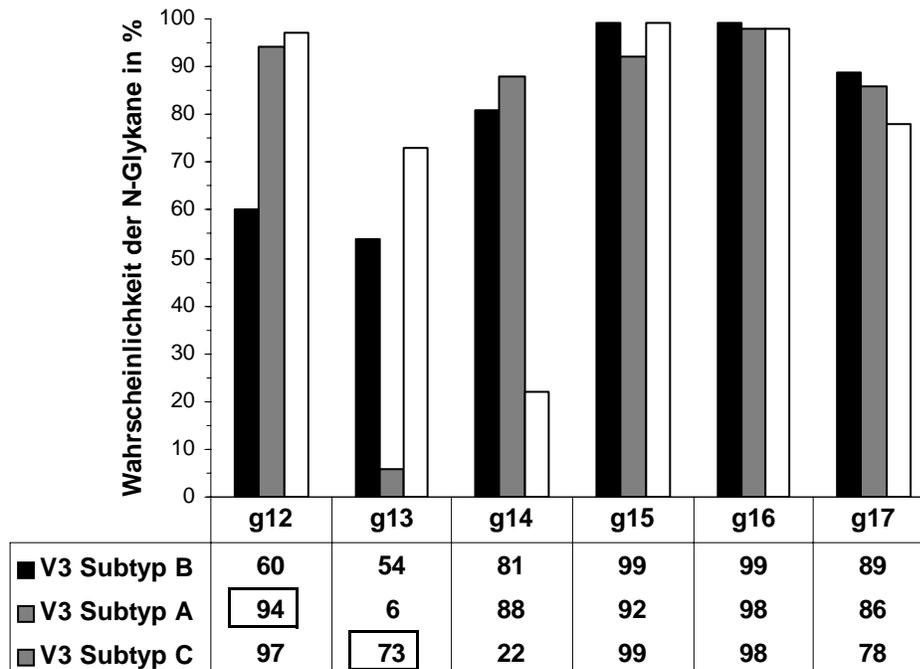


Abb. 4 Häufigkeit der N-Glykane g12-g17 bei den HIV-Subtypen-A, -B und -C

Je 50 V3-Loop Sequenzen von HIV-Subtyp-A (Neu-Guinea), -B (Deutschland) und -C (Südafrika) wurden aus Patientenserum aufgereinigt und sequenziert. Die Häufigkeit der N-Glykosylierungssignale in den drei Gruppen wurden korrespondierend zu den N-Glykosylierungssignalen des Laborstammes NL4-3 ausgewertet. Alle Subtyp-B-Sequenzen wurden von Ingo Thordsen zur Verfügung gestellt.

HIV-Subtyp-A-Sequenzen haben an Position g13 in 90% der Sequenzen kein Glykosylierungssignal. HIV-Subtyp-C-Sequenzen haben an Position g14 in 78% der Sequenzen kein Glykosylierungssignal. Bei HIV-Subtyp-B ist die Glykosylierungsstelle an Position g12 nur in 60% der Sequenzen zu finden, während sie bei HIV-Subtyp-A und -C Sequenzen in 90% der Sequenzen präsent ist. Alle analysierten Sequenzen hatten nach Vorhersage [bestimmt nach Fouchier et al., 1995] einen CCR5-tropen Phänotyp.

2.1.2 Häufigkeit der N-Glykane g12-g17 bei HIV-Sequenzen geordnet nach Korezeptornutzung

Die Häufigkeit des Glykan g15 nimmt bei den R5X4-tropen Viren ab. Noch deutlicher wird dieses Phänomen bei den X4-tropen Viren (Abbildung 5).

Um festzustellen, ob die Häufigkeit eines N-Glykans mit einem bestimmten Korezeptorphänotyp von HIV korreliert wurde eine Datenbankanalyse durchgeführt. Aus der *Los Alamos* Datenbank wurden 3 Gruppen aus HIV-Subtyp-B-Sequenzen zusammengestellt. Die erste Gruppe enthielt die V3-Loop-Sequenzen von 67 CCR5-tropen Viren. Die zweite Gruppe enthielt die Sequenzen von 27 dualtropen Viren und die dritte Gruppe enthielt die Sequenzen von 36 V3-Loop-Sequenzen von CXCR4-tropen HIV-Subtyp-B Viren. Aufgrund mangelnder Sequenzinformationen musste auf die Analyse von HIV-A- und HIV-C-Sequenzen verzichtet werden. Die N-Glykosylierungssignale wurden korrespondierend zu den N-Glykosylierungssignalen des HIV-Subtyp-B Virus NL4-3 ausgewertet.

Die Wahrscheinlichkeit einer Glykosylierungsstelle an der Position g15 ist bei CCR5-tropen Viren fast 100%. Die Wahrscheinlichkeit sinkt auf 71 bzw. 61% Prozent bei V3-Loop-Sequenzen von R5X4- bzw. X4-tropen Viren. Ansonsten konnte kein Trend beobachtet werden. Generell scheinen die X4-tropen Viren allerdings weniger Glykosylierungssignale im V3-Loop-Bereich zu besitzen.

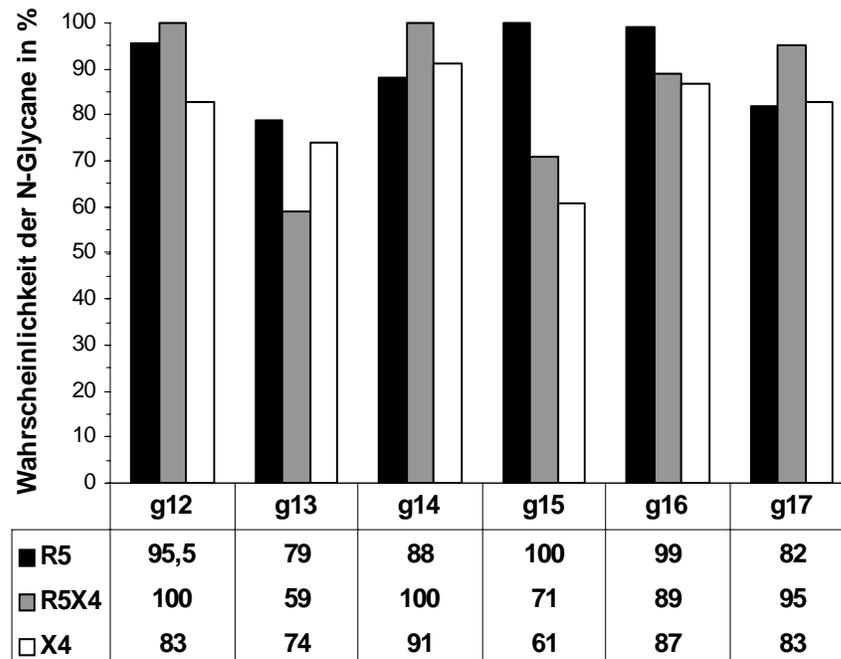


Abb. 5 Häufigkeit den N-Glykane g12-g17 bei R5-, R5X4- und X4-tropem HIV

67 HIV-Subtyp-B-V3-Loop-Sequenzen von Viren mit CCR5-Korezeptornutzung, 27 HIV-Subtyp-B-V3-Loop-Sequenzen von Viren mit CCR5/CXCR4-Korezeptornutzung und 36 HIV-Subtyp-B-V3-Loop-Sequenzen von Viren mit CXCR4-Korezeptor Spezifität wurden als Datensets aus der Los Alamos Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zusammengestellt und die potentiellen Glykosylierungsstellen analysiert.

Die Wahrscheinlichkeit einer Glykosylierungsstelle an Position g15 sinkt von fast 100% bei V3-Loop Sequenzen von R5-tropen Viren auf ca. 70 bzw. 60% bei V3-Loop Sequenzen von R5X4- bzw. X4-tropen Viren. An den anderen Positionen ist kein eindeutiger Trend zu beobachten. Die Analyse konnte nur für HIV-Subtyp-B durchgeführt werden, da für HIV-Subtyp-A und -C zu wenig Sequenzdaten vorhanden waren.

2.1.3 Häufigkeit der N-Glykane g12-g17 bei HIV-Sequenzen geordnet nach V3-Loop-Nettoladung

Die Anwesenheit des Glykans g15 wird mit zunehmender V3-Loop-Nettoladung immer seltener (Abbildung 6).

Da die Häufigkeit des N-Glykans g15 mit der Korezeptornutzung des HIV-Subtyp-B Virus korrelierte (2.1.2), wurde die Datenbankanalyse erweitert, indem V3-Loop-Sequenzen verschiedener Subtypen nach deren V3-Loop-Nettoladung in verschiedene Gruppen aufteilt wurden (die V3-Loop Nettoladung korreliert mit der Korezeptornutzung des Virus [Nabatov *et al.*, 2004]). CCR5-trope Viren haben eine V3-Loop-Nettoladung zwischen +1 und +5, CXCR4-trope Viren eine Nettoladung zwischen +6 und +10. Je 3 Gruppen aus je 54 HIV-Sequenzen (25 Subtyp-B-Sequenzen, 6 Subtyp-D-Sequenzen und 23 Subtyp-AE-Sequenzen) mit unterschiedlicher V3-Loop-Nettoladung bei pH7 wurden aus der Los Alamos Datenbank zusammengestellt. Die erste Gruppe enthielt Sequenzen mit einer Nettoladung von +1 bis +3, die zweite enthielt Sequenzen mit einer Nettoladung von +4 bis +5 und die dritte Gruppe enthielt Sequenzen mit einer Nettoladung von +6 bis +9. Die Nettoladung wurde errechnet, indem die basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) mit +1 bewertet wurden und die sauren Aminosäuren Aspartat (D) und Glutamat (E) mit -1. Histidin (H) wurde nicht berücksichtigt, da der Anteil von positiven zu ungeladenen Histidin-Seitenketten selbst bei kleinen pH-Änderungen drastisch schwankt. Die Häufigkeit der N-Glykosylierungssignale innerhalb einer Gruppe wurde korrespondierend zu den N-Glykosylierungssignalen des HIV-Subtyp-B Virus NL4-3 ausgewertet.

Mit zunehmendem Anteil positiver Aminosäuren in den Sequenzen sinkt die Wahrscheinlichkeit für ein Glykan an Position g15. Die 100%ige Wahrscheinlichkeit des Glykans bei einer Nettoladung von +1 bis +3 sinkt auf 62% bei Sequenzen mit einer Nettoladung von +4 bis +5. Bei den Sequenzen mit einer Nettoladung von +6 bis +9 beträgt die Wahrscheinlichkeit eines Glykosylierungssignals an der g15 Position sogar nur noch 30%. Der entgegengesetzte Trend konnte überraschender Weise für das Glykan an Position g14 beobachtet werden, dort steigt die Wahrscheinlichkeit von 59%, bei Sequenzen mit einer Nettoladung zwischen +1 und +3, auf über 90% bei Sequenzen mit einer Nettoladung von +6 bis +9. Ansonsten ließ sich nur ein leichter abnehmender Trend der Wahrscheinlichkeit eines N-Glykosylierungssignals mit zunehmender Nettoladung der V3-Loop-Sequenz beobachten.

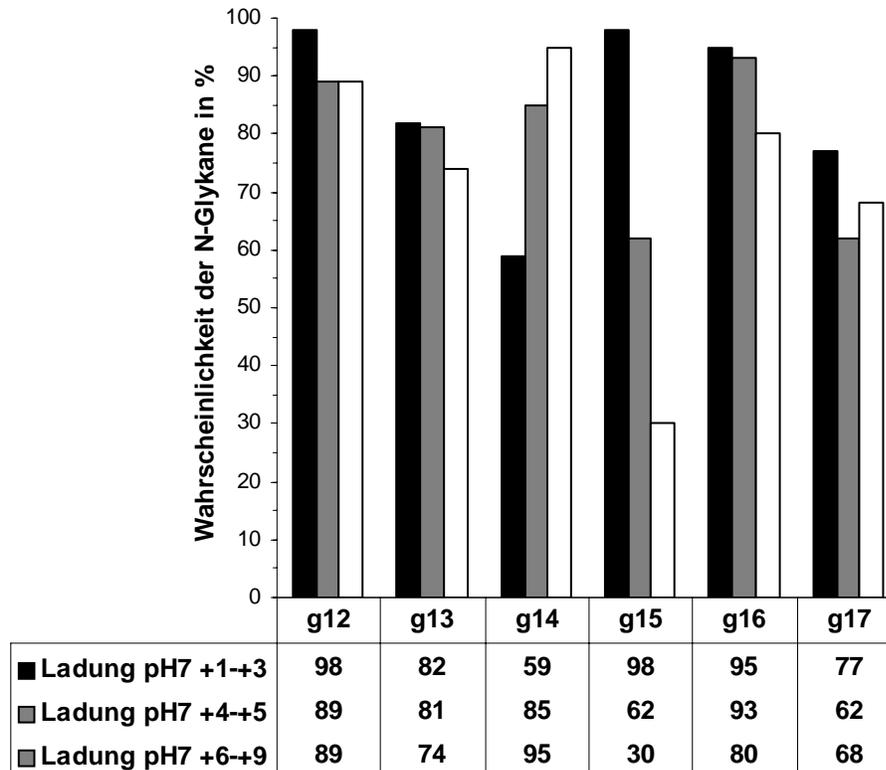


Abb. 6 Häufigkeit der N-Glykane g12-g17 bei V3-Loop-Sequenzen mit einer Nettoladung von +1 bis +9

Drei Gruppen aus je 54 Los Alamos Datenbank Sequenzen (davon 25 Subtyp-B-Sequenzen, 6 Subtyp-D-Sequenzen und 23 Subtyp-AE-Sequenzen) wurden nach ihrer V3-Loop-Nettoladung bei pH7 zusammengestellt. Die erste Gruppe enthielt Sequenzen mit einer Nettoladung von +1 bis +3, die zweite enthielt Sequenzen mit einer Nettoladung von +4 bis +5 und die dritte enthielt Sequenzen mit einer Nettoladung von +6 bis +9. Die Gruppen wurden auf die Häufigkeit der N-Glykosylierungssignale analysiert.

Die Wahrscheinlichkeit eines Glykosylierungssignals an Position g15 sinkt mit zunehmender Ladung. Von fast 100% Wahrscheinlichkeit des Glykosylierungssignals bei einer Nettoladung von +1 bis +3 sinkt sie auf 30% bei der Gruppe mit einer Nettoladung zwischen +6 und +9.

2.2 Herstellung von rekombinanten Viruschimären und Glykosylierungsmutanten

Um das Hüllprotein von HIV genetisch zu verändern wurde eine Genkassette eingesetzt. In der Arbeitsgruppe ist eine Genkassette vorhanden, die auf der proviralen DNA des HIV-Subtyp-B Laborstammes NL4-3 basiert, pNL4-3 [Polzer *et al.*,2001]. Besonders an dieser Genkassette ist, dass man über die Restriktionsschnittstellen *BstEII* und *BamHI* das *env*-Fragment austauschen kann und man damit ein Werkzeug in der Hand hat, welches erlaubt, Viruschimären herzustellen. Durch Transfektion der proviralen-DNA wird eine produktive Virusinfektion gestartet.

Man kann innerhalb des Provirusvektors weder den V3-Loop austauschen, noch durch gezielte Mutagenese verändern, da der Provirusvektor einerseits zu groß ist und andererseits zu viele multiple Restriktionsschnittstellen von *BglII*, *XbaI* besitzt. Deshalb wurde die *env*-Genkassette in einen pUC-Vektor kloniert und in diesem verändert. Zu Beginn der Arbeit war ein pUC-Vektor mit der *env*-Genkassette von NL4-3 vorhanden, in welchem man den V3-Loop über die Schnittstellen *BglII* und *XbaI* austauschen konnte.

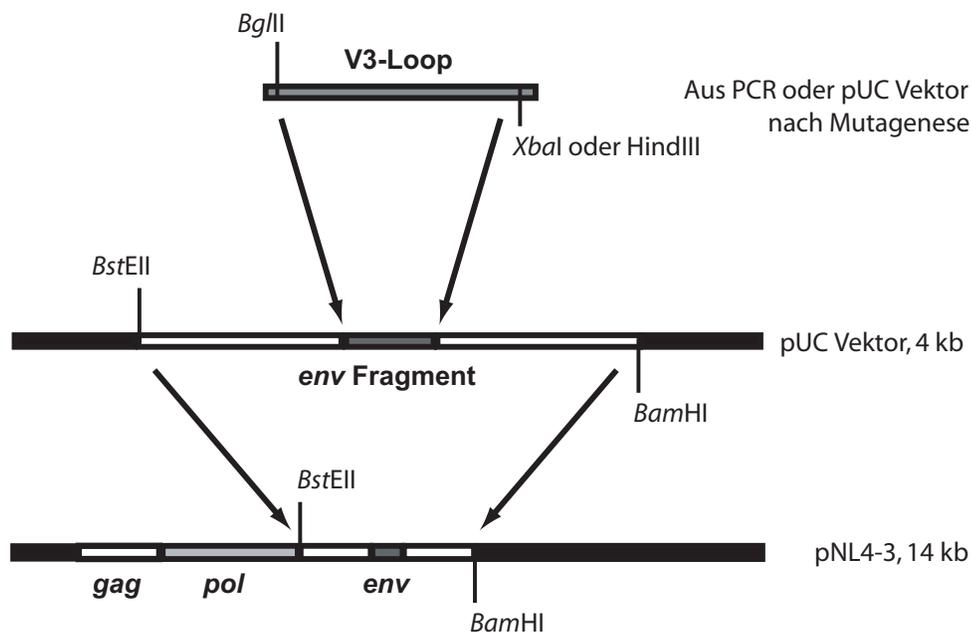


Abb. 7 Klonierungsschema zur Herstellung von Viruschimären

Glykosylierungsvarianten können durch den Austausch des V3-Loops im pUCenv Vektor hergestellt werden. Das env Gen wird über die BstEII und BamHI Schnittstellen im proviralen Vektor ausgetauscht.

Die “*Virus Entry*”-Eigenschaften eines HIV hängt von dem gp120 ab. Daher sollte der Provirusvektor so verändert werden, dass die resultierenden Viren die Hüllproteine von HIV-Subtyp-A und -C tragen.

Es wurden vier neue Genkassetten mit den zugehörigen pUC-Vektoren hergestellt, um die Möglichkeit zu haben, die Glykosylierungssignale der HIV-Viruschimären zu mutieren. Für diese wurde:

1. ein HIV-Subtyp-A-V3-Loop (92UG03, Accession Nr. AAT67473) aus Oligonukleotiden amplifiziert und in das *env*-Fragment des NL4-3 Virus inseriert (siehe 2.2.1).
2. das komplette *env*-Gen von dem Laborstamm NL4-3 mit dem *env*-Gen des CXCR4-tropen HIV-Subtyp-AG Virus BD6.1 (Accession Nr. AY271690) ausgetauscht (siehe 2.2.2).
3. der V3-Loop der NL4-3-*env*-BD6.1-Chimäre durch einen CCR5-tropen V3-Loop aus einem Patientenisolat aus Neu-Guinea ersetzt (2.2.3).
4. das komplette *env*-Gen des Laborstammes NL4-3 mit einem synthetisch hergestellten *env*-Gen des CCR5-tropen HIV-Subtyp-C Virus HIV1084i (Accession Nr. AY805330) ausgetauscht (2.2.4).

Damit standen drei HIV-Subtyp-A Viren zur Verfügung und ein HIV-Subtyp-C Virus. Die Vektoren für die Genkassette und die pUC Vektoren wurden wie folgt benannt:

Tab. 1 Nomenklatur der hergestellten Vektoren für die Genkassette

Vektor	Insert		Subtyp		Korezeptor
	<i>env</i>	V3-Loop	<i>env</i>	V3	
pUCenv	NL4-3	NL4-3	B	B	CXCR4
pNL4-3	NL4-3	NL4-3	B	B	CXCR4
pUCenv-V3-A	NL4-3	92UG03	B	A	CCR5
pNL-V3-A	NL4-3	92UG03	B	A	CCR5
pUCenv -A _{X4}	BD6.1	BD6.1	A	A	CXCR4
pNL-A _{X4}	BD6.1	BD6.1	A	A	CXCR4
pUCenv-A _{R5}	BD6.1	Patient	A	A	CCR5
pNL-A _{R5}	BD6.1	Patient	A	A	CCR5
pUCenv -C _{R5}	1084i	1084i	C	C	CCR5
pNL-C _{R5}	1084i	1084i	C	C	CCR5

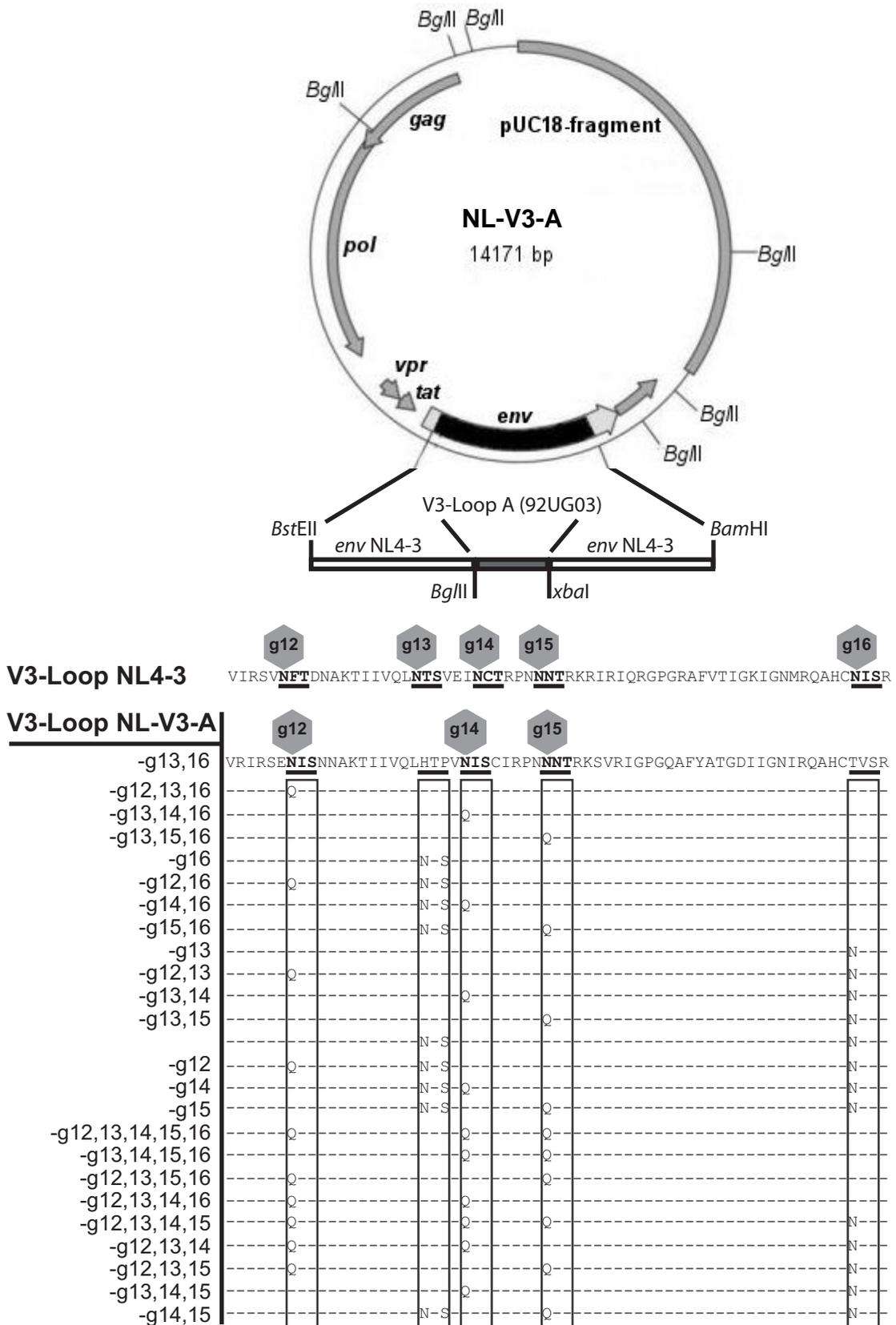
2.2.1 Herstellung der NL-V3-A-Viruschimäre und deren Glykosylierungsmutanten

Aus einer HIV-Subtyp-B-Genkassette wurde eine Genkassette hergestellt, die für einen HI-Virus kodiert, der die “*Virus Entry*”-Eigenschaften eines HIV-Subtyp-A Virus aufweist. Die minimale Domäne, die diese Eigenschaften vermittelt, ist der V3-Loop, da dieser maßgeblich an der Korezeptorbindung und der Abschirmung neutralisationssensitiver Epitope beteiligt ist.

Daher wurde der V3-Loop des HIV-Subtyp-A Virusisolates 92UG03 synthetisch über SOE-PCR mit den Oligonukleotiden 92UG03-1, 92UG03-2 und den *Primern* 92UG03 fw, 92UG03 rev amplifiziert und über die Schnittstellen *Bgl*II und *Xba*I in den pUCenv Vektor kloniert (pUCenv-V3-A). Basierend auf diesem Vektor wurden die N-Glykosylierungssignale g12 bis g16 mittels zielgerichteter Mutagenese in verschiedenen Kombinationen deletiert (siehe unten), beziehungsweise, sofern sie nicht vorhanden waren, insertiert. Die vorhandenen Glykosylierungssignale (NX(S/T)) wurden durch die konservative Aminosäuresubstitution von Asparagin (N) zu Glutamin (Q) mutiert, so dass die Aminosäuresequenzen zwar keine N-Glykosylierungssignale bilden, aber diesselben chemischen Eigenschaften besitzen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird diese Mutation als Deletion des Glykosylierungssignales bezeichnet. Die zielgerichtete Mutagenese wurde in dem pUCenv-V3-A Vektor durchgeführt, da der limitierende Faktor dieser Methode eine Plasmidgrösse von 10 kb ist. Um Mutagenese-Ereignisse außerhalb des V3-Loops auszuschließen, wurde nach erfolgter Mutagenese der neue V3-Loop über *Bgl*II und *Xba*I in den originalen pUCenv Vektor kloniert. Die erzeugten *env*-V3-A Fragmente wurden über die Schnittstellen *Bst*EII und *Bam*HI in die HIV-Genkassette pNL4-3 kloniert.

Es wurden insgesamt 25 NL-V3-A Glykosylierungsmutanten hergestellt, die nach “*Single Round*” Infektion von Ghost-CD4/CCR5-, Ghost-CD4/CXCR4- und Ghost-CD4-Reporterzellen alle einen CCR5-tropen Phänotyp aufwiesen.

Tab. 2: V3-Loop Sequenzen der hergestellten NL-V3-A-Glykosylierungsvarianten



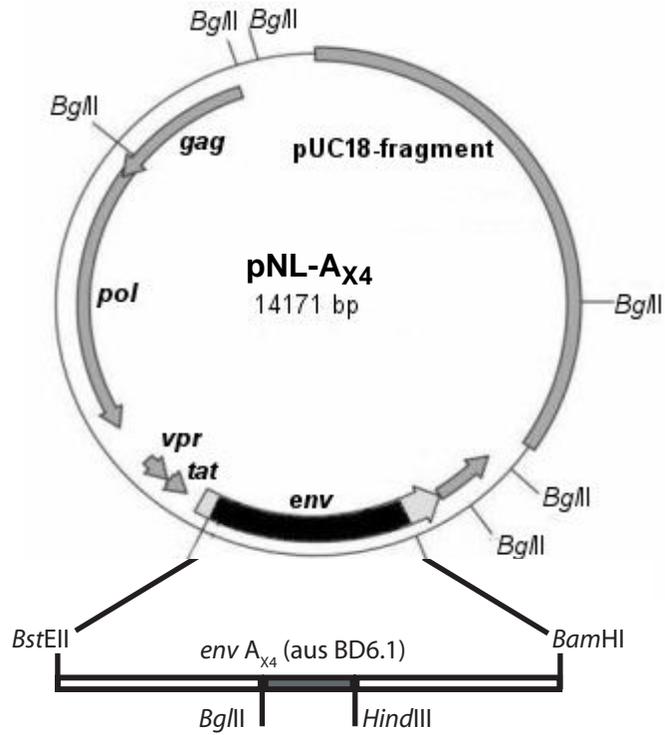
2.2.2 Herstellung der NL-A_{X4}-Viruschimäre und deren Glykosylierungsmutanten

Da auch andere Regionen neben dem V3-Loop die “*Virus Entry*” Eigenschaften eines Virus beeinflussen (z.B. die CD4-Bindung), wurde mit Hilfe der Genkassette eine HIV-Chimäre hergestellt, welche die Hüllproteine eines HIV-Subtyp-A Virus besitzt. Nur die Hüllproteine sind an dem “*Virus Entry*” beteiligt, daher unterscheidet sich ein solches Virus lediglich in den “*Entry*” Eigenschaften von dem ursprünglichen NL4-3-Virus.

Das HIV-Subtyp-A-*env*-Gen wurde aus der proviralen DNA des HIV-Klons pBD6.1 (Accession AY271690, Tebit, D.) amplifiziert. Die PCR-Primer enthielten die Restriktionsschnittstellen *BstEII* (pBDenv fw) und *BamHI* (pBDenv rev) im Leseraster und an den zu der pNL4-3 Genkassette korrespondierenden Codons. Das PCR-Produkt wurde über diese Schnittstellen in den pUCenv Vektor überführt (pUCenv-A_{X4}). Die Insertion einer *XbaI*-Schnittstelle im *env*-Fragment an der Position korrespondierend zur *XbaI*-Schnittstelle von NL-V3-A führte zu einem nicht funktionalen gp120. Daher wurde die Klonierungsstrategie der Genkassette verändert und der V3-Loop über die einfach vorhandenen Schnittstellen *BglII* und *HindIII* ausgetauscht. Die Glykosylierungssignale für die Glykane g12 bis g16 wurden in dem Vektor pUCenv-A_{X4} mittels zielgerichteter Mutagenese deletiert beziehungsweise inseriert. Zudem wurde die Aminosäuresequenz an der Position g15 (GNPI) gegen die Aminosäuresequenzen GNPT, GNNI, NNNI und die Glykosylierungssignale GNNT und NNNT ausgetauscht, da es Hinweise bei CXCR4-tropen HIV-Subtyp-B Viren gibt, dass diese Aminosäuren die Neutralisationssensitivität beeinflussen können. Nach erfolgter Mutagenese wurde der mutierte V3-Loop über *BglII* und *HindIII* in den unveränderten pUCenv-A_{X4}-Vektor eingebracht. Die mutierten *env*-A_{X4}-Fragmente wurden über die Schnittstellen *BstEII* und *BamHI* in die HIV-Genkassette pNL4-3 kloniert.

Es wurde eine HIV-Subtyp-A-Genkassette mit dazugehörigem pUCenv-A_{X4} Vektor hergestellt. 20 NL-A_{X4}-Glykosylierungsmutanten wurden hergestellt, die nach “*Single Round*” Infektion von Ghost-CD4/CCR5-, Ghost-CD4/CXCR4- und Ghost-CD4-Reporterzellen alle einen CXCR4-tropen Phänotyp aufwiesen.

Tab. 3: V3-Loop Sequenzen der hergestellten NL-A_{X4}-Glykosylierungsvarianten



V3-Loop NL-A _{X4}	g12	g13	g14	g15	g16	
-g13,15	RSENI	TNAKTI	IVQLVTPVK	INCTR	PCNP	IRKRVGIGPGQAFHATGNIIGDIRRAQONVSGTEWK
-g13,15 GNPT					-T	
-g13,15 GNNI					-N	
-g13 GNNT					-NT	
-g13,15 NNNI					-N-N	
-g13 NNNT					-N-NT	
-g15		N-S				
-g14,15		N-S	Q			
-g15 GNPT		N-S			-T	
-g15,16		N-S				Q
-g13,14,15			Q			
-g13,15,16						Q
-g13,14,15 GNPT			Q		-T	
-g13,15,16 GNPT					-T	Q
-g13,14,15,16			Q			Q
-g15,16 GNPT		N-S			-T	Q
-g14,15,16		N-S	Q			Q
-g14,15,16 GNPT		N-S	Q		-T	Q
-g14,15 GNPT		N-S	Q		-T	
-g13,14,15,16 GNPT			Q		-T	Q

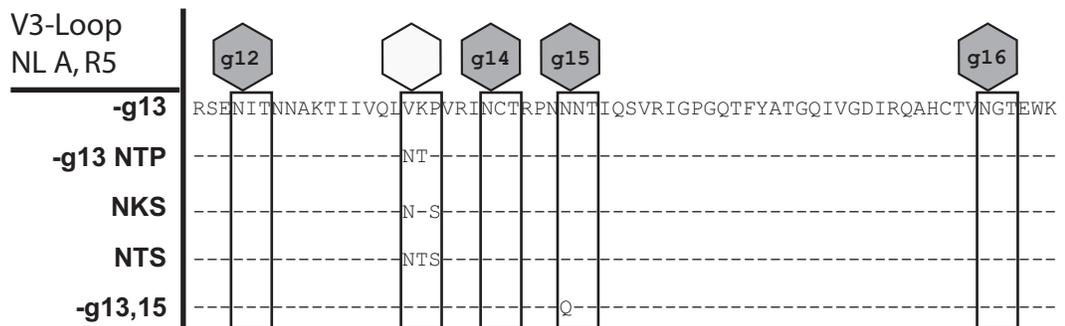
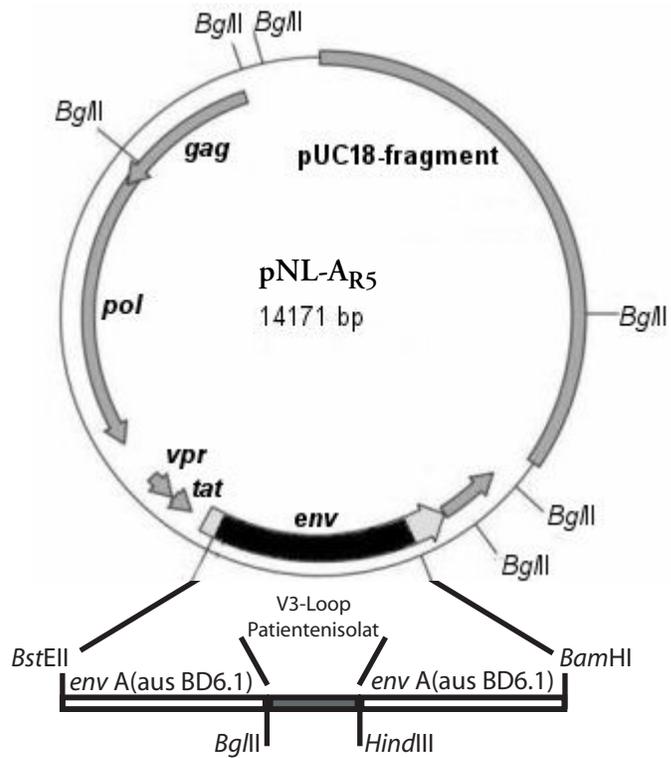
2.2.3 Herstellung der NL-A_{R5}-Viruschimäre und deren Glykosylierungsmutanten

Um ein R5-tropes HIV mit Subtyp-A-Hüllprotein zu erhalten, wurde der V3-Loop im pUCenv-A_{X4} Vektor durch einen V3-Loop ersetzt, der aus einer Blutprobe von einem HIV-Subtyp-A infizierten Patienten aus Neu-Guinea amplifiziert wurde (Sequenz siehe Tabelle 4). Der Austausch des V3-Loops ist ausreichend, um die Korezeptorspezifität des resultierenden Virus zu verändern.

Der V3-Loop wurde aus einem Vektor amplifiziert, der im Zuge der Sequenzanalyse zur Bestimmung der Häufigkeit der N-Glykane in den Subtypen A, B und C kloniert wurde (2.1.1). Die verwendeten Primer (V001 fw, V001 rev) enthielten die Schnittstellen *Bgl*II und *Hind*III, über welche der V3-Loop in den pUCenv-A_{X4} Vektor inseriert wurde. Der erhaltene Vektor wurde in pUCenv-A_{R5} umbenannt. Alle zielgerichteten Mutagenesen zur Erstellung der Glykosylierungs- und Sequenzvarianten wurden in diesem Vektor durchgeführt und über *Bgl*II, *Hind*III in den nicht mutierten pUCenv-A_{R5} Vektor überführt. Anschließend wurde das *env*-Gen über die einmal vorhandenen Schnittstellen *Bst*EII und *Bam*HI in die pNL4-3-Genkassette eingebracht.

Es wurden 5 verschiedene Glykosylierungsvarianten hergestellt. Dabei wurden die N-Glykane g13 und g15 mutiert, da g13 nur selten in HIV-Subtyp-A vorkommt (2.1.1) und die Deletion von Glykan g15 bei HIV-Subtyp-B einen Effekt auf die Infektiosität und Neutralisationssensitivität zeigt. Die erstellten Glykosylierungsmutanten von NL-A_{R5} zeigten alle einen rein CCR5-tropen Phänotyp bei der Infektion von Ghost-Reporterzellen.

Tab. 4: V3-Loop Sequenzen der hergestellten NL-A_{R5}-Glykosylierungsvarianten



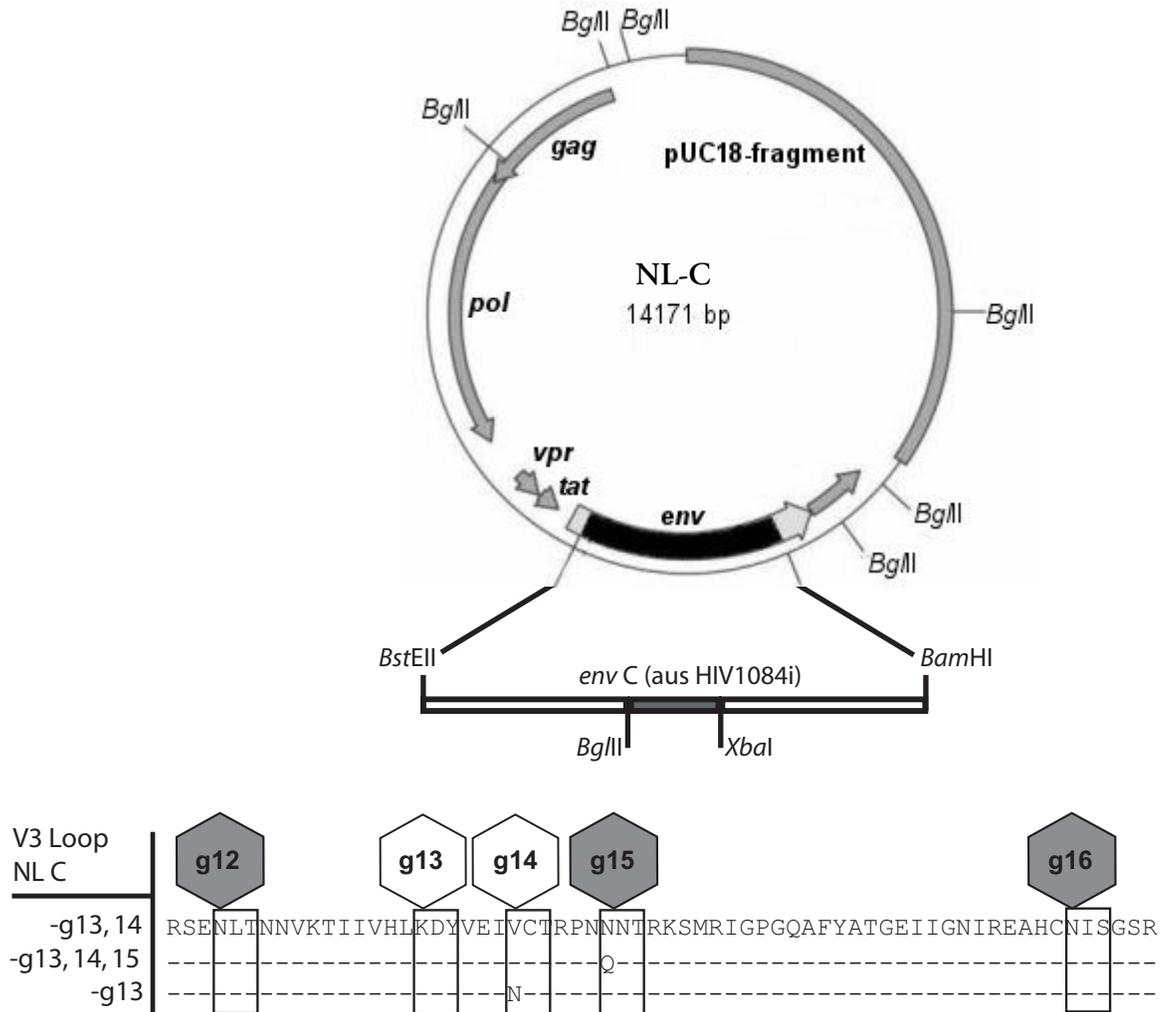
2.2.4 Herstellung der NL-C-Viruschimäre und deren Glykosylierungsmutanten

Eine HIV-Subtyp-C-Viruschimäre wurde erhalten, indem man das *env*-Gen der pNL4-3 Genkassette durch ein HIV-Subtyp-C-*env*-Gen ersetzte.

Die vorhandenen *env*-Gene waren leider ungeeignet für eine Genkassette, da sie alle Schnittstellen mehrfach besaßen. Daher wurde ein *env*-Gen nach der Sequenz des HIV-Subtyp-C Isolates 1084i (Accession Nr. AY805330) von der Firma Geneart (Regensburg) synthetisiert. Dabei wurde eine *Xba*I-Schnittstelle hinter dem V3-Loop und die beiden *env*-Gen flankierenden Schnittstellen *Bst*EII und *Bam*HI eingefügt. Das Einfügen der *Xba*I-Schnittstelle hatte einen konservativen Aminosäureaustausch von Lysin (K) zu Arginin (R) zur Folge. Das *env*-Gen wurde in den Vektor pUCenv insertiert und der resultierende Vektor pUCenv-C für alle zielgerichteten Mutagenesen verwendet. Die modifizierten *env*-Gene wurden anschließend über *Bst*EII und *Bam*HI in die pNL4-3 Genkassette insertiert.

Es wurden drei NL-C Viren erhalten, die sich hinsichtlich ihrer Glykosylierung unterschieden. Dabei wurde das Glykosylierungssignal für das N-Glykan g14 insertiert, da dieses in den meisten HIV-Subtyp-C Sequenzen nicht vorhanden ist (2.1.1). Ebenfalls wurde das Glykosylierungssignal für das N-Glykan g15 mutiert, da dieses bei HIV-Subtyp-B einen Effekt auf die Infektiosität und Neutralisationssensitivität zeigt.

Tab. 5: Liste der hergestellten NL-C-Glykovarianten (R5-trop)



2.3 Expression von gp120/gp160 Proteinen

Es wurde ein gp160-Expressionsvektor hergestellt. Mit dem Expressionsvektor wurde über die Größe des exprimierten gp120 überprüft, ob die vorhandenen oder eingefügten Glykosylierungssignale tatsächlich auch zu einer Modifikation führen (Abbildung 9 A). Über das Verhältnis von unprozessierten gp160 zu gp120 in den transfizierten Zellen wurde überprüft, ob es durch die eingefügten Mutationen zu einer gestörten Prozessierung kommt (Abbildung 9 B). Zudem können nach Transfektion *in vitro* Synzytientests durchgeführt werden, ohne infektiöses Material zu verwenden.

Um den gp160-Expressionsvektor pSVrevATG160 (zur Verfügung gestellt von Schaal, H., Düsseldorf) kompatibel zu den vorhandenen Genkassetten zu machen, wurde mittels zielgerichteter Mutagenese die *Bam*HI -Schnittstelle an Position 3427 bp zerstört. Damit waren die Schnittstellen *Bst*EII und *Bam*HI nur noch einmal vorhanden und das *env*-Gen konnte gegen die Genkassette ausgetauscht werden. Der erhaltene Vektor wurde pgp160 genannt. Der Vektor enthält das *rev*-, *tat*-, *vpu*- und *env*-Gen des HIV unter der Kontrolle eines SV40-Promoters.

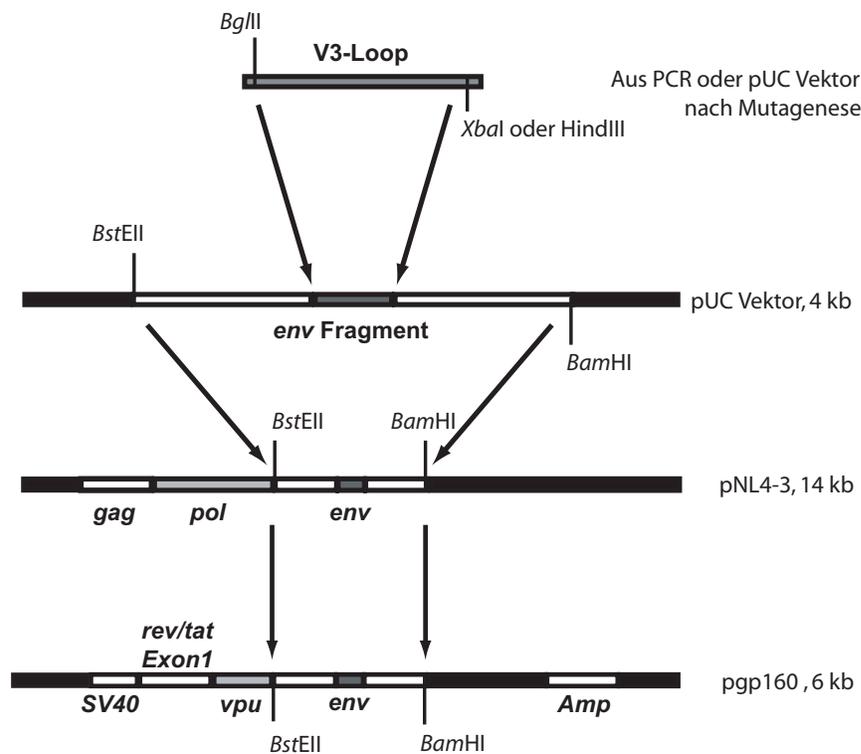


Abb. 8 Klonierungsschema zur Herstellung von gp160-Expressionsvektoren

Von mehreren NL-V3-A-Glykosylierungsvarianten wurde das korrespondierende *env*-Gen über die Schnittstellen *Bst*EII und *Bam*HI in den *pgp*160 Vektor überführt, um zu überprüfen, ob die potentiellen Glykosylierungsstellen im V3-Bereich auch genutzt werden. Nach der Expression in HeLaP4-Zellen wurde das *gp*120 aus dem Zellkulturüberstand immunpräzipitiert und anschließend im Western-Blot detektiert oder mittels Dot-Blot direkt aus dem Zellkulturüberstand quantifiziert. Unprozessiertes *gp*160 und prozessiertes *gp*120 wurde direkt aus Zelllysats mittels Western-Blot nachgewiesen.

Es wurden insgesamt 14 verschiedene Expressionsvektoren für diese Arbeit kloniert:

Tab. 6: Hergestellte Expressionsvektoren

Vektor: <i>pgp</i> 160	<i>env</i> Gen	V3-Loop	Subtyp	
			<i>env</i>	V3-Loop
	NL4-3	NL4-3	B	B
V3-A	NL4-3	92UG03	B	A
V3-A -g13,15	NL4-3	92UG03	B	A
V3-A -g14,15	NL4-3	92UG03	B	A
V3-A -g14,16	NL4-3	92UG03	B	A
V3-A -g13,15,16	NL4-3	92UG03	B	A
V3-A -g12,13,14,15	NL4-3	92UG03	B	A
V3-A -g12,13,14,15,16	NL4-3	92UG03	B	A
V3-A -g13,14,15,16	NL4-3	92UG03	B	A
918	NL4-3	Pat. Isolat 918	B	B
918 -g15	NL4-3	Pat. Isolat 918	B	B
A _{x4} -g13,15 GNNI	BD6.1	BD6.1	A	A
A _{x4} -g13,15 GNPT	BD6.1	BD6.1	A	A
A _{x4} -g13,15 GNPI	BD6.1	BD6.1	A	A

Die Konzentration von *gp*120 betrug zwischen 15 und 30 ng/ml im Zellkulturüberstand (Daten nicht gezeigt). Die abnehmende Größe des immunpräzipitierten *gp*120 Proteins von Glykosylierungsvarianten mit bis zu 5 deletierten Glykosylierungssignalen im Western-Blot bewies, dass alle Glykosylierungsstellen auch erkannt und genutzt wurden (Abbildung 9 A). Das Verhältnis von *gp*160 zu *gp*120 in transfizierten HeLaP4-Zellen zeigte, dass auch bei der Deletion von fünf Glykosylierungssignalen das *gp*160 korrekt zu *gp*120 prozessiert wird (Abbildung 9 B).

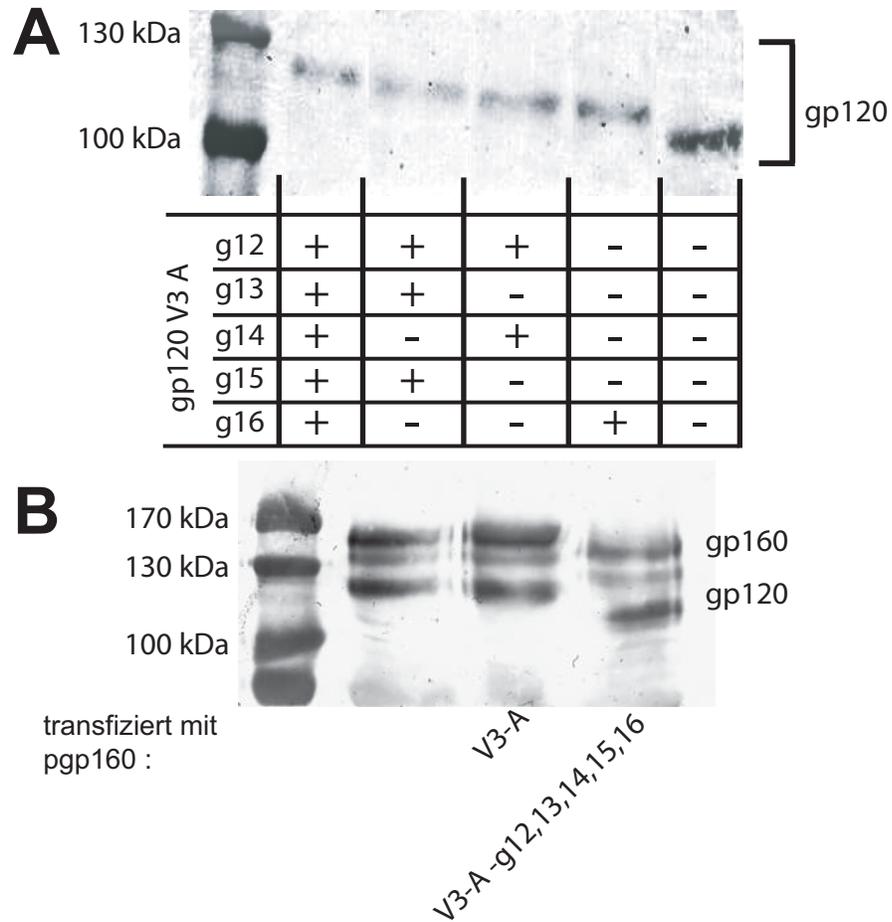


Abb. 9 Expression von HIV-gp160

A.) Western-Blot nach Immunopräzipitation der gp120-Proteine V3-A/ -g14,16/ -g13,15,16/ -g12,13,14,15/ -g12,13,14,15,16. Je mehr Glykosylierungssignale deletiert wurden, desto kleiner wird das gp120 Protein.

B.) Western-Blot der Glykoproteine gp120 und gp160 aus Zelllysaten von pgp160, pgp160-V3-A und pgp160-V3-A-g12,13,14,15,16 transfizierten Zellen. Sowohl das gp160 als auch gp120 des env-Fragments mit deletierten Glykosylierungssignalen war deutlich kleiner als die der glykosylierten Varianten. Das Verhältnis von exprimierten gp160 zu gp120 war bei allen drei Zelllysaten gleich.

2.4 Das N-Glykan g15 unterstützt die CCR5-Korezeptornutzung

2.4.1 Untersuchungen mit den NL-V3-A-Viren

Das N-Glykan g15 unterstützt bei den NL-V3-A-Glykosylierungsvarianten die Interaktion des gp120 mit dem Korezeptor CCR5. Einerseits zeigten die Viren mit g15 eine höhere Infektiosität, andererseits sind sie resistenter gegen die Neutralisation mit HIV-positivem Serum oder monoklonalen Antikörpern.

Die Glykosylierungsvarianten wurden zuerst auf ihre Fähigkeit getestet, Synzytien (mehrkernige Riesenzellen) in HeLaP4-Zellen zu induzieren. Eine HIV-infizierte Zelle baut die viralen Glykoproteine in die Zellmembran ein und diese können mit benachbarten Zellen fusionieren. HeLaP4-Zellen exprimieren neben CD4 und CXCR4 auch den Korezeptor CCR5 und können daher auch bei der Infektion mit CCR5-tropen Viren Synzytien ausbilden. Die Ausbildung von Synzytien ist einerseits ein Marker für die Fusionsaktivität der Glykoproteine und andererseits korreliert sie oft mit der Infektiosität des Virus [van't Woud *et al.*, 1998].

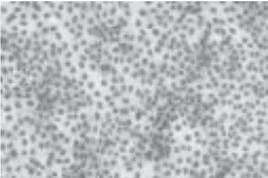
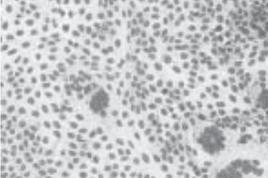
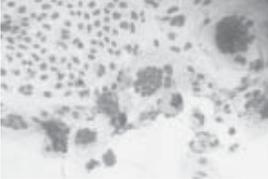
Bei dem Synzytien-Test wurden frisch selektionierte HeLaP4-Zellen mit 10 ng/ml p24 der NL-V3-A-Glykosylierungsvarianten infiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Alle Viren mit einem deletierten Glykosylierungssignal an der Position g15 zeigten keine Fähigkeit Synzytien zu induzieren. War ein Glykosylierungssignal an Position g15 vorhanden, aber keines an der Position g16, induzierten die Viren zwar Synzytien, aber durch die Insertion eines Glykosylierungssignals an Position g16 waren diese deutlich größer und traten vermehrt auf. Die Ausnahmen hierzu bildeten die beiden Klone NL-V3-A -g13,14 und NL-V3-A -g12,13,14, bei denen kein vermehrtes Auftreten von Synzytien beobachtet werden konnte. Die Existenz der Glykosylierungsstellen g12, g13 und g14 korrelierten nicht mit dem Auftreten von Synzytien in der HeLaP4-Zellkultur. Das Glykan g15 trägt also entweder zu einer gesteigerten gp120 Fusionsaktivität bei oder die Viren mit Glykan g15 waren deutlich infektiöser.

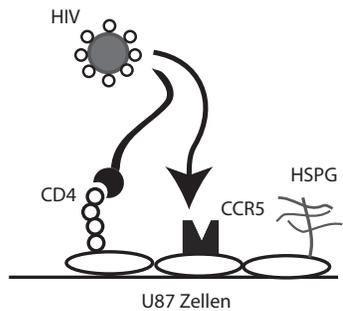
Abb. 10 Fähigkeit der NL-V3-A-Viren Synzytien zu induzieren

Die hergestellten NL-V3-A-Viren wurden auf ihre Fähigkeit, Synzytien auf HeLaP4 (CD4/CCR5/CXCR4)-Zellen zu induzieren, getestet. Dafür wurden 72 Stunden nach Infektion mit 10 ng/ml p24 Virusüberstand die Zellkerne angefärbt.

Alle Viren mit deletiertem Glykosylierungssignal an Position g15 zeigten keine Fähigkeit Synzytien zu induzieren. Die Viren mit einer Kombination von Glykosylierungssignalen an den Positionen g15 und g16 hatten eine erhöhte Fähigkeit Synzytien zu induzieren.

NL Vektor	Glykosylierungssignal					Synzytien		
	g12	g13	g14	g15	g16			
V3-A	+	+	+	+	+	+++	<div style="text-align: center;">neg</div> 	
V3-A-g12	-	+	+	+	+	+++		
V3-A-g13	+	-	+	+	+	+++		
V3-A-g14	+	+	-	+	+	+++		
V3-A-g12,13	-	-	+	+	+	+++		
V3-A-g16	+	+	+	+	-	++		
V3-A-g12,16	-	+	+	+	-	++		
V3-A-g13,14	+	-	-	+	+	++		
V3-A-g13,16	+	-	+	+	-	++		
V3-A-g14,16	+	+	-	+	-	++		
V3-A-g12,13,16	-	-	+	+	-	++		
V3-A-g13,14,16	+	-	-	+	-	++		
V3-A-g12,13,14	-	-	-	+	+	++		
V3-A-g12,13,14,16	-	-	-	+	-	++		
V3-A-g15	+	+	+	-	+	neg	<div style="text-align: center;">++</div> 	
V3-A-g13,15	+	-	+	-	+	neg		
V3-A-g14,15	+	+	-	-	+	neg		
V3-A-g15,16	+	+	+	-	-	neg		
V3-A-g12,13,15	-	-	+	-	+	neg		
V3-A-g12,15,16	-	+	+	-	-	neg		
V3-A-g13,15,16	+	-	+	-	-	neg		
V3-A-g13,14,15	+	-	-	-	+	neg		
V3-A-g14,15,16	+	+	-	-	-	neg		
V3-A-g12,13,14,15	-	-	-	-	+	neg		
V3-A-g12,13,15,16	-	-	+	-	-	neg		
V3-A-g13,14,15,16	+	-	-	-	-	neg		
V3-A-g12,13,14,15,16	-	-	-	-	-	neg		
								<div style="text-align: center;">+++</div> 

Ob die gesteigerte Fähigkeit der +g15 NL-V3-A-Glykosylierungsvarianten Synzytien zu induzieren auf eine erhöhte Fusionsaktivität oder auf ein infektiöseres Virus zurückzuführen ist, wurde durch eine Langzeitreplikation näher untersucht (Abbildung 11). Dabei stellte sich heraus, dass die +g15 Glykosylierungsvarianten deutlich infektiöser als die -g15 Mutanten sind.



Schema 1: HIV Infektion von U87 Zellen

Für die Untersuchung der Langzeitreplikation wurden U87-CD4/CCR5-Zellen mit einer Auswahl an +g15 und -g15 Glykosylierungsvarianten infiziert und der Virusgehalt der Zellkulturüberstände über einen Zeitraum von 12 Tagen gemessen. U87 Zellen wurden aus methodischen Gründen verwendet, da diese sehr langsam wachsen und damit auch über eine Zeitspanne von 12 Tagen keinen Mediumwechsel benötigen (Schema 1).

In Abbildung 11 sind Viren mit einer Glykosylierungsstelle an der Position g15 als Kurven mit durchgezogener Linie dargestellt, während Viren ohne Glykosylierungsstelle als Kurven mit gestrichelter Linie dargestellt werden. Die deutlichsten Unterschiede in der Replikationskinetik der Glykosylierungsvarianten kann man an Tag 6 erkennen. Alle Virusüberstände von Zellen, welche mit Glykosylierungsmutanten infiziert wurden, die ein Glykosylierungssignal an Position g15 haben, hatten an Tag 6 die höchsten p24 Konzentrationen. Die OD bei einer Wellenlänge von 405 nm war bei Glykosylierungsvarianten mit N-Glykan g15 größer als 1, während die Werte bei den mit -g15 Glykosylierungsvarianten infizierten Zellkulturüberständen kleiner als 0,5 waren. Die Extinktion bei den -g15 Glykosylierungsvarianten stieg erst ab Tag 9 und erreichte erst ab Tag 12 bei allen Varianten eine OD über 0,5 (Daten nicht gezeigt). Das Glykan g16 scheint trotz erhöhter Synzytienbildung (Abb. 10) keinen Einfluss auf die Infektiosität zu haben, da der Virus NL-V3-A -g13 einer der langsamsten von den +g15 Virusvarianten war. Die Anzahl der deletierten N-Glykane, zumindest die im V3-Bereich, spielten für die Infektion ebenfalls keine Rolle, da die Glykosylierungsvariante NL-V3-A -g12,13,14,15,16 von den -g15 Glykosylierungsvarianten die höchste p24-Konzentration an Tag 9 zeigte. Die Unterschiede in der Langzeitreplikation sind wahrscheinlich auf den Virus "Entry" zurückzuführen, da alle für die Replikation verantwortlichen Proteine in sämtlichen Glykosylierungsvarianten identisch sind. Die NL-V3-A +g15 Glykosylierungsvarianten zeichnen sich also durch eine höhere Infektiosität aus.

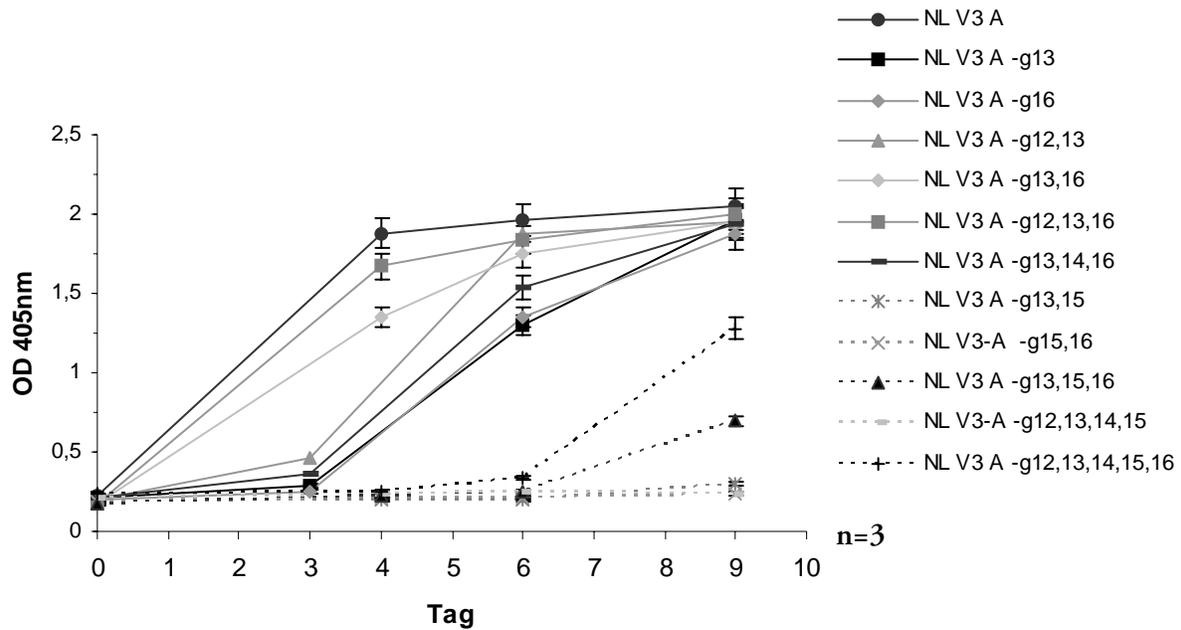
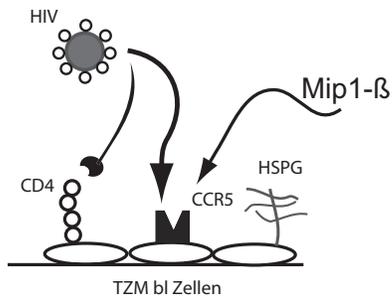


Abb. 11 Langzeitreplikation von NL-V3-A-Glykovarianten

Mit je 5 ng/ml p24 der NL-V3-A-Glykosylierungsvarianten wurden U87 CD4/CCR5-Zellen infiziert. Zellkulturüberstände wurden alle 3 Tage abgenommen und anschließend der p24-Gehalt mittels ELISA bei 405nm quantifiziert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die p24-Konzentration bei Viren mit einer potentiellen Glykosylierungsstelle an Position g15 über die Zeit schneller anstieg als die p24-Konzentrationen bei Viren mit deletiertem N-Glykosylierungssignal.

Eine schnellere Langzeitreplikation von NL-V3-A +g15 Glykovarianten kann durch mehrere Faktoren verursacht werden. Zum einen spielt die Affinität der Viren zu Heparansulfaten oder anderen Adsorptionsrezeptoren eine Rolle, zum anderen die Affinität von gp120 zu CD4 und die Affinität zu dem CCR5 Korezeptor. Um zwischen diesen Effekten zu unterscheiden, wurde die Bindung von gp120 an den Korezeptor CCR5 durch den natürlichen Liganden von CCR5, Mip1- β , inhibiert (Abbildung 12). Die +g15 Glykosylierungsvarianten haben alle eine deutlich höhere Affinität zu dem CCR5 Korezeptor.



Schema 2: Mip1- β
Kompetition

TZM-bl-Zellen wurden mit gleichen infektiösen Titern der NL-V3-A-Glykovarianten in der Anwesenheit verschiedener Konzentrationen Mip1- β infiziert. TZM-bl-Zellen sind Hela-Zellen, welche durch ihre hohe Korezeptorkonzentration von CXCR4 und CCR5 auf ihrer Zelloberfläche besonders gut von HIV infiziert werden. Zudem besitzen TZM-bl-Zellen ein β -Galactosidase Reportergen unter einem HIV *tat*-Promoter, so dass man infizierte Zellen mit X-Gal blau anfärben kann. Die Anzahl der infizierten Zellen bei der Infektion ohne die Anwesenheit von Mip1- β wurde auf 100% Infektion gesetzt (Abb. 12). (Schema 2)

Die Anzahl der infizierten Zellen mit einem potentiellen Glykosylierungssignal an der Position g15, in Abbildung 12 A als schwarze Balken dargestellt, stieg mit ansteigender Konzentration des Mip1- β . Doch die -g15 Glykosylierungsvarianten, dargestellt als weiße Balken, wurden schon bei einer Mip1- β Konzentration von 2 μ g/ml zu 90% inhibiert, bei höheren Konzentrationen sogar zu 99% (Abbildung 12).

Da Mip1- β in der Lage war, -g15 Glykosylierungsvarianten zu inhibieren, aber nicht +g15 Glykosylierungsvarianten, muss das N-Glykan g15 die Affinität zu dem Korezeptor unterstützen.

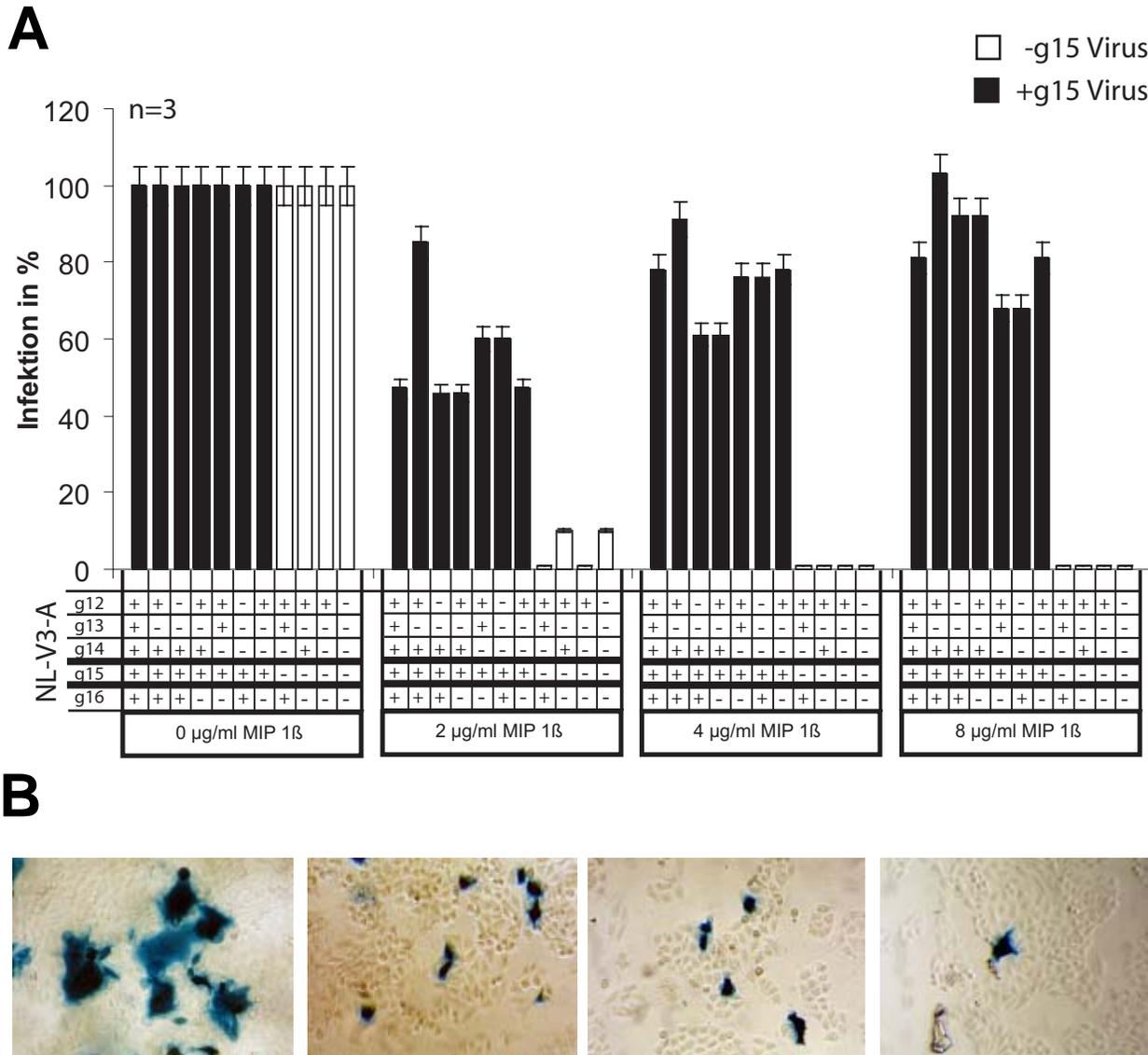


Abb. 12 Mip1-β Inhibition von NL-V3-A Glykovarianten

A.) TZM-bl-Zellen wurden mit 100 ffu (focus forming units) NL-V3-A-Glykovarianten in Anwesenheit von 0,2,4 und 8 μg/ml Mip1-β infiziert. Die Glykovarianten unterscheiden sich in den potentiellen Glykosylierungsstellen g12-g16, ein + zeigt das Vorhandensein einer potentiellen Glykosylierungsstelle an, ein - das Fehlen der Glykosylierungsstelle. Die Fehlerbalken markieren die Maximalfehler, welche 10% nicht überschritten haben. Die Infektionsereignisse wurden 48 Stunden später mittels X-Gal Färbung detektiert.

Die -g15 Glykosylierungsvarianten haben eine geringere Infektiosität, da sie schon von 2μg/ml Mip1-β bis zu 90% inhibiert wurden.

B.) Beispielbilder von infizierten TZM-bl-Zellen mit abnehmender Infektion. Direkt nebeneinander liegende Zellen wurden als eine ffu (focus forming unit) gezählt, um Zell-zu-Zell Transmission auszuschließen.

Viren mit niedriger Affinität zum Korezeptor sollten sehr anfällig gegen Mutationen im CCR5 Rezeptor sein. Deshalb wurden +g15 und -g15 Glykosylierungsvarianten auf ihre Fähigkeit getestet, Ghost-Zellen zu infizieren, die eine Korezeptormutante exprimieren (Abbildung 14).

Der CCR5-Korezeptor hat eine potentielle Glykosylierungsstelle im dritten-extrazellulären-Loop. Die potentielle N-Glykosylierungsstelle im dritten-extrazellulären-Loop (AS 268-270) wurde durch den Austausch der Aminosäure in Position 268 N->Q, oder Position 270 S->A mutiert (siehe Abbildung 13). Diese CCR5-Glykosylierungsmutanten wurden von Ingo Thordsen hergestellt und in Ghost-CD4-Zellen exprimiert.

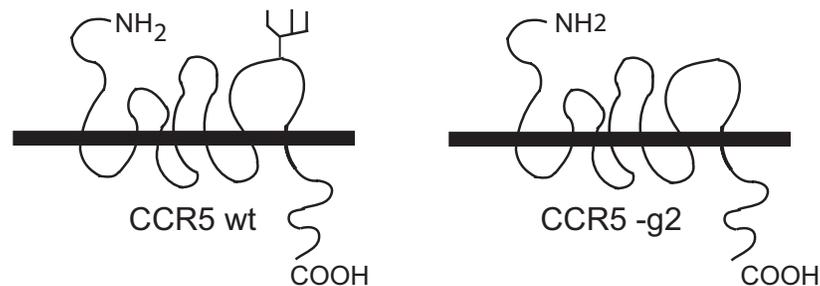


Abb. 13 CCR5-Korezeptormutante

Der Chemokinrezeptor CCR5 hat im dritten-extrazellulären-Loop ein N-Glykosylierungssignal. Eine stabile Zelllinie mit einem CCR5-Rezeptor mit mutierten Glykosylierungssignal wurde von Ingo Thordsen hergestellt.

Ghost-CCR5-wt und CCR5 -g2 Zellen wurden mit NL-V3-A Glykosylierungsvarianten infiziert und über Fluoreszenz detektiert (Abbildung 14).

Im Gegensatz zu +g15 Glykosylierungsvarianten konnten die an Position g15 deglykosylierten Viren nicht mehr Ghost-Zellen infizieren, die statt dem CCR5-Wiltyp-Korezeptor die CCR5 -g2-Korezeptormutante exprimieren. Alle getesteten Viren waren in der Lage, Zellen mit CCR5-Wildtyp zu infizieren (Abbildung 14). Dies unterstreicht die unterstützende Bedeutung des N-Glykans g15 für die Infektiosität.

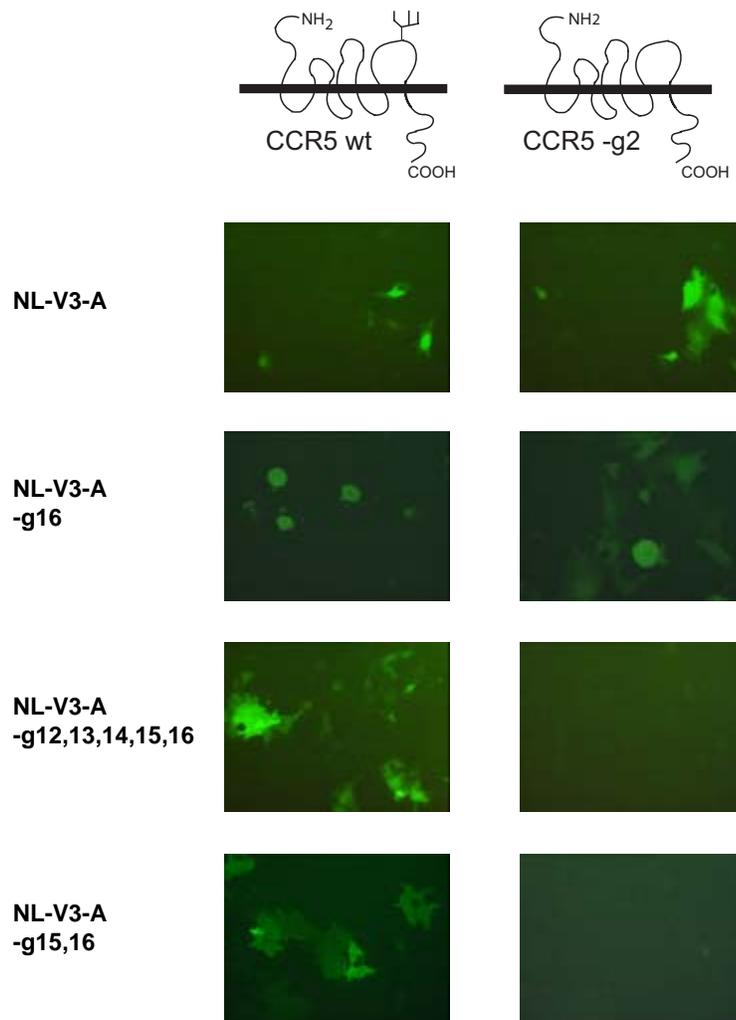


Abb. 14 Infektion von CCR5-wt und CCR5 -g2 Ghost-Zellen mit NL-V3-A-Glykovarianten

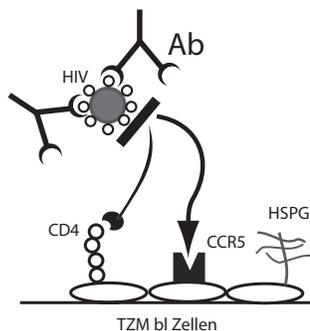
Ghost-CD4/CCR5-Zellen wurden mit je 100 ffu (focus forming units) NL-V3-A-Glykovarianten, hier exemplarisch NL-V3-A/ V3-A -g16/ V3-A -g12,13,14,15,16 / V3-A -g15,16, infiziert und mit Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Ghost-CD4/CCR5 -g2-Zellen wurden mit gleichen Mengen an Virus infiziert.

Alle Glykovarianten mit deletiertem Glykosylierungssignal an Position g15 verloren ihre Fähigkeit, Ghost-CD4/CCR5 -g2-Zellen zu infizieren, aber nicht ihre Fähigkeit, Ghost-CD4/CCR5-Wt-Zellen zu infizieren.

2.4.2 Das N-Glykan g15 blockiert antigene Epitope des NL-V3-A Virus

Für HIV-Subtyp-B ist bekannt, dass das Glykan g15 verschiedene Epitope maskiert und so den Zugang für neutralisierende Antikörper erschwert [Polzer *et al.*, 2000]. Die Rolle der N-Glykane im V3-Bereich sollte auch für die NL-V3-A Viren ermittelt werden. Epitope die von neutralisierenden Antikörpern erkannt werden, können sowohl CD4-bindende-Epitope, CD4-induzierte-Epitope oder Korezeptor-bindende-Epitope, wie der V3-Loop, sein.

Da die NL-V3-A-Glykosylierungsvarianten nur den V3-Loop von einem HIV-A Virus besitzen, wurden die Varianten sowohl mit HIV-A-positivem-Serum-Mix (zusammengestellt aus 10 HIV-A positiven Patienten), als auch mit HIV-B-positivem-Serum-Mix (zusammengestellt aus 40 HIV-B positiven Patienten) neutralisiert. Die Antikörper des HIV-A-positiven-Serum-Mix sollten hauptsächlich gegen den V3-Loop gerichtet sein, die Antikörper des HIV-B-positiven-Serum-Mix sollten gegen Epitope außerhalb des V3-Loops gerichtet sein. Bei der Neutralisation mit den beiden HIV-positiven-Seren können natürlich auch kreuzneutralisierende Eigenschaften auftreten.



Schema 3: HIV Neutralisation

TZM-bl-Zellen wurden mit 100 ffu Virusüberstand in Anwesenheit von 1:100 HIV-negativem, HIV-A- und -B-positivem-Serum mit R5-tropen NL-V3-A-Glykovarianten infiziert. Die Anzahl der infizierten Zellen in Anwesenheit von HIV-negativem-Serum wurde auf 100% gesetzt (Abb. 15). (Schema 3)

Das Glykan g15 schirmte das Virus vor neutralisierenden Antikörpern ab. Eine Mutation dieses Glykosylierungssignales hatte zur Folge, dass die -g15 Varianten durchweg besser von HIV-positivem-Serum neutralisiert wurden. Auch das Glykan g12 scheint neutralisierende Antikörper des HIV-Subtyp-B-positivem-Serums zu blockieren, da alle -g12 Glykosylierungsvarianten genauso gut wie die -g15 Glykosylierungsvarianten von HIV-B-positivem-Serum neutralisiert wurden.

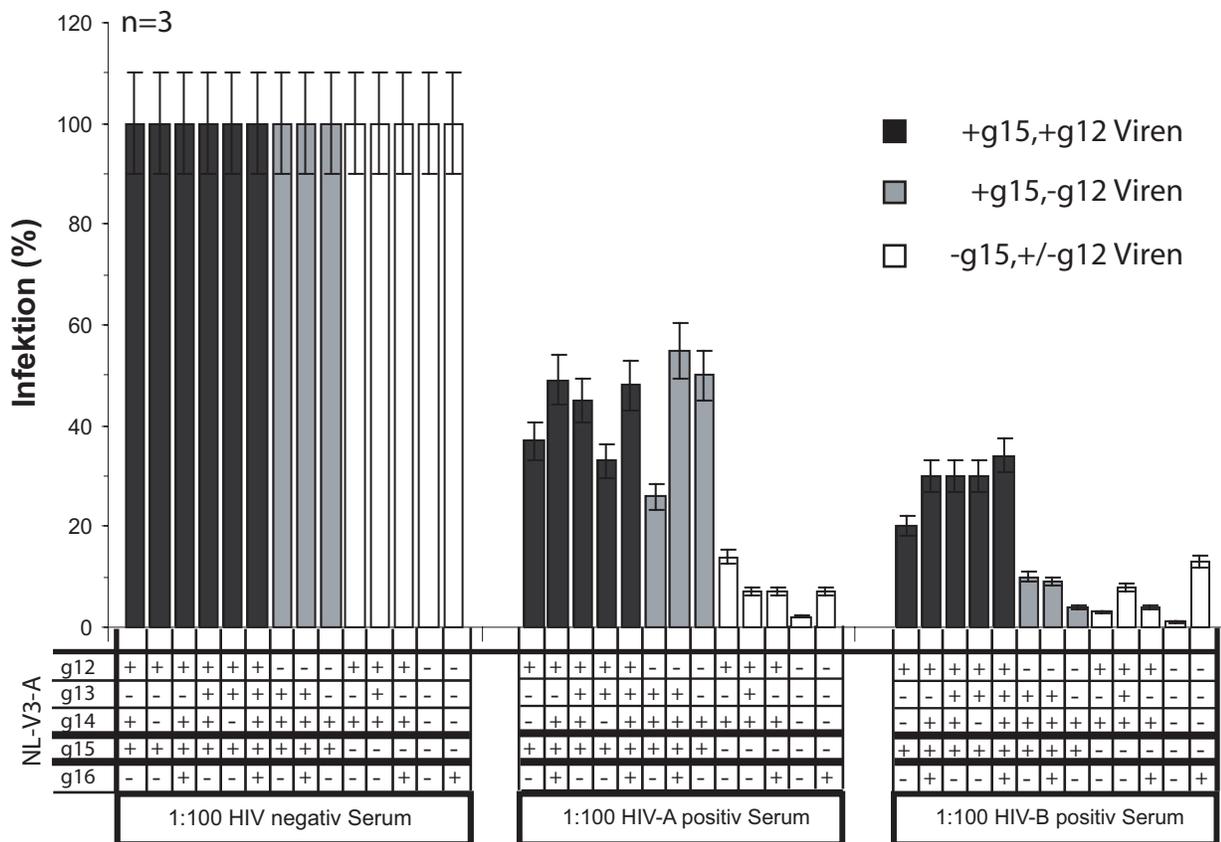


Abb. 15 Neutralisation von NL-V3-A-Glykovarianten mit HIV-positivem-Serum
TZM-bl Zellen wurden mit 100 ffu Virusüberstand in Anwesenheit von 1:100 HIV-negativem-Serum, HIV-positivem-Serum, gepoolt aus 10 HIV-A-positiven Patienten, und HIV-positivem-Serum, gepoolt aus 40 HIV-B-positiven Patienten, mit NL-V3-A Glykovarianten infiziert. Nach 48 Stunden wurden die infizierten Zellen visualisiert und ausgezählt.

Das Glykan g12 blockierte nur die neutralisierenden Antikörper von dem HIV-B-positivem-Serum. Das Glykan g15 blockierte die neutralisierenden Antikörper sowohl von HIV-A als auch von HIV-B-positivem-Serum.

Da das N-Glykan g15 auch bei dem NL-V3-A-Virus Epitope vor neutralisierenden Antikörpern maskiert, sollte durch monoklonale Antikörper die maskierten Epitope näher bestimmt werden. Daher wurde ein Neutralisationsexperiment der +/-g15 Glykosylierungsvarianten mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Es wurden zwei monoklonale Antikörper eingesetzt, einerseits ein anti-V2-Loop-Antikörper CRA4, da bekannt ist, dass der V3-Loop räumlich mit der V1/V2-Schleife des gp120 überlappt, andererseits ein neutralisierender Antikörper, der gegen ein diskontinuierliches Epitop gerichtet ist, welches die CD4-Bindungsstelle überlappt, IgG1b12. Zusätzlich wurde ein polyklonales-anti-V3-Hasenserum eingesetzt, welches gegen ein Konsensus V3-Loop-Subtyp-A-Peptid gerichtet ist, EVA 434. Damit konnte man die Maskierung von drei wichtigen Epitopen überprüft werden (Abbildung 16).

TZM-bl Zellen wurden mit Glykosylierungsvarianten infiziert, die sich hinsichtlich der Anwesenheit des g15 N-Glykans unterschieden. Die Infektion wurde in Anwesenheit von 1:50 CRA4, 1:100 EVA 434 und 1,3 µg/ml IgG1b12 im Zellkulturüberstand durchgeführt (Abbildung 16).

In Anwesenheit von einem V2-Loop Antikörper (CRA4) konnte keine Glykosylierungsvariante neutralisiert werden. Ebenso war das Anti-V3-Loop-A-Konsensus-Kaninchenserum nicht in der Lage, eine signifikante Neutralisation zu induzieren. Die -g15 Glykovarianten konnten durch den IgG1b12 Antikörper bis zu 90% inhibiert werden, während die +g15 Glykovarianten maximal zu 40% inhibiert wurden. Das Glykan g15 hatte also Einfluss auf die Neutralisation mit dem monoklonalen Antikörper IgG1b12.

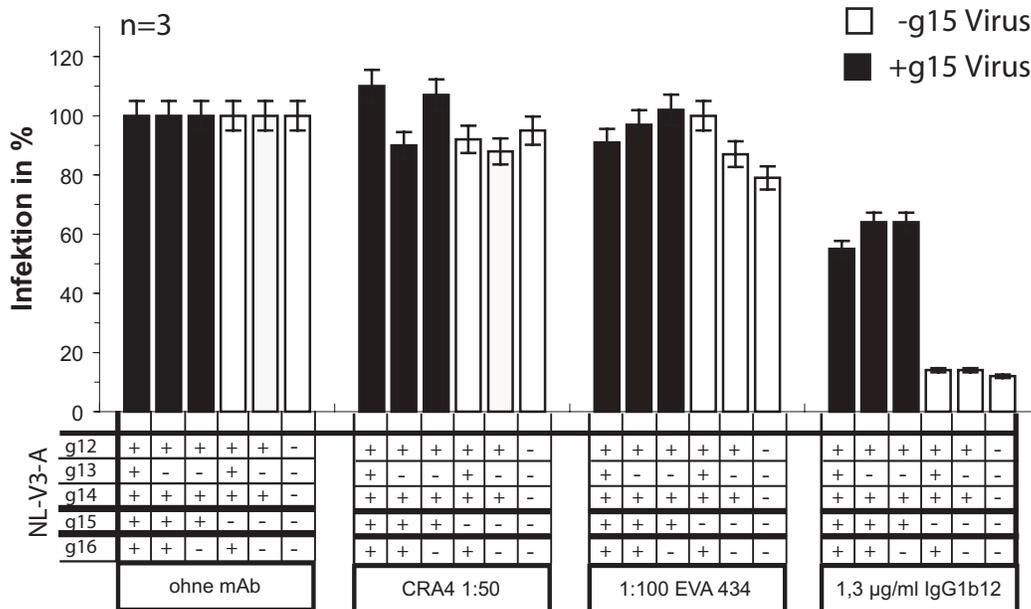


Abb. 16 Neutralisation von NL-V3-A-Glykovarianten mit monoklonalen Antikörpern
TZM-bl Zellen wurden mit 100 ffu NL-V3-A-Glykovarianten in Anwesenheit des anti-V2-Antikörpers CRA4, des anti-CD4bs-Antikörpers IgG1b12 und des Antiserums gegen ein HIV V3-A-Konsensus-Peptid infiziert.

Das Glykan g15 maskiert das CD4bs-Epitop, da eine Deletion zu einer erhöhten Neutralisations sensitivität gegenüber IgG1b12 der -g15 Glykovarianten führte.

2.5 Die Bedeutung der N-Glykane im V3-Bereich und der Aminosäuresequenz an der Position g15 für die Interaktion mit CXCR4

2.5.1 Untersuchungen mit NL-A_{X4}

Das Glykan g15 blockiert die Interaktion von gp120 mit dem Korezeptor CXCR4. Gleichzeitig moduliert die Aminosäuresequenz an der Position g15 die Interaktion mit dem Korezeptor CXCR4, falls das Glykosylierungssignal an dieser Position nicht vorhanden ist. Das Virus mit der Wildtyp-Sequenz GNPI hatte die geringste Infektiosität:

$$-g13,15 \text{ GNPI} < -g13,15 \text{ GNNI} < -g13,15 \text{ GNPI}$$

Zuerst wurde die Korezeptornutzung der NL-A_{X4}-Glykovarianten analysiert, dazu wurden Ghost-CD4-, Ghost-CD4/CCR5- und Ghost-CD4/CXCR4-Indikatorzellen mit einer "Single Round" Infektion infiziert und anschließend die infizierten Zellen direkt über Fluoreszenz visualisiert (Daten nicht gezeigt).

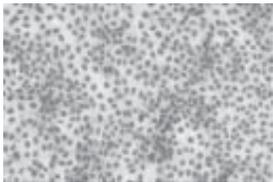
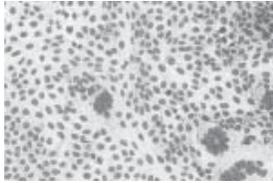
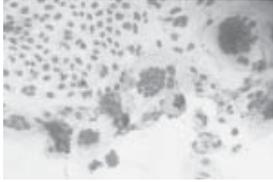
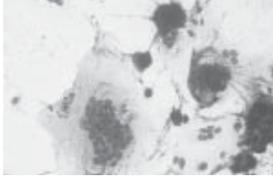
Zwei der Glykosylierungsvarianten NL-A_{X4}-g13,15 NNNI und NL-A_{X4}-g13 NNNT waren nicht in der Lage, die Ghost-Zellen zu infizieren. Die Glykosylierungsmutante NL-A_{X4}-g13 GNNT war nur in der Lage, Ghost-CD4/CXCR4-Zellen zu infizieren. Alle anderen Glykosylierungsmutanten konnten neben den Ghost-CD4/CXCR4-Zellen sowohl Ghost-CD4 als auch Ghost-CD4/CCR5 Zellen gleichermaßen infizieren (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Viren ohne das Glykan g15 eine so große Affinität zu CXCR4 haben, dass sie auch Ghost-CD4- und Ghost-CD4/CCR5 Zellen infizieren können. Diese exprimieren einen schwachen Hintergrund an CXCR4-Korezeptoren und sind deshalb durch Viren mit sehr hoher CXCR4-Affinität infizierbar. Das Glykan g15 blockiert im Umkehrschluss also die Interaktion mit CXCR4.

Alle NL-A_{X4}-Viren wurden danach auf ihre Fähigkeit getestet, in HeLaP4-Zellen Synzytien zu induzieren (Abbildung 17). Wie erwartet reduzierte sich die Fähigkeit Synzytien zu induzieren in Anwesenheit des g15 N-Glykans drastisch, da das Glykan g15 die gp120-CXCR4 Interaktion blockiert. Wurde die Aminosäuresequenz des NL-A_{X4}-g13,15 Wildtyps an Position g15 von GNPI in GNNI oder GNPT verändert, induzierten die Sequenzvarianten mehr Synzytien als der Wildtyp.

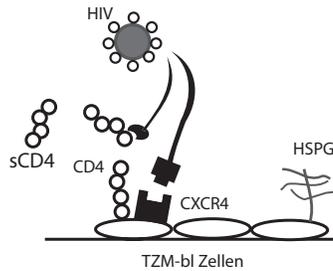
Abb. 17 Fähigkeit der NL-A_{X4}-Viren Synzytium zu induzieren

Die hergestellten NL-A_{X4}-Viren wurden auf ihre Fähigkeit, Synzytium auf HeLaP4 (CD4/CCR5/CXCR4) Zellen zu induzieren, getestet. Dafür wurden 72 Stunden nach Infektion mit 10 ng/ml p24 Virusüberstand die Zellkerne angefärbt.

Das infektiöse Virus mit Glykan g15 zeigte eine deutlich verringerte Fähigkeit Synzytium zu induzieren, da es eine geringere Korezeptor Affinität hat. Die Viren mit der Aminosäuresequenz GNNI und GNPT an Position g15 induzierten mehr Synzytium als die Viren mit der Wildtyp-Sequenz GNPI.

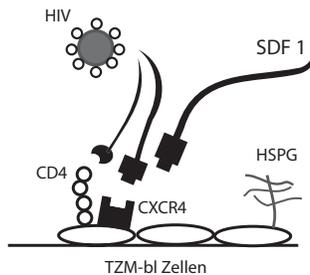
NL-A _{X4} Vektor	Glykosylierungssignal					Synzytium	
	g12	g13	g14	g15	g16		
-g13,15	+	-	+	-	+	++	
-g13	+	-	+	+	+	+	
-g13 NNNT	+	-	+	+	+	neg	
-g13,15 NNNI	+	-	+	-	+	neg	
-g15	+	+	+	-	+	++	
-g14,15	+	+	-	-	+	++	
-g15,16	+	+	+	-	-	++	
-g13,14,15	+	-	-	-	+	++	
-g13,15,16	+	-	+	-	-	++	
-g13,14,15,16	+	-	-	-	-	++	
-g14,15,16	+	+	-	-	-	++	
-g13,15 GNNI	+	-	+	-	+	+++	
-g13,15 GNPT	+	-	+	-	+	+++	
-g15 GNPT	+	+	+	-	+	+++	
-g13,14,15 GNPT	+	-	-	-	+	+++	
-g13,15,16 GNPT	+	-	+	-	-	+++	
-g15,16 GNPT	+	+	+	-	-	+++	
-g14,15,16 GNPT	+	+	-	-	-	+++	
-g14,15 GNPT	+	+	-	-	+	+++	
-g13,14,15,16 GNPT	+	-	-	-	-	+++	

Der Einfluss der Aminosäuresequenz an Position g15 auf die Interaktion von gp120 mit dem Rezeptor CD4 und dem Korezeptor CXCR4 wurde durch "Single Round"-Infektionen von TZM-bl Zellen in Anwesenheit von sCD4, IgG1b12 und SDF-1 näher untersucht (Abbildung 18).



Schema 4:
Konkpetition mit sCD4

Die Infektion in Anwesenheit von sCD4 zeigte deutlich, dass die Viren mit der Aminosäuresequenz GNPT und GNNI das sCD4 besser binden als die Wildtyp-Variante GNPI. Im Einklang dazu zeigte die erhöhte Sensitivität von den GNPT- und GNNI-Viren gegenüber dem IgG1b12-Antikörper, dass das CD4bs-Epitop dieser beiden Viren wahrscheinlich mehr exponiert ist als das des Wildtyp-Virus. Für die CD4-Affinität ergibt sich also folgendes Ergebnis: GNPI < GNNI < GNPT.



Schema 5:
Konkpetition mit SDF-1

Die Konkurrenz der Viren mit dem natürlichen Liganden von X4, SDF-1, zeigte die geringere Infektiosität des Wildtyp-Virus GNPI gegenüber dem modifizierten GNNI-Virus. Hier gilt also: GNPI < GNNI.

Wenn die Aminosäuresequenzen GNNI und GNPT an Position g15 eine höhere Affinität als die Wildtypsequenz für die beiden Rezeptoren haben, sollten sie einen evolutionären Vorteil gegenüber der GNPI-Variante haben. Trotzdem findet man in dem Wildtypvirus die GNPI-Sequenz. Einen Hinweis, warum dies so ist, gab die Neutralisation mit dem IgG1b12 Antikörper, denn die GNPI-Variante war gegen diesen fast resistent.

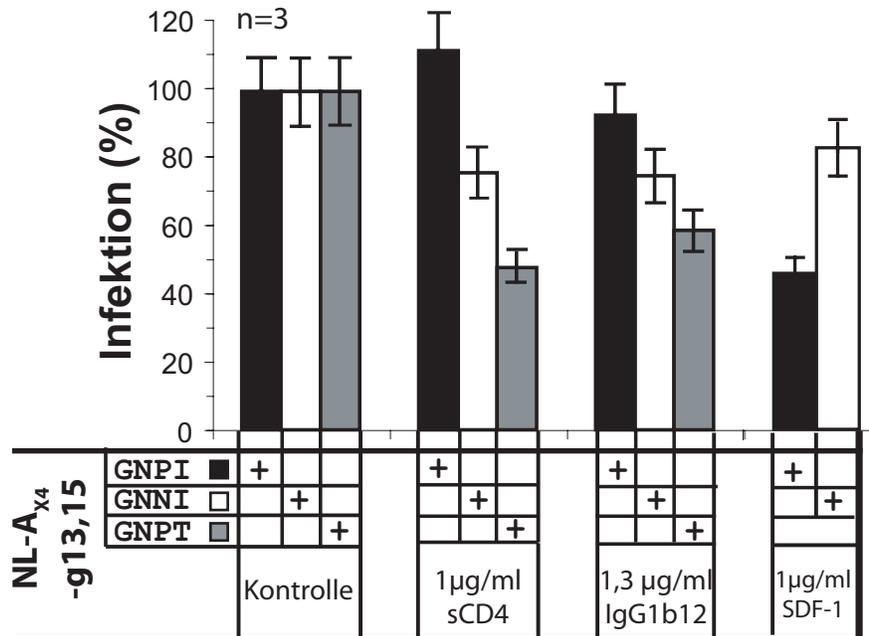


Abb. 18 Neutralisation von NL-AX₄-Sequenzvarianten mit SDF-1, sCD4 und IgG1b12

TZM-bl-Zellen wurden mit 100 ffu Virusüberstand in Anwesenheit von 1 µg/ml sCD4 und 1,3 µg/ml IgG1b12 und 1 µg/ml SDF-1 mit den Varianten NL-AX₄-g13,15 GNPI, NL-AX₄-g13,15 GNNI und NL-AX₄-g13,15 GNPT infiziert. Nach 48 Stunden wurden die infizierten Zellen ausgezählt.

Das NL-AX₄-g13,15 Virus war gegenüber sCD4 und IgG1b12 weniger sensitiv als die Glykovarianten mit den Sequenzen GNNI und GNPT an Position g15, aber gegenüber SDF-1 sensitiver.

Daher wurde eine “*Single Round*”-Infektion von Polybrene präinkubierten TZM-bl (adorptionsunabhängig) mit den Varianten GNPI, GNNI und GNNT (+g15) in Anwesenheit von HIV-positivem-Patientenserum durchgeführt (Abbildung 19).

Das Wildtypvirus NL-A_{X4} -g13,15 ist deutlich resistenter gegen HIV-Subtyp-A und HIV-Subtyp-B Patientenserum als die GNNI-, GNPT- und die NL-A_{X4} -g13 GNNT-Varianten. Die Neutralisationssensitivität gegenüber Antikörpern lässt sich also folgendermaßen darstellen: GNNT>GNNI/GNPT>GNPI

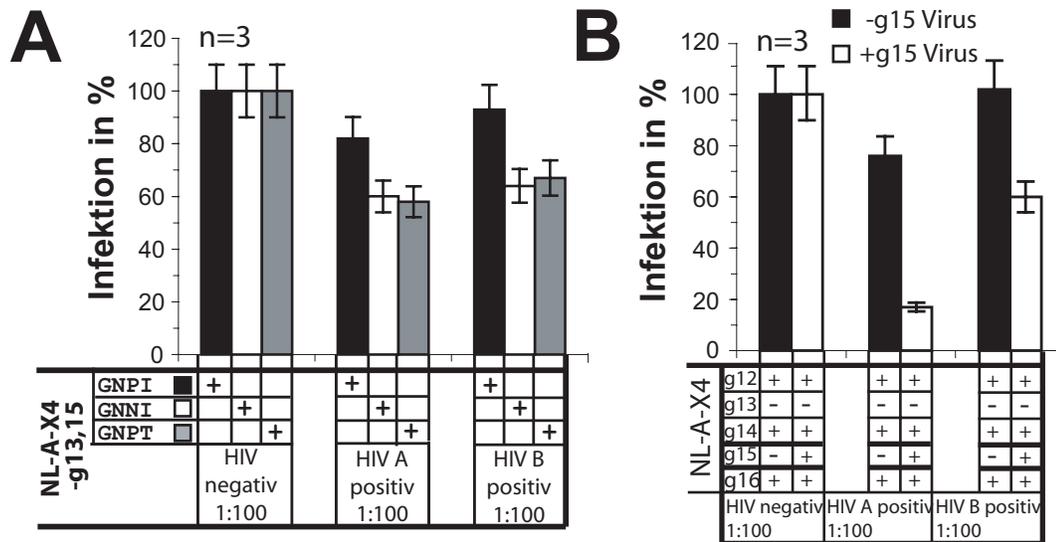


Abb. 19 Neutralisation von NL-A_{X4}-Sequenzvarianten mit HIV-positivem-Serum

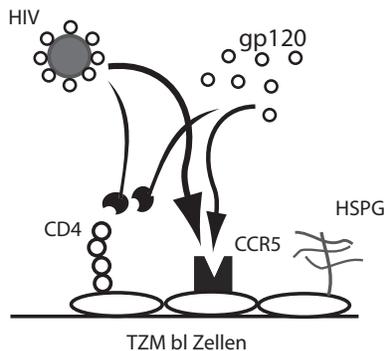
Polybrene präinkubierte TZM-bl-Zellen wurden mit 100 ffu Virusüberstand in Anwesenheit von HIV-negativem-Serum und HIV-A-/B-positivem-Serum mit den Varianten A.) NL-A_{X4} -g13,15, NL-A_{X4} -g13,15 GNNI, NL-A_{X4} -g13,15 GNPT und B.) NL-A_{X4} -g13,15 und NL-A_{X4} -g13 GNNT infiziert. Die Infektionsrate wurde 48 Stunden später bestimmt.

Die Neutralisationssensitivität gegenüber Antikörpern lässt sich folgendermaßen darstellen: GNNT>GNNI/GNPT>GNPI.

2.6 Auswirkung des freien gp120 auf die Virusinfektion

2.6.1 Neutralisation von R5-tropen -g15-Glykosylierungsvarianten durch freies gp120 der +g15-Glykosylierungsvarianten

In den vorherigen Kapiteln wurde gezeigt, dass das N-Glykan g15 die Bindung von gp120 mit dem CCR5-Korezeptor unterstützt. Dies wurde in Infektionsstudien von einem Virus auf einer Zelllinie gezeigt. Jedoch ist in einem Kompartiment, in welchem Virusreplikation und Infektion stattfindet, niemals nur ein Virus an der Infektion beteiligt, sondern eine ganze Quasispezies. Zudem findet die Virusinfektion von Zellen meist in direkter Nachbarschaft von anderen infizierten Zellen statt. Infizierte Zellen produzieren nicht nur infektiöse Viruspartikel durch "*Budding*", sondern exprimieren gp120, welches von der Zellmembran der infizierten Zellen abdissoziiert, ohne jemals in ein Viruspartikel eingebaut zu werden. Es ist methodisch sehr komplex, wenn nicht unmöglich, den Effekt einer Quasispezies auf die Infektion eines einzelnen Virus "*in vitro*" nachzustellen. Um die "*in vivo*" Situation besser darzustellen, wurde daher der Ansatz gewählt, eine Infektion in Anwesenheit von freiem gp120 eines anderen Virus durchzuführen.



Schema 6: Neutralisation mit freiem gp120

2.6.1.1 Konzentrationsabhängige Hemmung von NL-V3-A -g15 Glykosylierungsvarianten durch freies gp120 von NL-V3-A +g15 Glykosylierungsvarianten

CCR5-Virusvarianten mit geringer Infektiosität (NL-V3-A -g15 Viren) ließen sich konzentrationsabhängig mit freiem gp120 von Viren mit hoher Infektiosität (NL-V3-A +g15 Viren) inhibieren (Abbildung 20, 21). Dieser Effekt wurde in zwei verschiedenen Experimenten, sowohl bei der Infektion von TZM-bl Zellen als auch bei der Infektion von Ghost-Zellen, beobachtet (Abbildung 22). Die Ergebnisse zeigen, dass freies gp120 mit dem Virus um die Rezeptoren konkurriert und dadurch Virus neutralisieren kann.

Freies gp120 wurde durch Transfektion von HeLaP4 Zellen mit den pgp160-V3-A-Vektoren hergestellt. Diese exprimieren gp160 und gp120 dissoziiert in den Zellkulturüberstand ab. Mit Hilfe eines *Dot Blots* wurde eine durchschnittliche Konzentration von 15-30 ng/ml gp120 in den Zellkulturüberständen nachgewiesen. Die Experimente wurden in Anwesenheit von 50% Zellkulturüberstand (7,5-15 ng/ml gp120) durchgeführt. Die damit verbundene gp120-Konzentration liegt unter der gp120-Konzentration in Geweben (ca. 24-240 ng/ml gp120), aber über der Konzentration des freien gp120 im Blut (0,24-2,4 ng/ml gp120)(nach Gilbert *et al.*, 2003).

TZM-bl-Zellen wurden in Anwesenheit von freiem +g15 gp120 (gp120-V3-A) und -g15 gp120 (gp120-V3-A -g12,13,14,15,16) mit NL-V3-A +/-g15-Glykovarianten infiziert (Abbildung 20). Die Infektion von TZM-bl Zellen mit der +g15 NL-V3-A Glykovariante wurde in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen +/-g15 gp120 Zellkulturüberstand (25%, 50%, 75%, 100%) durchgeführt (Abbildung 21). Nach 48 Stunden wurden die infizierten Zellen ausgezählt.

Die -g15 NL-V3-A Glykovarianten wurden alle durch freies +g15 gp120 inhibiert, die +g15 NL-V3-A Glykovarianten wurden im Gegensatz dazu nicht inhibiert. Das freie -g15 gp120 (gp120-V3-A -g12,13,14,15,16) konnte keines der Viren neutralisieren. Die Inhibition der -g15 Glykovarianten mit freiem +g15 gp120 war abhängig von der eingesetzten gp120 Konzentration. Je mehr freies gp120-V3-A (+g15) zu der Infektion gegeben wurde, desto besser war die Inhibition der -g15 NL-V3-A-Glykosylierungsvarianten.

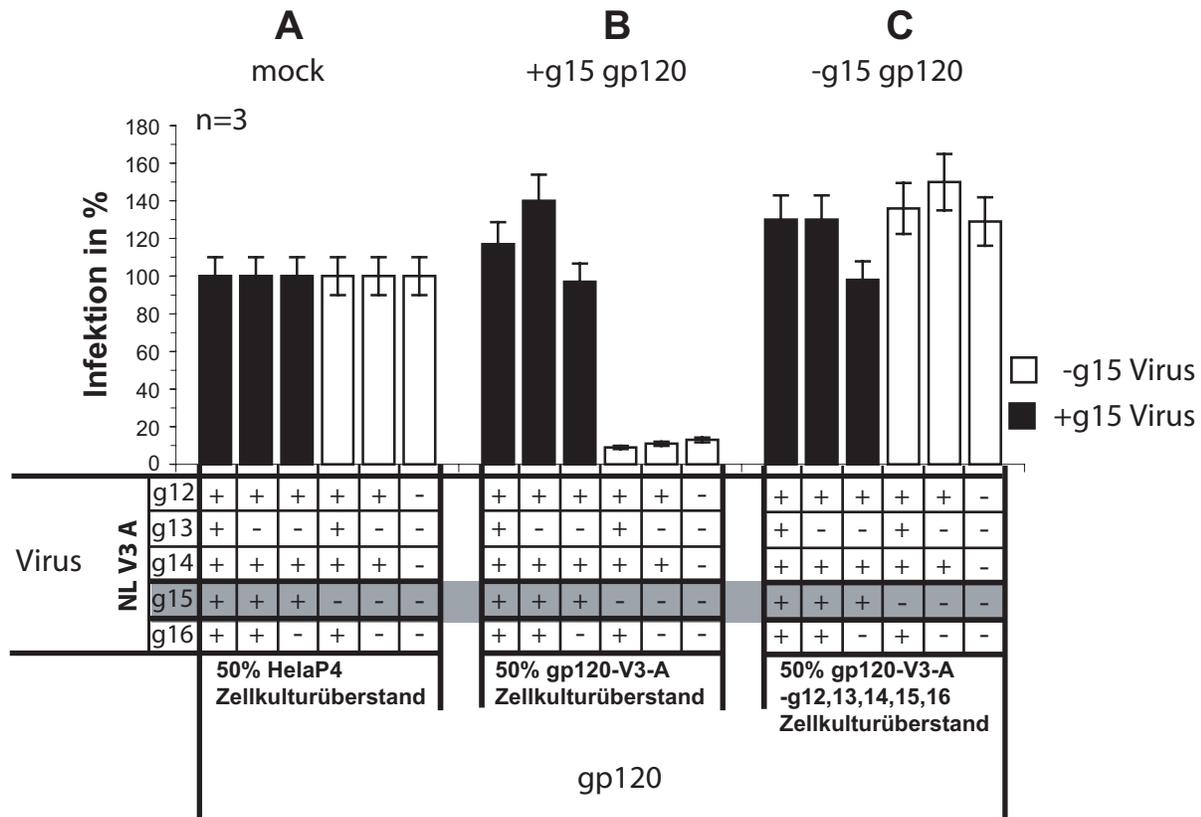


Abb. 20 Neutralisation von NL-V3-A Glykovarianten mit gp120-Zellkulturüberstand
TZM-bl Zellen wurden mit NL-V3-A Glykovarianten infiziert (100 ffu), in Anwesenheit von:

- A.) *mock (Überstand von untransfizierten HeLaP4 Zellen)*
- B.) *freiem +g15 gp120 (Überstand von pgp160-V3-A transfizierten HeLaP4 Zellen)*
- C.) *freiem -g15 gp120 (Überstand von pgp160-V3-A -g12,13,14,15,16 transfizierten HeLaP4 Zellen)*

Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden nach der Infektion ausgezählt. Die Infektionsrate wurde aus der Anzahl der infizierten Zellen im Vergleich zu der Anzahl der infizierten Zellen in Anwesenheit von mock (Überstand von untransfizierten HeLaP4 Zellen) bestimmt.

Alle Virus-Glykovarianten ohne das Glykan g15 konnten durch +g15 gp120 zu 90% inhibiert werden. Freies +g15 gp120 war nicht in der Lage, Glykovarianten mit dem Glykan g15 zu inhibieren. Ebenso war freies -g15 gp120-V3-A nicht in der Lage zu inhibieren, vielmehr war ein leichter infektionsverstärkender Effekt zu beobachten.

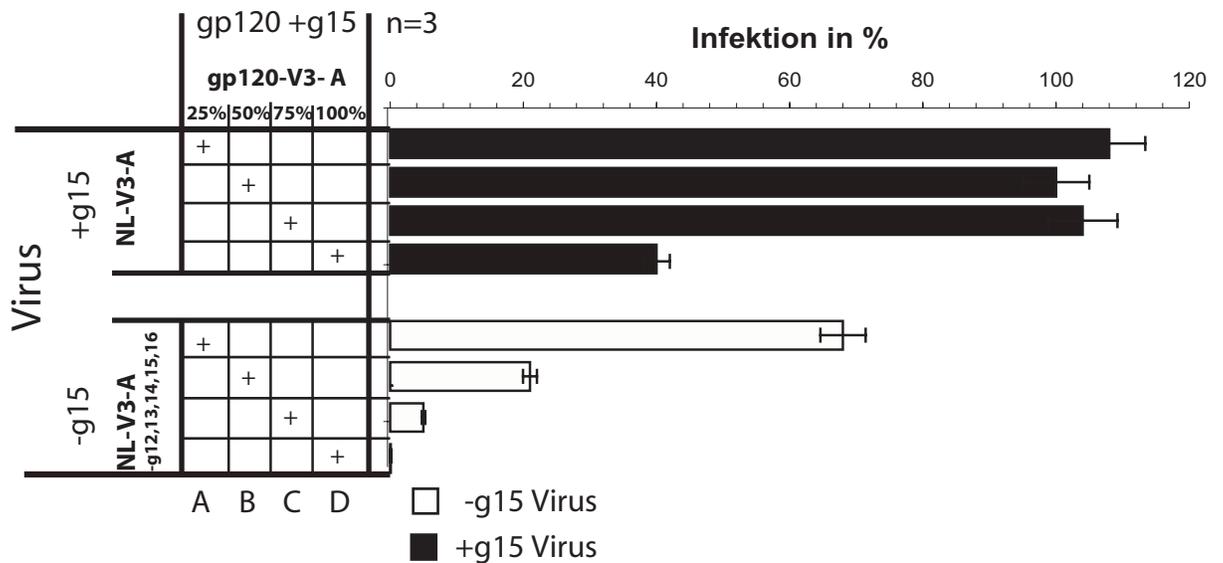


Abb. 21 Konzentrationsabhängige Neutralisation von NL-V3-A-Glykovarianten mit gp120 Zellkulturüberstand

TZM-bl Zellen wurden mit NL-V3-A-Glykovarianten infiziert (100 ffu), in Anwesenheit von:

A.) 25% +g15 gp120 (Überstand von ppg160-V3-A transfizierten HeLaP4 Zellen)

B.) 50% +g15 gp120 (Überstand von ppg160-V3-A transfizierten HeLaP4 Zellen)

C.) 75% +g15 gp120 (Überstand von ppg160-V3-A transfizierten HeLaP4 Zellen)

D.) 100% +g15 gp120 (Überstand von ppg160-V3-A transfizierten HeLaP4 Zellen)

Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden nach der Infektion ausgezählt.

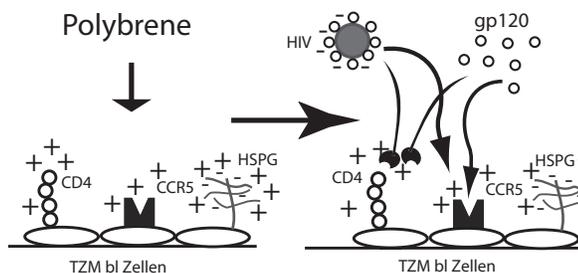
Bei der Infektion in Anwesenheit von 100% +g15 gp120 (gp120-V3-A) Zellkulturüberstand wurde auch die Infektion von NL-V3-A auf 40% gesenkt.

Die Neutralisation des -g15 Virus (NL-V3-A -g12,13,14,15,16) mit +g15 gp120 (gp120-V3-A) war konzentrationsabhängig.

Die Neutralisation von NL-V3-A-Glykovarianten mit gp120-Zellkulturüberstand wurde auch auf einem anderen Zelltyp (Ghost-CD4/CCR5-Zellen) getestet (Abbildung 22 A). Es wurde ebenfalls überprüft, ob Adsorptionseffekte (z.B. Bindung an HSPG) bei der Neutralisation mit freiem gp120 eine Rolle spielen. Dafür sollten TZM-bl Zellen mit Polybrene präinkubiert werden (Abbildung 22 B). Dies hat zur Folge, dass die Polykation die ladungsbedingte Abstoßung von Virus und Zellmembran minimiert und Adsorptionseffekte keine Rolle mehr spielen.

Ghost-CD4/CCR5-Zellen wurden mit den Glykosylierungsvarianten NL-V3-A und NL-V3-A -g12,13,14,15,16 in Anwesenheit von freiem +g15 gp120 (gp120-V3-A) und freiem -g15 gp120 (gp120-V3-A -g12,13,14,15) im Zellkulturüberstand infiziert. Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden später mit Hilfe eines GFP-Reportergentest visualisiert (Abbildung 22 A).

Das -g15 NL-V3-A (NL-V3-A -g12,13,14,15,16) Virus wurde von +g15 gp120 (gp120-V3-A) inhibiert, das +g15 NL-V3-A Virus jedoch nicht. Das freie -g15 gp120 (gp120-V3-A -g12,13,14,15,16) war nicht in der Lage zu inhibieren. Die Inhibition von Viren mit niedriger Infektiosität durch gp120 von Viren mit hoher Infektiosität ist also kein Effekt, der nur bei einer Zelllinie auftritt.



Schema 7: Infektion polybrene aktivierter Zellen

Um den Einfluss von Adsorptionseffekten zu untersuchen, wurden TZM-bl-Zellen mit 2 µg/ml Polybrene in Medium für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in Anwesenheit von freiem +g15 gp120 (gp120-V3-A) mit -g15 NL-V3-A Virus (NL-V3-A -g12,13,14,15,16) infiziert. Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden nach der Infektion ausgezählt (Abbildung 22 B). (Schema 7)

Der -g15 Virus (NL-V3-A -g12,13,14,15,16) wurde trotz Polybrene Vorbehandlung der Zellen durch freies +g15 gp120 (gp120-V3-A) im Zellkulturüberstand zu 80% neutralisiert. Daher lassen sich Adsorptionseffekte für die Neutralisation von NL-V3-A -g15 Glykovarianten durch gp120 von NL-V3-A +g15 Glykovarianten ausschließen.

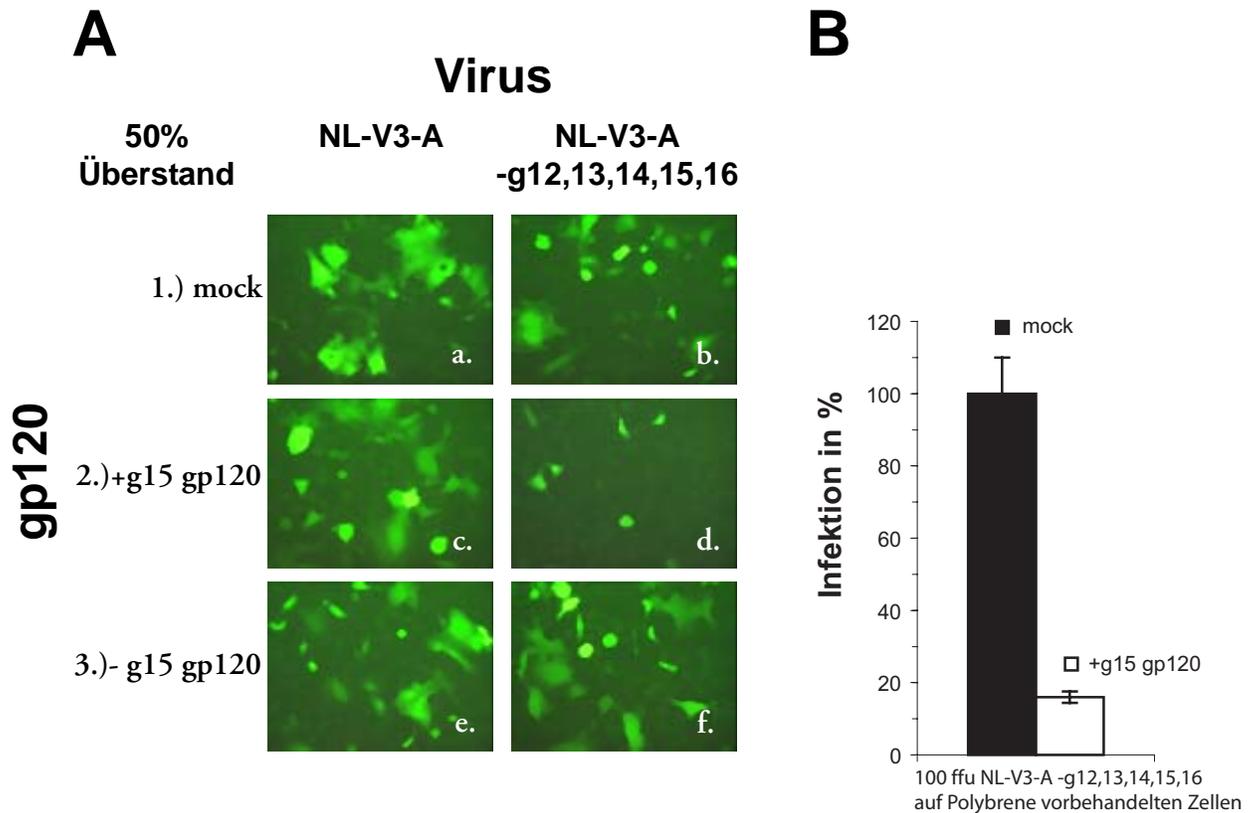


Abb. 22 Neutralisation von NL-V3-A -g12,13,14,15,16 mit gp120 des NL-V3-A Virus auf Ghost-CD4/CCR5-Zellen und Polybrene-behandelten Zellen

A.) Ghost-CD4/CCR5-Zellen wurden in Anwesenheit von:

1.) mock (50% Überstand von untransfizierten HeLaP4 Zellen)

2.) freiem +g15 gp120 (50% Überstand von pgp160-V3-A transfizierten HeLaP4 Zellen)

3.) freiem -g15 gp120 (50% Überstand von pgp160-V3-A -g12,13,14,15,16 transfizierten HeLaP4 Zellen)

mit 100 ffu der beiden Glykovarianten NL-V3-A und NL-V3-A -g12,13,14,15,16 infiziert.

In Anwesenheit von freiem +g15 gp120 Zellkulturüberstand wurde das -g15 Virus (NL-V3-A -g12,13,14,15,16) neutralisiert (d.).

B.) Um die Virusinfektion unabhängig von Adsorptionseffekten zu machen, wurden TZM-Zellen mit Polybrene eine Stunde präinkubiert. Die Zellen wurden mit 100 ffu -g15 Virus (NL-V3-A -g12,13,14,15,16) in Anwesenheit von mock (Überstand von untransfizierten HeLaP4 Zellen) und freiem +g15 gp120 (50% Überstand von pgp160-V3-A transfizierten HeLaP4 Zellen) infiziert.

Das -g15 Virus (NL-V3-A -g12,13,14,15,16) ließ sich auch auf Polybrene behandelten Zellen mit freiem +g15 gp120 (gp120-V3-A) Zellkulturüberstand zu 80% inhibieren.

2.6.1.2 Neutralisation von R5-tropen -g15 Glykovarianten mit gp120 von +g15 Glykovarianten

Die Neutralisation von R5-tropen V3-A -g15 Glykovarianten mit gp120 von +g15 Glykovarianten ist ein genereller Effekt. CCR5-trope Viren mit geringer Infektiosität (-g15 Glykovarianten) werden durch freies gp120 mit einer hohen Infektiosität (+g15 gp120) neutralisiert. Die verringerte Infektiosität ist auf das Fehlen des g15 Glykosylierungssignales zurückzuführen. Allerdings existiert eine Ausnahme: das HIV-B 918 Virus hat eine so starke Affinität zu dem CCR5-Korezeptor, dass das Glykan g15 die Affinität zum Korezeptor nicht moduliert [Polzer et al., 2002]. Die -g15 NL-918 Glykosylierungsvariante konnte nicht von freiem +g15 gp120 neutralisiert werden. Dies zeigt, dass die Neutralisation abhängig von der Korezeptoraffinität ist. Die Neutralisationsexperimente der R5-tropen NL-V3-A-Glykovarianten durch freies gp120 von NL-V3-A-Glykovarianten wurde durch Einsatz von freiem gp120 von anderen Virusisolaten ergänzt.

Dazu wurden TZM-bl-Zellen mit +g15 und -g15 Viren (NL-V3-A, NL-V3-A -g12,13,14,15,16) infiziert. Die Infektion wurde in Anwesenheit von freiem +g15 und -g15 gp120 durchgeführt (gp120-V3-A/ V3-A -g14,15/ V3-A -g13,15/ V3-A -g13,14,15,16/ V3-A -g12,13,14,15,16/ 918/ 918 -g15 (siehe Tabelle 6)). In den Experimenten wurde das freie gp120 in einer Endkonzentration von 7,5 ng/ml eingesetzt. Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden später ausgezählt.

Das +g15 NL-V3-A-Virus wurde von keinem der gp120 Zellkulturüberstände neutralisiert. Dabei spielte es keine Rolle, ob +g15 oder -g15 gp120 eingesetzt wurde. Das -g15 Virus (NL-V3-A -g12,13,14,15,16) dagegen wurde von allen +g15 gp120 Zellkulturüberständen zu 70% inhibiert. Die einzige Ausnahme bildete die Neutralisation durch gp120-Zellkulturüberstand von Zellen, die mit pgp160-918 -g15 transfiziert wurden. Dieser war ebenfalls in der Lage -g15 Virus (NL-V3-A -g12,13,14,15,16) zu inhibieren. Aber das Virus NL-918 -g15 weist die gleichen phänotypischen Eigenschaften wie das an Position g15 glykosylierte NL-918 Virus auf [Polzer et al., 2002]. Es ließ sich also das NL-V3-A -g15 Virus mit geringer Infektiosität generell von gp120 Überständen neutralisieren, welche von Viren mit hoher Infektiosität abstammten.

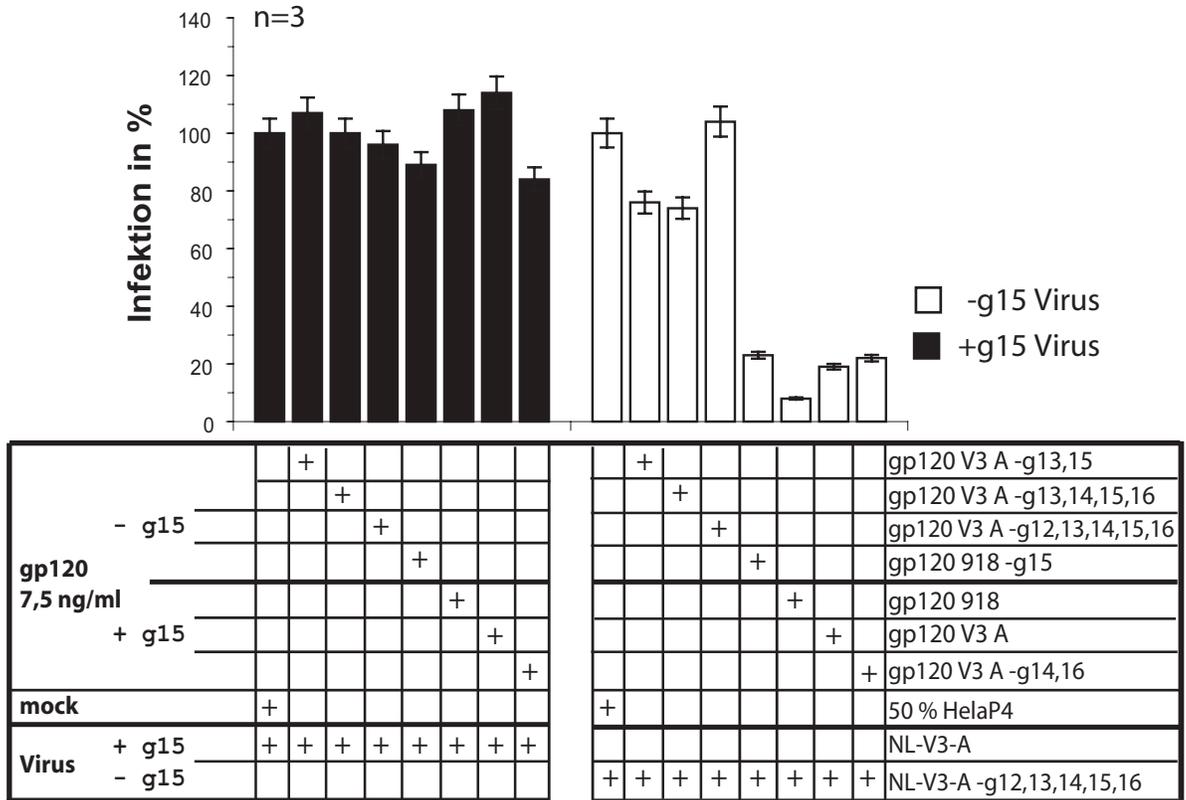


Abb. 23 Neutralisation von HIV-Glykovarianten durch freies gp120

TZM-bl-Zellen wurden mit 100 ffu Virusüberstand in Anwesenheit von 7,5 ng/ml gp120 von verschiedenen Glykosylierungsvarianten mit den Viren NL-V3-A und NL-V3-A -g12,13,14,15,16 infiziert. Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden nach der Infektion ausgezählt.

Das -g15 Virus (NL-V3-A -g12,13,14,15,16) wurde durch +g15 gp120 (gp120-V3-A) inhibiert (70% Neutralisation). Das einzige an Position g15 deglykosylierte gp120, welches in der Lage war -g15 Virus (NL-V3-A -g12,13,14,15,16) effektiv zu inhibieren, war das gp120-918 -g15 mit einer Neutralisationsrate von 70%. Die Neutralisation der Viren ist also abhängig von deren Infektiosität und der Infektiosität des kompetitierenden gp120.

Die Neutralisation der +/- g15 Glykovarianten durch freies gp120 wurde auch mit CCR5-tropen HIV-Subtyp-B-Virusisolaten durchgeführt. Zum einen wurden die +/- g15 Glykovarianten des HIV-B-Isolates NL-991 eingesetzt, dessen -g15 Glykosylierungsvariante eine niedrige Infektiosität hat, zum anderen die +/- g15 Glykovarianten des HIV-Subtyp-B-Virus NL-918, dessen -g15 Glykovariante dieselben Eigenschaften wie die +g15 Glykovariante besitzt.

In dem Neutralisationstest wurden TZM-bl-Zellen mit NL-991, NL-918 und NL-A_{R5} +/- g15 Glykovarianten in Anwesenheit von 7,5 ng/ml freiem +g15 gp120 (gp120-V3-A) und -g15 gp120 (gp120-V3.A -g12,13,14,15,16) infiziert. Die Infektionsrate wurde auf die Anzahl der infizierten Zellen ohne freies gp120 (mock: untransfizierter HeLaP4-Zellkulturüberstand) normalisiert.

Sowohl die HIV-Subtyp-B -g15 Glykosylierungsvariante NL-991 -g15, als auch die HIV-A -g15 Glykosylierungsvariante NL-A_{R5} -g15 können durch freies +g15 gp120 (gp120-V3-A) zu 80% bzw. 70% inhibiert werden, während keines der Viren durch 7,5 ng/ml -g15 gp120 (gp120 V3 A -g12,13,14,15,16) effektiv neutralisiert wurde. Die Ausnahme war die -g15 Glykosylierungsvariante des NL-918 Virus, diese wurde durch 7,5 ng/ml +g15 gp120 (gp120-V3-A) im Zellkulturüberstand nicht inhibiert. Das Virus NL-918 -g15 zeigt allerdings, wie schon erwähnt, die gleichen phänotypischen Eigenschaften wie das an Position g15 glykosylierte NL-918 Virus [Polzer *et al.*, 2002]. Ein unerwarteter infektionsverstärkender Effekt ist bei der Neutralisation von NL-A_{R5} mit 7,5 ng/ml -g15 gp120 (gp120-V3-A -g12,13,14,15,16) aufgetreten. Ähnliche, aber geringere Effekte sind auch in Abbildung 23 zu beobachten.

Bei der Neutralisation der -g15 Viren durch +g15 gp120 spielt der Subtyp keine Rolle. Die Infektion sowohl mit -g15 HIV-Subtyp-A als auch Subtyp-B Viren wurde durch freies +g15 gp120 Subtyp-A und -B erreicht. Am Beispiel der NL-918 +/- g15 Viren konnte gezeigt werden, dass die Neutralisation abhängig von der unterschiedlichen Infektiosität des Virus und des freien gp120 ist. Das Glykan g15 spielte dann eine entscheidende Rolle, wenn das Fehlen des Glykans einen negativen Einfluss auf die Infektiosität hatte.

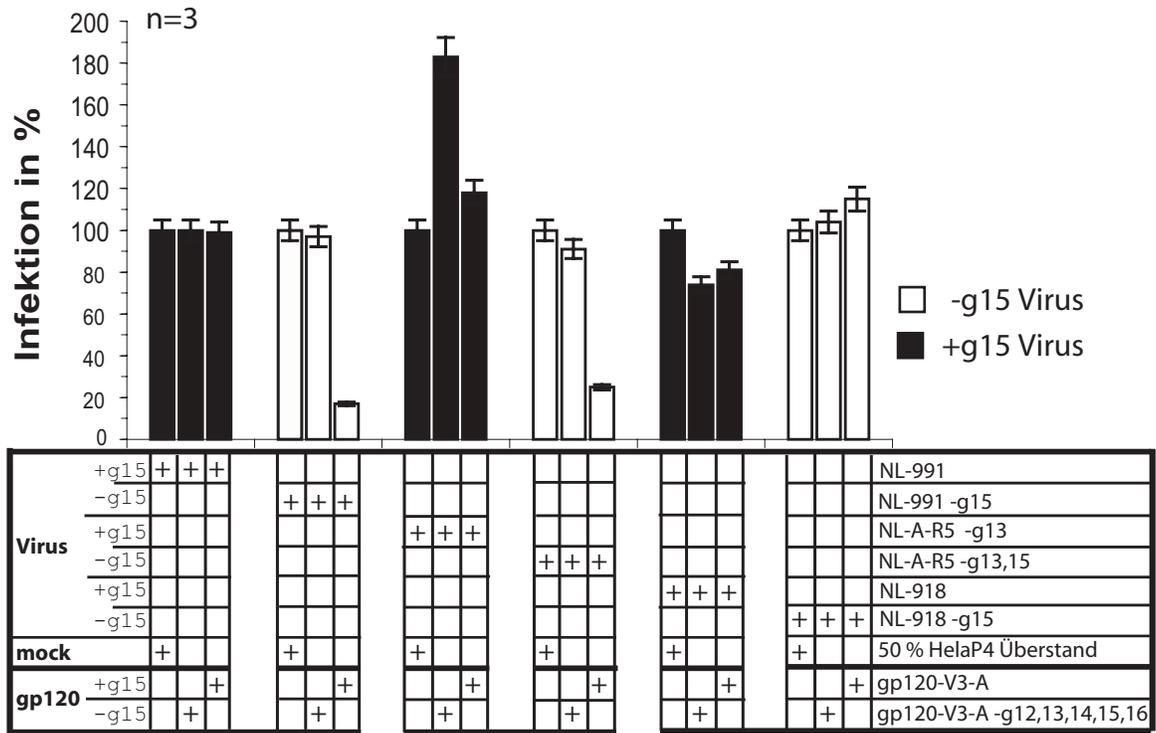


Abb. 24 Neutralisation von HIV-Glykovarianten durch freies gp120-V3-A +/- g15

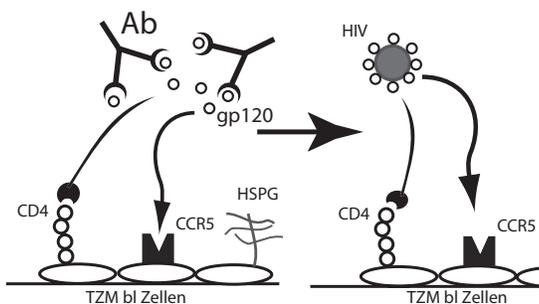
TZM-bl Zellen wurden mit 100 ffu Virusüberstand in Anwesenheit von 7,5 ng/ml +g15 gp120 (gp120-V3-A) und -g15 gp120 (gp120-V3-A -g12,13,14,15,16) mit verschiedenen Glykovarianten infiziert. Nach 48 Stunden wurden die infizierten Zellen ausgezählt. Die Infektionsrate wurde aus der Anzahl der infizierten Zellen durch die Anzahl der infizierten Zellen in Anwesenheit von 50% HeLaP4 Überstand errechnet.

7,5 ng/ml +g15 gp120 reichten aus, um die Infektion von zwei CCR5-tropen Virusglykovarianten, NL-V3-991 -g15 (hergestellt von Polzer, S.) und NL-A_{R5} -g15 zu 80% zu inhibieren. Das NL-918 -g15 (hergestellt von Polzer, S.) Virus war das einzige an Position g15 deglykosylierte Virus, welches nicht inhibiert werden konnte. Die Viren mit geringer Infektiosität konnten alle durch das gp120 mit einer hohen Infektiosität inhibiert werden.

2.6.1.3 HIV-spezifische Antikörper blockieren die Neutralisation durch freies gp120

Neutralisierende Antikörper können freies gp120 binden und dadurch die neutralisierenden Eigenschaften des freien gp120 aufheben.

Da die Neutralisation mit gp120-haltigen Zellkulturüberständen durchgeführt wurde, sollte überprüft werden, ob tatsächlich das freie gp120 im Zellkulturüberstand für die Virusneutralisation verantwortlich ist. Durch Zugabe von HIV-positivem-Serum wurde freies gp120 von den Antikörpern abgefangen und war so nicht mehr in der Lage Viren zu neutralisieren. Da gp120-spezifische Antikörper aber ebenfalls das Virus neutralisieren, wurden die Zellen mit gp120 Zellkulturüberständen in Anwesenheit von HIV-positivem-Serum, bzw. HIV-negativem-Serum zu inkubieren und nach einem Waschschrift die gp120 beladenen Zellen zu infizieren. Ein neutralisierender Effekt des freien gp120 wird beobachtet, wenn gp120 an CD4 oder CCR5 bindet.



Schema 8: Antikörper heben die gp120 Effekte auf

TZM-bl-Zellen wurden mit mock, 7,5 ng/ml +g15 gp120 (gp120-V3-A) oder -g15 gp120 (gp120-V3-A -g12,13,14,15,16) in Anwesenheit von 1:100 HIV-negativem-Serum oder 1:100 HIV-positivem-Serum (Schema 8) für eine Stunde inkubiert. Zur Kontrolle wurden TZM-bl-Zellen mit 1:100 HIV-negativem-Serum oder 1:100 HIV-positivem-Serum für eine Stunde inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit NL-V3-A -g12,16 und NL-V3-A -g15 infiziert. Die Infektionsrate wurde 48 Stunden später bestimmt.

In Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern konnte das NL-V3-A -g15 Virus nicht von dem freien gp120-V3-A inhibiert werden (Abbildung 25). Die Neutralisation wurde durch das freie gp120 vermittelt.

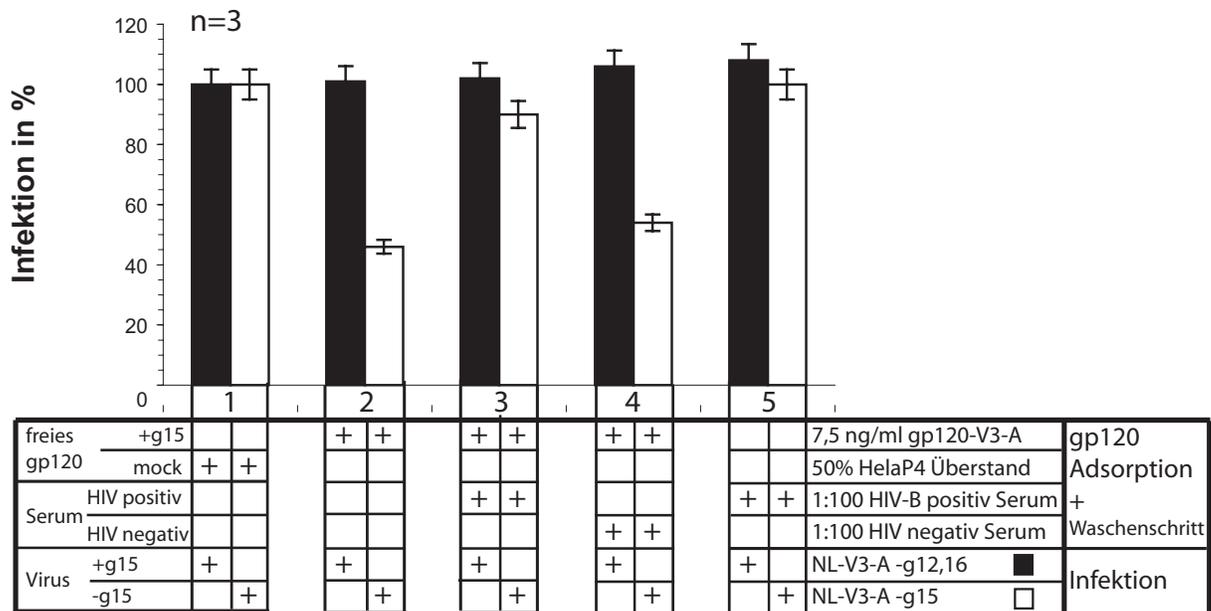


Abb. 25 Neutralisierende Antikörper heben die Virus-Neutralisation durch freies gp120 auf

TZM bl Zellen wurden mit

- 1.) 50% mock (Zellkulturüberstand einer untransfizierten HeLaP4 Kultur)
- 2.) 7,5 ng/ml gp120-V3-A (Überstand von einer pgp160-V3-A transfizierten HeLaP4 Kultur)
- 3.) 7,5 ng/ml gp120-V3-A und 1:100 HIV-B positivem Serum
- 4.) 7,5 ng/ml gp120-V3-A und 1:100 HIV-B negativem Serum
- 5.) 1:100 HIV-B positivem Serum

für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

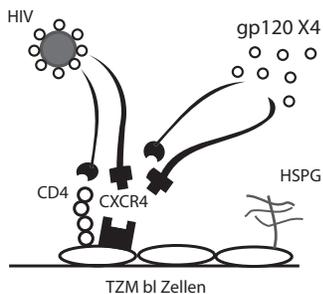
Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellen mit 100 ffu +g15 Virus (NL-V3-A -g12,16) und -g15 Virus (NL-V3-A -g15) infiziert. Nach 48 Stunden wurden die infizierten Zellen ausgezählt.

Nach Adsorption des freien +g15 gp120 an die Zellen beobachtet man eine 50%ige Neutralisation des -g15 Virus. In Anwesenheit von HIV-positivem-Serum bei der Präinkubation sinkt der inhibitorische Effekt des freien gp120 auf 10% ab, während der inhibitorische Effekt bei Anwesenheit von HIV-negativem-Serum erhalten bleibt. Die Präinkubation mit HIV-positivem-Serum alleine hatte keinen Effekt auf die Virusinfektion.

2.6.2 Steigerung der Infektiosität von X4-tropen Viren durch Zugabe von freiem gp120 X4-troper Viren

In Anwesenheit von X4-tropen gp120 kann die Infektiosität von heterologen X4-tropen Viren konzentrationsabhängig gesteigert werden.

Da eine Neutralisation von R5-tropen Viren mit gp120-Zellkulturüberstand von CCR5-tropen Viren im vorherigen Kapitel gezeigt werden konnte, sollte dieses System auch für CXCR4-trope Viren etabliert werden. Die Konkurrenz der R5-tropen Viren mit gp120 um den Korezeptor ist abhängig von der Infektiosität, daher wurden die Sequenzvarianten von NL-A_{X4}-g13,15 für die Wettbewerbsversuche ausgewählt. Diese unterscheiden sich neben der Neutralisationssensitivität auch in ihrer Affinität zu CXCR4.



Schema 9: Infektionssteigerung durch X4-tropes gp120

Für den Neutralisationstest wurden TZM-bl-Zellen mit NL-A_{X4}-g13,15 GNPI/GNPT/GNNI infiziert. Die Infektion wurde in Anwesenheit von mock oder X4-tropen gp120 (gp120-A_{X4}-g13,15 GNPI/GNPT/GNNI) durchgeführt.

Durch Zugabe der gp120-Zellkulturüberstände von X4-tropen Viren wurde keine Neutralisation erzielt (Abbildung 26). Es sind sogar virusverstärkende Effekte zu beobachten, denn in Anwesenheit von gp120-g13,15 GNNI infiziert das NL-A_{X4}-g13,15 GNPI Virus doppelt so gut. Das Virus, dessen gp120 die beiden anderen Virusinfektionen steigerte, war das Virus, dessen Infektiosität sich durch keines der gp120-Zellkulturüberstände steigern ließ.

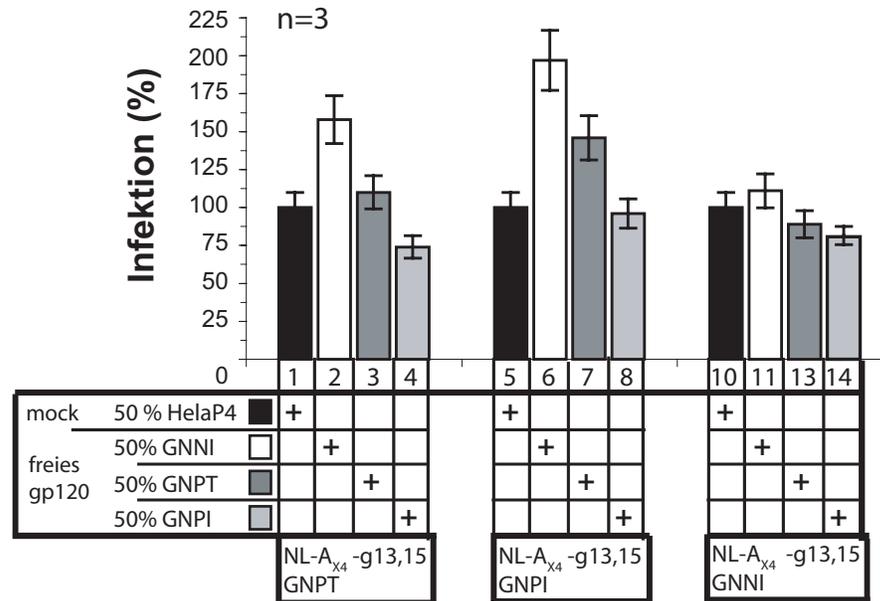


Abb. 26 Steigerung der Infektion von NL-A_{X4}-Sequenzvarianten mit gp120 Zellkulturüberstand

TZM-bl-Zellen wurden mit 100 ffu Virusüberstand in Anwesenheit von 1,5,10.) mock (50% untransfizierter HeLaP4 Zellkulturüberstand) 2,6,11.) gp120-A_{X4}-g13,15 GNNI (HeLaP4 Überstand von pgp160-A_{X4}-g13,15 GNNI) 3,7,13.) gp120-A_{X4}-g13,15 GNPT (HeLaP4 Überstand von pgp160-A_{X4}-g13,15 GNPT) 4,8,14.) gp120-A_{X4}-g13,15 GNPI (HeLaP4 Überstand von pgp160-A_{X4}-g13,15 GNPI) mit den Viren NL-A_{X4}-g13,15 GNNI (10-14) /GNPT (1-4) /GNPI (5-8) infiziert.

Kein Virus wurde durch das freie gp120 effektiv neutralisiert. Die beste inhibitorische Wirkung erzielte der gp120-A_{X4}-g13,15 GNPI-Zellkulturüberstand mit 40% Neutralisation des NL-A_{X4}-g13,15 GNNI Virus. Die umgekehrte Kombination, NL-A_{X4}-g13,15 GNPI Virus in Anwesenheit von freiem gp120-A_{X4}-g13,15 GNNI, zeigte eine virusverstärkende Wirkung von 100%. Auch der gp120-A_{X4}-g13,15 GNPT-Überstand steigerte die Virusinfektion von NL-A_{X4}-g13,15 GNPI um 50%.

Um die Konzentrationsabhängigkeit der infektionssteigernden Effekte zu überprüfen, wurden TZM-bl Zellen in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen Zellkulturüberstand-gp120 GNNI (0%, 25%, 50%, 75%) mit X4-tropen-Virus (NL-A_{X4}-g13,15 GNNI/GNPT/GNPI) infiziert.

Die infektionssteigernden Effekte sind konzentrationsabhängig (Abbildung 27). In Anwesenheit von steigenden gp120 (gp120-A_{X4}-g13,15 GNNI)-Konzentrationen stieg auch die Infektionsrate des X4-tropen Virus NL-A_{X4}-g13,15 GNPT von 100 auf 300 %. Die Infektionsrate des X4-tropen Virus NL-A_{X4}-g13,15 GNPI stieg sogar auf 750 %. Die Anwesenheit von freiem gp120-A_{X4}-g13,15 GNNI steigerte die Infektion des autologen Virus NL-A_{X4}-g13,15 GNNI nicht, sondern nur die Infektion der heterologen Viren.

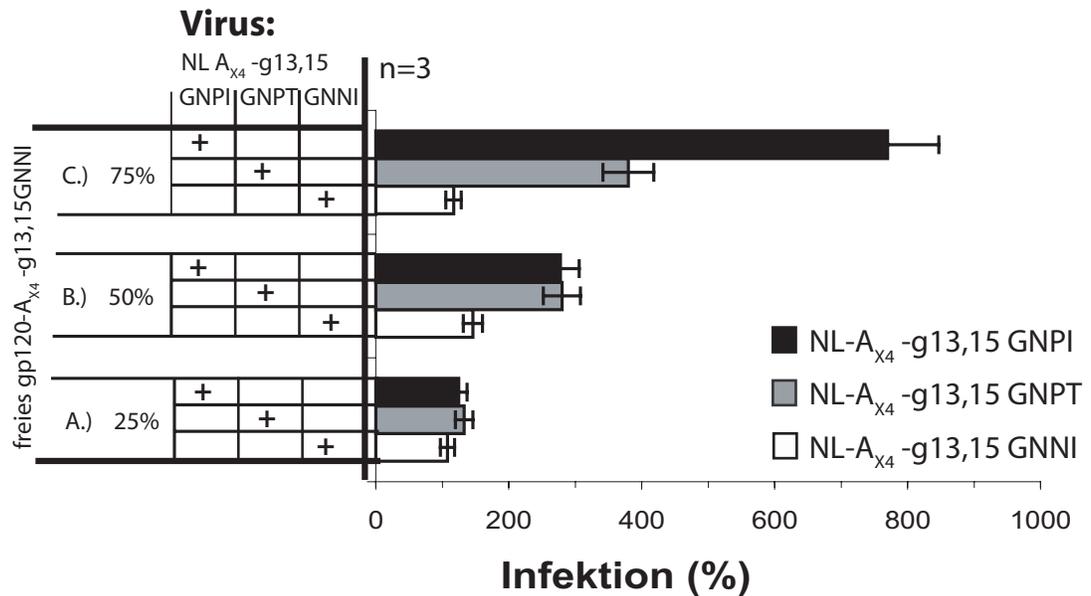


Abb. 27 Konzentrationsabhängige Steigerung der Infektion von NL-A_{X4}-Glykovarianten mit freiem X4-tropen gp120

TZM-bl-Zellen wurden mit NL-A_{X4}-Glykovarianten infiziert (100 ffu) in Anwesenheit von X4-tropen gp120 in den Konzentrationen:

A.) 25% gp120 (Überstand von pgp160-A_{X4}-g13,15 GNNI transfizierten HeLaP4 Zellen)

B.) 50% gp120 (Überstand von pgp160-A_{X4}-g13,15 GNNI transfizierten HeLaP4 Zellen)

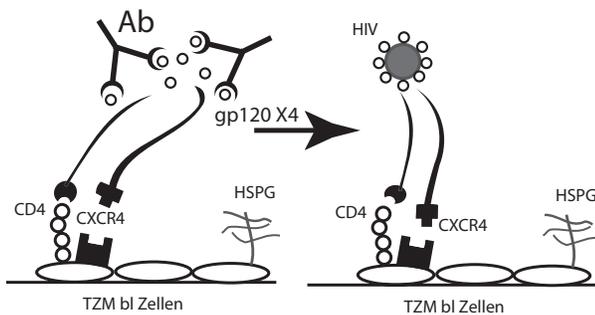
C.) 75% gp120 (Überstand von pgp160-A_{X4}-g13,15 GNNI transfizierten HeLaP4 Zellen)

Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden nach der Infektion ausgezählt.

Die Steigerung der Infektion von dem X4-tropen NL-A_{X4}-g13,15 GNPI und GNPT Virus durch freies X4-tropes gp120 (gp120-A_{X4}-g13,15 GNNI) war konzentrationsabhängig. Es konnte eine Steigerung der Infektion um 750% bei Anwesenheit von 75% freiem gp120 erzielt werden.

2.6.3 Die Infektionssteigerung durch freies X4-tropes gp120 wird durch neutralisierende Antikörper aufgehoben

Neutralisierende Antikörper können das freie X4-trope gp120 in den Zellkulturüberständen binden und dadurch die beschriebenen infektionssteigernden Eigenschaften des gp120 aufheben, ebenso wie neutralisierende Antikörper die neutralisierenden Eigenschaften des freien R5-tropen gp120 für R5-trope Viren aufheben können (2.6.1.3).



Schema 10: Infektion nach Präinkubation mit X4-gp120 und Antikörpern

Um zu testen, ob die Infektionssteigerung abhängig von gp120 ist, wurden TZM-bl-Zellen mit 7,5 ng/ml gp120- A_{X4} -g13,15 GNPT/GNPI/GNNI und gp120 NL4-3 in Anwesenheit von HIV-negativem- und HIV-B-positivem-Serum (Schema 10) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit NL- A_{X4} -g13,15 GNPI infiziert. Die Infektionsrate wurde 48 Stunden später bestimmt.

Bei einer Präinkubation mit freiem gp120- A_{X4} -g13,15 GNPT/GNNI und freiem gp120 NL4-3 in Anwesenheit von HIV-negativem-Serum beobachtete man eine Steigerung der Infektiosität, während nach der Präinkubation mit freiem gp120 in Anwesenheit von HIV-positivem-Serum weder eine Steigerung noch eine Inhibition der Infektion beobachtet wurde (Abbildung 28). Das X4-trope gp120 war also für die beobachteten infektionssteigernden Effekte verantwortlich.

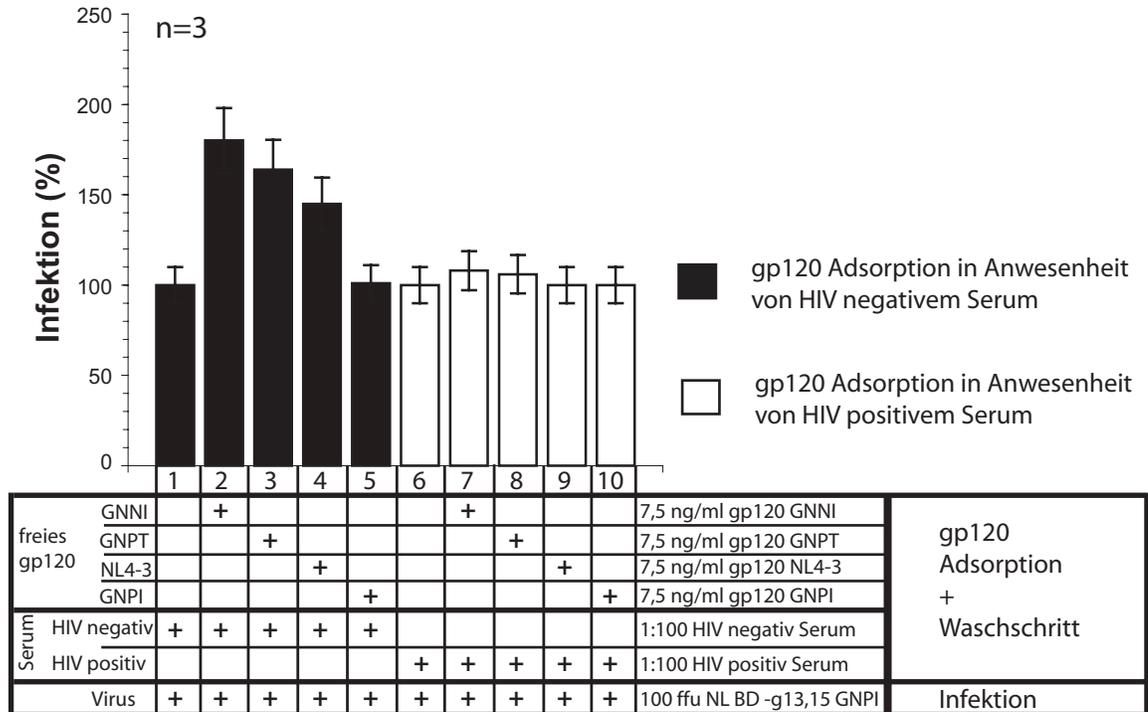


Abb. 28 Steigerung der Infektion von NL- A_{X4} -Glykovarianten mit gp120 Zellkulturüberstand in Anwesenheit von HIV-negativem- und positivem-Serum

3000 TZM-bl-Zellen wurden mit

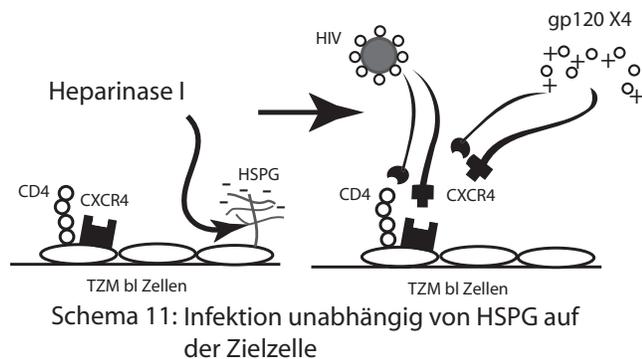
- 1.) 1:100 HIV negativ Serum
- 2.) 1:100 HIV negativ Serum und 7,5 ng/ml gp120- A_{X4} -g13,15 GNNI
- 3.) 1:100 HIV negativ Serum und 7,5 ng/ml gp120- A_{X4} -g13,15 GNPT
- 4.) 1:100 HIV negativ Serum und 7,5 ng/ml gp120 NL4-3
- 5.) 1:100 HIV negativ Serum und 7,5 ng/ml gp120- A_{X4} -g13,15 GNPI
- 6.) 1:100 HIV positiv Serum
- 7.) 1:100 HIV positiv Serum und 7,5 ng/ml gp120- A_{X4} -g13,15 GNPT
- 8.) 1:100 HIV positiv Serum 7,5 ng/ml gp120 gp120- A_{X4} -g13,15 GNNI
- 9.) 1:100 HIV positiv Serum 7,5 ng/ml gp120 NL4-3
- 10.) 1:100 HIV positiv Serum und 7,5 ng/ml gp120- A_{X4} -g13,15 GNPI

eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Menge an freiem gp120 in den Zellkulturüberständen von pgp160 transfizierten HeleP4-Zellen wurde mit Hilfe eines Dot-Blots bestimmt. Anschließend wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit 100 ffu NL- A_{X4} -g13,15 GNPI infiziert. Die Infektionsrate wurde 48 Stunden später bestimmt.

Man beobachtete eine deutliche Steigerung der Infektiosität des Virus NL- A_{X4} -g13,15 GNPI, wenn die TZM-bl-Zellen mit gp120- A_{X4} -g13,15 GNNI, gp120- A_{X4} -g13,15 GNPT oder gp120 NL4-3 Zellkulturüberständen inkubiert wurden. Es wurde keine Steigerung der Infektiosität des NL- A_{X4} -g13,15 GNPI beobachtet, wenn bei der Präinkubation mit freiem $X4$ -tropen gp120 ebenfalls HIV-B-positives-Serum anwesend war.

2.6.4 Heparan-Sulfate auf der Zielzelle sind notwendig für die Steigerung der Infektion durch X4-tropes gp120

Warum neutralisiert einerseits R5-tropes gp120 R5-trope Viren, aber im Unterschied dazu verstärkt X4-tropes gp120 die Infektion X4-troper Viren? Die R5-tropen Viren können nicht mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) interagieren, während X4-trope Viren über den V3-Loop an HSPG binden können. Daher sollte der Einfluss von Heparansulfat-Proteoglykanen auf die Steigerung der Infektion von NL-A_{X4} Glykovarianten durch freies X4-tropes gp120 untersucht werden.



Für die Untersuchung wurden TZM-bl-Zellen mit und ohne Heparinase I vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit NL-A_{X4} -g13,15 GNPI in Anwesenheit von mock oder X4-tropen gp120 (gp120-A_{X4} -g13,15 GNNI) infiziert. Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden später ausgezählt. (Schema 11)

Wurden TZM-bl Zellen mit Heparinase I präinkubiert, so zeigte das freie X4-trope gp120 (gp120 -A_{X4} -g13,15 GNNI) nicht die Fähigkeit, die Infektion des X4-tropen Virus (NL-A_{X4} -g13,15 GNPI) zu steigern, wurden die Zellen dagegen nicht mit Heparinase vorbehandelt, so zeigte sich der infektionssteigernde Effekt des freien X4-tropen gp120 (doppelte Infektionsrate) (Abbildung 29).

Die Steigerung der Infektionsrate von X4-tropen Viren durch freies X4-tropes gp120 war also abhängig von der Anwesenheit der Heparan-Sulfat-Proteoglykane auf der Zelloberfläche.

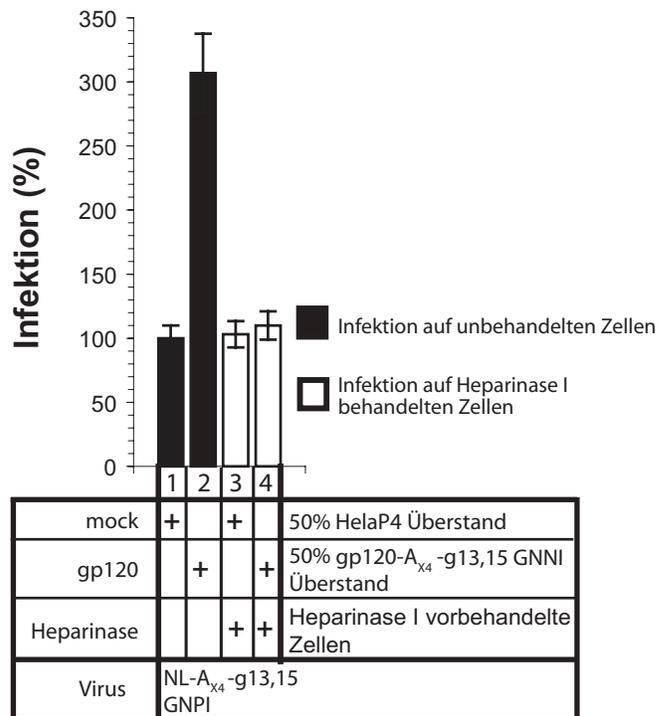


Abb. 29 Einfluss der Heparan-Sulfate auf die Steigerung der Infektion von X4-tropen Virus mit X4-tropem freiem gp120

TZM-bl-Zellen wurden zwei Stunden bei 37°C in PBS-M oder 10 Units/ml Heparinase I (Sigma) in PBS-M vorbehandelt. Die Zellen wurden mit 100 ffu NL-A_{X4}-g13,15 GNPI infiziert in Anwesenheit von:

1,3.) mock (50% untransfizierter HeLaP4 Zellkulturüberstand)

2,4.) X4-tropem freiem gp120 (50% pgp160-A_{X4}-g13,15 GNNI transfizierter HeLaP4 Zellkulturüberstand)

Die Steigerung der Infektion durch freies X4-tropes gp120 (gp120-A_{X4}-g13,15 GNNI) von X4-tropem Virus (NL-A_{X4}-g13,14 GNPI) war nur auf den Heparinase I unbehandelten Zellen zu beobachten. Der Verdau der Heparan-Sulfat-Proteoglykane auf den Zielzellen hatte zur Folge, dass das freie gp120 keine infektionssteigernden Effekte ausübte.

Es stellte sich die Frage, warum freies gp120-A_{X4}-g13,15 GNNI in der Lage war, die Infektion von heterologen X4-tropen Viren zu steigern (z.B. Abbildung 26), aber nicht freies gp120-A_{X4}-g13,15 GNPI, obwohl sich die gp120 Moleküle nur in einer Aminosäure unterscheiden.

Da die infektionssteigernde Wirkung des freien gp120-A_{X4}-g13,15 GNNI nur beobachtet wurde, wenn auch HSPG auf den Zielzellen vorhanden war, sollte überprüft werden, ob die beiden Viren NL-A_{X4}-g13,15 GNNI und NL-A_{X4}-g13,1 GNPI gleichermaßen von der Anwesenheit der Heparan-Sulfat-Proteoglykane auf den Zielzellen abhängig sind.

Dazu wurden TZM-bl-Zellen mit Heparinase I und Chondroitinase ABC in PBS-M präinkubiert. Chondroitinase verdaut Chondroitin-Sulfat-Proteoglykane und diente als Kontrolle. Die Zellen wurden mit NL-A_{X4}-g13,15 GNNI und NL-A_{X4}-g13,15 GNPI infiziert. Die Infektionsrate entsprach dem Quotient der Anzahl der infizierten Zellen geteilt durch die Anzahl der infizierten Zellen bei der Präinkubation ohne Heparinase oder Chondroitinase.

Die Präinkubation mit Chondroitinase hatte keinen Effekt auf die Infektion sowohl des NL-A_{X4}-g13,15 GNNI als auch des NL-A_{X4}-g13,15 GNPI Virus (Abbildung 30). Bei der Infektion der Heparinase I behandelten Zellen mit NL-A_{X4}-g13,15 GNNI Virus wurden nur noch 60% der Zellen infiziert, doch bei der Infektion mit NL-A_{X4}-g13,15 GNPI Virus zeigte sich kein inhibitorischer Effekt der Heparinase I-Behandlung.

Die Infektion mit dem NL-A_{X4}-g13,15 GNPI Virus war im Gegensatz zu der Infektion mit NL-A_{X4}-g13,15 GNNI unabhängig von der Anwesenheit der Heparan-Sulfat-Proteoglykane auf der Zielzelle. Es ist also wahrscheinlich, dass das freie gp120-A_{X4}-g13,15 GNNI infektionssteigernd wirkte, weil es im Gegensatz zu gp120-A_{X4}-g13,15 GNPI in der Lage war, an HSPG zu binden.

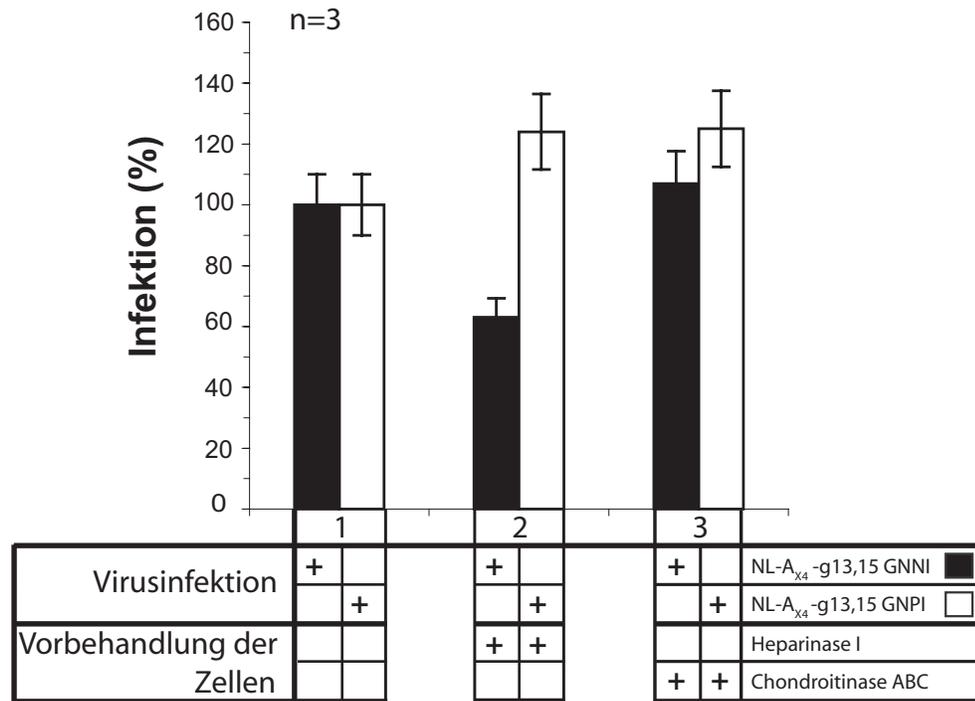


Abb. 30 Einfluss der Heparan-Sulfate auf die Infektion der X4-tropen Viren NL-A_{X4}-g13,15 GNNI und NL-A_{X4}-g13,15 GNPI

TZM-bl-Zellen wurden 2 Stunden bei 37°C mit

1.) PBS-M

2.) 10 Units/ml Heparinase I (Sigma) in PBS-M

3.) 10 Units/ml Chondroitinase ABC (Sigma) in PBS-M vorbehandelt.

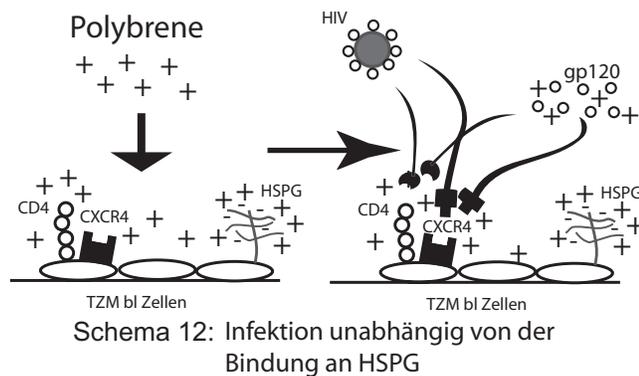
Die Zellen wurden anschließend mit 100 ffu NL-A_{X4}-g13,15 GNNI oder NL-A_{X4}-g13,15 GNPI-Virusüberstand infiziert.

Das NL-A_{X4}-g13,15 GNNI Virus infizierte Heparinase I behandelte Zellen schlechter als die unbehandelten Zellen, die Infektion war also abhängig von HSPG auf den Zielzellen.

Die Infektion des NL-A_{X4}-g13,15 GNPI Virus wurde durch den Heparinaseverdau der Zielzellen nicht beeinflusst, die Infektion war also unabhängig von HSPG auf den Zielzellen.

2.6.5 Neutralisation einer X4-tropen +gp15 Glykosylierungsvariante durch freies gp120 von -gp15 Glykosylierungsvarianten

Die vorhergehenden Versuche zeigten, dass die Steigerung der Infektion mit gp120 Zellkulturüberständen durch Interaktion mit Heparan-Sulfat-Proteoglykanen vermittelt wird (2.7.3), daher stellte sich die Frage, ob auch X4-tropes gp120 CXCR4-trope Viren neutralisieren kann, wenn die Infektion unabhängig von der Bindung an HSPG durchgeführt wird.



TZM-bl-Zellen wurden mit Polybrene präinkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und mit NL-A_{X4}-g13,15 GNPI in Anwesenheit von mock, freiem gp120-A_{X4}-g13,15 GNPI/GNNI/GNPT und freiem gp120 NL4-3 Zellkulturüberstand infiziert. Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden später ausgezählt.

War die Infektion unabhängig von HSPG, wurde das NL-A_{X4}-g13,15 GNPI Virus am besten durch freies gp120-A_{X4}-g13,15 GNNI (30%) inhibiert. Dieses gp120 stammt von dem Virus, welches neutralisationsresistenter gegen SDF-1 war als das NL-A_{X4}-g13,15 GNPI Virus (Abbildung 18). Freies gp120 von NL-A_{X4}-g13,15 GNPT und NL4-3 Viren konnte das NL-A_{X4}-g13,15 GNPI Virus kaum inhibieren (10 und 20%), aber es traten auch keine infektionssteigernden Effekte wie bei der HSPG abhängigen Infektion auf (Abbildung 31 A).

Da das NL-A_{X4}-g13 GNNT Virus eine deutlich geringere Infektiosität zeigte als die anderen X4-tropen Viren (Abbildung 17), wurde dieser Virus wie oben beschrieben mit freiem gp120-A_{X4}-g13,15 GNPI und gp120-A_{X4}-g13,15 GNNI neutralisiert.

Das NL-A_{X4}-g13 GNNT Virus ließ sich von dem freien X4-tropen gp120 (gp120-A_{X4}-g13,15 GNPI und gp120-A_{X4} GNNI) zu 80% inhibieren. War die Infektion unabhängig von HSPG, konnte X4-tropes gp120 mit hoher Infektiosität auch X4-tropes Virus mit niedriger Infektiosität neutralisieren (Abbildung 31 B).

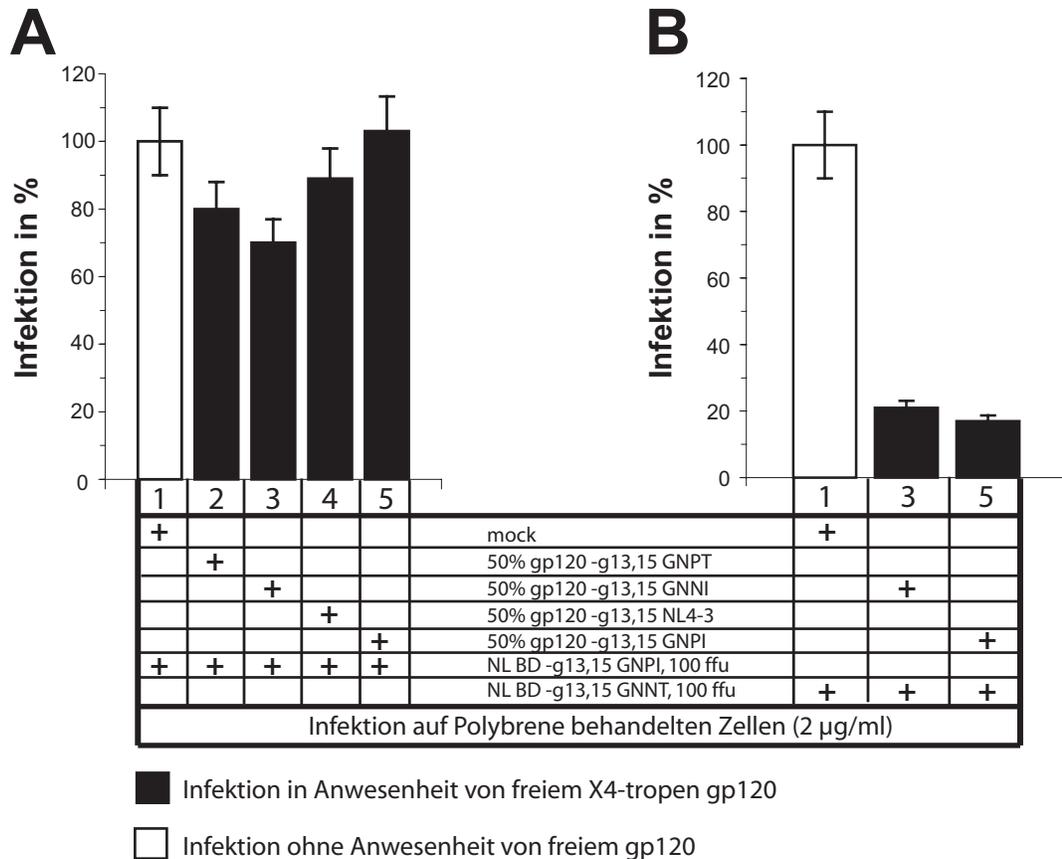


Abb. 31 Neutralisation von NL- A_{X4} -Glykovarianten mit freiem gp120 auf Polybrene behandelten Zellen

TZM-bl-Zellen wurden nach Präinkubation mit 2 µg/ml Polybrene für eine Stunde bei 37°C mit A.) 100 ffu NL- A_{X4} -g13,15 GNPI Virus infiziert oder B.) 100 ffu NL- A_{X4} -g13,15 GNNT Virus infiziert.

Die Infektion erfolgte in Anwesenheit von 50% HeLaP4 Zellkulturüberstand:

- 1.) mock (untransfizierte HeLaP4 Zellen)
- 2.) gp120- A_{X4} -g13,15 GNPT (pgp160- A_{X4} -g13,15 GNPT transfizierte HeLaP4 Zellen)
- 3.) gp120- A_{X4} -g13,15 GNNI (pgp160- A_{X4} -g13,15 GNNI transfizierte HeLaP4 Zellen)
- 4.) gp120-NL4-3 (mit pgp160 transfizierte HeLaP4 Zellen)
- 5.) gp120- A_{X4} -g13,15 GNPI (pgp160- A_{X4} -g13,15 GNPI transfizierte HeLaP4 Zellen)

A.) *In Anwesenheit von Polybrene wird die Infektion von NL- A_{X4} -g13,15 GNPI durch das freie gp120 (mit Ausnahme des gp120- A_{X4} -g13,15 GNPI) leicht inhibiert.*

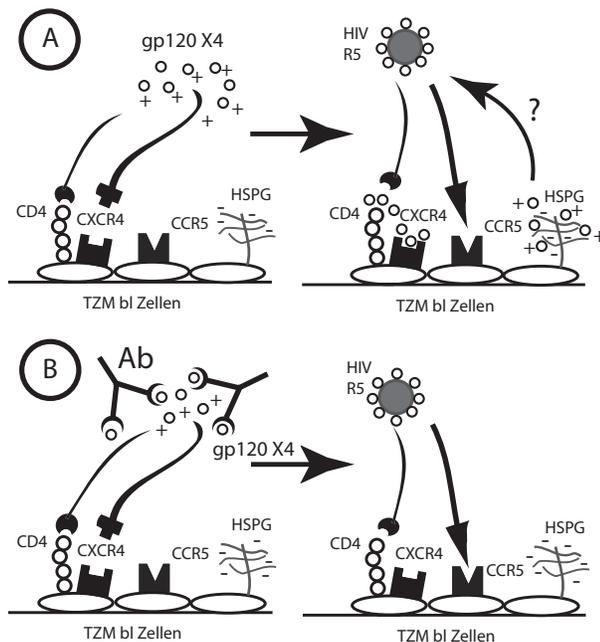
B.) *Die Infektion des NL- A_{X4} -g13,15 GNNT Virus konnte zu 80% von gp120- A_{X4} -g13,15 GNPT bzw. gp120- A_{X4} -g13,15 GNNI Zellkulturüberstand inhibiert werden.*

Ist die Infektion unabhängig von HSPG, kann also X4-tropes gp120 ein X4-tropes Virus neutralisieren.

2.6.6 Steigerung der Infektion R5-troper Viren mit gp120 Zellkulturüberstand von X4-tropen Viren

Die Infektion von R5-tropem Virus kann durch die Anwesenheit von X4-tropem gp120 gesteigert werden.

Wenn freies X4-tropes gp120 aufgrund einer Bindung an Heparan-Sulfat-Proteoglykanen (HSPG) die Infektion steigert, sollte auch die Infektion von R5-tropen Viren von den gp120 Zellkulturüberständen von X4-tropen Viren gesteigert werden.



Schema 13: Infektion durch R5-HIV in Anwesenheit von X4-gp120

Um dies zu testen, wurden TzM-bl-Zellen mit gp120 NL4-3 in Anwesenheit von HIV-negativem- (Schema 13 A) und HIV-B positivem-Serum (Schema 13 B) präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit NL-V3-A, NL-991 und NL-918 infiziert. Die infizierten Zellen wurden 48 Stunden später ausgezählt.

Die gp120 NL4-3 Zellkulturüberstände waren in der Lage, sowohl mit als auch ohne HIV-negativem-Serum die Infektion von den CCR5-tropen Viren zu steigern. Der Effekt konnte durch Anwesenheit von HIV-positivem-Serum inhibiert werden. Freies gp120 von X4-tropen Viren steigerte nicht nur die Infektion von X4-tropen Viren (Abb. 26+27), sondern auch die Infektion von R5-tropen Viren (Abb. 32).

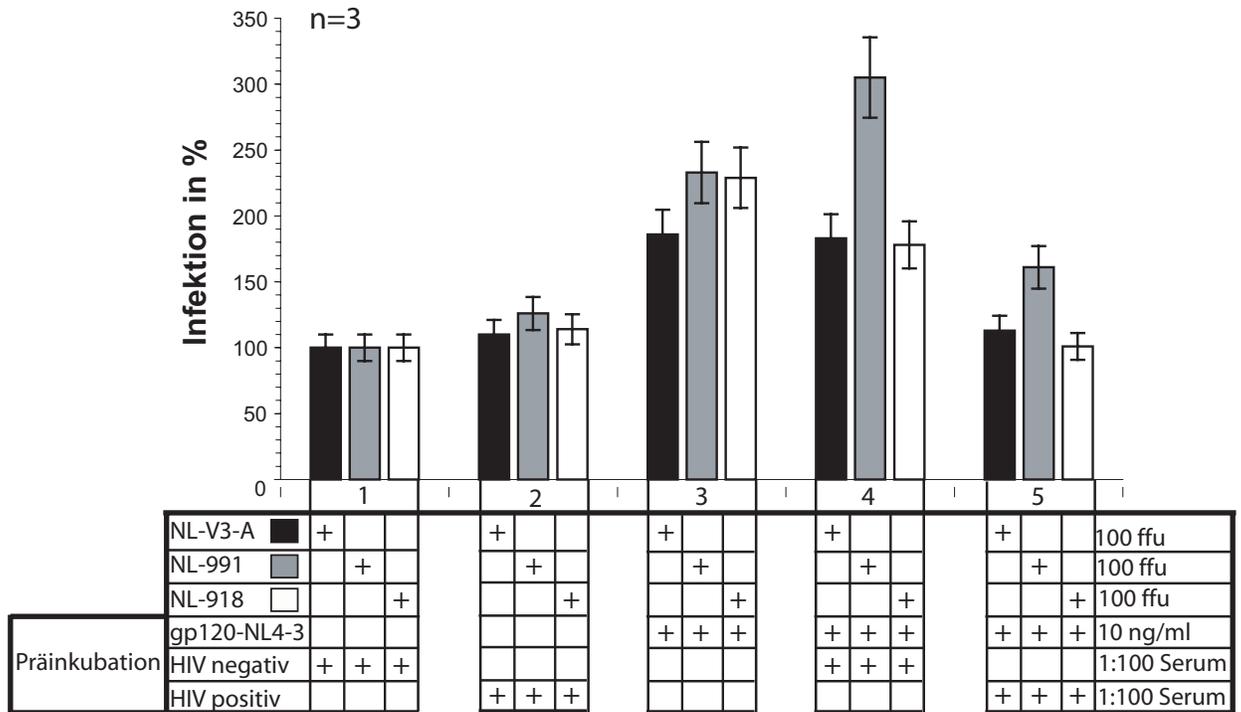


Abb. 32 Steigerung der Infektion R5-troper Viren durch X4-tropes gp120

3000 TZM-bl Zellen wurden mit

1.) 1:100 HIV-negatives-Serum

2.) 1:100 HIV-positives-Serum

3.) 10ng ng/ml gp120 NL4-3

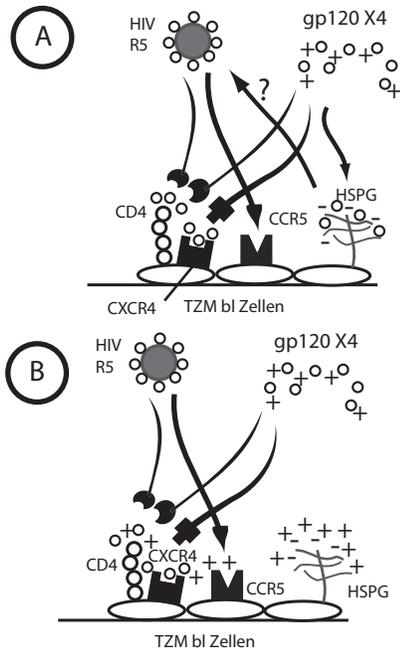
4.) 1:100 HIV negativ Serum und 10ng/ml gp120 NL4-3

5.) 1:100 HIV positiv Serum und 10ng/ml gp120 NL4-3

Eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit 100 ffu NL-V3-A, NL-991 und NL-918 infiziert. Die Infektionsrate wurde 48 Stunden später bestimmt.

Beobachtet wurde eine deutliche Steigerung der Infektiosität von R5-tropen Viren auf Zellen, die mit X4-tropem gp120 vorbehandelt wurden. Die Infektionssteigerung wurde inhibiert, wenn bei der Vorbehandlung der Zellen HIV-positives-Serum anwesend war. Freies gp120 von X4-tropen Viren hatte also einen infektionssteigernden Effekt auf R5-trope Viren, der durch HIV-positives-Serum aufgehoben werden konnte.

Um zu bestätigen, dass die Infektionssteigerung von CCR5-tropen Viren tatsächlich von Adsorptionseffekten abhängt, wurde die Infektion unabhängig von der Bindung an HSPG durchgeführt.

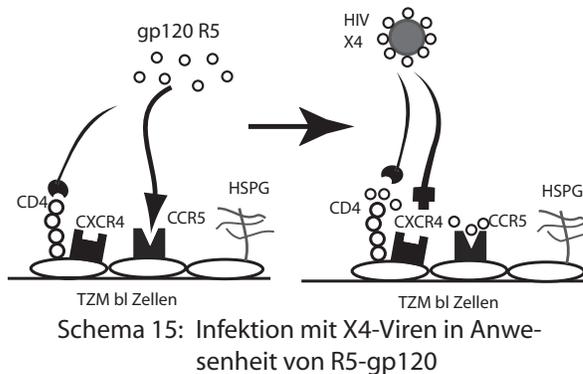


Schema 14: Infektion mit R5-Viren und freiem X4-gp120 auf Polybrene behandelten Zellen

Dafür wurden TZM-bl-Zellen mit (Schema 14 B) und ohne (Schema 14 A) Polybrene präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit NL-V3-A Virus in Anwesenheit von mock und freiem X4-tropen gp120 (50% Zellkulturüberstand von $pgp160-A_{X4}$ -g13,15 GNNI transfizierten HeLaP4-Zellen) infiziert. Nach 48 Stunden wurde die Infektionsrate bestimmt.

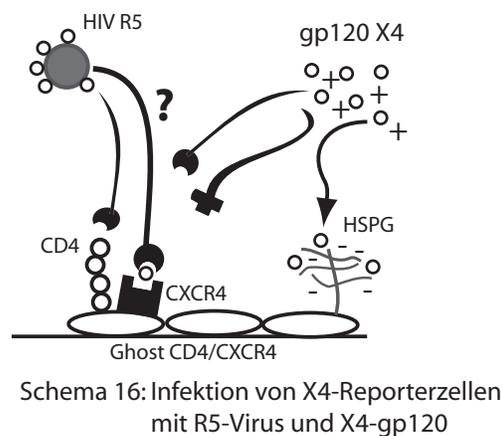
In Anwesenheit von freiem X4-tropen gp120 ($gp120-A_{X4}$ -g13,15 GNNI) wurde eine Steigerung des NL-V3-A Virus auf durchschnittlich 550% beobachtet (Abbildung 33 A). Wurden die Zellen dagegen mit Polybrene vorbehandelt, beobachtete man keinerlei Infektionssteigerung des R5-tropen NL-V3-A Virus, trotz der Gegenwart des freien X4-tropen gp120. Der infektionssteigernde Effekt konnte daher eindeutig auf die Adsorption des freien X4-tropen gp120 an die Zelloberfläche zurückgeführt werden.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob umgekehrt freies gp120 von CCR5-tropen Viren auch einen Einfluss auf CXCR4-trope Viren hat.



Der Frage wurde nachgegangen, indem TzM-bl-Zellen mit NL-A_{X4}-g_{13,15} GNPI/GNPT und GNNI in Anwesenheit von mock, freiem X4-tropen gp120 (gp120-A_{X4}-g_{13,15} GNNI) und freiem R5-tropen gp120 (gp120-V3-A) infiziert wurden (Schema 15). Nach 48 Stunden wurden die infizierten Zellen ausgezählt.

Im Gegensatz zu dem X4-tropen gp120 (gp120-A_{X4}-g_{13,15} GNNI) hatte die Anwesenheit des R5-tropen gp120 (gp120-V3-A) keinerlei infektionssteigernde Wirkung (Abb. 33 B). Um auszuschließen, dass eine Infektionssteigerung eines R5-tropen Virus durch freies gp120 von X4-tropen Viren dadurch zustande kommt, dass der R5-trope Virus neben dem CCR5-Korezeptor zusätzlich den CXCR4 Korezeptor benutzt, wurden Ghost-Zellen infiziert, welche nur einen Korezeptor exprimieren.



Ghost-CD4/CXCR4-Zellen und Ghost-CD4/CCR5-Zellen wurden mit 100 ffu eines R5-tropen Virus (NL-V3-A) infiziert. Die Infektion der Ghost-CD4/CXCR4-Zellen wurde in Anwesenheit von freiem X4-tropen gp120 (gp120-A_{X4}-g_{13,15} GNNI) oder mock durchgeführt. Die Infektionsrate wurde 48 Stunden später mit Hilfe eines GFP-Reportergentest bestimmt. (Schema 16)

Ghost-CD4/CXCR4-Zellen wurden nicht von dem R5-tropen Virus infiziert (Abb. 33 C), unabhängig von der Anwesenheit von freiem X4-tropen gp120 (gp120-A_{X4}-g_{13,15} GNNI). Eine Assoziation des X4-tropen gp120 mit dem gp41 auf dem R5-tropen Virus war damit ausgeschlossen.

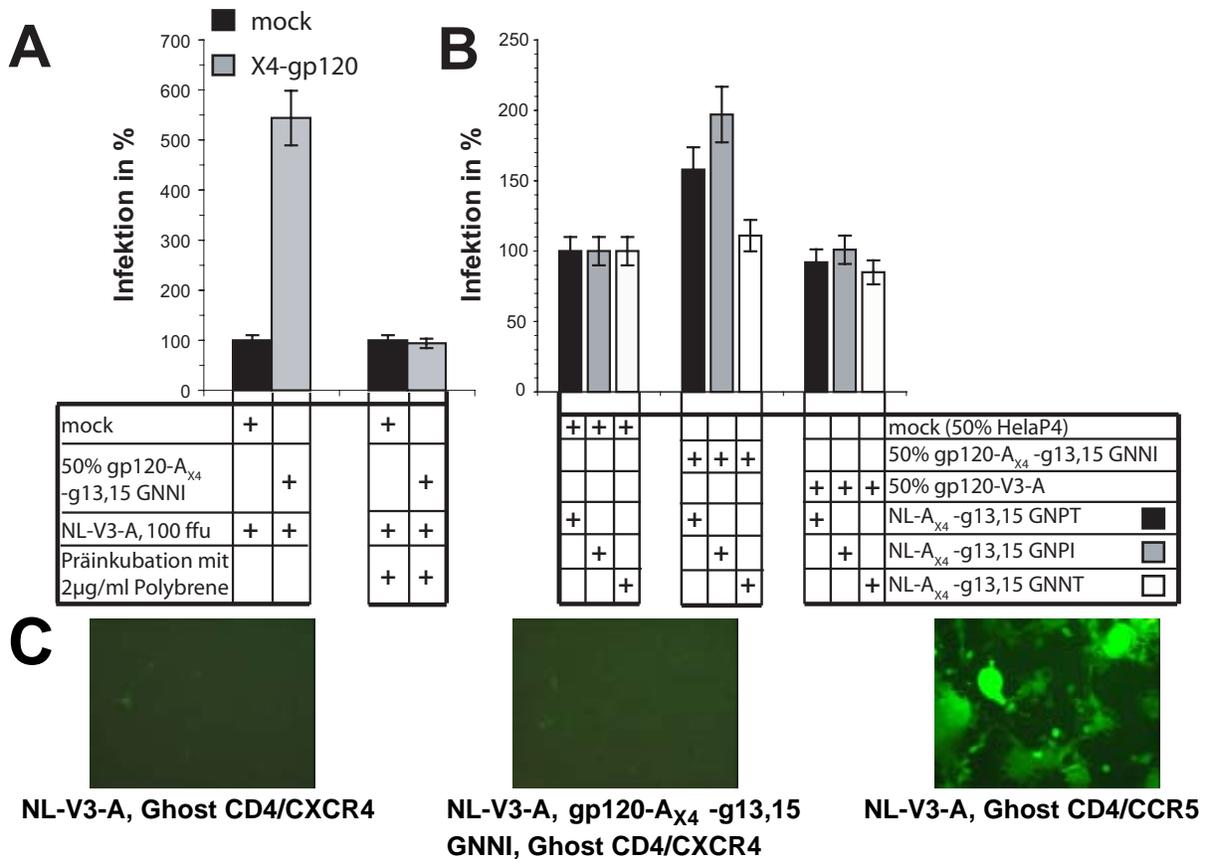


Abb. 33 Die Steigerung der Infektion von R5-tropen Virus mit freiem X4-tropen gp120 ist abhängig von HSPG

A.) Mit je 100 ffu NL-V3-A Virus wurden unbehandelte TZM-bl-Zellen und TZM-bl-Zellen, welche mit 2 µg/ml Polybrene 1 Stunde bei 37°C präinkubiert wurden, infiziert. Die Infektion wurde in Anwesenheit von mock (50% HelaP4-Zellkulturüberstand) und in Anwesenheit von freiem X4-tropen gp120 (50% gp120-A_{X4}-g13,15 GNNT Zellkulturüberstand) durchgeführt.

Das X4-trope gp120 war in der Lage, die Infektion von einem R5-tropen Virus zu steigern, wenn die Zellen Polybrene unbehandelt waren.

B.) Mit je 100 ffu NL-A_{X4}-g13,15 GNPI/GNNT/GNPT Virus wurden 3000 TZM-bl Zellen in Anwesenheit von mock (s.o.), freiem X4-tropen gp120 (s.o.) und freiem R5-tropen gp120 (50% gp120-V3-A Zellkulturüberstand) infiziert.

Das X4-trope gp120 verstärkte wie erwartet die Infektion der NL-A_{X4}-g13,15 GNPT und GNPI Viren, das R5-trope gp120 hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Infektion.

C.) Ghost-CD4/CXCR4-Zellen und Ghost-CD4/CCR5-Zellen wurden mit 100 ffu des R5-tropen Virus NL-V3-A in An- und Abwesenheit von freiem X4-tropen gp120 (50% gp120 BD-g13,15 GNNT Zellkulturüberstand) infiziert.

Das R5-trope NL-V3-A Virus infizierte in Anwesenheit von freiem X4-tropen gp120 die X4-Reporterzellen nicht. X4-tropes gp120 konnte also nicht mit einem R5-tropen Virus assoziieren und so die Infektion über einen anderen Korezeptor auslösen.

3. Diskussion

3.1 Die Bedeutung der N-Glykane im V3-Bereich für die Infektiosität der R5-tropen Viren

Von den HIV-Subtyp-A und Subtyp-C Viren wurden N-Glykosylierungsvarianten hergestellt und auf deren Infektiosität in einem Virus-Zell-System untersucht. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die N-Glykane im V3-Bereich des gp120. Im folgendem werden die Ergebnisse, geordnet nach N-Glykanen, diskutiert.

3.1.1 Das N-Glykan g12 maskiert ein neutralisationssensitives Epitop in den CCR5-tropen NL-V3-A-Viren

Das N-Glykan g12 ist neben dem N-Glykan g15 das einzige Glykan im V3-Loop-Bereich, welches vom komplexen Typ ist [Zhu *et al.*, 2000]. Die Deletion dieses Glykans in der HIV-A-V3-Loop-Chimäre (NL-V3-A -g12) zeigte im Unterschied zu den g15-Daten keinen Einfluss auf die Fähigkeit, Synzytien zu induzieren, oder auf die Infektiosität der NL-V3-A Glykosylierungsvarianten. Bei den Untersuchungen mit neutralisierenden Seren zeigte sich eine erhöhte Sensitivität der -g12 Glykosylierungsvarianten gegen HIV-Subtyp-B-positives-Serum, aber nicht gegen HIV-A-positives-Serum. Dies spricht dafür, dass das Glykan g12 ein Epitop außerhalb des V3-Loops abschirmt, welches von dem HIV-Subtyp-A-Serum nicht erkannt wird, aber von dem HIV-Subtyp-B-Serum. In dem HIV-A-positiven-Serum befinden sich wahrscheinlich keine Antikörper, die gegen die HIV-Subtyp-B-Epitope außerhalb des HIV-Subtyp-A-V3-Loops gerichtet sind (kreuzneutralisierende Antikörper). Bei dem Versuch, das von g12 maskierte Epitop näher einzugrenzen, wurden Neutralisationstests mit einem monoklonalen V2-Loop-Antikörper (CRA-4), zwei monoklonalen CD4bs-Antikörpern (CRA-5, IgG1b12) und einem monoklonalen anti-CD4-Antikörper (ADP357) durchgeführt, doch gegen keinen dieser Antikörper war eine erhöhte Neutralisationssensitivität zu beobachten. Auch die Neutralisation mit löslichen CD4 (sCD4) zeigte keinen Unterschied in der Neutralisationssensitivität (Daten nicht gezeigt). Die Epitope für die getesteten monoklonalen Antikörper sowie das CD4-Bindungsepitop scheiden damit als g12-maskiertes Epitop aus. Auch die Neutralisation mit dem natürlichen Liganden des

CCR5, Mip-1 β , zeigte keinen Unterschied zwischen g12-Varianten. Dies spricht gegen eine besondere Exposition oder Abschirmung des CCR5-Bindungsepitopes, dem V3-Loop.

In dieser Arbeit wurde beschrieben, dass g12 ein neutralisierendes Epitop auf dem Subtyp-B-Hüllprotein maskiert. Wahrscheinlich wurde dieses Resultat erst durch den Austausch des Subtyp-B-V3-Loops gegen den Subtyp-A-V3-Loop ermöglicht. Grund für den gefundenen Maskierungseffekt könnte sein, dass die sonst dominante Immunantwort gegen den V3-Loop diesen g12-Effekt "verdeckt" hat. Da im Subtyp-B-Serum keine V3-spezifischen Subtyp-A-Antikörper vorhanden sind, werden andere neutralisationsrelevante Epitope sichtbar. Das N-Glykan g12 scheint ein solches, bisher unbekanntes Epitop zu maskieren.

3.1.2 Die Bedeutung des N-Glykans g13 bei HIV-Subtyp-A-Viren

Da die Glykosylierungsstelle an dem zu NL4-3 korrespondierenden Glykosylierungssignal g13 bei 90% der HIV-A-Sequenzen nicht vorhanden war, wurde dieses Glykosylierungssignal durch Mutation in den Subtyp-A V3-Loop-Bereich eingeführt. Sowohl bei NL-V3-A-Viren als auch bei Viren mit kompletten HIV-Subtyp-A gp120 (NL-A_{R5}, NL-A_{X4}), zeigten Viren +g13 Varianten keine veränderte Infektiosität, Korezeptornutzung oder Neutralisationssensitivität. Da es wahrscheinlich keinen Selektionsdruck durch neutralisierende Antikörper auf die N-Glykosylierungsstelle gibt, ist es für das Virus kein selektiver Vorteil, diesen V3-Loop-Bereich durch ein N-Glykan zu maskieren.

3.1.3 Die Bedeutung des N-Glykans g14 in CCR5-tropen-Subtyp-A- und Subtyp-C-Viren

Für HIV-Subtyp-B ist bekannt, dass das Glykan g14 die CD4-Bindungsstelle (CD4bs) maskiert [McCaffrey *et al.*,2004]. Jedoch war weder bei HIV-Subtyp-A noch bei HIV-Subtyp-C-Viren eine erhöhte Neutralisationssensitivität der -g14 Varianten zu beobachten (Daten für Subtyp C nicht gezeigt). Dies wird unterstützt durch die Sequenzanalyse, die zeigte, dass das g14 N-Glykan nur bei etwa 20% der sequenzierten HIV-C-Viren vorhanden war. Das Glykosylierungssignal an dieser Stelle kann bei einem Großteil der Sequenzen durch den Austausch einer Aminosäure wiederhergestellt werden. So war bei den meisten HIV-C-Sequenzen statt dem

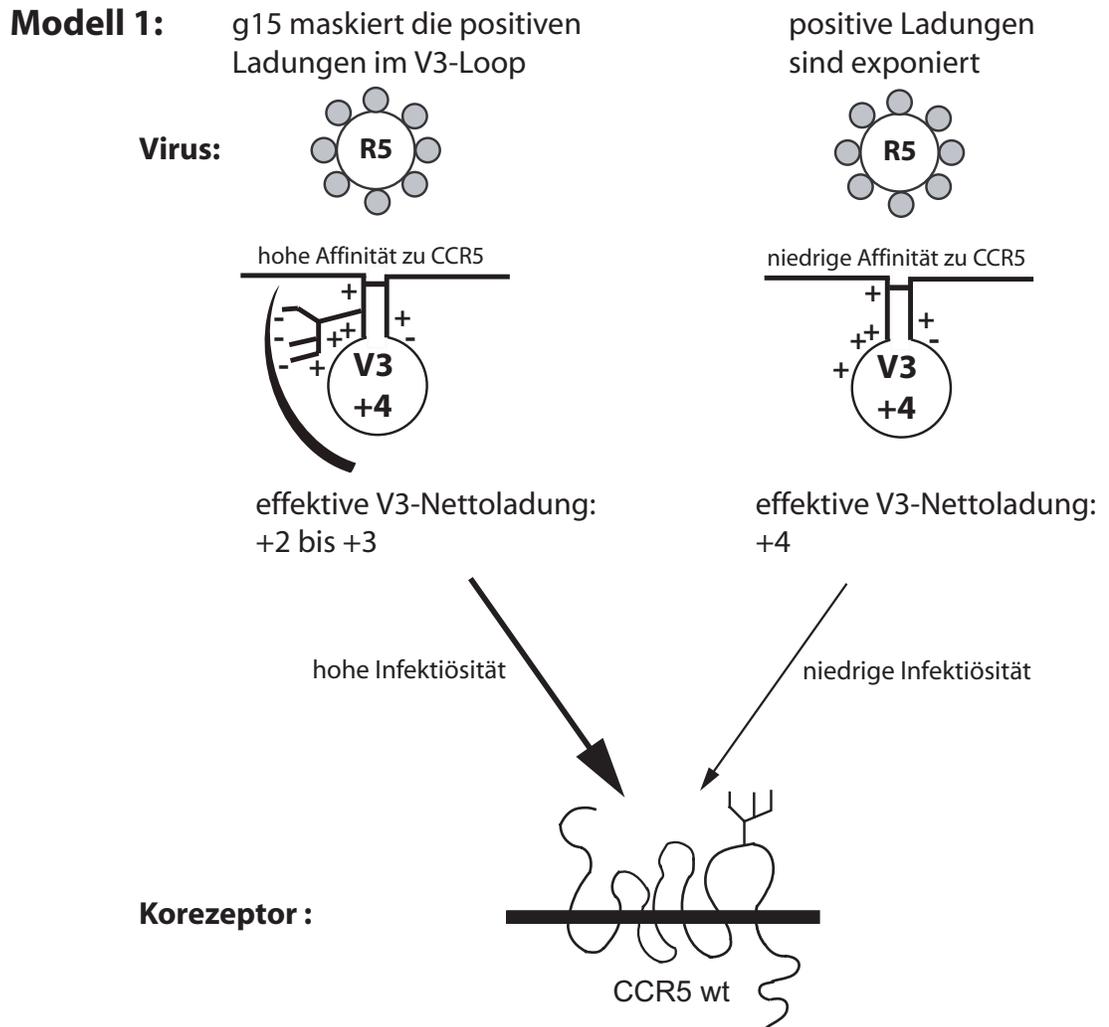
Glykosylierungssignal die Aminosäuresequenz VCT zu finden, ebenso wie bei dem NL-C -g14 Virus. Seltener war die Aminosäuresequenz VCI zu finden, bei welcher eine Doppelmutation nötig, ist um das Glykosylierungssignal wiederherzustellen. Ebenso wie bei der Glykosylierungsstelle g13 bei HIV-Subtyp-A könnte man hier argumentieren, dass durch einen fehlenden Selektionsdruck auf das Epitop, welches das Glykan g14 maskiert, dieses Glykan keine Funktion für das Virus ausübt und daher in den Subtyp-C Sequenzen nicht vorhanden ist. Falls ein Selektionsdruck entstehen würde, könnte das Glykosylierungssignal aber schnell wieder entstehen, da bei den meisten gefundenen -g14 Sequenzen nur der Austausch einer Aminosäure für die Entstehung der NXS/T-Glykosylierungsstelle nötig ist. Allerdings legen die neuesten Studien von Chen und Mitarbeitern [Chen *et al.*, 2005] den Schluss nahe, dass ein Selektionsdruck auf das N-Glykan g14 selbst besteht. Bei Anwesenheit des Glykosylierungssignals g14 in einem HIV-Subtyp-C Virus wurde die Bindung des monoklonalen Antikörpers, 2G12, und somit die Neutralisation des Virus beobachtet. Der 2G12-Antikörper erkennt ein Epitop aus Aminosäuren und *“high mannose”* N-Glykanen. Zu diesem AK-Epitop gehört auch das Karbohydrat g14 [Scanlan *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2002]. Die Entstehung des 2G12-Epitopes im Verlauf der Erkrankung wurde für HIV-Subtyp-B-Viren mit dem *“evolving Glykan shield”* in Verbindung gebracht [Dacheux *et al.*, 2004]. Da der Verlust dieses Glykans nicht die Infektiosität, die Affinität zu CD4, die Neutralisationssensitivität gegenüber HIV-A- und -B-positivem-Serum und die Erkennung anderer monoklonaler Antikörper beeinflusst (IgG1b12), ist der Verlust dieses Glykans für das HIV-C-Virus wahrscheinlich von Vorteil und gibt Hinweise darauf, dass sich die Veränderung der N-Glykosylierung (*evolving Glykan shield*) während der Infektion bei HIV-Subtyp-C-Viren anders entwickeln könnte als bei HIV-Subtyp-B Viren.

3.1.4 Das N-Glykan g15 unterstützt die Interaktion CCR5-troper Subtyp-A und Subtyp-C Viren

Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte des N-Glykans g15 auf die Infektiosität R5-troper Viren könnte durch die Abschirmung positiv geladener Aminosäuren im V3-Loop erklärt werden. Da das N-Glykan g15 vom komplexen Typ ist, könnte es durch seine endständig-negativ-geladenen-Sialinsäuren eine Wechselwirkung mit positiven Aminosäuren des V3-Loops eingehen. Dies hätte zur Folge, dass die effektive Nettoladung des V3-Loops in Anwesenheit des Glykans g15 sinkt und dadurch die Interaktion mit CCR5 gesteigert wird (Modell 1).

Für Subtyp-B Viren konnte gezeigt werden, dass je höher die Ladung des V3-Loops ist, desto sensibler wurde das Virus gegenüber der Neutralisation mit RANTES und sCD4 [Nabatov *et al.*, 2004]. Dies zeigt, dass CCR5-trope Viren mit hoher Nettoladung eine verminderte Affinität zu dem Korezeptor CCR5 haben, im Unterschied zu Viren mit einer niedrigeren V3-Loop-Nettoladung, da RANTES sie vom Korezeptor verdrängen kann. Außerdem spricht eine erhöhte Neutralisationssensitivität gegenüber sCD4 für eine Exposition des sCD4-Epitops und einer damit einhergehenden gesteigerten Affinität zu CD4.

Die R5-tropen -g15-Subtyp-B Viren zeigten die gleichen Eigenschaften wie Viren mit einer hohen V3-Loop-Nettoladung. Die -g15-Viren waren weniger infektiös und wiesen eine erhöhte Neutralisationssensitivität gegenüber RANTES auf [McCaffrey *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2003; Polzer *et al.*, 2002]. Zudem waren sie sensibler gegenüber der Neutralisation mit sCD4, was für eine Exposition des CD4bs-Epitopes spricht [Malenbaum *et al.*, 2001; McCaffrey *et al.*, 2004; Rizzuto *et al.*, 2000]. Besonders die Tatsache, dass R5/X4-trope Viren nach Verlust des N-Glykans g15 einen rein X4-tropen Phänotyp aufweisen [Li *et al.*, 2001; Ogert *et al.*, 2001; Polzer *et al.*, 2002; Pollakis *et al.*, 2001], beweist die CCR5-unterstützende Wirkung des N-Glykans g15, besonders wenn man in Betracht zieht, dass der X4-trope Phänotyp mit einer höheren V3-Loop-Nettoladung assoziiert ist [Dong *et al.*, 2005]. Es gibt allerdings auch Virusisolate, bei denen der Verlust des N-Glykans g15 keinen Einfluss auf die Infektiosität und Neutralisationssensitivität hat, diese Viren haben eine minimale V3-Loop-Nettoladung und sind so gut an den Korezeptor adaptiert, dass g15 deren Korezeptoraffinität nicht mehr weiter beeinflussen kann [Polzer *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2001].



Modell 1: *Das N-Glykan g15 kann positive Ladungen des V3-Loops abschirmen. Dadurch kommt es zu einer niedrigeren effektiven V3-Loop-Nettoladung, was sich positiv auf die CCR5-Interaktion auswirkt.*

Die Daten dieser Arbeit unterstützen die für HIV-Subtyp-B erstellte Hypothese, dass das N-Glykan g15 die CCR5-Korezeptornutzung unterstützt (Modell 1). Die Analyse der *Los Alamos* Datenbank-Sequenzen zeigte die Assoziation des N-Glykans g15 mit dem CCR5-tropen Phänotyp der Subtyp-B Viren. Noch deutlicher wurde dieser Zusammenhang, wenn man die Sequenzen, unabhängig von dem HIV-Subtyp, nach V3-Loop-Nettoladung unterteilte. Viren mit einer V3-Loop-Nettoladung von +6 bis +9 hatten nur in 31% der Sequenzen ein Glykosylierungssignal an der Position g15, während bei V3-Loop-Sequenzen mit niedriger Nettoladung (+1 bis +3) das N-Glykan in 99% der Sequenzen vorhanden war. Neben der Datenbankanalyse, die auch von Dong *et al.* bestätigt wird [Dong et al., 2005], unterstützen auch die in dieser Arbeit vorgestellten Daten über die -g15 CCR5-tropen HIV-Subtyp-A und Subtyp-C-Varianten die Hypothese, dass das N-Glykan g15 die CCR5-Korezeptornutzung unterstützt. Der Verlust des N-Glykans g15 führte bei den NL-V3-A Viren zu einer verminderten Synzytienbildung und zu einer verlangsamten Replikation. Zudem zeigten die -g15 Varianten von NL-V3-A, NL-A_{R5} (Daten nicht gezeigt) und NL-C (Daten nicht gezeigt) eine stark erhöhte Sensitivität gegenüber der Neutralisation mit dem CCR5-Antagonisten MIP-1 β . Dies lässt auf eine stark verminderte Affinität zu CCR5 schließen und steht im Einklang mit den Beobachtungen von Malenbaum et al. [Malenbaum *et al.*, 2001]. Die CCR5-tropen -g15 Glykosylierungsvarianten wurden besser durch sCD4 und IgG1b12 (Antikörper der die CD4bs bindet) neutralisiert. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Verringerung der Infektiosität bei R5-tropen -g15-Varianten. Die MIP-1 β -Experimente zeigen, dass g15 erst nach der Bindung an CD4 für den Viruseintritt von Bedeutung ist.

3.1.5 Das N-Glykan g15 moduliert die Neutralisationssensitivität der CCR5-tropen Glykosylierungsvarianten

Aus den Daten der Literatur für den HIV-Subtyp-B ist bekannt, dass R5-trope -g15 Varianten eine höhere Sensitivität gegenüber einigen monoklonalen neutralisierenden Antikörpern und HIV-positivem Serum aufweisen [Polzer *et al.*, 2002; Pollakis *et al.*, 2001; McCaffrey *et al.*, 2004; Malenbaum *et al.*, 2001, Nabatov *et al.*, 2004]. Nabatov und Mitarbeiter behaupten zudem, dass CCR5-Viren mit einer hohen V3-Loop-Nettoladung sensitiver gegenüber Antikörper sind als CCR5-Viren mit einer niedrigen V3-Loop-Nettoladung [Nabatov *et al.*, 2004].

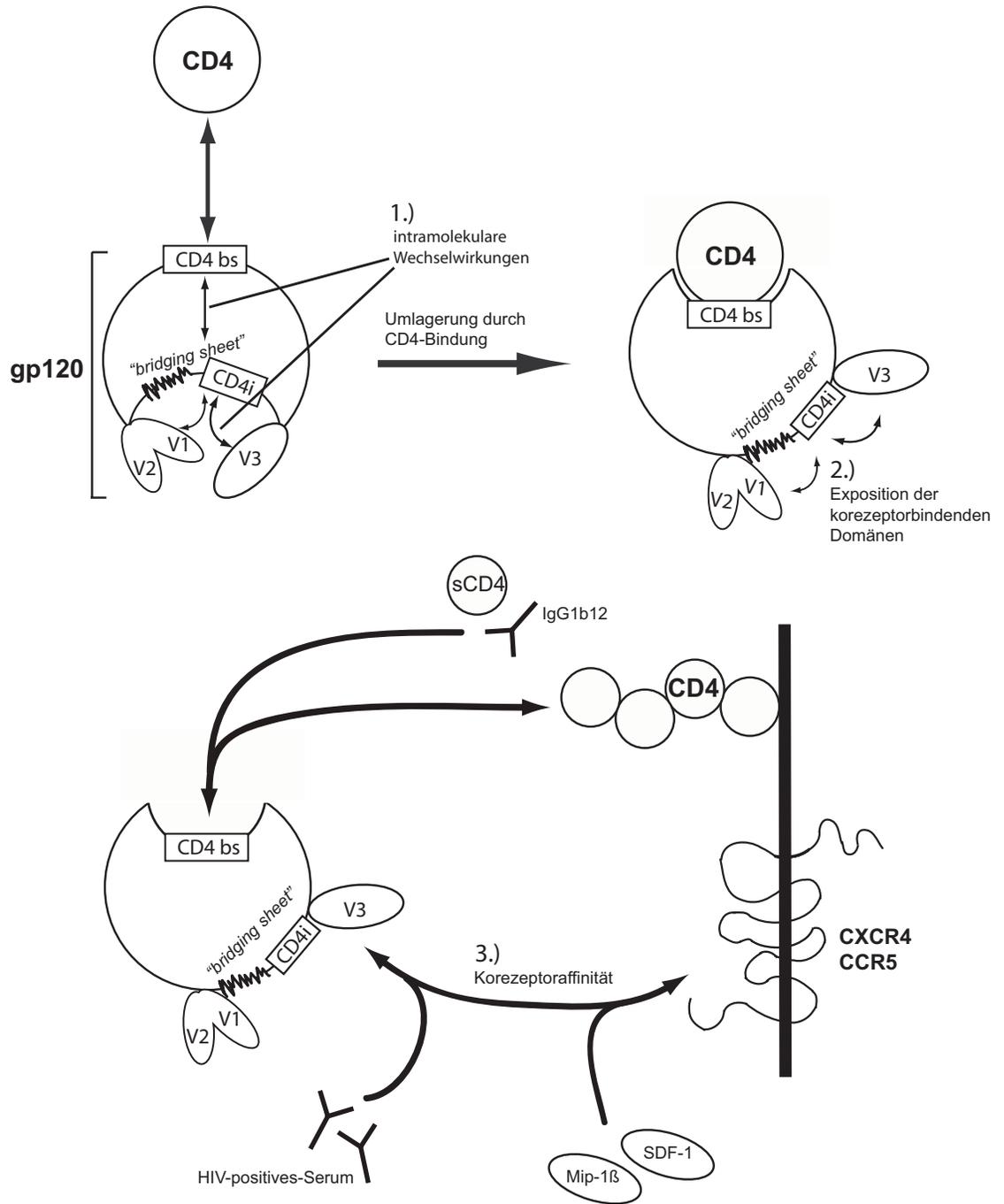
Das Problem an der Interpretation von Neutralisationsexperimenten ist die komplexe Interaktion des Virus mit der Wirtszelle (Modell 2). Ein Virus kann aus einer Reihe von Gründen besser neutralisiert werden als ein anderes und die Interpretation der Daten kann oft nicht auf einen bestimmten Faktor zurückgeführt werden. Einerseits wird ein Virus besser neutralisiert, wenn dessen neutralisationssensitiven Epitope exponiert und so leicht zugänglich für Antikörper sind. Andererseits spielt auch die Infektiosität eine Rolle bei der Neutralisation: Ein Virus z.B. mit einer niedrigen Korezeptoraffinität wird besser neutralisiert, da die Interaktion mit dem Korezeptor langsamer verläuft und dadurch die neutralisationssensitiven Epitope länger den Antikörpern ausgesetzt sind. Die Korezeptoraffinität wird wiederum von vielen Faktoren beeinflusst: (i) der V3-Loop-Nettoladung (Modell 1), (ii) der Aminosäuresequenz der korezeptorbindenden Domänen und (iii) den intramolekularen Wechselwirkungen zwischen dem V3-Loop und dem “*bridging sheet*” (Modell 2). Die intramolekularen Wechselwirkungen haben wiederum Auswirkungen auf die Konformationsänderung, die durch die CD4-Bindung induziert wird. Damit entsteht ein Geflecht von Wechselwirkungen im Virus-Zell-Biosystemen (siehe Modell 2):

- 1.) Die Umlagerung des gp120 durch CD4-Bindung
- 2.) Die Exposition der korezeptorbindenden Domänen
- 3.) Die eigentliche Korezeptoraffinität

In dieser Arbeit wurde die erhöhte Neutralisationssensitivität von CCR5-tropen -g15 Varianten, der HIV-Subtypen A und C, gegenüber HIV-positivem-Serum im Unterschied zu den +g15 Varianten gezeigt. Wahrscheinlich tragen sowohl die geringe Korezeptoraffinität der -g15 Varianten (1.3.4), als auch die Exposition von neutralisationssensitiven Epitopen zu der erhöhten Neutralisationssensitivität bei. Wenn das Glykan g15 tatsächlich positive Ladungen im V3-Loop maskiert, dann wird die Behauptung von Nabatov *et al.*, dass bei HIV-Subtyp-B eine hohe V3-Loop Nettoladung mit einer erhöhten Neutralisationssensitivität einhergeht, auch für HIV-A und -C bestätigt. Diese erhöhte Neutralisationssensitivität wäre dann auf eine verminderte Korezeptoraffinität zurückzuführen.

Von den getesteten monoklonalen Antikörpern war nur der IgG1b12-Antikörper in der Lage, die -g15 Varianten besser zu neutralisieren als die +g15 Varianten. Falls die erhöhte Neutralisationssensitivität von den -g15 Varianten nur auf einen Unterschied in der Korezeptoraffinität zurückzuführen wäre, müssten alle Antikörper diese Varianten besser neutralisieren, was nicht der Fall war. Außerdem verhindert die Bindung des IgG1b12-Antikörper die Bindung von CD4 an gp120 und blockiert einen Schritt, der noch vor der Korezeptorbindung stattfindet. Es ist also wahrscheinlich, dass die CD4bs-Domäne, welche von dem IgG1b12-Antikörper erkannt wird, durch den Verlust des N-Glykans g15 exponiert wird. Dies würde bedeuten, dass der V3-Loop eine konformationelle Änderung in den neutralisationssensitiven Domänen induzieren kann, auch wenn er sich nicht in räumlicher Nähe zu diesen Domänen befindet.

Modell 2: Virus-Zell-Interaktion



Modell 2

Das Modell beschreibt die Virus-Zell-Interaktionen. Durch die CD4-Bindung kommt es zu einer Umlagerung des gp120, dadurch kommt es zu der Exposition der korezeptorbindenden Domänen. Die Umlagerung wird von intramolekularen Wechselwirkungen beeinflusst.

3.2 Die Bedeutung des N-Glykans g15 für CXCR4-trope HIV-Subtyp-A-Viren

Im folgenden wird nur die Bedeutung des g15 N-Glykans diskutiert, da alle anderen Glykosylierungsvarianten keine signifikanten Unterschiede in der Infektiosität oder der Neutralisation zeigten.

3.2.1 Das N-Glykan g15 vermindert die Infektiosität der CXCR4-tropen HIV-Subtyp-A-Viren

Im Gegensatz zu den CCR5-tropen Viren wurde für CXCR4-trope HIV-Subtyp-B Viren gezeigt, dass der Verlust des N-Glykans g15 mit einer infektionssteigernden Wirkung assoziiert ist [Polzer *et al.*, 2001; Pollakis *et al.*, 2001]. Durch die Deletion des N-Glykans g15, konnte die Infektion des Laborstammes NL4-3 soweit gesteigert werden, dass dieser sogar parentale Ghost-CD4-Reporterzellen infizierte, welche einen geringen CXCR4-Hintergrund exprimieren [Polzer *et al.*, 2001]. Dieser CXCR4-„Hintergrund“ (ca. 5-10% des Ghost-CXCR4 Expressionsniveaus) reicht normalerweise nicht für eine Infektion des +g15 NL4-3 Virus aus. Daraus kann man schlussfolgern, dass das g15 die Interaktion zu CXCR4 behindert. Tatsächlich ist für die NL-930 Variante gezeigt worden, dass +g15 NL-930 nicht mehr infektiös ist, aber die -g15 NL-930 Variante gut auf Ghost-CXCR4 wächst (Doktorarbeit Polzer, 2002].

Die Interaktion von gp120 mit CXCR4 unterscheidet sich wahrscheinlich stark von der Interaktion des gp120 mit CCR5. Die Abschirmung von positiven Ladungen im V3-Loop scheint sich negativ auf die Interaktion mit CXCR4 auszuwirken, während eine Exposition der positiven Ladungen zu einer gesteigerten Infektiosität führt. Legt man die Hypothese zugrunde, dass die Interaktion von gp120 mit CXCR4 hauptsächlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht, kann man den Unterschied erklären. Die extrazellulären Domänen des CXCR4-Korezeptors weisen insgesamt eine Nettoladung von -11 auf, während die extrazellulären Domänen des CCR5-Korezeptors eine Nettoladung von +1 aufweisen. Bindet nun der positive V3-Loop an den negativen CXCR4-Korezeptor über elektrostatische Wechselwirkungen, so erhöht sich die Wechselwirkung aufgrund der höheren V3-Loop-Nettoladung.

Auch in dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass das +g15 X4-trope HIV-Subtyp-A-Virus eine deutlich verringerte Fähigkeit hatte, Synzytien zu induzieren. Zudem war es, im Gegensatz zu den -g15 Varianten, nicht in der Lage, parentale Ghost-CD4-Zellen über deren CXCR4-Hintergrund-Expression zu infizieren. Wie für die NL4-3 -g15 Varianten gezeigt, konnten die -g15 Subtyp-A-Varianten Ghost-CD4-Zellen infizieren, während das +g15 Virus nur Ghost-CD4/CXCR4-Zellen infizieren konnte. Im Unterschied zu -g15 NL4-3 wurde bei den -g15 Subtyp-A Viren sogar die Infektion von Ghost-CD4/CCR5 Zellen beobachtet. Da nicht davon auszugehen ist, dass die -g15 Mutation einen Korezeptorwechsel verursacht hat, scheint die sehr geringe CXCR4-Menge der Ghost-CD4/CCR5 Zellen für die Infektion ausreichend zu sein. Dies zeigt ebenfalls die gesteigerte Infektiosität von -g15 X4-tropen Viren im Unterschied zu den +g15 Varianten. Dies lässt auf eine erhöhte Affinität zu CXCR4 schließen, da für die Infektion mit den -g15 Glykosylierungsvarianten anscheinend eine geringere Korezeptordichte auf den Zielzellen ausreicht. Dass der Verlust des N-Glykans g15 mit der CXCR4-Korezeptornutzung assoziiert ist, hat auch die Datenbankanalyse bestätigt. Da die Datenbank auf Sequenzen von Patientenisolaten beruht, zeigt dies, dass die Ergebnisse (-g15 unterstützt die CXCR4-Korezeptornutzung) mit der "in vivo"-Situation übereinstimmen (2.1.2; 2.1.3).

Bei CXCR4-tropen Viren spielt noch ein weiterer Faktor für die Infektiosität eine Rolle:

Die Interaktion mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG). Viren mit einer hohen V3-Loop-Nettoladung, typisch für X4-trope Viren, binden besser an zelluläres HSPG (1.4.1). Dadurch erhöht sich die Menge der adsorbierten Viren und deren Infektiosität wird gesteigert. Falls das N-Glykan g15 positive Ladungen im V3-Loop maskiert, hätte die +g15 Glykosylierungsvariante wahrscheinlich eine geringere Affinität zu HSPG und würde deshalb schlechter an Zellen binden. Um die HSPG-Effekte von den CXCR4-Korezeptoreffekten zu trennen, müsste man die Infektion auf Zellen durchführen, die kein HSPG exprimieren. Die zur Verfügung stehenden HIV-Reporterzellen exprimieren jedoch alle HSPG. Es war deshalb nicht möglich, die Versuche auf CD4/Korezeptor-Zelllinien durchzuführen, die kein HSPG exprimieren.

3.2.2 Die Bedeutung des N-Glykans g15 bei der Neutralisation von CXCR4-tropen HIV-Subtyp-A Viren

Für CXCR4-trope HIV-Subtyp-B-Viren wurde gezeigt, dass das N-Glykan g15 neutralisationsensitive Epitope maskiert, Antikörper blockiert und daher mit einem neutralisationsresistenten Phänotyp assoziiert ist [Polzer *et al.*, 2002, Schonning *et al.*, 1996; Back *et al.*, 1994].

In dieser Arbeit wurde ebenfalls untersucht ob, sich X4-trope Viren durch das g15 N-Glykan gegen Antikörper schützen. Dazu wurde die Infektiosität und Neutralisation von +g15 und -g15 Subtyp-A-Varianten getestet. Die Untersuchungen zur Infektiosität zeigten für das +g15 Virus eine stark verringerte Infektiosität. Bei den Neutralisationsexperimenten wurden die entsprechenden +g15 Viren besser als die -g15 Viren neutralisiert. Das g15 N-Glykan vermittelt in diesen Untersuchungen also keinen Schutz vor neutralisierenden Antikörpern, wie z.B. im Falle des +g15 NL4-3 Virus. Eine Erklärung für diese Ergebnisse könnte die sehr geringe Infektiosität des +g15 Subtyp-A Virus sein. Das N-Glykan g15 kann die Infektiosität eines X4-tropen Virus soweit erniedrigen, so dass es keine Replikation auf Ghost/CXCR4 Zellen mehr zeigt, wie im Falle des +g15 NL-930 gezeigt (Polzer, Doktorarbeit). Auch die Infektiosität der in dieser Arbeit untersuchten Subtyp A +g15 Variante ist sehr niedrig. Vermutlich ist das Virus deshalb sensitiver gegen neutralisierende Antikörper. Dieses Experiment zeigt gleichzeitig eine der Schwierigkeiten bei der Bestimmung, welche Rolle das V3-Loop N-Glykan für die Infektion hat. Wenn sich Viren sehr stark in der Infektiosität unterscheiden, dann ist es schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, jegliche Art von Neutralisationsexperimenten in Bezug auf die g15-Mutation auszuwerten.

3.2.3 Die Aminosäuresequenz an der Position g15 moduliert die Affinität zu CXCR4 und die Neutralisation X4-troper HIV-Subtyp-A Viren

CXCR4-trope HIV-Subtyp-B Primärisolate haben im Bereich der g15 Glykosylierungsstelle oft eine Aminosäuresequenz, welche sich stark von der konservierten Aminosäuresequenz NNNT unterscheidet [Polzer, Doktorarbeit, 2002; Nakayama *et al.*, 1998]. Wahrscheinlich versucht das X4-trope Virus den “Spagat” zwischen optimaler Anpassung an CXCR4 durch die -g15 Mutation und gleichzeitig den “*Immune escape*” durch eine starke Variation des g15-Sequenzbereiches.

Um den Einfluss der Aminosäuresequenz an Position g15 näher zu untersuchen, wurde die GNPI Sequenz des CXCR4-tropen -g15 HIV-Subtyp-A Primärisolate zu den Sequenzen GNPT und GNNI mutiert. Die Viren mit der GNPT- und GNNI-Sequenz zeigten eine höhere Sensitivität gegenüber HIV-positivem Serum als die ursprüngliche Sequenzvariante GNPI. Die Aminosäuresequenz an dieser Position beeinflusst also auch bei den CXCR4-tropen -g15 HIV-Subtyp-A-Viren die Neutralisationseigenschaften des Virus. Vorstellbar wäre, dass durch die Mutation des GNPI-Motifs zu GNNI oder GNPT die Konformation des gp120 offener, und damit für neutralisierende Antikörper leichter zugänglich wird.

Die durch Antikörper gut neutralisierbaren -g15 Sequenzvarianten, GNNI und GNPT, induzierten mehr Synzytien als das -g15 Wildtyp Virus (GNPI). Sie haben also eine höhere Infektiosität. Daher ist die bessere Bindung neutralisierender Antikörper und die erhöhte Synzytien-Bildung auf eine bessere Exposition der CXCR4-bindenden Domäne, dem V3-Loop zurückzuführen. In der Weise, wie sich der V3-Loop für den CXCR4-Korezeptor “öffnet”, so wird er auch für Antikörper besser erreichbar. Hier zeigt sich wieder, dass der “offene” -g15 V3-Loop für CXCR4 von Vorteil ist. Im Umkehrschluss lässt sich sagen, dass sich ein X4-tropes Virus vor Antikörpern schützt, dabei aber an Infektiosität verliert. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu R5-tropen Viren. Bei R5-tropen Viren konnte gezeigt werden, dass das N-Glykan g15 die Infektiosität der Viren steigert und gleichzeitig vor neutralisierenden Antikörpern schützt. Ein R5-tropes Virus kann sich also mit dem g15-Glykan vor Antikörpern schützen und erhöht gleichzeitig seine Infektiosität.

3.3 Auswirkung des freien gp120 auf die Virusinfektion

In den vorherigen Kapitel wurde diskutiert, warum das N-Glykan g15 bei CCR5-tropen Viren die Infektiosität der Viren beeinflusst. Man kam zu dem Schluss, dass die Korezeptoraffinität R5-troper -g15 Varianten vermindert sein muss. Die Experimente dazu wurden alle in einem Virus-Zell-Biosystem durchgeführt, jedoch ist die “*in vivo*”-Situation wesentlich komplexer. Im Patienten repliziert nicht ein Virus in einem Zelltyp, sondern eine Vielzahl an Viren vermehrt sich in den verschiedensten Zelltypen. Hinzu kommt, dass im Blut von AIDS-Patienten freies gp120 gefunden wird. Die dort nachgewiesenen Konzentrationen liegen je nach Studie zwischen 0,24-2,4 ng/ml [Gilbert *et al.*, 2003] und 12-96 ng/ml [Oh *et al.*, 1992]. Es wird spekuliert, dass die Konzentration des freien gp120 in Geweben, wie den Lymphknoten, diese Konzentrationen noch übersteigt, da es dort zu einer massiven HIV-Vermehrung kommt [Pantaleo *et al.*, 1993]. Da gp120 nichtkovalent mit gp41 assoziiert ist, kann es leicht vom Viruspartikel abdissoziieren (“*shedding*”). Auch im Zellkulturüberstand von HIV-infizierten Zellen wurde freies gp120 in einer “*in vivo*”-relevanten Konzentration von 7-28 ng/ml nachgewiesen [Pyle *et al.*, 1987]. Freies gp120 wird aber nicht nur vom Virus in das Medium abgegeben [Hart *et al.*, 1993], sondern auch von gp160-transfizierten Zellen [Pyle *et al.*, 1987; Schneider *et al.*, 1986]. Um der “*in vivo*”-Situation näher zu kommen, wurde erstmals das Biosystem um den Faktor des freien gp120 erweitert. Die Infektion wurde somit in einem Virus-gp120-Zell-System durchgeführt. Für die Experimente wurde nicht “artifizielles” gp120 aus E-coli oder aus dem Baculovirussystem verwendet, sondern gp120 aus gp160-transfizierten Zellkulturüberständen. Damit wurde sichergestellt, dass das gp120 seine funktionelle Konformation besitzt und die richtige Glykosylierung erhält. Es wurde eine gp120-Konzentration von 7,5 ng/ml eingesetzt. Diese Konzentration entspricht in etwa der von Gilbert und Oh *et al.* gefundenen gp120-Konzentrationen im Blut HIV-infizierter Patienten.

3.3.1 Neutralisation CCR5-troper Glykovarianten mit gp120 Zellkulturüberständen

Bisher sind zu diesem Thema keine Studien in der aktuellen Literatur vorhanden, jedoch ist bekannt, dass freies gp120 in der Lage ist, sowohl CD4 als auch CCR5 zu binden [Cicala *et al.*, 2002; Misse *et al.*, 1999; Schols *et al.*, 1996]. In dem Virus-gp120-Zell-Biosystem sollte freies gp120 eingesetzt werden, um in Konkurrenz mit dem Virus zu treten. In diesem Biosystem spielt das Verhältnis der Infektiosität des Virus ($I_{V_{gp120}}$) zu der Infektiosität des freien gp120 ($I_{F_{gp120}}$), eine entscheidende Rolle (siehe Modell 3). Die Infektiosität der Viren wurde in vorherigen Infektionsstudien (3.1.4) bestimmt. Mit CCR5-tropen HIV-Subtyp-A und -B +/-g15 Glykosylierungsvarianten und des freien gp120 wurden drei Szenarien getestet:

1. $I_{V_{gp120}} = I_{F_{gp120}}$ z.B.: Ein +g15-Virus wird in Konkurrenz mit einem +g15 gp120 getestet, oder ein -g15 Virus wird in Konkurrenz mit einem -g15 gp120 getestet
2. $I_{V_{gp120}} > I_{F_{gp120}}$ z.B.: Ein +g15-Virus wird in Konkurrenz mit einem -g15 gp120 getestet
3. $I_{V_{gp120}} < I_{F_{gp120}}$ z.B.: Ein -g15-Virus wird in Konkurrenz mit einem +g15 gp120 getestet

Es zeigte sich, dass man nur eine Virusneutralisation beobachten konnte, wenn $I_{V_{gp120}}$ kleiner als $I_{F_{gp120}}$ war (Modell 3). Für die CCR5-tropen HIV-Subtyp-A-Glykosylierungsvarianten bedeutet dies konkret, dass die -g15-Glykosylierungsvarianten durch freies gp120, welches von +g15-Glykosylierungsvarianten abstammt, neutralisiert werden. Wahrscheinlich lagert sich das freie +g15 gp120 an den Korezeptor an und das -g15-Virus ist nicht in der Lage dieses zu verdrängen. Zusammen mit den Infektionsstudien deutet dies auf eine erhöhte Korezeptoraffinität des +g15 gp120 bzw. der +g15-Viren gegenüber den -g15-Virusvarianten hin. Das Glykan g15 scheint also auch hier die CCR5-Korezeptorinteraktion zu unterstützen.

Kontrollexperimente, in denen das freie gp120 von HIV-positiven-Serum abgefangen wurde, und adsorptionsunabhängige Infektionsstudien zeigten, dass das freie gp120 die Neutralisation, unabhängig von Adsorptionseffekten zu anderen Strukturen auf den Zelloberflächen, vermittelt.

Modell 3: R5 - spezifische Infektion

gp120
vermittelt für das Virus:

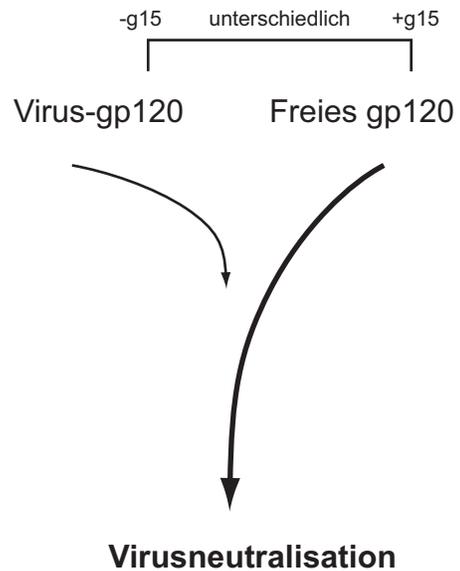
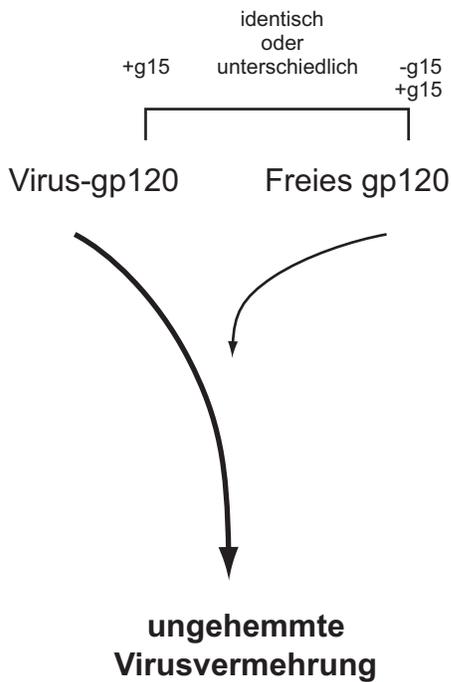
gleiche oder stärkere
Infektiosität

geringere
Infektiosität

$$I_{Vgp120} = I_{Fgp120}$$

$$I_{Vgp120} < I_{Fgp120}$$

$$I_{Vgp120} > I_{Fgp120}$$



Modell 3

Das Modell zeigt die Bedeutung des freien gp120 für die R5-spezifische Interaktion. Freies gp120 von Viren mit einer hohen Infektiosität ist in der Lage, Viren mit einer niedrigeren Infektiosität zu neutralisieren.

3.3.2 Aktivierung CXCR4-troper Viren durch X4-tropes gp120

Für die CXCR4-tropen Viren wurde in den vorhergehenden Infektionsstudien beobachtet, dass +g15-Viren eine niedrigere Infektiosität aufweisen als -g15-Viren. Vermutlich ist die verringerte Infektiosität der +g15-Viren auf eine niedrigere Korezeptoraffinität zurückzuführen (3.2.2). Zudem moduliert die Sequenz an der Position g15, unabhängig von der Anwesenheit des Glykans, die Infektion (3.2.3). Daher stellte sich die Frage, wie X4-tropes gp120 die CXCR4-spezifische Infektion beeinflusst.

In dem Virus-gp120-Zell-Biosystem sollte, wie für die CCR5-Infektion, freies gp120 zugesetzt werden, um in Konkurrenz mit dem Virus zu treten. Die in 3.3.1 beschriebenen Infektiositäten, $I_{V_{gp120}}$ und $I_{F_{gp120}}$, basierten auf den Ergebnissen der CXCR4-Infektionsstudien (3.2.2; 3.2.3). Die drei in 3.3.1 beschriebenen Szenarien wurden um eine Variable (+/- Polybrene) erweitert. Da einige X4-trope Virusisolate in der Lage sind, Heparansulfat-Proteoglykane auf Zellen zu binden und dadurch ihre Infektion steigern, wurden die Infektionsstudien sowohl HSPG-abhängig (- Polybrene) als auch unabhängig (+ Polybrene) durchgeführt. Es wurden also folgenden Szenarien untersucht (Modell 4):

1. $I_{V_{gp120}} = I_{F_{gp120}}$ abhängig und unabhängig von HSPG
2. $I_{V_{gp120}} > I_{F_{gp120}}$ abhängig und unabhängig von HSPG
3. $I_{V_{gp120}} < I_{F_{gp120}}$ abhängig und unabhängig von HSPG

Wurde die Infektion unabhängig von HSPG durchgeführt, wurde eine Virusneutralisation beobachten, wenn $I_{V_{gp120}}$ kleiner als $I_{F_{gp120}}$ war. Für die X4-tropen Glykosylierungsvarianten bedeutet dies, dass das +g15-Virus vom freien -g15 gp120 neutralisiert wurde. Es zeigen sich also diesselben Effekte wie bei der Neutralisation der CCR5-tropen Glykosylierungsvarianten mit gp120. Wahrscheinlich lagert sich das freie -g15 gp120 an den X4-Korezeptor an und das +g15-Virus ist nicht in der Lage, dieses zu verdrängen. Zusammen mit den Ergebnissen der Infektionsstudien über die CXCR4-tropen HIV-Subtyp-A Viren, lässt dies auf eine verringerte Korezeptoraffinität des X4-tropen +g15-Virus gegenüber den -g15-Viren schließen.

Wurde die Infektion abhängig von HSPG auf den Zielzellen des Virus durchgeführt, konnte keine Neutralisation beobachtet werden. Es wurde im Gegenteil eine Infektionsverstärkung beobachtet. Die Eigenschaft des freien gp120, die Infektion zu steigern, hing anscheinend mit dessen Fähigkeit zusammen, HSPG zu binden, unabhängig von der gp120 vermittelten Infektiosität.

Warum es zu dieser Infektionssteigerung kommt ist unklar. Zwei Hypothesen bieten sich an:

1. Vielleicht bindet freies gp120 an HSPG und schirmt dadurch dessen negative Ladungen ab. Dadurch könnte die elektrostatische Virusmembran-Zellmembran-Abstoßung verringert werden, was die erhöhte Infektiositätsrate erklären würde.

Da die Infektion von verschiedenen Viren unterschiedlich stark gesteigert wurde, spricht dies aber eher gegen eine unspezifische Abschirmung von negativen Ladungen auf der Zielzelle.

2. Denkbar wäre auch eine Interaktion des freien gp120 mit HSPG auf den Zielzellen und HSPG oder einem anderen Interaktionspartner auf dem Virus. Dadurch könnte es zu einer gesteigerten Virusadsorption kommen und damit auch zu einer gesteigerten Infektion, da die Virusadsorption ein wichtiger Schritt bei der CXCR4-spezifischen-Infektion ist [O'Doherty *et al.*, 2000].

Kontrollexperimente, in denen freies gp120 von HIV-positiven-Serum abgefangen wurde, zeigten, dass das freie gp120 die Infektionssteigerung vermittelt.

Modell 4: X4 - spezifische Infektion

gp120 vermittelt für das Virus:

gleiche, stärkere oder geringere
Infektiosität

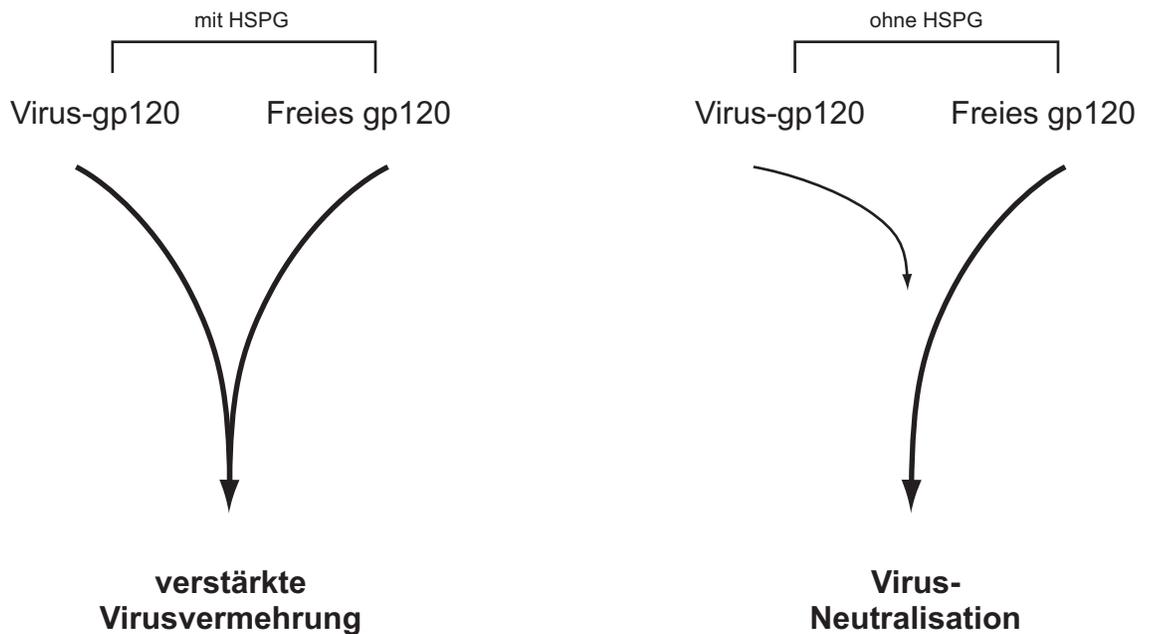
geringere
Infektiosität

$$I_{Vgp120} = I_{Fgp120}$$

$$I_{Vgp120} < I_{Fgp120}$$

$$I_{Vgp120} > I_{Fgp120}$$

$$I_{Vgp120} < I_{Fgp120}$$



Modell 4

Das Modell zeigt die Bedeutung des freien X4-tropen gp120 für die X4-spezifische-Infektion. In Anwesenheit von HSPG wirkt das freie gp120 infektionsverstärkend. Wird die Infektion unabhängig von HSPG durchgeführt, kann freies gp120 von X4-tropen Viren mit hoher Infektiosität die X4-tropen Viren mit niedrigerer Infektiosität neutralisieren.

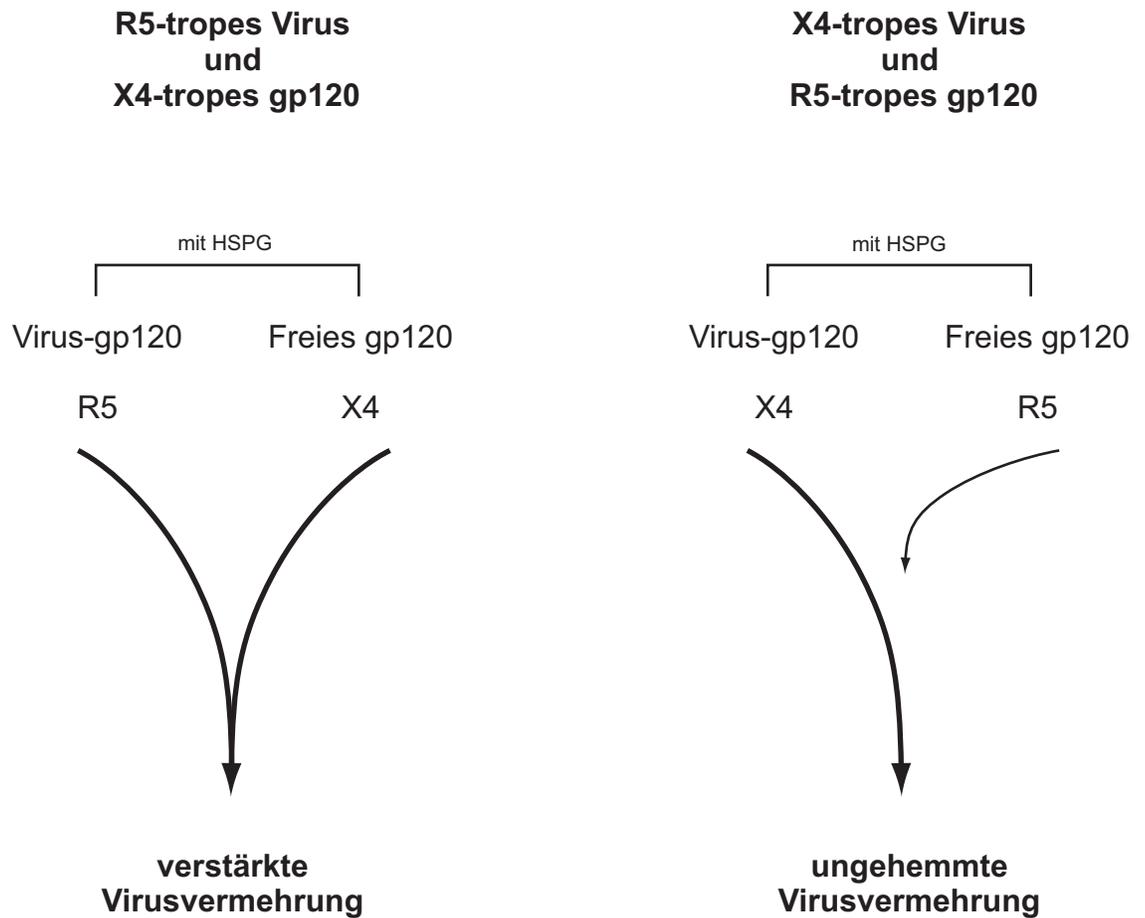
3.3.3 Aktivierung CCR5-troper Viren durch X4-tropes gp120

Da gp120 von CXCR4-tropen, HSPG bindenden Viren in der Lage war, die Infektion von CXCR4-tropen Viren zu steigern, sollte die Auswirkung des freien X4-tropen gp120 auf R5-trope Viren getestet werden. Umgekehrt sollte auch der Einfluss von R5-tropen gp120 auf X4-trope Viren getestet werden (Modell 5).

Freies R5-tropes gp120 hatte keine Auswirkung auf die Infektionsrate X4-troper Viren. Dies entspricht auch den Erwartungen, denn R5-tropes gp120 sollte nicht mit dem CXCR4-Korezeptor interagieren. Zudem zeigt dies, dass das R5-trope gp120 nicht mit dem X4-Virus um CD4 konkurriert oder an HSPG bindet. Der Einfluss des freien R5-tropen gp120 beschränkt sich also auf die Interaktion mit dem CCR5-Korezeptor.

Überraschenderweise steigert freies X4-tropes gp120 die Infektion R5-troper Viren. Theoretisch ist es vorstellbar, dass X4-tropes gp120 erst mit CXCR4 interagiert und danach mit gp41 auf dem R5-tropen Virus. Würde sich dadurch ein fusionsaktives Protein bilden, könnte das R5-trope Virus auch über CXCR4 infizieren. Diese Theorie konnte aber widerlegt werden, denn in Anwesenheit von freiem X4-tropen gp120 konnten R5-trope Viren nur Zellen infizieren, die CCR5-exprimieren, CXCR4-exprimierende Zellen wurden dagegen nicht infiziert. Daher ist die Infektionssteigerung der R5-tropen Viren durch Erweiterung der Korezeptornutzung von rein R5-trop auf R5/X4-trop ausgeschlossen. Die von freiem X4-tropen gp120 vermittelte gesteigerte Infektion der R5-tropen Viren beruht wahrscheinlich auf einer der in 3.3.2 diskutierten Hypothesen, z.B. der Bindung an HSPG.

Modell 5: R5X4 - spezifische Infektion



Modell 5

Das Modell beschreibt die Bedeutung des R5-tropen gp120 für die X4-trope Infektion und die Bedeutung des X4-tropen gp120 für die R5-trope Infektion. Das R5-trope gp120 hat keinen Einfluss auf die X4-spezifische Infektion. Das X4-trope gp120 kann die Infektion des R5-tropen Virus verstärken.

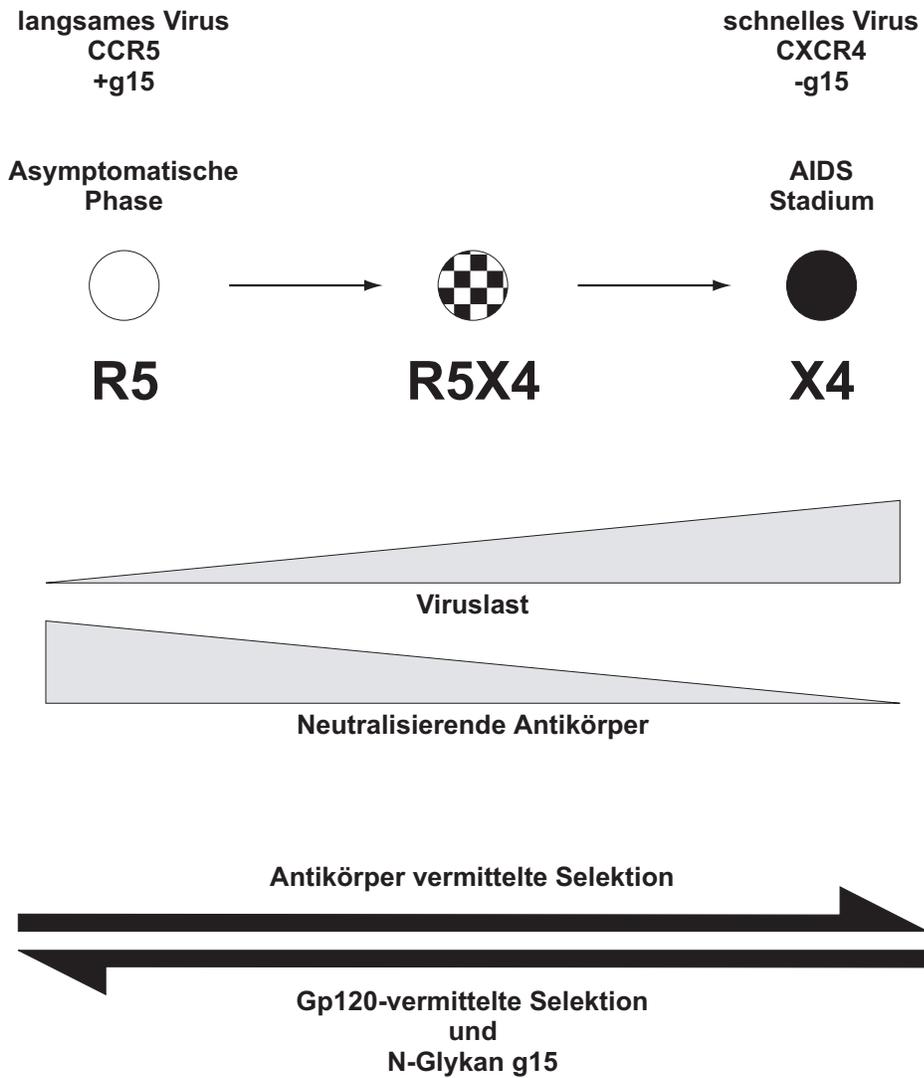
3.3.4 Die Bedeutung des N-Glykans g15 für den Verlauf der HIV-1-Pathogenese

Aus den bisherigen Daten zur Infektiosität des HIV-1 wird klar, dass die schnellsten Viren X4-trope Viren ohne das N-Glykan g15 sind (Polzer *et al.*, 2001; Pollakis *et al.*, 2001; Nabatov *et al.*, 2004). Die X4-tropen Viren wachsen in Zellkultur schneller als +g15 R5-trope Viren und erreichen höhere Virustiter. Bei einfacher Betrachtungsweise sind die -g15 X4-tropen Viren der biologische "*in vitro best fit*" des HIV-1. Diese, im Zellkultursystem gemachte Beobachtung gilt für alle drei getesteten Subtypen A, B und C und ist daher für die "*in vitro*"-Situation allgemeingültig.

Betrachtet man allerdings den "*in vivo*"-Verlauf der Erkrankung, so treten bei Patienten im frühen Stadium bevorzugt die +g15 R5-tropen Viren auf. Erst im späteren Krankheitsverlauf entwickelt sich in den Patienten die R5/X4-dualtrope oder X4-monotrope Form des Virus. Dieser Verlauf, der "*shift*" der Viruspopulation von R5-tropen zu R5X4- und X4-tropen Viren, ist unabhängig von der Art der Virusübertragung (Modell 6).

Auch nach intensiver Forschung auf diesem Gebiet ist bis heute nicht genau geklärt, warum in der frühen Phase der HIV-Infektion die langsamen, R5-tropen Viren dominieren und warum sich erst später die schnellen, X4-tropen Viren durchsetzen. Eine Theorie geht davon aus, dass es bei der Übertragung des Virus zu einer Selektion R5-troper Viren kommt. Eine Selektion auf der Ebene des Infizierten ist unwahrscheinlich, da keine Dominanz und damit eine bessere Übertragbarkeit von R5-tropen Viren im Samen festgestellt werden konnte [Delwart *et al.*, 1998]. Daher wird vermutet, dass eine Selektion auf der Ebene des Empfängers stattfinden könnte. Ein Hinweis wäre, dass vaginale Schleimhautzellen und Darm-Epithelzellen nur den HIV-Korezeptor CCR5 exprimieren [Meng *et al.*, 2002]. Auch die dendritischen Zellen, die das Virus in den Lymphknoten transportieren, sind Träger des CCR5-Korezeptors und würden deshalb eine Entwicklung der R5-tropen Viren begünstigen [Granelli-Piperno *et al.*, 1998, Reece *et al.*, 1998]. Mit diesen Tatsachen lässt sich eine Dominanz R5-troper Viren bei der natürlichen Übertragung erklären, aber auch bei Nadelstichverletzungen und anderen Arten der Blutübertragung findet sich bei den Neu-Infizierten am Anfang der R5-trope Virustyp.

Modell 6: R5-nach-X4 "shift"



Modell 6

Das Modell zeigt die Zusammenhänge zwischen dem Korezeptor-“Shift” der HIV-Viren, dem Auftreten neutralisierender Antikörper, der Rolle des N-Glykans g15 und der gp120-vermittelten-Selektion. Im Verlauf der HIV-Erkrankung steigt die Viruslast und neutralisierende Antikörper nehmen ab. Freies R5-tropes gp120 selektioniert R5-trope Viren. Durch neutralisierende Antikörper wird dieser Selektionsdruck beseitigt. R5/X4-trope und X4-trope Viren können sich bilden. Deren gp120 steigert HSPG-abhängig sowohl die Infektiosität der R5-tropen als auch die der X4-tropen Viren.

Die Dominanz der R5-Viren ist also von der Art der Übertragung unabhängig [van't Wout *et al.*, 1994]. So wurde z.B. bei Laborarbeitern, welche sich durch eine Stichverletzung mit einem X4-tropen Laborvirusstamm infiziert hatten, ein Wechsel der Viruspopulation hin zum CCR5-tropen Phänotyp beobachtet [Cornelissen *et al.*, 1995, Pratt *et al.*, 1995]. Gleichzeitig mit dem Wechsel der Viruspopulation zum R5-tropen Virus wurde bei den Laborarbeitern die Serokonversion beobachtet. Dies zeigt, dass mit der Entwicklung neutralisierender Antikörper die X4-tropen Viren unterdrückt werden, während sich die R5-tropen Viren behaupten können.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, spielt dabei das N-Glykan g15 eine wichtige Rolle. Zum einen unterstützt g15 die Interaktion mit CCR5 und zum anderen zeigen +g15 R5-trope Viren eine höhere Infektiosität als die -g15 Mutanten. Diese beiden Effekte des g15 N-Glykans geben den R5-tropen Viren einen Vorteil gegenüber den X4-tropen Viren. Die X4-tropen Viren werden durch g15 bei der Infektion gehindert und haben trotz der Anwesenheit des g15 N-Glykans eine erhöhte Neutralisationssensitivität gegenüber den R5-tropen Viren [Tersmetti *et al.*, 1990; Bou-Habib *et al.*, 1994].

Aus den oben geschilderten zwei Gründen: (i) Schutz vor Antikörpern und (ii) der Unterstützung der CCR5-Bindung durch das N-Glykan g15, scheinen die +g15 R5-tropen Viren der *“in vivo best fit“* zum Beginn der Erkrankung zu sein.

In diesen Arbeiten wurde das normale Zellkultursystem, bestehend aus Virus und Zelle, um den Faktor des freien gp120 erweitert. Damit konnte untersucht werden, wie sich das Hüllprotein eines gleichen oder eines anderen Virus auf die Infektiosität einer bestimmten HIV-1-Variante auswirkt. Diese Arbeiten haben interessante neue Hinweise gegeben, warum R5-trope Viren am Anfang der Erkrankung dominieren.

Ein wichtiger Hinweis ist, dass freies gp120 eines R5-tropen Virus ein anderes R5-tropes Virus neutralisiert. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch hier das N-Glykan eine zentrale Rolle spielt. Wie nicht anders zu erwarten, hat das freie gp120 des zu testenden Virus keinen Einfluss auf dessen eigene Infektiosität, egal ob es sich um -g15 oder +g15 R5-trope Viren handelt. Der Wirkung des freien gp120 wird dann relevant, wenn ein +g15-gp120 in Gegenwart

eines -g15 R5-tropen Virus getestet wurde. Dann zeigte sich eine vollständige Neutralisation des -g15 Virus. Dies ist verständlich, da das +g15 Virus besser auf CCR5-Zellen repliziert als das -g15 Virus. Das entsprechende freie gp120 des +g15 Virus sollte demnach auch besser an den viralen Rezeptoren binden und dadurch das -g15 Virus verdrängen. Dieser Befund war neu und überraschend, da bisher keine Daten in der Literatur existieren, die diesen Effekt beschrieben haben. Daher sind keine vergleichenden Arbeiten zitierbar. Bei der Neutralisation des R5-tropen Virus steht aber wiederum das N-Glykan g15 im Vordergrund, da es einen unterstützenden Einfluss auf die Infektiosität des Virus hat.

Die Anwesenheit des N-Glykans g15 auf dem freien gp120 wirkt sich also auch positiv auf die Entwicklung der R5-tropen Viruspopulation aus. R5-trope Viren, die schlechter infizieren als der R5-trope „*in vivo best fit*“, werden durch dessen freies gp120 neutralisiert. Da sich dieser Effekt nicht bei X4-monotropen Viren zeigte, R5-gp120 neutralisierte nicht die CXCR4-spezifische Infektion, ist anzunehmen, dass freies gp120 und Virus um den CCR5-Korezeptor konkurrieren. Dieses Experiment unterstützt die Argumentation, dass sich die g15-Effekte bei R5-tropen Viren durch den direkten Einfluss der g15-mutierten Hüllproteine auf die CCR5-Bindung erklären lassen.

Die Neutralisation R5-troper Viren durch freies gp120 des „besten“ R5-tropen Virus ist ein weiterer Effekt, der erklärt warum sich am Anfang der Erkrankung die R5-Viruspopulation etabliert.

Zu dem gp120-vermittelten Effekt der Virusneutralisation gesellt sich außerdem noch die infektionsverstärkende Wirkung des X4-tropen gp120. Interessanterweise zeigte X4-tropes gp120 keine neutralisierenden Eigenschaften, vielmehr wurde durch autologes oder auch heterologes X4-gp120 die Infektion X4-troper Viren verstärkt. Dieser infektionsfördernde Effekt war HSPG abhängig, d.h. die Adhäsion des Virus an die Zelle wurde durch freies gp120 unterstützt und damit dessen Infektiosität gesteigert. Wurde HSPG blockiert, wurde der infektionsfördernde Effekt nicht beobachtet.

Dies zeigt, dass die R5-Viruspopulation nicht nur durch eigenes gp120 selektiert wird, sondern dass „Korezeptor-fremdes“ gp120 die R5-tropen Viren antreibt.

Man kann nun postulieren, dass sich in einem System bestehend aus R5-Virus-X4-Virus-Zelle am Ende das „beste“ R5-trope Virus durchsetzen wird, da es durch das X4-gp120 gefördert wird und seine „schlechten“ R5-tropen Konkurrenten neutralisiert. Die virale Population unterliegt somit einem weiteren Selektionsdruck, der die R5-Viren bevorzugt.

Dies gilt alles für die Situation ohne Anwesenheit neutralisierender Antikörper. In dieser Arbeit wurden daher dem System Virus-gp120-Zelle neutralisierende Seren von Patienten zugegeben. Die gp120-vermittelten Effekte wurden durch die neutralisierenden Seren aufgehoben. Die Antikörper binden an freies gp120 und dessen Interaktion mit CCR5 oder die Bindung an HSPG wird verhindert. Für den Verlauf der Erkrankung kann dieser Effekt eventuell von Bedeutung sein. Wichtiger noch scheint seine Bedeutung bei der Entwicklung therapeutischer Impfstoffe zu sein.

Aufgrund der bestehenden Daten würde man nun annehmen müssen, dass ein Antikörper gegen ein R5-tropes Virus auch gleichzeitig dessen freies gp120 neutralisiert. Damit würde keine gp120 vermittelte Neutralisation anderer Viren mehr stattfinden und der Weg für ein Virus mit verringerter Korezeptoraffinität wäre frei. Die hier vorgestellten Arbeiten zeigen eindeutig die stark kreuzneutralisierenden Eigenschaften des gp120 und es ist bis heute nicht klar wie man mit Hilfe eines Antigens ein entsprechend kreuzneutralisierendes Serum herstellen könnte. Daher ist vermutlich einer der Gründe, warum es zum Fortschreiten der Erkrankung und zur Entwicklung der R5/X4- und X4-tropen Virusvarianten kommt, die hochspezifische Immunantwort der Patienten. Durch die Bildung neutralisierender, aber hochspezialisierter Antikörper wird zwar ein Virus eliminiert, aber auch dessen freies gp120 abgefangen. Gerade am Anfang der Erkrankung wird der R5-trope „*best fit*“ das bevorzugte Ziel der Immunantwort sein. Werden gegen das „beste“-Virus neutralisierende Antikörper gebildet, so setzt sich der Mechanismus des R5-nach-X4 „*shift*“ in Gang. Am Ende entwickelt sich eine Viruspopulation, deren freies gp120 sich gegenseitig fördert und die ihren optimalen Zustand erreicht, wenn die neutralisierende Aktivität der Antikörper im Serum zurückgeht. Dann setzt sich die -gp15 X4-trope Viruspopulation durch, der HIV-1 „*best fit*“ im späten Stadium der Erkrankung, dem Stadium AIDS.

3.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zur Funktion des HIV-V3-Loops und des g15 N-Glykans fügen sich gut in die aktuellen Hypothesen zur HIV-Pathogenese ein. Die Daten bieten darüber hinaus auch neue interessante Einblicke in die molekularen Vorgänge bei der HIV-Infektion, die zu einem besseren Verständnis der HIV-Rezeptor-Interaktion und damit der HIV-Pathogenese beitragen. Allerdings ist es schwierig *“in vitro”* Daten direkt auf die *“in vivo”* Situationen zu übertragen, da *“in vivo”* verschiedene Zellpopulationen, verschiedene Gewebe und verschiedene Selektionsparameter auf die Veränderung der Viruspopulation einwirken.

Im Labor kann dies nur bedingt nachgestellt werden. Das vorgestellte Virus-gp120-Zell-System ist ein neuer Weg, Veränderungen der Viruspopulation und die Funktion komplexer Zuckerstrukturen in einem Biosystem von großer Bedeutung zu erforschen. Es bleibt trotzdem noch genug experimenteller „Spielraum“ um den Krankheitsverlauf und die Entwicklung des AIDS-Stadiums genauer zu verstehen. Zum einen könnten die Versuche mit freiem gp120 auch auf humanen PBMC durchgeführt werden, da dies der *“in vivo”*-Situation näher kommt als Experimente mit den bekannten Korezeptor-Indikatorzelllinien. Zum anderen wäre es interessant, die virusverstärkende Wirkung des X4-tropen gp120 und dessen Interaktion mit HSPG näher zu untersuchen.

In Zukunft wird es ebenfalls wichtig sein, Indikatorzelllinien zu etablieren, welche sich auch in den Adhäsionsfaktoren für das Virus, z.B. in der Expression des HSPG, unterscheiden.

Wichtig sind die Daten auch in Zusammenhang mit der Diskussion über einen therapeutischen Impfstoff. Sollte ein solcher Impfstoff nicht eine genügend breite, bzw. kreuz-neutralisierende Immunantwort induzieren, so wäre ein solcher Einsatz für die Infizierten eher schädlich als nützlich, denn jeder Antikörper, der gegen ein bestimmtes Virus wirkt, verändert auch die Wirkung des freien gp120.

Trotz aller Anstrengungen der wissenschaftlichen Forschungsgemeinde - die wahre innere treibende Kraft der viralen HIV-Quasispezies bleibt uns auch weiterhin verborgen.

4. Zusammenfassung

Die Frage war: Welche Funktionen haben die N-Glykane im V3-Loop-Bereich des gp120 für den Viruseintritt von Subtyp-A- und -C-Viren. Dafür wurden vier Vektoren hergestellt:

- ein NL4-3-Retrovirusvektor mit Subtyp-A, R5-tropem V3-Loop
- ein NL4-3-Retrovirusvektor mit Subtyp-A, X4-tropem *env*
- ein NL4-3-Retrovirusvektor mit Subtyp-A, R5-tropem *env*
- ein NL4-3-Retrovirusvektor mit Subtyp-C, R5-tropem *env*

Um die Funktion der N-Glykane zu untersuchen, wurden die entsprechenden N-Glykosylierungssignale mutiert. Die mutierten Viren wurden auf ihre Infektiosität, ihre Korezeptornutzung und ihre Neutralisierbarkeit untersucht.

Bei den Infektionsstudien zeigte sich, dass die -g15 Virusmutanten der R5-tropen Subtyp-A und Subtyp-C Viren eine verringerte Affinität für CCR5 besitzen. Das N-Glykan g15 unterstützt daher die CCR5-Korezeptornutzung. Die Neutralisationsstudien zeigten, dass sich die -g15 Mutanten leichter durch Antikörper und Chemokine neutralisieren ließen. Daher blockiert g15 auch bei den Subtyp-A und -C Viren neutralisierende Antikörper.

Im Unterschied zu der Funktion des g15 N-Glykans bei der CCR5-spezifischen Infektion behindert das Glykan g15 die CXCR4-spezifische Interaktion. Die +g15 Glykosylierungsvarianten der HIV-A-X4-tropen Viren hatten, wie die -g15 Mutanten der R5-tropen Viren, eine geringere Affinität zum jeweiligen Korezeptor. Bei der CXCR4-spezifischen Infektion ist ein Verlust des N-Glykans g15 für die CXCR4-Nutzung von Vorteil. Die Neutralisationsstudien zeigten, dass sich die +g15 Mutanten leichter durch Antikörper neutralisieren ließen. Daher hat die niedrige Affinität der CXCR4-tropen +g15 Viren zu dem Korezeptor wahrscheinlich auch Auswirkungen auf dessen Neutralisationssensitivität, trotz potentiellen Schutz vor neutralisierenden Antikörpern durch das Glykan g15.

Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass freies gp120 die Infektion eines Virus neutralisieren, aber auch verstärken kann. In diesem Falle spielt das N-Glykan g15 ebenfalls eine wichtige Rolle. Freies gp120 einer R5-tropen +g15 Virusmutante konnte die Infektion durch eine R5-trope

-g15-Virusmutante verhindern. Der neutralisierende Effekt des R5-tropen, +g15-gp120 ist unabhängig von Heparansulfatstrukturen auf der Oberfläche der Zellen. Dagegen spielt Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) bei der Wirkung des X4-tropen gp120 eine wichtige Rolle. Freies gp120 von X4-tropen Viren ist in der Lage, die Virusinfektion anderer X4- oder R5-troper Viren zu steigern. Dieser Effekt wird unterdrückt, wenn HSPG blockiert wird. Bei der HSPG unabhängigen Infektion dominiert das X4-trope (-g15)-gp120 über das (+g15)-Virus und verhindert dessen Viruseintritt.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sich Viren gegenseitig bei der Infektion fördern oder behindern können. X4-tropes gp120 steigert die Infektion von Viren, während im Unterschied dazu R5-tropes gp120 andere R5-trope Viren neutralisiert. Diese neuen Daten verbessern unser Verständnis, wie sich die virale Population gegenseitig beeinflusst.

5. Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.2 Amplifizierung, Modifizierung, Klonierung und Analyse von DNA

5.2.1 Verwendete Bakterienstämme

Molekularbiologische Arbeiten wurden in kompetenten Bakterien des *Escherichia coli* Stammes XL1-Blue MRF' durchgeführt. Im Folgenden ist der Genotyp des verwendeten Stammes aufgeführt:

XL1-Blue MRF': $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$, $173\ endA1$, $supE44$, $thi-1$, $recA1$, $gyrA96$, $relA1$, $lac [F', proAB, laqI^{\Delta}Z\Delta M15Tn10 (Tetr)]$

5.2.2 Ausstrich von Bakterien [Sambrook *et al.*, 1989]

50 μ l einer *E. coli* XL1-Blue-Glycerinstockkultur wurde mit einer sterilen Impföse in mehreren Streifen auf einer LB-, bzw. einer LB-Ampicillin (Amp)-Platte ($\varnothing 94$ mm, 16 mm hoch) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden bei 4°C aufbewahrt und mit Parafilm verschlossen.

5.2.3 Präparation chemisch kompetenter Bakterien [Chung *et al.*, 1989]

Die Präparation von chemisch kompetenten Bakterien erfolgte nach der Methode von Chung *et al.* [Chung *et al.*, 1989]. Dafür wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 580nm von 0,3-0,4 unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in 50ml Greiner Röhrchen sedimentiert (2500 rpm, 10 min, 4°C, Eppendorf 5804 R) und in 20 ml eiskaltem TSS resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden in vorgekühlte 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

5.2.4 Transformation von Bakterien [Mandel *et al.*, 1979]

Zu 1-2 ng aufgereinigter Plasmid-DNA, beziehungsweise zu dem jeweiligen Ligationsansatz (5.2.12), wurden jeweils 100 µl kompetente Bakterien gegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis erfolgte 40 Sekunden ein Hitzeschock bei 42°C. Nach Zusatz von 600 µl LB-Medium wurde 15-30 Minuten bei 37°C inkubiert, so dass Bakterien mit aufgenommenem Plasmid Zeit hatten, β -Lactamase zu exprimieren, welche den Lactamring des Ampicillins hydrolysiert und somit eine Ampicillin-Resistenz ausbildet. Anschließend wurde der komplette Ansatz unter halbsterilen Bedingungen auf LB-Amp-Platten (\varnothing 94 mm, 16 mm hoch) ausgebracht und diese 8-10 Stunden bei 37°C inkubiert.

5.2.5 Einfrieren von Bakterien

Um Flüssigkulturen von Bakterien über längere Zeit aufzubewahren, wurden 500 µl der entsprechenden Bakterienkultur mit 500 µl Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

5.2.6 Präparation von Plasmid-DNA [Birnboim *et al.*, 1979]

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte in 4 ml dYT-Medium in Gegenwart von 100 µg/ml Ampicillin. Die Präparation der Plasmid-DNA aus den sedimentierten Bakterien erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse. Es wurde das "NucleoSpin Plasmid" Aufreinigungskit der Firma Macherey und Nagel nach Herstellerangaben verwendet.

5.2.7 Phenol/Chloroform-Extraktion [Penman *et al.*, 1966]

Um Nucleinsäurelösungen von Proteinen zu trennen wurde eine Phenolextraktion durchgeführt. Dazu wurde die Lösung mit einem 1:1-Gemisch Phenollösung und Chloroform versetzt und auf einem Vortex-Mischer gemischt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation in einer Biofuge *pico* Heraeus-Tischzentrifuge (13000 rpm, RT) nahm man die abgetrennte wässrige Phase mit einer Pipette ab und überführte sie in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem 1fachem Volumen Chloroform, um eventuell störende Phenolreste zu entfernen. Man extrahierte in gleicher Weise, nahm erneut die obere, wässrige Phase ab, versetzte sie mit 1/10 Volumen NaAc-Lösung (pH 5,2) und fällte durch Zugabe des 2,5fachen Volumens an Ethanol abs. die Nucleinsäuren. Zur Präzipitation mit 0,6fachen Volumen Isopropanol wurde statt 1/10 Volumen NaAc Lösung, 1/3 Volumen 10 M NH₄Ac-Lösung verwendet. Nach einstündiger Inkubation bei

-20°C zentrifugierte man die Suspension 15 Minuten (Heraeus-Tischzentrifuge, 13000 rpm, RT). Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, 5 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend in einer angemessenen Menge gewünschtem Puffer aufgenommen.

5.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen [Sambrook *et al.*, 1989]

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure in einer Lösung erfolgte über die Messung der OD (optischen Dichte) bei 260 nm. Eine geeignete Verdünnung (1:25, 1:50) wurde in einer Quarzküvette in einem Photometer (Shimadzu, UV160-A) gemessen. Eine OD_{260nm} von 1,0 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 40 µg/ml. Als Reinheitsgrad für die Nukleinsäuren wurde der Quotient aus OD_{260nm}/OD_{280nm} gemessen (Ratio). Die Ratio für reine DNA beträgt 1,8, für reine RNA 2.

5.2.9 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen [Sambrook *et al.*, 1989]

Die Ansatzgröße und die Inkubationszeit eines Restriktionsverdau wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Enzymeinheiten in U}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{\text{Länge } \lambda\text{-DNA (48850 bp)}}{\text{Länge der Proben-DNA}} = \frac{\text{Anzahl Enzymschnittstellen in Proben-DNA}}{\text{Anzahl der Schnittstellen in } \lambda\text{-DNA}}$$

Ein U entspricht dabei der Enzymmenge, die 1 µg λ-DNA in einer Stunde vollständig schneidet. Der Enzymanteil am Gesamtansatz durfte nicht mehr als 1/10 betragen, da die Enzyme in 50% Glycerin aufbewahrt werden, welches in zu hohen Konzentrationen störend bei dem Restriktionsverdau wirkt. Die verwendeten Puffer (10fach konzentriert) konnten Tabellen der Herstellerfirmen entnommen werden, die Inkubationstemperatur wurde enzymspezifisch nach Herstellerangaben gewählt. Der Restriktionsverdau wurde durch Zugabe von 6x Elektrophoresepuffer und anschließender Elektrophorese auf einem Agarosegel (5.4.1) abgestoppt oder die Enzyme nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

5.2.10 Dephosphorylierung von DNA [Chaconas und van de Sande, 1980]

Um die Rezirkularisierung einer geschnittenen Plasmid-DNA zu verhindern, wurde durch eine Dephosphorylierung die 5'-Phosphatgruppe entfernt. Die Plasmid-DNA wurde mit 0,5 Einheiten alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) pro pmol 5'-Phosphat versetzt und im Reaktionspuffer 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 minütige Hitzeinaktivierung bei 85°C gestoppt.

5.2.11 Kinasierung von DNA-Fragmenten

Ca. 2 µg DNA-Fragment wurde eine Stunde bei 37°C in Gegenwart von 10 nmol ATP und 30 U T4-Polynukleotid-Kinase im Kinase-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion oder durch Zugabe von Elektrophoresepuffer gestoppt.

5.2.12 Ligationen [Bolivar et al., 1977]

Die Fragment-DNA wurde im zwei- bis dreifachen molaren Überschuß zu 100-200 ng dephosphorylierter linearisierter Vektor-DNA eingesetzt. Die DNA wurde in einem 10 µl Ansatz aus Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase bei 8°C über Nacht inkubiert. Der komplette Ligationsansatz wurde anschließend zur Transformation (5.2.4) eingesetzt.

5.2.13 Sonderprotokoll für die Klonierung in den pNLΔenv Vektor

Da sich die Klonierung des *env*-Fragments über *BstEII* und *BamHI* in den 14kb grossen pNLΔenv Vektor besonders schwierig gestaltet, wurde folgendes Sonderprotokoll ausgearbeitet:

4 µg pNLΔenv Vektor wurden genau 7 Minuten bei 37°C im *BamHI*-Puffer von Fermentas mit 10 Units *BstEII* und 10 Units *BamHI* in einem 20 µl Ansatz doppelverdaut und anschließend 7-10 Minuten bei 83°C hitzeinaktiviert. Nach einer kurzen Inkubationsphase auf Eis (30s) wurde durch Zugabe von 1 Unit CIAP der geschnittene Vektor bei 37°C genau 7 Minuten dephosphoryliert und anschließend die CIAP 7-10 Minuten bei 83°C hitzeinaktiviert. Der Vektor wurde danach auf Eis gelagert, bis die Ligation mit *BstEII/BamHI* geschnittenem und über das Agarose-Gel aufgereinigtem *env*-Fragment nach (5.2.12) durchgeführt wurde.

5.2.14 PCR-Kettenreaktion [Saiki *et al.*, 1986]

Die Hybridisierungstemperatur für die PCR wurde berechnet, indem man für jedes GC-Paar 4°C und für jedes AT-Basenpaar 2°C im überlappendem Bereich der Primer addierte und von dieser Temperatur 3°C abzog. Die Reaktion erfolgte in einem 50 µl Ansatz in Anwesenheit von 3 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung, 5 µl eines 10x PCR-Puffers, 4 µl 25 mM dNTP-Mix, 10 U Pfu-Polymerase (für TA-Klonierungen Taq-Polymerase), 100 ng DNA und je 2 µl 10 pM Primerlösung. In einem programmierbarem Mastercycler Gradient (Eppendorf) führte man die PCR in 25 Zyklen durch. In einem Zyklus wurde erst 30 Sekunden auf 94°C erhitzt, dabei werden die möglicherweise ausgebildeten Doppelstränge aufgeschmolzen, 30 s auf Hybridisierungstemperatur gebracht (Annealing) und dann 30 s auf 72° C (Extension) erhitzt. Nachdem 25 Zyklen durchlaufen waren, wurde der Ansatz auf 4°C gekühlt. Zur Aufreinigung gab man den Ansatz auf ein 1%iges Agarosegel (5.4.1), schnitt die Bande der richtigen Größe aus und eluierte die DNA aus dem Gel (5.4.2).

5.2.15 “*nested*”-PCR

Um geringe Mengen an DNA zu amplifizieren, wurde eine “*nested*”-PCR durchgeführt, welche sehr sensitiv ist. Der Unterschied zu einer normalen PCR ist, dass man erst eine normale PCR (5.2.14) durchführt und mit dessen Produkt eine zweite PCR, mit Primern, welche innerhalb des Amplifikats hybridisieren, ausführt. Beide PCRs wurden nach (5.2.14) durchgeführt.

5.2.16 “*Touchdown*”-PCR

Für PCRs, bei denen als Produkt mehrere Banden auftraten, wurde eine “*Touchdown*”-PCR durchgeführt. Dabei startet man bei einer Hybridisierungstemperatur (“*Annealing*”-Temperatur) und senkt sie pro Zyklus der PCR um einen Grad bis zu der niedrigsten gewählten Hybridisierungstemperatur (“*Touchdown*”), welche dann für 10 oder mehr Zyklen verwendet wird. Da jeder Unterschied in der Temperatur T_m zwischen korrekter und inkorrekt Hybridisierung einen 4-fachen Unterschied in Produktmenge pro Grad Celsius und Zyklus ergibt, wird das korrekte Produkt über das inkorrekte angereichert. Bis auf die Änderung der “*Annealing*” Temperatur wurde die PCR nach (5.2.14) durchgeführt.

5.2.17 SOE (“*single overlap extension*”)-PCR

Bei der SOE-PCR werden zwei Oligonukleotide so gewählt, dass sie in einem Bereich von mindestens 20 Nukleotiden komplementär sind. Mit diesen wird dann eine PCR nach (5.2.14) durchgeführt, und man erhält ein DNA-Produkt, welches beide Oligonukleotide als doppelsträngige DNA umfasst.

5.2.18 Positionsspezifische-Mutagenese (“*site directed Mutagenesis*”)

Um einzelne Basen in einer DNA-Sequenz auszutauschen, wurde die Methode der “*site directed*”-Mutagenese gewählt. Dabei werden zwei komplementäre Primer, welche beide die gewünschte Mutation tragen, von etwa 20-30 Basenpaaren in einer PCR eingesetzt. Sowohl in Richtung 5' als auch 3' Ende müssen neben der Mutation mindestens 10 Basen komplementär zur Ausgangs-DNA sein, um eine korrekte Hybridisierung zu gewährleisten. Ausgehend von den beiden Primern werden zwei neue DNA-Stränge synthetisiert. Im Anschluss an die PCR wird die parentale DNA durch das Restriktionsenzym DpnI, welches nur methylierte und hemimethylierte DNA (5'-Gm6ATC-3') erkennt, hydrolysiert. Diese Methode ist nur bis zu einer maximalen Größe der zu mutierenden DNA von 10 kb möglich.

Die Reaktion erfolgte in einem 50 µl Ansatz in Anwesenheit von 3 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung, 5 µl eines 10x PCR-Puffers, 4 µl 25 mM dNTP-Mix, 10 U Pfu-Polymerase, 5-10 ng DNA und je 2 µl 10 pM Primerlösung. In einem programmierbarem Mastercycler gradient (Eppendorf) führte man die PCR in 18 Zyklen durch. In einem Zyklus wurde erst 30 Sekunden auf 94°C erhitzt, 50s auf Hybridisierungstemperatur gebracht (“*Annealing*”) und dann 2 Minuten pro kb der zu mutierenden DNA auf 68° C (Extension) erhitzt. Nachdem 18 Zyklen durchlaufen waren, wurde der Ansatz auf 4°C gekühlt. Anschließend wurden 10 U des Restriktionsenzym DpnI in die PCR gegeben und der Ansatz bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Dabei wird die von den Bakterien methylierte DNA geschnitten, aber die unmethylierten PCR Produkte bleiben erhalten. 5 µl des Restriktionsansatzes wurden in kompetente Bakterien transformiert, deren Reparatursystem die doppelsträngige “*nicked*” DNA wieder zum zirkulären Plasmid repariert.

5.2.19 TA-Klonierung [Shuman *et al.*, 1994]

Um PCR-Fragmente unabhängig von Restriktionsschnittstellen direkt in einen Vektor zu klonieren, wurde das PCR-Produkt kinasiert (5.2.11). Der Vektor pTAdv wurde in der MCS (“*multible cloning site*”) von *EcoRV* ohne Überhänge (“*blunt end*”) geschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA mit 10 U Taq-Polymerase im Taq-PCR Puffer in Anwesenheit von 2mM dTTP bei 72°C 2h inkubiert. Der Vektor wurde anschließend Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.7), Isopropanol gefällt und als linearisierter Vektor für die Ligation (5.2.12) eingesetzt.

5.2.20 Sequenzierung von DNA [Sanger *et al.*, 1992]

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Didesoxynucleotid-Kettenabbruchverfahren nach Sanger [Sanger *et al.*,]. Analog zur PCR werden in zyklischen Schritten fluoreszenz-markierte Didesoxynucleotide in die entstehenden Produkte eingebaut, welche zum Abbruch der Polymerisation führen. Die so markierten Produkte können in einem Analysegerät mittels Kapillarelektrophorese getrennt und mit einem Laser detektiert werden. Dazu wurde das CEQ-Quickstart-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Auftrennung der Sequenzen erfolgte auf dem Beckman CEQ2000-Sequenzierer.

5.2.21 Synthetische Oligodesoxyribonukleotide

Synthetische Oligodesoxyribonukleotide wurden bei der Firma Metabion bestellt.

5.3 Arbeiten mit RNA

5.3.1 Isolierung von RNA aus Blut und Serum [Qiagen]

Für die Isolierung von totaler RNA aus Blut und Serum wurde das RNeasy-Blood-Mini-Kit nach Herstellerangaben verwendet.

5.3.2 RT-PCR

Um die virale RNA in DNA umzuschreiben wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Dafür wurde 1 µg totaler RNA mit 20 pM cDNA Primer und nukleasefreiem Wasser (DEPC behandelt) in einem 11 µl Ansatz 5 Minuten bei 70°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die Reaktion erfolgte in einem 20 µl Ansatz mit 4 µl 5x Reaktions Puffer, 1 mM dNTP Mix und 20 U Ribonuklease-Inhibitor. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C wurden 40 U M-MuLV Reverse Transkriptase hinzugegeben, der Ansatz weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 10 minütige Hitzeinaktivierung bei 70°C gestoppt. Nach kurzer Inkubationsphase auf Eis wurden 15 µl des Ansatzes in einer “*nested*” PCR (5.2.15) eingesetzt.

5.4 Gelelektrophorese

5.4.1 Elektrophorese von DNA-Molekülen in Agarosegelen [Sambrook *et al.*, 1989]

Die DNA-Fragmente wurden ihrer Größe entsprechend auf 1-2%igen (w/v) Agarosegelen in TAE-Puffer aufgetrennt. Das Agarosegel enthielt zur Visualisierung der DNA 0,25 µg/ml Ethidiumbromid, welches in die Nukleinsäuren interkaliert und sie bei UV-Licht (254 oder 300 nm) sichtbar macht. Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurden die aufzutrennenden Proben vor dem Auftragen mit $\frac{1}{6}$ Volumen 6x Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte etwa 30 Minuten bei einer Spannung von 90 V. Als DNA Größenmarker wurden je nach erwarteter Fragmentgröße die GeneRuler 100bp DNA Ladder oder die GeneRuler 1kb DNA Ladder von Fermentas eingesetzt.

5.4.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen [Macherey-Nagel]

Um DNA aus Agarosegelen zu eluieren, wurde ein Macherey-Nagel “*Nucleospin Extract Kit*” nach Herstellerangaben verwendet.

5.4.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [Laemmli *et al.*, 1970]

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Methode von Laemmli. Die Trenngele (7%ige Acrylamidlösungen mit 0,18% Bisacrylamid) hatten die Dimensionen von 84x50x1,5 mm und besaßen eine Endkonzentration von 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,0024% v/v TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) und 0,1 % v/v SDS (Natriumdodecylsulfat). Das Sammelgel war 3%ig (mit 0,08% Bisacrylamid) mit einer Endkonzentration von 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,0024% TEMED und 0,1 % SDS. Die Wanderungsstrecke für die Proben durch das Sammelgel betrug 1 cm. Nach Zugabe des Radikalstarters APS (0,01% w/v Ammoniumperoxidisulfat) und anschließendem Gießen wurde das Trenngel vorsichtig mit Wasser überschichtet, um eine gerade Oberfläche des polymerisierenden Gels zu erhalten. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Elektrophorese bei 20 mA, bis die Farbstofffront das Trenngel erreicht hatte. Man erhöhte die Spannung auf 30 mA und stoppte die Elektrophorese, wenn die unterste Farbstofffront aus dem Gel lief. Als Marker für die Proteingrößen wurde ein geeignetes Proteingemisch als Größenstandard aufgetragen, bei Gelen für Westernblots wurde ein Prestained Marker verwendet.

5.4.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Coomassie-Färbung wurde nach der Methode von Neuhoff *et al.* [Neuhoff *et al.*, 1988] durchgeführt. Dabei wird Coomassie Blue G250 kolloidal in die Proteinbanden eingelagert. Zur Visualisierung wurde das Colloidal-Blue-Staining-Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Zur Aufbewahrung konnte das Gel auch getrocknet werden.

5.4.5 Western-Blot zum Nachweis der HIV-Hüllproteine

Für den Western-Blot wurden Proteine mittels einer SDS-Gelelektrophorese (5.4.3) nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (PROTRAN, Schleicher&Schuell) in einer BioRad-Elektrophoresekammer in Anwesenheit von Transferpuffer bei 100 V für 1 Stunde transferiert. Die freien Bindungsstellen der Membran wurden mit Block-Puffer (PBS-T mit 5% FKS) abgesättigt und die Membran über Nacht mit einer Antikörperverdünnung (Anti-gp120 polyklonal, Ziege, Acris) von 1:1000 in Block-Puffer bei 4°C

inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für 15 Minuten wurde die Membran eine Stunde mit einem HRP (*“horseradish peroxidase”*) konjugiertem sekundären Antikörper (Anti-Ziege IgG, Kaninchen, Peroxidase-konjugiert) (1:5000) in Block-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend weitere 3 Mal mit PBS-T für 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dem finalen Waschen mit PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die zu detektierende Proteinbande mittels 4-CN Färbung oder mittels ECL-System visualisiert.

Die Visualisierung mit 4-CN (4-chloro-1-naphthol) ist nicht so sensitiv wie eine Visualisierung mittels ECL System. Dabei setzt die HRP das 4-CN in einen nicht löslichen chromogenen Farbstoff um. Das Substrat wurde in Methanol gelöst (0,3% 4-CN in 100% Methanol) und in PBS 1:6 verdünnt. Nach Zugabe von 0,0005% H₂O₂ wurde die Membran in der Substratlösung solange inkubiert, bis deutliche Banden zu erkennen waren, danach wurde die Reaktion durch Waschen mit destilliertem Wasser gestoppt und die Membran zur weiteren Aufbewahrung getrocknet und dunkel gelagert.

Bei der Visualisierung mit dem ECL-System (*“enhanced Chemiluminescence”*) wird ein Substrat von der HRP in eine lumineszierende Substanz umgesetzt, welche mit einem Emulsionfilm (Kodak, BioMax) detektierbar ist. Hierfür wurde das Amersham ECL Advance Kit nach Herstellerangaben verwendet.

5.4.6 Dot Blot zur Quantifizierung von gp120

Die Quantifizierung von gp120 im Zellkulturüberstand erfolgte über einen Dot-Blot. Dafür wurde auf einem Streifen Nitrocellulose Membran je 1µl Zellkulturüberstand, 1µl Medium und je 1µl einer gp120 III-B Eichlösung mit den Konzentrationen, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 63 ng/ml, 35 ng/ml und 15 ng/ml aufgetropft. Die freien Bindungsstellen der Nitrocellulose wurden 1 Stunde mit 5% FKS in PBS-T bei Raumtemperatur abgesättigt und der Streifen über Nacht, bei 4°C, in einer 1:1000 Verdünnung eines anti-gp120-AP (alkalische Phosphatase)-konjugierten Antikörpers in PBS-T mit 5% FKS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für 15 Minuten bei RT und einem finalen Waschschriff mit PBS wurde der gebundene Antikörper mittels BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine Salz)- /NBT (*“Nitro-Blue Tetrazolium Chloride”*)-Substratlösung detektiert und der Blot mit ImageJ quantifiziert.

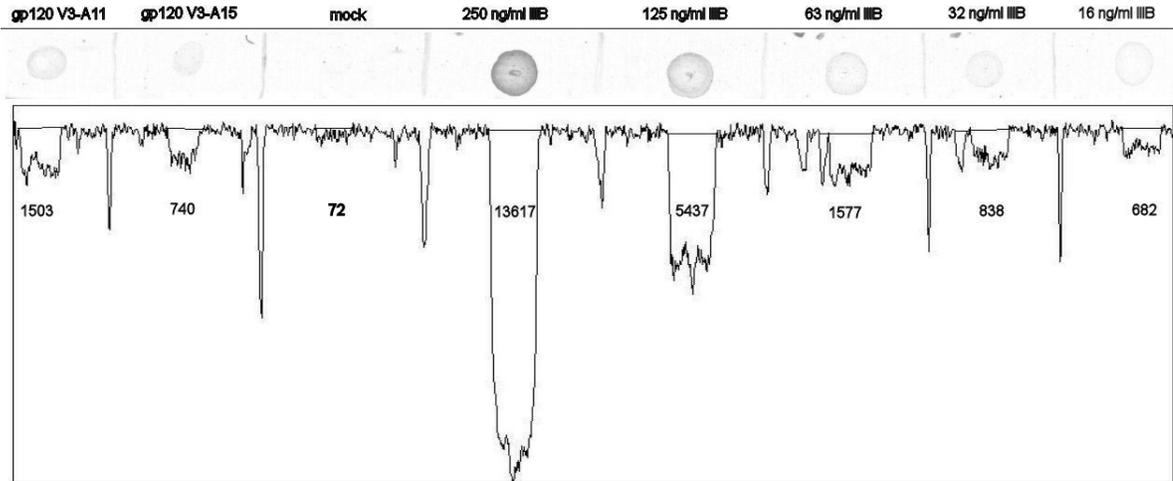


Abbildung 34

Beispiel eines Dot-Blots.

Aufgetragen von links nach rechts: je 1µl von gp120 V3-A Überstand, gp120 V3-A - g12,13,14,15,16 Überstand, mock (Überstand von untransfizierten Zellen), Stammlösung von gp120 III B in den Konzentrationen 250, 125, 63,32 und 16 ng/ml. Detektion mit AP-konjugierten anti-gp120 Antikörper (Aalto, Irland) (1:1000) und anschließender Visualisierung mit BCIP/NBT. Durch die Flächenberechnung nach Einscannen und Auswertung mit ImageJ kann man die gp120-Konzentrationen im Überstand densitometrisch abschätzen.

5.5 Zellkultur & Proteinbiochemische Methoden

Alle Arbeiten der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert oder autoklaviert und alle Geräte vor Benutzung desinfiziert. Die Zellen wurden in Inkubationsschränken bei 37°C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit kultiviert.

5.5.1 Verwendete Zellen

Tab. 7: Verwendete Zellen

Zelllinie	Charakteristika	Medium	Selektionsmedium
HelaP4	humane Zervixkarzinom Zelllinie, stabil transfiziert mit CD4, CXCR4, CCR5	DMEM, 5% FKS, Penicillin/Streptomycin (50µg/ml)	500 µg/ml G418 (CD4), 1 µg/ml Puromycin (Korezeptoren)
Ghost (nur CD4) Ghost CCR5, Ghost CXCR4, Ghost CCR5 -g2 Ghost CCR5, +g1	humane Osteosarkomzelllinie, stabil transfiziert mit CD4, GFP-Reporter Gen und jeweiligen Korezeptor,	DMEM, 5% FKS, Penicillin/Streptomycin (50µg/ml)	500 µg/ml G418 (CD4), 1 µg/ml Puromycin (Korezeptoren), 100µg/ml Hygromycin (GFP-Reporter Gen)
U87 CCR5, U87 CXCR4	Humane Gliomzelllinie, stabil transfiziert mit CD4 und jeweiligen Korezeptor	DMEM, 10% FKS, Penicillin/Streptomycin (50µg/ml)	500 µg/ml G418 (CD4), 1 µg/ml Puromycin (Korezeptoren)
TZM-bl	humane Zervixkarzinom Zelllinie, stabil transfiziert mit CD4, CXCR4, CCR5 und β-Gal Reporter Genen.	DMEM, 5% FKS, Penicillin/Streptomycin (50µg/ml)	keine Selektion nötig

5.5.2 Kultivierung von Zellen

Die adhärennten Zelllinien wurden in geeigneten Zellkulturschalen (Sarstedt) in DMEM supplementiert mit FKS (siehe Tabelle 1) im 37°C-Inkubationsschrank (Heraeus, BBD 6220) in 5%iger CO₂-Atmosphäre mit maximaler Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die Zellen wurden alle 3-4 Tage, je nach Zelldichte, trypsinisiert und verdünnt. Alle zwei Monate wurden die Zellen auf ihre Rezeptoren, Korezeptoren und Reporter Gene mit dem geeigneten Selektionsmedium selektioniert und in neue Kulturschalen überführt.

5.5.3 Trypsinieren von adhärennten Zellen

Die Zellen wurden zweimal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA von der Kulturschale abgelöst und in DMEM supplementiert mit 5% FKS verdünnt.

5.5.4 Lagerung von Zellen

Um Zelllinien über längere Zeit lagern zu können, wurden die Zellen erst trypsinisiert (5.5.3) und dann bei 500 Umdrehungen/Minute (Eppendorf, Centrifuge 5804R) bei Raumtemperatur sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal in sterilem PBS gewaschen und anschließend in gleichen Teilen FKS und einer 20%igen DMSO-Lösung (DMSO in PBS) aufgenommen. Die Zellen wurden in Cryoröhrchen überführt und nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis 10 Minuten bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei -70°C bis zu einem halben Jahr gelagert oder in flüssigem Stickstoff auf unbestimmte Zeit eingefroren.

5.5.5 Bestimmung der Zellzahl in einer Zellkultur

Die Zellzahl in einer Zellsuspension wurde mittels eines Trypanblau-Ausschlusstests bestimmt. 20 µl der Zellsuspension wurde in 80 µl Trypanblau verdünnt und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Von der gefärbten Zellsuspension wurden 10 µl auf eine Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1mm) gegeben. Die nicht gefärbten (lebenden) Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop in jeweils 2 Großquadraten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Anzahl der Zellen pro Milliliter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{2} \times 5 \times 10^4 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

5.5.6 Transfektion

Die Transfektion von eukaryontischen Zellen erfolgte mit dem Fugene6 Transfektionsreagenz von Roche. Dafür wurden die Zellen in Kulturgefäße mit 6 Kavitäten (je 9,4 cm² Fläche) in 2 ml Medium so ausgebracht, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 60-80% (ca. 20000 Zellen) aufwiesen. Zu 100 µl DMEM-Medium ohne Supplementierung wurden 6 µl

Fugene6 Transfektionsreagenz hinzugegeben und der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 µg der zu transfizierenden DNA hinzugegeben und der Ansatz weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Je ein kompletter Ansatz wurde nach dieser Inkubation in je eine Kavität getropft und bei 37°C, 5% CO₂ bei maximaler Luftfeuchtigkeit 4 Stunden inkubiert. Das Medium wurde danach abgenommen und durch frisches DMEM, supplementiert mit 5% FKS, ersetzt und für Proteinexpression 48 Stunden, bei Provirus-Transfektionen 64 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ bei maximaler Luftfeuchtigkeit inkubiert.

5.5.7 Lyse von Zellen

Die Zellen in einer Kavität von 9,4 cm² Fläche wurden in 200 µl Lysis Puffer (50mM Tris-Cl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5% SDS) lysiert.

5.5.8 Immunopräzipitation von gp120

Die Immunopräzipitation von gp120 erfolgte entweder aus Zellkulturüberstand oder aus lysierten Zellen.

Bei der Immunopräzipitation aus Zellkulturüberstand wurde der Überstand durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 3000 rpm (Heraeus Biofuge *pico*) von Zelltrümmern getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde auf 0,05% SDS eingestellt und 1/20igstel Volumen einer 10%igen Protein-A-Staphylococcus-Aureus-Zell-Suspension (Sigma) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde auf Eis bei ständigem Schütteln inkubiert und die Staphylococcus-Aureus-Zellen wurden anschließend durch Sedimentation bei 3000 rpm (2 Minuten, Heraeus Biofuge *pico*) aus dem Überstand entfernt. Zu dem Überstand wurden 5 µg polyklonaler anti-gp120 Antikörper (Ziege, Acris) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Präzipitation erfolgte mit Zugabe von 50 µl Protein-A-Agarosesuspension (Sigma) und anschließender Inkubation bei 4°C für 4 Stunden. Die Protein-A-Agarose "Beads", welche die IgG Antikörper binden, wurden bei 5000 rpm (5 Minuten, Heraeus Biofuge *pico*) sedimentiert, zweimal in sterilem PBS gewaschen und in 30 µl Laemmli-Puffer aufgenommen, resuspendiert und für 10 Minuten bei 90°C inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese (für radioaktiv markierte Proteine) (5.4.3) oder Western Blot (5.4.5).

Bei der Immunopräzipitation aus lysierten Zellen wurden die Zellen nach der Lyse (5.5.7) mit 600 µl TNA Puffer versetzt. Zu dem Ansatz wurden 50 µl einer 10%igen Protein-A-Staphylococcus-Aureus-Zellsuspension (Sigma) hinzugegeben und 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 5000rpm (5 Minuten, Heraeus Biofuge *pico*) sedimentiert und der Überstand mit 5 µg polyklonalen gp120 (Ziege, Acris)-Antikörper versetzt. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht erfolgte die Präzipitation mit 50µl Protein-A-Agarosesuspension (Sigma) und anschließender Inkubation bei 4°C für 4 Stunden. Die Protein-A-Agarose “*Beads*” wurden sedimentiert (5000rpm, 5 Minuten, Heraeus Biofuge *pico*), dreimal mit TNA-Puffer gewaschen und in 30 µl Laemmli-Puffer aufgenommen, resuspendiert und für 10 Minuten bei 90°C inkubiert.

5.6 Virologische Methoden

Alle Arbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 durchgeführt.

5.6.1 Anzucht von Viren

Um Viren anzuzüchten, wurde die provirale DNA in HeLaP4 Zellen transfiziert (5.5.6). Der Überstand wurde nach 64 Stunden geerntet und in 200 µl Aliquots bei -70°C bis zu drei Monaten gelagert. Für “*Single Round*” Infektionen wurden mit einem Aliquot die ffu (focus forming units) pro µl Virusüberstand bestimmt (5.6.4) (5.6.7) und für Replikationskinetiken (5.6.2) die Virusmenge mittels eines p24-ELISAs (5.6.3) quantifiziert.

5.6.2 Replikationskinetik

In einer Zellkulturplatte mit 96 Kavitäten wurden 3×10^3 U87 Zellen pro Kavität mit geeignetem Korezeptor ausgesät und 16-20 Stunden im Inkubationsschrank bei 37°C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 5 ng p24/ml Virusüberstand (5.6.1) infiziert und nach 4 Stunden mit sterilem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 200 µl frischem DMEM supplementiert mit 5% FKS im Inkubationsschrank für 0, 3, 6, 9 und 12 Tage inkubiert und ihr Virusgehalt mittels eines p24-ELISA (5.6.3) bestimmt. Alle Versuche wurden in Triplets durchgeführt.

5.6.3 p24-Antigen Nachweis mittels ELISA [Neurath et al., 1985]

Um die Viruspartikel im Zellkulturüberstand zu quantifizieren, wurde das Kapsid Protein p24, welches proportional zur Virusmenge ist, im Überstand nachgewiesen.

Dafür wurde eine 96 well MAXIsorb-Platte (Nunc, USA) über Nacht bei 4°C mit 100 µl eines p24-Antikörpers (1mg/ml, D7320, Biochrom) im "Coating"-Puffer (10 µg/ml Natriumhydrogencarbonat) beschichtet. Anschließend wurden die Kavitäten dreimal mit PBS-T gewaschen und die freien Bindungsstellen mit 300 µl Blockpuffer (5% FKS in PBS-T) abgesättigt, um unspezifische Antigenbindung zu verhindern. Nach einer Inkubation über Nacht bei 8°C wurden die Kavitäten erneut dreimal mit PBS-T gewaschen und je 100 µl Viruskulturüberstände, welche vorher mit 0,1% Empigen inaktiviert wurden, pro Kavität zugegeben. Die Bindung des p24-Antigens erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Kavitäten wurden dreimal mit PBS-T gewaschen und mit 100 µl anti-HIV Kaninchenserum (1:2000 im Blockpuffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei erneuten Waschschrritten mit PBS-T wurden 100 µl eines alkalische-Phosphatase-konjugierten anti-Kaninchen IgG Antikörpers (1:2000 im Blockpuffer, Sigma) pro Kavität hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kavitäten wurden zweimal mit PBS-T gewaschen und einmal mit H₂O bidest., die Detektion erfolgte mit 100 µl einer Nitrophenylphosphat-Substrat Lösung (*Alkaline Phosphatase Substrate Kit*, BioRad). Die Farbreaktion wurde nach fünf Minuten mit 100 µl 0,4 M NaOH gestoppt und die OD bei 405 nm ausgewertet. Der p24-Gehalt wurde mittels einer Standardkurve, welche sich aus einer halblogarithmischen Verdünnung von standardisierten p24-Protein ergab, ermittelt.

5.6.4 "Single Round"-Infektion [Wei et al., 2002]

In einer Zellkulturplatte mit 96 Kavitäten wurden 3×10^3 Zellen (HelaP4 für Synzytientest, TZM-bl- und Ghost-Zellen für Kompetitionsanalysen) pro Kavität mit geeignetem Korezeptor ausgesät und 16-20 Stunden im Inkubationsschrank bei 37°C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden mit 100 ffu (auf TZM-bl Zellen, 10 ng/ml p24 für Synzytien-Test) Virusüberstand infiziert und 48 Stunden im 37°C Inkubationsschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Synzytien Test (5.6.5), β-Galactosidase Reporter-gen-Nachweis (5.6.7) oder direkter Fluoreszenz des GFP-Reporter-gens (5.6.8).

5.6.5 Synzytientest

Beim Synzytien-Test nutzt man aus, dass infizierte Zellen, die Virusproteine auf ihrer Oberfläche exprimieren, untereinander fusionieren können. Dadurch entstehen mehrkernige Riesenzellen (Synzytien). Oft korrespondiert diese Eigenschaft mit der Infektiosität des Virus und immer mit der Fähigkeit des gp120, mit CD4 und Korezeptoren zu interagieren.

Für den Synzytientest wurden HeLaP- Zellen eingesetzt und mit einer *“Single Round”*-Infektion (5.6.4) infiziert. Obwohl die Synzytien nach 72 Stunden schon unter dem Lichtmikroskop zu erkennen waren, wurden die Synzytien durch einen Hemacolor Schnellfärbetest von Merck besser visualisiert. Dafür wurden die Zellen mit Methanol für 2 Minuten fixiert und dann mit 100 µl Lösung 2 (Farbstoff rot) pro Kavität und anschließender Färbung mit 100 µl Lösung 3 (Farbstoff blau) pro Kavität für je 2 Minuten angefärbt. Anschließend wurden die Kavitäten mit PBS gewaschen. Da die Kerne durch die Schnellfärbung blau gefärbt waren, konnten die Synzytien klar visualisiert werden.

5.6.6 Kompetitionsanalysen, Inhibitionsanalysen

Für Kompetitions- und Inhibitionsanalysen von Viren in Anwesenheit von Antikörpern, Chemokinen, Inhibitoren und freiem gp120 wurde eine *“Single Round”*-Infektion (5.6.4) von TZM-bl oder Ghost-Zellen durchgeführt. Dabei wurde die zu testende Substanz in den gewünschten Konzentrationen während der Infektion zugesetzt. Je nach Experiment wurden teilweise die Zellen präinkubiert, teilweise die Viren oder die Zellen simultan mit Virus und Inhibitor/Kompetitor infiziert. Sollten Adsorptionsfaktoren ausgeschlossen werden, wurden die Zellen mit 2 µg/ml des Polykations Polybrene (in DMEM, 5% FKS) für eine Stunde präinkubiert und anschließend mit sterilem PBS gewaschen. Eine andere Möglichkeit war die Degradierung der Heparan-Sulfat-Proteoglykane auf der Zelloberfläche mit Heparinase I (Sigma), Heparinase III (Sigma) und als Kontrolle Chondroitinase I (degradiert Chondroitin Sulfate). Die Degradierung mittels Heparinase I und Chondroitinase I erfolgte für eine Stunde bei 37°C, mit einer Unit des Enzyms in 50 µl PBS-M. Die Degradierung mit 1 U Heparinase III (Heparitinase I) erfolgte in 50 µl Zellkulturmedium (DMEM, 5% FKS) für 2 Stunden bei 37°C. Nach einem Waschschrift mit sterilem PBS wurde die *“Single Round”*-Infektion durchgeführt.

5.6.7 β -Galactosidase-Reporter-gen-Nachweis

Die Infektion von TZM-bl Zellen wurde mit einem β -Galactosidase-Reporter-Test nachgewiesen. Die TZM-bl Zellen haben ein HIV β -Galactosidase-Reporter-Gen unter einem Tat Promoter. Wird β -Galactosidase in infizierten Zellen exprimiert, sind diese in der Lage, die glycosidische Bindung von X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) zu schneiden, was eine Dimerisierung und Oxydation zur Folge hat, die zur Bildung eines unlöslichen blauen Farbstoffes führt.

Die Zellen wurden pro Kavität mit 100 μ l 2%igem Formaldehyd 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend folgte die Färbung mit 100 μ l Färbelösung (PBS mit 0,5 mg/ml X-Gal, 3mM $K_3Fe(CN)_6$, 3mM $K_4Fe(CN)_6$, 1mM $MgCl_2$) bei 37°C für 2-4 Stunden.

5.6.8 GFP-Reporter-gen-Nachweis

Ghost-Zellen sind stabil mit einem GFP (*“Green Fluorescence Protein”*)-Reporter-gen transfiziert, das durch einen Tat-Promoter reguliert wird. Wird in der infizierten Zelle GFP exprimiert, kann es direkt unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DMLS) visualisiert werden. Die Zellen wurden mit 1% Formaldehyd in PBS vorher 2 Minuten fixiert.

6. Material

6.1 Chemikalien und Enzyme

Tab. 8: Chemikalien und Enzyme

Substanz	Bezugsquelle
Adenosintriphosphat	Boehringer (Mannheim)
Acrylamid, Gel 30, Gel 40	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Life Technologies (Karlsruhe)
Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Ammoniumpersulfat	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)

Tab. 8: Chemikalien und Enzyme

Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
CEQ2000 DTCS Quickstart Kit	Beckman Coulters (Unterschleißheim)
Chloroform	Serva (Heidelberg)
Chondroitinase	Sigma (Deisenhofen)
CIAP	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Diethylformamid	Sigma (Deisenhofen)
Desoxyribonucleosidtriphosphate	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Dimethylsulfoxid	Merck (Darmstadt)
DMEM	Life Technologies (Karlsruhe)
DMEM, Cystein- und Methionin-frei	Life Technologies (Karlsruhe)
Dithiothreitol	Sigma (Deisenhofen)
Empigen BBTM, 30 % (v/v)	Calbiochem (Schwalbach)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol (96%)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Formamid	Sigma (Deisenhofen)
Fötales Kälberserum	Biochrom (Gründau)
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche (Mannheim)
Glukose	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Sigma (Deisenhofen)
Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
Heparinase I und III	Sigma (Deisenhofen)
HEPES	Biomol (Hamburg)
Hygromycin B	Life Technologies (Karlsruhe)
IPTG	Appllichem (Darmstadt)
Isopropanol (96 %)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid	Merck (Darmstadt)

Tab. 8: Chemikalien und Enzyme

Klenow-Fragment (DNA Polymerase I)	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
LB-Medium	Sigma (Deisenhofen)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Methanol (96%)	Merck (Darmstadt)
Methionin und Cystein, [³⁵ S]-markiert	Amersham Pharmacia
Molekulargewichtstandard, GenRuler™ 100 bp	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Molekulargewichtstandard, GenRuler™ 1 kb	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
Penicillin	Life Technologies (Karlsruhe)
Pfu DNA Polymerase	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Phenol/Chloroform	Sigma (Deisenhofen)
Polybrene®	Sigma (Deisenhofen)
Puromycin	Sigma (Deisenhofen)
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
RNeasy Blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Salzsäure, 37% (v/v)	Sigma (Deisenhofen)
Streptomycin	Life Technologies (Karlsruhe)
Taq DNA Polymerase	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Tetramethylethylendiamin	Sigma (Deisenhofen)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
Trypsin/EDTA	Life Technologies (Karlsruhe)

Tab. 8: Chemikalien und Enzyme

Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Trypton	Life Technologies (Karlsruhe)
Tween-20	Serva (Heidelberg)
X-Gal	Applichem (Darmstadt)
Xylencyanol	Serva (Heidelberg)

6.2 Antikörper

Tab. 9: verwendete Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-HIV-1 p24 D7320 (Schaf)	Biochrom, Berlin
Anti gp120 polyklonal (Ziege)	Acris GmbH, Herford
Anti gp120 D7324 (Schaf), Alkaline Phosphatase konjugiert	Aalto, (Dublin)
Anti goat IgG (Kaninchen), Peroxidase konjugiert	Sigma (Deisenhofen)
monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope von gp120 und Chemokinen	Aids-Reagent, NIBSC, London

6.3 Seren

Tab. 10: verwendete Seren

Seren	Bezugsquelle
anti p24 Kaninchen Serum	H.-G. Kräusslich, Heidelberg
HIV-1 Subtyp-B-Positivserum	Serumgemisch aus 40 HIV subtyp B Patienten
HIV-1 Subtyp-A-Positivserum	Serumgemisch aus 10 HIV subtyp A Patienten
HIV-Negativserum	Serumgemisch aus 40 HIV negativen Patienten

6.4 Verwendete Puffer und Medien

Tab. 11: verwendete Puffer und Medien

Puffer	Zusammensetzung
TEA Puffer (50x)	2 mM Tris-Base, 0,25 M Essigsäure, 0,05 M EDTA
PBS Puffer (50x)	120 mM NaCl, 17mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBS-T	PBS, 0,05% Tween 20
PBS-M	PBS, 50 mM MgCl ₂
Blockpuffer	PBS-T, 5% FKS
Coating Puffer	150 mM Na ₂ HCO ₃ , pH 8,5
TSS	LB Medium, 10% w/v PEG 3350, 5% v/v DMSO, 50 mM MgCl ₂ , pH 6,5, sterilfiltriert
DNA Ladepuffer	0,09 % Bromphenolblau, 0,09% Xylencyanol, 60% Glycerol, 60mM EDTA
X-Gal Substratlösung	PBS, 0,5 mg/ml X-Gal, 3mM K ₃ Fe(CN) ₆ , 3mM K ₄ Fe(CN) ₆ , 1 mM MgCl ₂
BCIP/NBT Substratlösung	330µg/ml NBT, 166µg/ml BCIP , 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 50 mM MgCl ₂
Zelllyse Puffer	50mM Tris-Cl pH 7,4, 1mM EDTA, 0,5 % SDS
TNA Puffer	50 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,6 % Triton-X, 1,24 mg/ml BSA
Transferpuffer	192 mM Glycin, 25mM Tris-Base, 20% v/v Ethanol (oder Methanol)
SDS-Page Elektrophoresepuffer	192 mM Glycin, 25mM Tris-Base, 0,1% SDS
Laemmli Probenpuffer	5mM Tris/HCl (pH 6,8), 200mM DTT, 5% SDS, 20% Glycerin, 0,03 % Pyronin Y
dYT Medium	16g/l Bacto-Pepton, 10 g/l Hefe Extrakt, 5 g/l NaCl, pH 7 autoklaviert
LB-Medium	10g/l Bacto-Pepton, 5 g/l Hefe Extrakt, 5g/l NaCl, pH 7 autoklaviert
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/ml Bactoagar, pH7 autoklaviert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose

7. Literaturverzeichnis

Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-1958.

Almond, N., A. Jenkins, A. B. Heath, and P. Kitchin. 1993. Sequence variation in the env gene of simian immunodeficiency virus recovered from immunized macaques is predominantly in the V1 region. *J. Gen. Virol.* **74 (Pt 5)**:865-871.

Argyris, E. G., E. Acheampong, G. Nunnari, M. Mukhtar, K. J. Williams, and R. J. Pomerantz. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 enters primary human brain microvascular endothelial cells by a mechanism involving cell surface proteoglycans independent of lipid rafts. *J. Virol.* **77**:12140-12151.

Back, N. K., L. Smit, J. J. De Jong, W. Keulen, M. Schutten, J. Goudsmit, and M. Tersmette. 1994. An N-glycan within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop affects virus neutralization. *Virology* **199**:431-438.

Bernfield, M., M. Gotte, P. W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum, and M. Zako. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* **68**:729-777.

Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.

Bjorndal, A., H. Deng, M. Jansson, J. R. Fiore, C. Colognesi, A. Karlsson, J. Albert, G. Scarlatti, D. R. Littman, and E. M. Fenyo. 1997. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J. Virol.* **71**:7478-7487.

Bobardt, M. D., A. C. Saphire, H. C. Hung, X. Yu, S. B. Van der, Z. Zhang, G. David, and P. A. Gally. 2003. Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity.* **18**:27-39.

Bobardt, M. D., P. Salmon, L. Wang, J. D. Esko, D. Gabuzda, M. Fiala, D. Trono, S. B. Van der, G. David, and P. A. Gally. 2004. Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. *J. Virol.* **78**:6567-6584.

Bolivar, F., R. L. Rodriguez, M. C. Betlach, and H. W. Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* **2**:75-93.

Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, and H. W. Boyer. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.

Bonhoeffer, S., E. C. Holmes, and M. A. Nowak. 1995. Causes of HIV diversity. *Nature* **376**:125.

- Bou-Habib, D. C., G. Roderiquez, T. Oravec, P. W. Berman, P. Lusso, and M. A. Norcross.** 1994. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J. Virol.* **68**:6006-6013.
- Bron, R., P. J. Klasse, D. Wilkinson, P. R. Clapham, A. Pelchen-Matthews, C. Power, T. N. Wells, J. Kim, S. C. Peiper, J. A. Hoxie, and M. Marsh.** 1997. Promiscuous use of CC and CXC chemokine receptors in cell-to-cell fusion mediated by a human immunodeficiency virus type 2 envelope protein. *J. Virol.* **71**:8405-8415.
- Callahan, L. N., M. Phelan, M. Mallinson, and M. A. Norcross.** 1991. Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp120-CD4 interactions. *J. Virol.* **65**:1543-1550.
- Chaconas, G. and J. H. van de Sande.** 1980. 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol.* **65**:75-85.
- Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-273.
- Chen, H., X. Xu, A. Bishop, and I. M. Jones.** 2005. Reintroduction of the 2G12 epitope in an HIV-1 clade C gp120. *AIDS* **19**:833-835.
- Chertova, E., J. J. Bess, Jr., B. J. Crise, R. C. Sowder II, T. M. Schaden, J. M. Hilburn, J. A. Hoxie, R. E. Benveniste, J. D. Lifson, L. E. Henderson, and L. O. Arthur.** 2002. Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **76**:5315-5325.
- Chesebro, B., K. Wehrly, J. Nishio, and S. Perryman.** 1992. Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J. Virol.* **66**:6547-6554.
- Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski.** 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**:1135-1148.
- Chu, J. J., R. Rajamanonmani, J. Li, R. Bhuvanakantham, J. Lescar, and M. L. Ng.** 2005. Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **86**:405-412.
- Chung, C. T., S. L. Niemela, and R. H. Miller.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:2172-2175.
- Cicala, C., J. Arthos, S. M. Selig, G. Dennis, Jr., D. A. Hosack, D. Van Ryk, M. L. Spangler, T. D. Steenbeke, P. Khazanie, N. Gupta, J. Yang, M. Daucher, R. A. Lempicki, and A. S. Fauci.** 2002. HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:9380-9385.

- Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, A. Cara, R. C. Gallo, and P. Lusso.** 1996. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat. Med.* **2**:1244-1247.
- Connor, R. I., H. Mohri, Y. Cao, and D. D. Ho.** 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**:1772-1777.
- Cormier, E. G. and T. Dragic.** 2002. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J. Virol.* **76**:8953-8957.
- Cornelissen, M., G. Mulder-Kampinga, J. Veenstra, F. Zorgdrager, C. Kuiken, S. Hartman, J. Dekker, H. L. van der, C. Sol, R. Coutinho, and .** 1995. Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population. *J. Virol.* **69**:1810-1818.
- Dacheux, L., A. Moreau, Y. Ataman-Onal, F. Biron, B. Verrier, and F. Barin.** 2004. Evolutionary dynamics of the glycan shield of the human immunodeficiency virus envelope during natural infection and implications for exposure of the 2G12 epitope. *J. Virol.* **78**:12625-12637.
- Delwart, E. L., J. I. Mullins, P. Gupta, G. H. Learn, Jr., M. Holodniy, D. Katzenstein, B. D. Walker, and M. K. Singh.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen. *J. Virol.* **72**:617-623.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**:661-666.
- Dick, A. D., M. Pell, B. J. Brew, E. Foulcher, and J. D. Sedgwick.** 1997. Direct ex vivo flow cytometric analysis of human microglial cell CD4 expression: examination of central nervous system biopsy specimens from HIV-seropositive patients and patients with other neurological disease. *AIDS* **11**:1699-1708.
- Dirckx, L., D. Lindemann, R. Ette, C. Manzoni, D. Moritz, and J. Mous.** 1990. Mutation of conserved N-glycosylation sites around the CD4-binding site of human immunodeficiency virus type 1 GP120 affects viral infectivity. *Virus Res.* **18**:9-20.
- Dong, X. N., X. Chen, Y. Chen, A. Ablimit, Z. Ye, Y. Wu, and Y. H. Chen.** 2005. Short communication: HIV type 1 phenotype, tropism, and sequence patterns: association and preference. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **21**:234-238.
- Earl, P. L., B. Moss, and R. W. Doms.** 1991. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **65**:2047-2055.

Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**:872-877.

Fenouillet, E., J. C. Gluckman, and I. M. Jones. 1994. Functions of HIV envelope glycans. *Trends Biochem. Sci.* **19**:65-70.

Fouchier, R. A., M. Brouwer, S. M. Broersen, and H. Schuitemaker. 1995. Simple determination of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing V3 genotype by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**:906-911.

Fouts, T. R., J. M. Binley, A. Trkola, J. E. Robinson, and J. P. Moore. 1997. Neutralization of the human immunodeficiency virus type 1 primary isolate JR-FL by human monoclonal antibodies correlates with antibody binding to the oligomeric form of the envelope glycoprotein complex. *J. Virol.* **71**:2779-2785.

Freed, E. O., D. J. Myers, and R. Risser. 1989. Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J. Virol.* **63**:4670-4675.

Freed, E. O. and M. A. Martin. 1995. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J. Biol. Chem.* **270**:23883-23886.

Geijtenbeek, T. B. and Y. van Kooyk. 2003. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **276**:31-54.

Gelderblom, H. R. 1991. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5**:617-637.

Gilbert, M., J. Kirihaara, and J. Mills. 1991. Enzyme-linked immunoassay for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein 120. *J. Clin. Microbiol.* **29**:142-147.

Gilbert, P. B., Y. L. Chiu, M. Allen, D. N. Lawrence, C. Chapdu, H. Israel, D. Holman, M. C. Keefer, M. Wolff, and S. E. Frey. 2003. Long-term safety analysis of preventive HIV-1 vaccines evaluated in AIDS vaccine evaluation group NIAID-sponsored Phase I and II clinical trials. *Vaccine* **21**:2933-2947.

Goudsmit, J., L. G. Epstein, D. A. Paul, H. J. van der Helm, G. J. Dawson, D. M. Asher, R. Yanagihara, A. V. Wolff, C. J. Gibbs, Jr., and D. C. Gajdusek. 1987. Intra-blood-brain barrier synthesis of human immunodeficiency virus antigen and antibody in humans and chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**:3876-3880.

Graneli-Piperno, A., E. Delgado, V. Finkel, W. Paxton, and R. M. Steinman. 1998. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J. Virol.* **72**:2733-2737.

Hallenberger, S., M. Moulard, M. Sordel, H. D. Klenk, and W. Garten. 1997. The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J. Virol.* **71**:1036-1045.

- Harrop, H. A., D. R. Coombe, and C. C. Rider.** 1994. Heparin specifically inhibits binding of V3 loop antibodies to HIV-1 gp120, an effect potentiated by CD4 binding. *AIDS* **8**:183-192.
- Hart, T. K., A. M. Klinkner, J. Ventre, and P. J. Bugelski.** 1993. Morphometric analysis of envelope glycoprotein gp120 distribution on HIV-1 virions. *J. Histochem. Cytochem.* **41**:265-271.
- Hill, C. M., H. Deng, D. Unutmaz, V. N. Kewalramani, L. Bastiani, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, and D. R. Littman.** 1997. Envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus can use human CCR5 as a coreceptor for viral entry and make direct CD4-dependent interactions with this chemokine receptor. *J. Virol.* **71**:6296-6304.
- Jensen, M. A., F. S. Li, A. B. 't Wout, D. C. Nickle, D. Shriner, H. X. He, S. McLaughlin, R. Shankarappa, J. B. Margolick, and J. I. Mullins.** 2003. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J. Virol.* **77**:13376-13388.
- Klasse, P. J. and J. P. Moore.** 2004. Is there enough gp120 in the body fluids of HIV-1-infected individuals to have biologically significant effects? *Virology* **323**:1-8.
- Koch, M., M. Pancera, P. D. Kwong, P. Kolchinsky, C. Grundner, L. Wang, W. A. Hendrickson, J. Sodroski, and R. Wyatt.** 2003. Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology* **313**:387-400.
- Kolchinsky, P., E. Kiprilov, P. Bartley, R. Rubinstein, and J. Sodroski.** 2001. Loss of a single N-linked glycan allows CD4-independent human immunodeficiency virus type 1 infection by altering the position of the gp120 V1/V2 variable loops. *J. Virol.* **75**:3435-3443.
- Kuhmann, S. E., E. J. Platt, S. L. Kozak, and D. Kabat.** 2000. Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **74**:7005-7015.
- Kwon, D. S., G. Gregorio, N. Bitton, W. A. Hendrickson, and D. R. Littman.** 2002. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity.* **16**:135-144.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson.** 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**:648-659.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, S. Majeed, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson.** 2000. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure. Fold. Des* **8**:1329-1339.
- Labrosse, B., C. Treboute, A. BreLOT, and M. Alizon.** 2001. Cooperation of the V1/V2 and V3 domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120 for interaction with the CXCR4 receptor. *J. Virol.* **75**:5457-5464.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Layne, S. P., M. J. Merges, M. Dembo, J. L. Spouge, and P. L. Nara. 1990. HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection. *Nature* **346**:277-279.

Layne, S. P., M. J. Merges, M. Dembo, J. L. Spouge, S. R. Conley, J. P. Moore, J. L. Raina, H. Renz, H. R. Gelderblom, and P. L. Nara. 1992. Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology* **189**:695-714.

Leonard, C. K., M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory. 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**:10373-10382.

Li, Y., L. Luo, N. Rasool, and C. Y. Kang. 1993. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J. Virol.* **67**:584-588.

Li, Y., M. A. Rey-Cuille, and S. L. Hu. 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**:1473-1479.

Liu, Y., X. P. Tang, J. C. McArthur, J. Scott, and S. Gartner. 2000. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gp160 sequences from a patient with HIV dementia: evidence for monocyte trafficking into brain. *J. Neurovirol.* **6 Suppl 1**:S70-S81.

Malenbaum, S. E., D. Yang, L. Cavacini, M. Posner, J. Robinson, and C. Cheng-Mayer. 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**:11008-11016.

Malenbaum, S. E., D. Yang, and C. Cheng-Mayer. 2001. Evidence for similar recognition of the conserved neutralization epitopes of human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 in humans and macaques. *J. Virol.* **75**:9287-9296.

Mandel, G. and W. Wickner. 1979. Translational and post-translational cleavage of M13 procoat protein: extracts of both the cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* contain leader peptidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**:236-240.

Maniatis, T., J. Sambrook, and E. F. Fritsch. 1982. *Molecular cloning a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Masciotra, S., S. M. Owen, D. Rudolph, C. Yang, B. Wang, N. Saksena, T. Spira, S. Dhawan, and R. B. Lal. 2002. Temporal relationship between V1V2 variation, macrophage replication, and coreceptor adaptation during HIV-1 disease progression. *AIDS* **16**:1887-1898.

Mbemba, E., V. Carre, A. Atemezem, L. Saffar, J. C. Gluckman, and L. Gattegno. 1996. Inhibition of human immunodeficiency virus infection of CD4+ cells by CD4-free glycopeptides from monocytic U937 cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**:47-53.

McCaffrey, R. A., C. Saunders, M. Hensel, and L. Stamatatos. 2004. N-linked glycosylation of

the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *J. Virol.* **78**:3279-3295.

McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, and I. L. Weissman. 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**:55-67.

Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert, and F. S. Cohen. 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J. Cell Biol.* **151**:413-423.

Meng, G., X. Wei, X. Wu, M. T. Sellers, J. M. Decker, Z. Moldoveanu, J. M. Orenstein, M. F. Graham, J. C. Kappes, J. Mestecky, G. M. Shaw, and P. D. Smith. 2002. Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. *Nat. Med.* **8**:150-156.

Misse, D., M. Cerutti, N. Noraz, P. Jourdan, J. Favero, G. Devauchelle, H. Yssel, N. Taylor, and F. Veas. 1999. A CD4-independent interaction of human immunodeficiency virus-1 gp120 with CXCR4 induces their cointernalization, cell signaling, and T-cell chemotaxis. *Blood* **93**:2454-2462.

Modrow, S., B. H. Hahn, G. M. Shaw, R. C. Gallo, F. Wong-Staal, and H. Wolf. 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**:570-578.

Mondor, I., S. Ugolini, and Q. J. Sattentau. 1998. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J. Virol.* **72**:3623-3634.

Moore, J. P. and P. J. Klasse. 1992. Thermodynamic and kinetic analysis of sCD4 binding to HIV-1 virions and of gp120 dissociation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:443-450.

Moore, J. P. and J. Binley. 1998. HIV. Envelope's letters boxed into shape. *Nature* **393**:630-631.

Moulard, M., H. Lortat-Jacob, I. Mondor, G. Roca, R. Wyatt, J. Sodroski, L. Zhao, W. Olson, P. D. Kwong, and Q. J. Sattentau. 2000. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* **74**:1948-1960.

Moyle, G. J., A. Wildfire, S. Mandalia, H. Mayer, J. Goodrich, J. Whitcomb, and B. G. Gazzard. 2005. Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **191**:866-872.

Nabatov, A. A., G. Pollakis, T. Linnemann, A. Kliphuis, M. I. Chalaby, and W. A. Paxton. 2004. Inpatient alterations in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V1V2 and V3 regions differentially modulate coreceptor usage, virus inhibition by CC/CXC chemokines, soluble CD4, and the b12 and 2G12 monoclonal antibodies. *J. Virol.* **78**:524-530.

- Nakayama, E. E., T. Shioda, M. Tatsumi, X. Xin, D. Yu, S. Ohgimoto, A. Kato, Y. Sakai, Y. Ohnishi, and Y. Nagai.** 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**:367-372.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt.** 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**:255-262.
- Neurath, A. R., N. Strick, P. Sproul, L. Baker, P. Rubinstein, C. E. Stevens, P. Taylor, R. C. Gallo, J. W. Gold, Y. S. Lee, and .** 1985. Radioimmunoassay and enzyme-linked immunoassay of antibodies to the core protein (P24) of human T-lymphotropic virus (HTLV III). *J. Virol. Methods* **11**:75-86.
- O'Doherty, U., W. J. Swiggard, and M. H. Malim.** 2000. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J. Virol.* **74**:10074-10080.
- Ogert, R. A., M. K. Lee, W. Ross, A. Buckler-White, M. A. Martin, and M. W. Cho.** 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.
- Oh, S. K., W. W. Cruikshank, J. Raina, G. C. Blanchard, W. H. Adler, J. Walker, and H. Kornfeld.** 1992. Identification of HIV-1 envelope glycoprotein in the serum of AIDS and ARC patients. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **5**:251-256.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, J. F. Demarest, L. Butini, M. Montroni, C. H. Fox, J. M. Orenstein, D. P. Kotler, and A. S. Fauci.** 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**:355-358.
- Papuashvili, M. N., A. S. Novokhatsky, and T. I. Shcherbakova.** 2005. Characteristics of HIV-1 env V3 loop sequences for subtype A1 variant spread in Eastern Europe. *Infect. Genet. Evol.* **5**:45-53.
- Pastore, C., A. Ramos, and D. E. Mosier.** 2004. Intrinsic obstacles to human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching. *J. Virol.* **78**:7565-7574.
- Pinter, A., W. J. Honnen, Y. He, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, and S. C. Kayman.** 2004. The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J. Virol.* **78**:5205-5215.
- Pollakis, G., S. Kang, A. Kliphuis, M. I. Chalaby, J. Goudsmit, and W. A. Paxton.** 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**:13433-13441.
- Polzer, S., M. T. Dittmar, H. Schmitz, B. Meyer, H. Muller, H. G. Krausslich, 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**:11-19.
- Polzer, S., M. T. Dittmar, H. Schmitz, and M. Schreiber.** 2002. The N-linked glycan g15 within

the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology* **304**:70-80.

Pratt, R. D., J. F. Shapiro, N. McKinney, S. Kwok, and S. A. Spector. 1995. Virologic characterization of primary human immunodeficiency virus type 1 infection in a health care worker following needlestick injury. *J. Infect. Dis.* **172**:851-854.

Pyle, S. W., J. W. Bess, Jr., W. G. Robey, P. J. Fischinger, R. V. Gilden, and L. O. Arthur. 1987. Purification of 120,000 dalton envelope glycoprotein from culture fluids of human immunodeficiency virus (HIV)-infected H9 cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **3**:387-400.

Reece, J. C., A. J. Handley, E. J. Anstee, W. A. Morrison, S. M. Crowe, and P. U. Cameron. 1998. HIV-1 selection by epidermal dendritic cells during transmission across human skin. *J. Exp. Med.* **187**:1623-1631.

Reeves, J. D., S. Hibbitts, G. Simmons, A. McKnight, J. M. Azevedo-Pereira, J. Moniz-Pereira, and P. R. Clapham. 1999. Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo. *J. Virol.* **73**:7795-7804.

Regoes, R. R. and S. Bonhoeffer. 2005. The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective. *Trends Microbiol.* **13**:269-277.

Reynard, F., A. Fatmi, B. Verrier, and F. Bedin. 2004. HIV-1 acute infection env glycomutants designed from 3D model: effects on processing, antigenicity, and neutralization sensitivity. *Virology* **324**:90-102.

Rizzuto, C. and J. Sodroski. 2000. Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**:741-749.

Rizzuto, C. D., R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, and J. Sodroski. 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**:1949-1953.

Rosen, O., J. Chill, M. Sharon, N. Kessler, B. Mester, S. Zolla-Pazner, and J. Anglister. 2005. Induced fit in HIV-neutralizing antibody complexes: evidence for alternative conformations of the gp120 V3 loop and the molecular basis for broad neutralization. *Biochemistry* **44**:7250-7258.

Saiki, R. K., T. L. Bugawan, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1986. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**:163-166.

Sambrook, J., T. Maniatis, and E. F. Fritsch. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanders, R. W., M. Venturi, L. Schiffner, R. Kalyanaraman, H. Katinger, K. O. Lloyd, P. D. Kwong, and J. P. Moore. 2002. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody

2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J. Virol.* **76**:7293-7305.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**:104-108.

Saphire, A. C., M. D. Bobardt, Z. Zhang, G. David, and P. A. Gallay. 2001. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J. Virol.* **75**:9187-9200.

Sattentau, Q. J., S. Zolla-Pazner, and P. Pognard. 1995. Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. *Virology* **206**:713-717.

Sattentau, Q. J. and J. P. Moore. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer. *J. Exp. Med.* **182**:185-196.

Scanlan, C. N., R. Pantophlet, M. R. Wormald, S. E. Ollmann, R. Stanfield, I. A. Wilson, H. Katinger, R. A. Dwek, P. M. Rudd, and D. R. Burton. 2002. The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J. Virol.* **76**:7306-7321.

Scarlatti, G., E. Tresoldi, A. Bjorndal, R. Fredriksson, C. Colognesi, H. K. Deng, M. S. Malnati, A. Plebani, A. G. Siccardi, D. R. Littman, E. M. Fenyo, and P. Lusso. 1997. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat. Med.* **3**:1259-1265.

Schellekens, P. T., M. T. Roos, F. De Wolf, J. M. Lange, and F. Miedema. 1990. Low T-cell responsiveness to activation via CD3/TCR is a prognostic marker for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infected men. *J. Clin. Immunol.* **10**:121-127.

Schneider, J., O. Kaaden, T. D. Copeland, S. Oroszlan, and G. Hunsmann. 1986. Shedding and interspecies type sero-reactivity of the envelope glycopolyptide gp120 of the human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* **67 (Pt 11)**:2533-2538.

Schols, D. and E. De Clercq. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production. *J. Virol.* **70**:4953-4960.

Schonning, K., B. Jansson, S. Olofsson, J. O. Nielsen, and J. S. Hansen. 1996. Resistance to V3-directed neutralization caused by an N-linked oligosaccharide depends on the quaternary structure of the HIV-1 envelope oligomer. *Virology* **218**:134-140.

Shankarappa, R., J. B. Margolick, S. J. Gange, A. G. Rodrigo, D. Upchurch, H. Farzadegan, P. Gupta, C. R. Rinaldo, G. H. Learn, X. He, X. L. Huang, and J. I. Mullins. 1999. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **73**:10489-10502.

Shuman, S. 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269**:32678-32684.

Sonza, S., A. Maerz, S. Uren, A. Violo, S. Hunter, W. Boyle, and S. Crowe. 1995.

Susceptibility of human monocytes to HIV type 1 infection in vitro is not dependent on their level of CD4 expression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**:769-776.

Suphaphiphat, P., A. Thitithanyanont, S. Paca-Uccaralertkun, M. Essex, and T. H. Lee. 2003. Effect of amino acid substitution of the V3 and bridging sheet residues in human immunodeficiency virus type 1 subtype C gp120 on CCR5 utilization. *J. Virol.* **77**:3832-3837.

Sweet, R. W., A. Truneh, and W. A. Hendrickson. 1991. CD4: its structure, role in immune function and AIDS pathogenesis, and potential as a pharmacological target. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**:622-633.

Trkola, A., T. Ketas, V. N. Kewalramani, F. Endorf, J. M. Binley, H. Katinger, J. Robinson, D. R. Littman, and J. P. Moore. 1998. Neutralization sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates to antibodies and CD4-based reagents is independent of coreceptor usage. *J. Virol.* **72**:1876-1885.

van't Wout, A. B., N. A. Kootstra, G. A. Mulder-Kampinga, N. Albrecht-van Lent, H. J. Scherpbier, J. Veenstra, K. Boer, R. A. Coutinho, F. Miedema, and H. Schuitemaker. 1994. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J. Clin. Invest* **94**:2060-2067.

van't Wout, A. B., L. J. Ran, C. L. Kuiken, N. A. Kootstra, S. T. Pals, and H. Schuitemaker. 1998. Analysis of the temporal relationship between human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *J. Virol.* **72**:488-496.

Varki, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**:97-130.

Veazey, R. S. and A. A. Lackner. 2004. Getting to the guts of HIV pathogenesis. *J. Exp. Med.* **200**:697-700.

Vranken, W. F., F. Fant, M. Budesinsky, and F. A. Borremans. 2001. Conformational model for the consensus V3 loop of the envelope protein gp120 of HIV-1 in a 20% trifluoroethanol/water solution. *Eur. J. Biochem.* **268**:2620-2628.

Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani, J. M. Kilby, M. S. Saag, X. Wu, G. M. Shaw, and J. C. Kappes. 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1896-1905.

Wei, X., J. M. Decker, S. Wang, H. Hui, J. C. Kappes, X. Wu, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G. Salazar, J. M. Kilby, M. S. Saag, N. L. Komarova, M. A. Nowak, B. H. Hahn, P. D. Kwong, and G. M. Shaw. 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**:307-312.

Wu, L., N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**:179-183.

Yamaguchi, Y. and T. Gojobori. 1997. Evolutionary mechanisms and population dynamics of

the third variable envelope region of HIV within single hosts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **94**:1264-1269.

Yonezawa, A., T. Hori, A. Takaori-Kondo, R. Morita, and T. Uchiyama. 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**:4258-4267.

Zhang, Y. J., T. Hatziioannou, T. Zang, D. Braaten, J. Luban, S. P. Goff, and P. D. Bieniasz. 2002. Envelope-dependent, cyclophilin-independent effects of glycosaminoglycans on human immunodeficiency virus type 1 attachment and infection. J. Virol. **76**:6332-6343.

Zhu, P., E. Chertova, J. Bess, Jr., J. D. Lifson, L. O. Arthur, J. Liu, K. A. Taylor, and K. H. Roux. 2003. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **100**:15812-15817.

Zhu, X., C. Borchers, R. J. Bienstock, and K. B. Tomer. 2000. Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. Biochemistry **39**:11194-11204.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichniss

μ	mikro
Abb.	Abbildung
AIDS	<u>A</u> quired <u>I</u> mmunodeficiency <u>S</u> ndrome
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CD4bs	CD4 <u>b</u> inding <u>s</u> ite
CD4i	CD4 <u>i</u> nduced
DC-Sign	<u>D</u> ublecos <u>M</u> odified <u>E</u> agles <u>M</u> edium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxyribonukleinsäure
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
et al.	et alii - und andere
ffu	<u>f</u> ocus <u>f</u> orming <u>u</u> nits
FKS	<u>F</u> ötale <u>K</u> älber <u>S</u> erum
GAG	<u>G</u> lykos <u>a</u> minoglykan
<i>gag</i>	group specific antigen, Gen des HIV
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HA	Hemagglutinin
HIV	Human immunodeficiency virus
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
IN	Integrase
l	Liter
LB	Luria Betani

m	mili
M	molar
min	Minute
MDM	monocyte derived makrophage
MIP	makrophage inflammatory protein
n	nano
NSI	nicht Synzytium induzierend
p	pico
PR	Protease
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>pol</i>	Polymerase Gen des HIV
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
R5-trop	CCR5-trop
RANTES	<u>R</u> egulated upon <u>A</u> ctivation, <u>N</u> ormal <u>T</u> -cell <u>E</u> xpressed and <u>S</u> ecreted
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
rpm	rounds per minute
R5X4-trop	CCR5/CXCR4-trop
SI	<u>S</u> ynzytium <u>I</u> nduzierend
SDF-1	<u>S</u> tromal <u>D</u> erived <u>E</u> actor
SOE-PCR	<u>S</u> ingle <u>O</u> verlap <u>E</u> xtension PCR
tat	transactivation of transcription
Tab.	Tabelle
Tris	(trimethylsilyl)silan
T-trop	T-Zell trop
U	unit
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V1-V5	variable Regionen 1-5 des gp120
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid

z.B.

zum Beispiel

8.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Begasungswärmeschrank	Heraeus (Hamburg)
Blot-Anlage, Blot-Mini-V8.10	BioRad (München)
Centromat® BS-T, Orbitalinkubator	Braun (Melsungen)
CEQTM2000 DNA Analyse System	Beckman Coulters
Elektrophoreseanlage Mini Protean II	BioRad (München)
Elektrophoreseanlage HORIZON 58	(Bethesda, USA)
Elektrophoreseanlage SE660	Hoefer Pharmacia
Horizontalschüttler KL2	Wilke und Witzler (Hamburg)
KingFisher Thermo	LabSystems (Egelsbach)
Laborwaage	Satorius (Göttingen)
Lichtmikroskop	Leitz (Wetzlar)
Magnetrührer, heizbar	Ikamag (Staufen)
Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	Brand (Wertheim)
pH-Meter	Schott (Mainz)
Pipetten	Gilson
Photometer, Lambda E	MWG-Biotech (Ebersberg)
Quarzküvetten	Hellma (Jena)
Rotoren, HFA22.50, HFA14.290	Heraeus (Hamburg)
Rotor, 5094A	Hettich (Tuttlingen)
Rotor, A-4-44	Eppendorf (Hamburg)
Spektrophotometer UV-160A	Shimadzu (Hamburg)
Thermocycler, Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer, compact	Eppendorf (Hamburg)
UV-Geldokumentationsgerät	Kodak Deutschland
Videodokumentation UP-895 CE	Sony Deutschland
Vortex Gene 2	Bender und Hobein (Zürich)

Wärmeschrank, Modell 600	Memmert (Schwabach)
Wasserbad GFL1003	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge, Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge ROTANTA/R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Superfuge 22	Heraeus (Hamburg)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)

8.3 Aminosäuren

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

8.4 Oligonukleotide:

92UG03-1:

5' GTGCGCATCAGATCTGAGAACATCAGCAACAACGC
CAAGACCATCATCGTGCAGCTGCACACCCCGTGAAC
ATCAGCTGCATCCGCCCAACAACAACACCCGCAAGA
GCGTGCGTATCGGCCCGGCCAGG-3'

92UG03-2:

5' TCTTGTCCACTCGCTTCTAGACACGGTGCAGTGG
GCCTGGCGGATGTTGCCGATGATGTGCGCGGTGGCGT
AGAACGCTGGCCGGGGCCGATACGCACG-3'

92UG03 fw:

5' -GTGCGCATCAGATCTGAG-3'

92UG03 rev:

5' -TCTTGTCCACTCGCTTC-3'

NL-V3-A Glykosylierungsprimer:

-g12 N->Q fw:

5' -CAGATCTGAGCAGATCAGCAAC-3'

-g12 N->Q rev:

5' -GTTGCTGATCTGCTCAGATCTG-3'

+g13 VQL->NQL fw:

5' -GACCATCATCAACCAGCTGCACA-3'

+g13 VQL->NQL rev:

5' -TGTGCAGCTGGTTGATGATGGTC-3'

+g13 NQL->NQT fw:

5' -CATCAACCAGACGCACACCCCG-3'

+g13 NQL->NQT rev:

5' -CGGGGGTGTGCGTCTGGTTGAT-3'

-g14 N->Q fw:

5' -CACCCCGTGCAGATCAGCTGCA-3'

-g14 N->Q rev:

5' -TGCAGCTGATCTGCACGGGGGTG-3'

-g15 N->Q fw:

5' -CCGCCCAACCAGAACACCCGCA-3'

-g15 N->Q rev:

5' -TGCGGGTGTCTGGTTGGGGCGG-3'

+g16 T->N fw:

5' -GGCCCACTGCAACGTGTCTAGAA-3'

+g16 T->N rev:

5' -TTCTAGACACGTTGCAGTGGGCC-3'

V3-Loop Sequenzierprimer:

V3-not fw:

5' -CCAATTCACATACATTATTGTGCC-3'

V3-not rev:

5' -ATACATTGCTTTTCTACTTCTGC-3'

Expressionsvektor pgp160:

pSVrevATG160 -BamHI (3427) fw:

5' -TATCATGTCTGGCTCCTCTACGCCG-3'

pSVrevATG160 -BamHI (3427) rev:

5' -CGGCGTAGAGGAGCCAGACATGATA-3'

NL-A_{R5} Glykosylierungsprimer:

V3-Loop Amplifikationsprimer:

V001 fw:

5' -ATGATTAGATCTGAAAAT-3'

V001 rev:

5' -GTTGTAAAGCTTCCTTC-3'

V001 +g13 VKP-> VTS fw:

5' -ATTGGTTACGTCTGTAAGAATCA-3'

V001 +g13 VKP-> VTS rev:

5' -TGATTCTTACAGACGTAACCAAT-3'

V001 +g13 VTS-> NTS fw:

5' -AGTACAATTGAATACGTCTGTAA-3'

V001 +g13 VTS-> NTS rev:

5' -TTACAGACGTATTCAATTGTACT-3'

V001 -g15 N->Q fw:

5' -CAGACCTAACCAGAATAACAATAC-3'

V001 -g15 N->Q rev:

5' -GTATTGTATTCTGGTTAGGTCTG-3'

V001 -g12 N->Q fw:

5' -AGATCTGAACAGATCACAAACA-3'

V001 -g12 N->Q rev:

5' -TGTTTGTGATCTGTTTCAGATCT-3'

V001 +g13 NTS->NKS fw:

5' -GTACAATTGAATAAGTCTGTAAGAATC-3'

V001 +g13 NTS->NKS rev:

5' -GATTCTTACAGACTTATTCAATTGTAC-3'

V001 +g13 NTS->NTP fw:

5' -CAATTGAATACGCCTGTAAGAATCAAT-3'

V001 +g13 NTS->NTP rev:

5' -ATTGATTCTTACAGGCGTATTCAATTG-3'

V3-Loop Sequenzierprimer:

V3-fw seq pBD6.15:

5' -CATGCAAGAATGTGAGTACAGTACA-3'

V3-rev seq pBD6.15:

5' -CATGCAAGAATGTGAGTACAGTACA-3'

NL-A_{x4} Glykosylierungsprimer:**env Amplifikationsprimer:****pBD env fw:**

5' - AAGTTGTGGGTACCCGTATACTAT - 3'

pBD env rev:

5' - GCAAGTGCTAAGGATCCGCTCACTA - 3'

pBD +g13 P->S fw:

5' - GCTGGTTACTTCTGTAAAAATTA - 3'

pBD +g13 P->S rev:

5' - AATTTTTTACAGAAGTAACCAG - 3'

pBD +g13 V->N fw:

5' - TAGTACAGCTGAATACTTCTCTAAAA - 3'

pBD +g13 V->N rev:

5' - TTTTAGAGAAGTATTCAGCTGTACTA - 3'

pBD +g15 fw:

5' - TAGTACAGCTGAATACTTCTCTAAAA - 3'

pBD +g13 V->N rev:

5' - TTTTAGAGAAGTATTCAGCTGTACTA - 3'

pBD GNPI->GNNI fw:

5' - ACCTGGCAATAATATAAGAAAAAG - 3'

pBD GNPI->GNNI rev:

5' - CTTTTTCTTATATTATTGCCAGGT - 3'

pBD GNPI->NNPI fw:

5' - TACCAGACCTAACAAATAATATAAG - 3'

pBD GNPI->NNPI rev:

5' - CTTATATTATTGTTAGGTCTGGTA - 3'

pBD GNNI->GNNT fw:

5' - CTGGCAATAATACAAGAAAAAGGGT - 3'

pBD GNNI->GNNT rev:

5' - ACCCTTTTTCTTGTATTATTGCCAG - 3'

pBD -g14 N->Q fw:

5' - CTGTAAAAATTCAGTGTACCAGACC - 3'

pBD -g14 N->Q rev:

5' - GGTCTGGTACACTGAATTTTTTACAG - 3'

pBD -g16 N->Q fw:

5' - GAGCACAGTGTGAGGTCAGTGGAAC - 3'

pBD -g16 N->Q rev:

5' - GTTCCACTGACCTGACACTGTGCTC - 3'

V3-Loop Sequenzierprimer:**V3-fw seq pBD6.15:**

5' - CATGCAAGAATGTCAGTACAGTACA - 3'

V3-rev seq pBD6.15:

5' - CATGCAAGAATGTCAGTACAGTACA - 3'

NL-C Glykosylierungsprimer:**HIV-C -g15 fw:**

5' - ACAAGGCCCAACCAGAATACAAGGAAA - 3'

HIV-C -g15 rev:

5' - TTTCCCTTGTATTCTGGTTGGGCCTTGT - 3'

HIV-C +g14 fw:

5' - TATGTAGAAAATTAAGTGTACAAGGCCC - 3'

HIV-C +g14 rev:

5' - GGGCCTTGTACAGTTAATTTCTACATA - 3'

V3-fw:

5' - TAGAAAAATTCTCCTCCACAATTAA - 3'

V3-rev:

5' - AATGTCAGCACAGTACAATGTACACA - 3'

RT-PCR Primer:**cDNA:**

5' - GTTTTATTCTGCATGGGAG - 3'

V3-fw:

5' - TAGAAAAATTCTCCTCCACAATTAA - 3'

V3-rev:

5' - AATGTCAGCACAGTACAATGTACACA - 3'

V3-nested fw:

5' - CACATGGAATTAAGCCAGTAGTATC - 3'

V3-nested rev:

5' - AATTTCTAGGTCCCCTCCTGAGGA - 3'

pUC Sequenzierprimer:**M13 fw (-40):**

5' - GTTTTCCCAGTCACGAC - 3'

M13 rev:

5' - GAAACAGCTATGACCATG - 3'

NL Δ env Sequenzierprimer:**NL4-3 BstEII out:**

5' - GTGTGGCCCAAACATTATG - 3'

NL4-3 BamHI out:

5' - CACCTCCAATCCCAGGG - 3'

Anhang

N N V K T I I V H L K D Y V E I V C T R P N N N T R K
721 AACAAATGTCAAAAACAATAATAGTACATCTTAAGGACTATGTAGAAATGTATGTACAAGGCCCAACAATAATACAAGGAA 800
721 TTGTTACAGTTTTGTTATTATCATGTAGAATTCCTGATACATCTTTAACATACATGTTCCGGGTTGTTATTATGTTCCCTT 800
AflII BsrGI

S M R I G P G Q A F Y A T G E I I G N I R E A H C N
801 AAGTATGAGGATAGGACCAGGACAAGCATTCTATGCAACAGGAGAAATAATAGGAAATATAAGAGAAGCTCATTGTAACA 880
801 TTCATACTCCTATCCTGGTCCTGTTTCGTAAGATACGTTGTCCTCTTTATTATCCTTTATATTCTCTTCGAGTAACATTGT 880

I S G S R W N N T L Q R V K K K L G E H F P N N T T I
881 TCAGTGGATCTAGATGGAATAACACTTTACAAAGGGTAAAGAAAAAATTAGGAGAGCACTTCCCTAATAACACCACAATA 960
881 AGTCACCTAGATCTACCTTATTGTGAAATGTTTCCATTCTTTTTTAATCCTCTCGTGAAGGGATTATTGTGGTGTAT 960
XbaI

D F K P S S G G D L E I T T H S F N C R G E F F Y C N
961 GACTTTAAACCATCCTCAGGAGGGGACCTAGAAATTACAACACATAGCTTTAATTGTAGAGGAGAATTTTTCTATTGCAA 1040
961 CTGAAATTTGGTAGGAGTCTCCCTGGATCTTTAATGTTGTGTATCGAAATTAACATCTCCTCTTAAAAAGATAACGTT 1040
DraI

T S K L F N G T S E S N S T I T L P C K I K Q I I N
1041 TACATCAAAATTTGTTAATGGTACATCAGAGTCAAATTC AACCATCACACTCCCATGCAAGATAAAAACAAATTATAAACA 1120
1041 ATGTAGTTTTAACAAATTACCATGTAGTCTCAGTTTTAAGTTGGTAGTGTGAGGGTACGTTCTATTTTTGTTAATATTTGT 1120
PsiI
PciI

M W Q G V G R A M Y A P P I A G N I T C K S N I T G L
1121 TGTGGCAAGGGGTAGGACGAGCAATGTATGCCCTCCCATGTCAGGAAACATAACATGCAAATCAAATATCACAGGACTA 1200
1121 ACACCGTTCCCATCCTGCTCGTTACATACGGGGAGGGTAACGTCTTTGTATTGTACGTTTAGTTTATAGTGTCTGAT 1200

L L T R D G G N G N G T E I F R P G G G D M R D N W R
1201 CTATTAACACGTGATGGAGAAATGGAAATGGTACAGAGATATTCAGACCGGGAGGAGAGATATGAGGGACAATTGGAG 1280
1201 GATAATTGTGCACTACCTCCTTTACCTTTACCATGTCTCTATAAGTCTGGCCCTCCTCTATACTCCCTGTTAACCTC 1280
PmlI MfeI

S E L Y K Y K V V K I E P L G I A P T K A K R R V V
1281 AAGTGAATTATATAAATATAAAGTGGTGAATTTGAACCATTAGGAATAGCACCCACTAAGGCAAAAAGGAGAGTGGTGG 1360
1281 TTCACTTAATATATTTATATTTACCACCTTTAACTTGGTAATCCTTATCGTGGGTGATTCCGTTTTTCTCTCACCACC 1360

E R G K R A V G I G A L F L G F L G A A G S T M G A A
1361 AGAGAGGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTCTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCGGCG 1440
1361 TCTCTCCTTTTTCTCGTCACCCTTATCCTCGAGACAAGGAACCCAAGAACCCCTCGTCGTCCTTCGTGATAACCGCGCCGC 1440
EcoICRI
SacI

S L T L T V Q A R Q L L S G I V Q Q Q N N L L R A I E
1441 TCACTAACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCCTGGTATAGTGCAACAGCAAAAACAATTTGCTGAGGGCTATAGA 1520
1441 AGTGATTGCGACTGCCATGTCCGGTCTGTTAATAACAGACCATATCACGTTGTCTGTTTTGTTAAACGACTCCCAGATATCT 1520

A Q Q H M L Q L T V W G I K Q L Q A R V L A I E R Y
1521 GCGCAACAGCATATGTTGCAACTCACGGTCTGGGGCATTAAGCAGCTCCAGGCAAGAGTCTTGGCTATAGAAAGATACC 1600
1521 CCGGTTGTCTGATATAACAGTTGAGTGCCAGACCCCGTAATTCGTCGAGGTCCGTTCTCAGAACCGATATCTTTCTATGG 1600
NdeI

L Q D Q Q L L G I W G C S G K L I C T T D V P W N S S
 1601 TACAGGATCAACAGCTCCTAGGAATTTGGGGCTGCTCTGGAAAACATCTGCACCACTGATGTGCCTTGGAACCTAGT 1680
 1601 ATGTCCTAGTTGTCGAGGATCCTTAAACCCCGACGAGACCTTTTGAGTAGACGTGGTGACTACACGGAACCTTGAGATCA 1680
 AvrII

W S S K S Y E D I W T N M T W M Q W D K E I N N Y T N
 1681 TGGAGTAGTAAATCTTATGAGGACATTTGGACAAATATGACCTGGATGCAGTGGGATAAAGAAATTAATAATTACACAAA 1760
 1681 ACCTCATCATTTAGAATACTCCTGTAAACCTGTTTATACTGGACCTACGTCACCCTATTTCTTAATTATTAATGTGTTT 1760
 AseI

T I Y Q L L V D S Q T Q Q E K N E R E L L A L D S W
 1761 CACAATATATCAGTTGCTTGTAGACTCGCAAACCCAGCAGGAAAAAATGAAAGGGAGTTACTAGCATTGGACAGTTGGA 1840
 1761 GTGTTATATAGTCAACGAACATCTGAGCGTTTGGGTCGTCCTTTTTTACTTTCCCTCAATGATCGTAACCTGTCAACCT 1840
 BseYI

K N L W N W F N I T N W L W Y I K I F I M I V G G L I
 1841 AAAATCTGTGGAATTTGGTTTAAACATAACAAATTGGCTATGGTATATAAAAAATATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGATA 1920
 1841 TTTTAGACACCTTAACCAAATTGTATTGTTTAAACCGATACCATATATTTTTTATAAGTATTACTATCATCCTCCGAACTAT 1920
 SspI

G L R I I F A V L S M V N R V R Q G Y S P L S F Q T L
 1921 GGTTTAAAGAATAATTTTTGCTGTGCTCTCTATGGTAAATAGAGTTAGGCAGGGATACTCACCTCTGTCTTTTCAGACCCCT 2000
 1921 CCAAATTCCTTATTA AAAACGACACGAGAGATACCATTTATCTCAATCCGTCCCTATGAGTGGAGACAGTAAAGTCTGGGA 2000

T P N P R G P D R L G R I E E E G G E Q D R D R S I
 2001 TACCCCAAACCCGAGGGGACCCGACAGGCTCGGAAGAATCGAAGAAGAAGGTGGAGAGCAAGACAGAGACAGATCCATTC 2080
 2001 ATGGGGTTTGGGCTCCCCTGGGCTGTCCGAGCCTTCTTAGCTTCTTCTCCACCTCTCGTTCTGTCTCTGTCTAGGTAAG 2080

R L V S G S L A
 2081 GATTAGTGAGCGGATCCTTAGCGCT 2105
 2081 CTAATCACTCGCCTAGGAATCGCGA 2105
 BsrBI
 BamHI

Enzyme	Recognition	frequency	Position
BamHI	G'GATC_C	1	2093
BglII	A'GATC_T	1	704
BstEII	G'GTnAC_C	1	10
XbaI	T'CTAG_A	1	890

XbaI überlappt mit Dam Methylierungsstelle. Zum Austausch des V3-Loops muss das Plasmid in Dam negativen Bakterien amplifiziert werden.

env-Sequenz NL-A_{X4}

K L W V T V Y Y G V P V W R D A E T T L F C A S E A R
 1 AAGTTGTGGGTCACCGTATACTATGGGGTACCGGTGTGGAGAGACGCAGAGACCACTCTATTTTGTGCATCAGAGGCTAG 80
 1 TTCAACACCCAGTGGCATATGATACCCCATGGCCACACCTCTCTGCGTCTCTGGTGTAGATAAAAACACGTAGTCTCCGATC 80
 BstEII BstZ17I Acc65I
 AgeI
 KpnI

A Y D P E A H N V W A T H A C V P T D P N P Q E L P
 81 GGCATATGATCCAGAAGCACATAATGTCTGGGCTACACATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAGAATTACCTT 160
 81 CCGTATACTAGGTCTTTCGTGTATTACAGACCCGATGTGTACGGACACATGGGTGTCTGGGGTTGGGTGTTCTTAATGGAA 160
 NdeI

L E N V T E E F N M W K N N M V E Q M H E D I I S L W
 161 TAGAAAATGTAACAGAAGAGTTTAAACATGTGGAAAAATAACATGGTAGAGCAGATGCATGAAGATATAATTAGTCTATGG 240
 161 ATCTTTTACATTGTCTTCTCAAATTGTACACCTTTTTTATTGTACCATCTCGTCTACGTACTTCTATATTAATCAGATACC 240
 PciI BfrBI
 NsiI

D Q S L K P C V K L T P L C V T L N C S D V T F N R T
 241 GACCAAAGCCTAAAGCCATGTGTAAAGCTAACCCCTCTCTGCGTTACATTAATTTGTTCTGACGTCACCTTCAACAGAAC 320
 241 CTGGTTTCGGATTTTCGGTACACATTTTCGATTGGGGAGAGACGCAATGTAATTTAACAAGACTGCAGTGGAAAGTTGCTTGG 320
 ZraI
 AatII

F D S E M K K E I K N C T F N T T T E R I D K K E K
 321 CTTTGATAGTGAAATGAAAAGGAAATAAAAACTGCACCTTTCAATACGACCACAGAAAGAATAGATAAAAAAGAGAAAAG 400
 321 GAAACTATCACTTTACTTTTCTCTTTATTTTTTGACGTGAAAGTTATGCTGGTGTCTTTCTTATCTATTTTTTCTCTTTC 400

A Y A L F Y K L D I K E L E G S K D N S S N S S Q F I
 401 CATATGCACCTTTTTTATAAACTTGATATAAAAAGAACTTGAGGGAAGTAAGGATAATAGTAGTAATAGTAGCCAGTTTATA 480
 401 GTATACGTGAAAAAATATTTGAACTATATTTTCTTGAACCTCCCTTCATTCCTATTATCATCATTATCATCGGTCAAATAT 480
 NdeI PsiI

L I H C N T S T I A Q A C P K V S F E P I P I H Y C A
 481 CTAATACATTGTAATACCTCGACCATTCACAGGCTTGCCAAAGGTGCCTTTGAGCCAATTCACATACATTATTGTGC 560
 481 GATTATGTAACATTATGGAGCTGGTAACGTGTCCGAACAGGTTTCCACAGGAAACTCGGTTAAGGGTATGTAATAACACG 560

P A G F A I L E C K E K N F N G T G P C K N V S T V
 561 CCCAGCTGGTTTTGCGATTCTGGAGTGTAAAGAGAAGAATTTCAATGGAACAGGGCCATGCAAGAATGTGAGTACAGTAC 640
 561 GGGTGCACAAAACGCTAAGACCTCACATTTCTCTTCTTAAAGTTACCTTGTCGCCGGTACGTTCTTACAGTCATGTCATG 640
 BseYI
 PvuII

Q C T H G I K P V V S T Q L L L N G S L A E E E V M I
 641 AATGCACACATGGAATCAAACCAGTAGTGTCAACTCAACTGCTACTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAGAGGTAATGATT 720
 641 TTACGTGTGTACCTTAGTTGGTCATCACAGTTGAGTTGACGATGATTTACCGTCAGATCGTCTTCTTCTCCATTACTAA 720

Anhang

R S E N I T N N A K T I I V Q L V T P V K I N C T R P
721 AGATCTGAAAATATCACAAACAATGCCAAAACCATAATAGTACAGCTGGTTACTCCTGTAAAAATTAATTGTACCAGACC 800
721 TCTAGACTTTTATAGTGTGGTTACGGTTTTGGTATTATCATGTGACCAATGAGGACATTTTAAATTAACATGGTCTGG 800
BglII PvuII AseI

G N P I R K R V G I G P G Q A F H A T G N I I G D I
801 TGGCAATCCTATAAGAAAAGGGTAGGTATAGGACCAGGACAAGCATTCCATGCAACAGGTAATATAATAGGAGACATAA 880
801 ACCGTTAGGATATTCTTTTTCCCATCCATATCCTGGTCTGTTCGTAAGGTACGTTGTCCATTATATTATCCTCTGTATT 880

R R A Q C N V S G T E W K E A L Q K V T E Q L G K H F
881 GACGAGCACAGTGAATGTGAGTGAACAGAATGGAAGGAAGCTTTACAAAAGGTAAGTGAACAATTAGGGAAGCACTTT 960
881 CTGCTCGTGTACATTACAGTCACCTTGTCTTACCTTCTTCGAAATGTTTTCCATTGACTTGTTAATCCCTTCGTGAAA 960
HindIII

N V S T I N F T K S S G G D V E I T T H S F N C G G E
961 AATGTTAGCACAATAAACTTTACTAAATCCTCAGGAGGGATGTAGAAATTACAACACATAGTTTTAATTGTGGAGGAGA 1040
961 TTACAATCGTGTATTGAAATGATTTAGGAGTCTCCCTACATCTTTAATGTTGTGTATCAAAAATTAACACCTCCTCT 1040

F F Y C N T S G L F N S T W S R N S T D N S T W N I
1041 GTTTTTCTATTGCAATACATCAGGACTATTTAATAGCACTTGGAGTAGGAATAGCACTGATAACAGCACTTGAATATCA 1120
1041 CAAAAAGATAACGTTATGTAGTCTGATAAATATCGTGAACCTCATCCTTATCGTGACTATTGTGCGTGAACCTTATAGT 1120

N D T V S S N H T G N I T L Q C R I R Q V V R M W Q R
1121 ATGACACTGTGACGCTCAAATCACACAGGAAATATAACTCTCCAATGCAGAATAAGGCAAGTTGTAAGAATGTGGCAGAGG 1200
1121 TACTGTGACAGTCGAGTTTTAGTGTGTCCTTTATATTGAGAGGTTACGTCCTTATTCGGTTCAACATTCTTACACCGTCTCC 1200

V G Q A M Y A P P I P G E I K C K S N I T G I L L T R
1201 GTAGGACAAGCAATGTATGCCCTCCCATCCCAGGAGAAATTAAGTGTAATCAAACATTACAGGAATACTATTGACAAG 1280
1201 CATCCTGTTCTGTTACATACGGGAGGGTAGGGTCTCTTTAATTCACATTTAGTTTGTAAATGTCCTTATGATAACTGTTT 1280

D G G T K N Q N A S E E F N T T E V F R P G G G D M
1281 AGATGGAGGGACAAAAATCAGAATGCAAGTGAGGAATTTAATACAACACTGAGGTATTACAGCTGAGGAGGAGACATGA 1360
1281 TCTACCTCCCTGTTTTTTAGTCTTACGTTCACTCCTTAAATATGTTGACTCCATAAGTCTGGACCTCCTCCTCTGTACT 1360

R D N W R S E L Y K Y K V V Q I E P I G V A P T R A K
1361 GGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAGGTAGTACAAATTGAACCAATAGGTGTGGCACCCACCGTGCAAAA 1440
1361 CCCTGTTAACCTCTTCACTTAATATATTTATATTCATCATGTTTAACTTGGTTATCCACACCGTGGGTGGGCACGTTTT 1440
MfeI

R R V V Q K E K R A V G L G A F F L G F L G V A G S T
1441 AGAAGAGTGGTGCAGAAAGAAAAAGAGCAGTTGGACTGGGAGCTTTCTTCTTGGGTTCTTAGGAGTTGCAGGAAGCAC 1520
1441 TCTTCTCACCACGTCTTTCTTTTTCTCGTCAACCTGACCCCTCGAAAGAAGGAACCCAAGAATCCTCAACGTCCTTCGTG 1520

M G A A S I T L T V Q A R Q L L S G I V Q Q Q S N L
1521 TATGGGCGCAGCGTCAATAACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATATTGTCTGGTATAGTGCAACAGCAGAGCAATCTGC 1600
1521 ATACCCGCGTGCAGTTATTGCGACTGCCATGTCCGGTCTGTTAATAACAGACCATATCACGTTGTGCTCTCGTTAGACG 1600

L K A I E A Q Q H I L R L T V W G I K Q L Q A R V L A
1601 TGAAGGCTATAGAGGCTCAACAACATATATTGAGACTCACGGTCTGGGGCATTAAACAGCTCCAGGCAAGAGTCTGGCT 1680
1601 ACTTCGATATCTCCGAGTTGTTGTATATAACTCTGAGTGCCAGACCCCGTAATTTGTGCGAGGTCCGTTCTCAGGACCGA 1680

Anhang

L E R Y L K D Q Q L L G I W G C S G K L I C T T N V P

1681 CTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGGAATTTGGGGCTGCTCTGGAAAACCTCATCTGCACCCTAATGTGCC 1760

1681 GACCTTTCTATGGATTTCTAGTTGTCGAGGATCCTTAAACCCCGACGAGACCTTTTGAGTAGACGTGGTGATTACACGG 1760

AvrII

W N S S W S N K T Y D K I W D N M T W M Q W D R E I

1761 CTGGAACCTAGTTGGAGTAATAAACTTATGATAAGATATGGGACAATATGACCTGGATGCAATGGGATAGAGAAATTA 1840

1761 GACCTTGAGATCAACCTCATTATTTTGAATACTATTCTATAACCCTGTTATACTGGACCTACGTTACCCTATCTCTTTAAT 1840

S N Y T E I I Y D L I E E S Q K Q Q E K N E Q E L L A

1841 GCAATTACACAGATAATATATGATCTAATTGAAGAATCGCAGAAGCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTTGGCA 1920

1841 CGTTAATGTGTCTCTATTATATACTAGATTAACCTTCTAGCGTCTTCGTCGTTCTTTTCTTACTTGTCTTAATAACCGT 1920

L D K W T S L W N W F S I S N W L W Y I R I F I M I V

1921 TTGGACAAGTGGACAAGTCTGTGGAATTTGGTTTAGCATATCAAACCTGGCTATGGTATATAAGAATATTCATAATGATAGT 2000

1921 AACCTGTTACCTGTTACAGACACCTTAACCAAATCGTATAGTTTGACCGATACCATATATTCTTATAAGTATTACTATCA 2000

SspI

G G L I G L R I V C A V L N V I N R V R Q G Y S P L

2001 AGGAGGCTTGATAGGCTTAAGAATAGTTTGTGCTGTGCTTAATGTAATAAATAGAGTTAGGCAGGGATACTCACCTTTGT 2080

2001 TCCTCCGAAGTATCCGAATTCTTATCAAACACGACACGAATTACATTATTTATCTCAATCCGTCCTATGAGTGGAACA 2080

AflII

S F Q T L T H H Q R E P D R P E R I E E G G G E R D R

2081 CATTCCAGACCCTTACCCACCACCAGAGGGAACCCGACAGACCCGAAAGAATCGAAGAAGGAGGTGGCGAGCGAGACAGA 2160

2081 GTAAGGTCTGGGAATGGTGGTGGTCTCCCTTGGGCTGTCTGGGCTTCTTAGCTTCTTCCCTCCACCGCTCGCTCTGTCT 2160

D R S V R L V S G S L A L

2161 GACAGATCCGTGCGCTTAGTGAGCGGATCCTTAGCACTTGC 2201

2161 CTGTCTAGGCACGCGAATCACTCGCCTAGGAATCGTGAACG 2201

BsrBI

BamHI

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
BamHI	G'GATC_C	1	2186
BglII	A'GATC_T	1	722
BstEII	G'GTnAC_C	1	10
HindIII	A'AGCT_T	1	921

env-Sequenz NL-V3-A

W V T V Y Y G V P V W K E A T T T L F C A S D A K A Y
 1 TGGGTCACCGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCACCCTCTATTTTGTGCATCAGATGCTAAAGCATA 80
 1 ACCCAGTGGCAGATAATAACCCCATGGACACACCTTCCTTCGTTGGTGGTGGAGATAAAAACACGTAGTCTACGATTTCGTAT 80
 BstEII Acc65I NdeI
 KpnI

D T E V H N V W A T H A C V P T D P N P Q E V V L V
 81 TGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCACACATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAGAAGTAGTATTGGTAA 160
 81 ACTATGTCTCCATGTATTACAAACCCGGTGTGTACGGACACATGGGTGTCTGGGGTGGGTGTCTTTCATCATAACCATT 160

N V T E N F N M W K D D M V E Q M H E D I I S L W D Q
 161 ATGTGACAGAAAATTTTAAACATGTGGAAAGATGACATGGTAGAACAGATGCATGAGGATATAATCAGTTTATGGGATCAA 240
 161 TACTGTCTTTTAAAATTGTACACCTTTCTACTGTACCATCTTGTCTACGTACTCCTATATTAGTCAAATACCCCTAGTT 240
 PciI BfrBI
 NsiI

S L K P C V K L T P L C V S L K C T D L K N D T N T N
 241 AGCCTTAAGCCATGTGTAATAATTAACCCACTCTGTGTTAGTTTAAAGTGCCTGATTTGAAGAATGATACTAATAACCAA 320
 241 TCGGAATTCGGTACACATTTTAAATTGGGGTGGAGACACAATCAAATTTACGTGACTAAACTTCTTACTATGATTATGGTT 320
 AflII DraI
 ApaLI

S S S G R M I M E K G E I K N C S F N I S T S I R D
 321 TAGTAGTAGCGGAGAATGATAATGGAGAAAGGAGAGATAAAAACTGCAGCTTCAATATCAGCACAAAGCATAAGAGATA 400
 321 ATCATCATCGCCCTTACTATTACCTCTTTCCTCTATTTTTTGGACGTGGAAGTTATAGTCGTGTTTCGTATCTCTAT 400
 PstI

K V Q K E Y A F F Y K L D I V P I D N T S Y R L I S C
 401 AGGTGCAGAAAGAATATGCATTCTTTTATAAACTTGATATAGTACCAATAGATAAATACCAGCTATAGGTTGATAAGTTGT 480
 401 TCCACGTCTTTCTTATACGTAAGAAAATTTGAACACTATATCATGGTTATCTATTATGGTCGATATCCAACATTTCAACA 480
 BfrBI PsiI
 NsiI

N T S V I T Q A C P K V S F E P I P I H Y C A P A G F
 481 AACACCTCAGTGATCACACAGGCCTGTCCAAAGGTATCCTTTGAGCCAATCCCATACATTATTGTGCCCGGCTGGTTT 560
 481 TTGTGGAGTCACTAGTGTGTCCGGACAGTTTCCATAGGAAACTCGGTTAGGGGTATGTAATAACACGGGGCCGACAAA 560
 BclI StuI

A I L K C N N K T F N G T G P C T N V S T V Q C T H
 561 TGCGATTCTAAAATGTAATAATAAGACGTTCAATGGAACAGGACCATGTACAAATGTCAGCACAGTACAATGTACACATG 640
 561 ACGCTAAGATTTTACATTATTATTCTGCAAGTTACCTTGTCCTGGTACATGTTTACAGTCGTGTCATGTTACATGTGTAC 640
 BsrGI BsrGI

G I R P V V S T Q L L L N G S L A E E D V V I R S E N
 641 GAATTCGACCAGTAGTATCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAGATGTAGTAATTAGATCTGAGAAC 720
 641 CTTAAGCTGGTCAATCATAGTTGAGTTGACGACAATTTACCGTCAGATCGTCTTCTTCTACATCATTAATCTAGACTCTTG 720
 EcoRI BglII

Anhang

I S N N A K T I I V Q L H T P V N I S C I R P N N N T
721 ATCAGCAACAACGCCAAGACCATCATCGTGCAGCTGCACACCCCGTGAACATCAGCTGCATCCGCCCAACAACAACAC 800
721 TAGTCGTTGTTGCGGTTCTGGTAGTAGCACGTCGACGTGTGGGGGCACCTGTAGTCGACGTAGGCGGGGTTGTTGTTGTG 800
PvuII PvuII

R K S V R I G P G Q A F Y A T G D I I G N I R Q A H
801 CCGCAAGAGCGTGCATCGGCCCGCCAGGCGTTCACGCCACCGCGACATCATCGGCAACATCCGCCAGGCCACT 880
801 GCGGTTCTCGCACGCATAGCCGGGGCCGGTCCGCAAGATGCGGTGGCCGCTGTAGTAGCCGTTGTAGGCGGTCCGGGTGA 880

C T V S R A K W N A T L K Q I A S K L R E Q F G N N K
881 GCACCGTGTCTAGAGCAAAATGGAATGCCACTTTAAACAGATAGCTAGCAAATTAAGAGAACAATTTGGAAATAATAAA 960
881 CGTGGCACAGATCTCGTTTTACCTTACGGTGAAATTTTGTCTATCGATCGTTTAATCTCTTGTAAACCTTTATTATTT 960
XbaI DraI NheI
BmtI

T I I F K Q S S G G D P E I V T H S F N C G G E F F Y
961 ACAATAATCTTTAAGCAATCATCCGGAGGGGACCCAGAAATGTAAACGCACAGTTTTAATGTGGAGGGGAATTTTTCTA 1040
961 TGTTATTAGAAATTCGTTAGTAGGCCTCCCTGGGTCTTAAACATTGCGTGTCAAAATTAACACCTCCCTTAAAAAGAT 1040
BspEI

C N S T Q L F N S T W F N S T W S T E G S N N T E G
1041 CTGTAATCAACACAACCTGTTTAAATAGTACTTGGTTTTAATAGTACTTGGAGTACTGAAGGGTCAAATAACACTGAAGGAA 1120
1041 GACATTAAGTTGTGTTGACAAATTATCATGAACCAAATATCATGAACCTCATGACTTCCAGTTTTATGTGACTTCCTT 1120
ScaI ScaI ScaI

S D T I T L P C R I K Q F I N M W Q E V G K A M Y A P
1121 GTGACACAATCACACTCCCATGCAGAATAAAACAATTTATAAACATGTGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCT 1200
1121 CACTGTGTTAGTGTGAGGGTACGTCTTATTTTGTAAATATTTGTACACCGTCCTTCATCCTTTTCGTTACATACGGGA 1200
PsiI
PciI

P I S G Q I R C S S N I T G L L L T R D G G N N N N G
1201 CCCATCAGTGGCCAAATTAGATGTTTCATCAAATATTACTGGGCTGCTATTAACCTCGAGATGGTGGTAATAACAACAATGG 1280
1201 GGGTAGTCACCGGTTAATCTACAAGTAGTTTATAATGACCCGACGATAATTGAGCTCTACCACCTATTGTTGTTACC 1280
MscI SspI XhoI

S E I F R P G G G D M R D N W R S E L Y K Y K V V K
1281 GTCCGAGATTTTCAGACCTGGAGGAGCGATATGAGGGATAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAA 1360
1281 CAGGCTCTAAAAGTCTGGACCTCCTCCGTATACTCCCTATTAACCTCTTCACTTAATATATTTATATTTTCATCATTTTT 1360

I E P L G V A P T K A K R R V V Q R E K R A V G I G A
1361 TTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGACGCGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCT 1440
1361 AACTTGGTAATCCTCATCGTGGGTGGTTCCGTTTCTCTGCGCACACGCTCTCTTTTTTCTCGTACCCTTATCCTCGA 1440
MluI

L F L G F L G A A G S T M G A A S M T L T V Q A R Q L
1441 TTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATT 1520
1441 AACAAGGAACCAAGAACCCTCGTCTGTTCCGTTTCTGCGCACACGCTCTCTTTTTTCTCGTACCCTTATCCTCGA 1520

L S D I V Q Q Q N N L L R G Q L R Q Q H L L Q L T V
1521 ATTGTCTGATATAGTGCAGCAGCAGAAACAATTTGCTGAGGGGGCAATTGAGGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCT 1600
1521 TAACAGACTATATCAGTCGTCGTCTTGTAAACGACTCCCCCGTTAACTCCGTTGTCGTAGACAACGTTGAGTGTGAGA 1600
MfeI

W G I K Q L Q A R I L A V E R Y L K D Q Q L L G I W G
 1601 GGGGCATCAAACAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGT 1680
 1601 CCCCGTAGTTTTGTCGAGGTCCGTTCTTAGGACCGACACCTTCTATGGATTTCTAGTTGTCGAGGACCCCTAAACCCA 1680

C S G K L I C T T A V P W N A S W S N K S L E Q I W N
 1681 TGCTCTGGAAAACATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAA 1760
 1681 ACGAGACCTTTTGAGTAAACGTGGTGACGACACGGAACCTTACGATCAACCTCATTATTTAGAGACCTTGTCTAAACCTT 1760

N M T W M E W D R E I N N Y T S L I H S L I E E S Q
 1761 TAACATGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAA 1840
 1761 ATTGTACTGGACCTACCTCACCTGTCTCTTTAATTGTTAATGTGTTTCAATTTATGTGAGGAATTAACCTTCTTAGCGTTT 1840

HindIII

N Q Q E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F N I T N
 1841 ACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAAT 1920
 1841 TGGTCGTTCTTTTCTTACTTGTCTTAATAACCTTAATCTATTTACCCGTTCAAACACCTTAACCAAATTGTATTGTTTA 1920

W L W Y I K L F I M I V G G L V G L R I V F A V L S I
 1921 TGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTAT 2000
 1921 ACCGACACCATATATTTTAATAAGTATTACTATCATCTCCGAACCATCCAAATTCTTATCAAAAACGACATGAAAGATA 2000

V N R V R Q G Y S P L S F Q T H L P I P R G P D R P
 2001 AGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTTAGACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCG 2080
 2001 TCACTTATCTCAATCCGTCCTATAAGTGGTAATAGCAAAGTCTGGGTGGAGGGTTAGGGCTCCCCTGGGCTGTCCGGGC 2080

E G I E E E G G E R G R D R S I R L V N G S L A L I W
 2081 AAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGCAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGG 2160
 2081 TTCCTTATCTTCTTCTCCACCTCTCTCCGTCCTGTCTAGGTAAGCTAATCACTTGCCTAGGAATCGTGAATAGACC 2160

BamHI

Enzyme	Recognition	frequency	Positions
BamHI	G'GATC_C	1	2141
BglII	A'GATC_T	1	710
BstEII	G'GTnAC_C	1	3
XbaI	T'CTAG_A	1	890

env-Sequenz NL-A_{R5}

K L W V T V Y Y G V P V W R D A E T T L F C A S E A R
1 AAGTTGTGGGTCACCGTATACTATGGGGTACCGGTGTGGAGAGACGCAGAGACCACTCTATTTTGTGCATCAGAGGCTAG 80
1 TTCAACACCCAGTGGCATATGATACCCCATGGCCACACCTCTCTGCGTCTCTGGTGTAGATAAAAACACGTAGTCTCCGATC 80
BstEII BstZ17I Acc65I
AgeI
KpnI

A Y D P E A H N V W A T H A C V P T D P N P Q E L P
81 GGCATATGATCCAGAAGCACATAATGTCTGGGCTACACATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAGAATTACCTT 160
81 CCGTATACTAGGTCTTTCGTGTATTACAGACCCGATGTGTACGGACACATGGGTGTCTGGGGTTGGGTGTTCTTAATGGAA 160
NdeI

L E N V T E E F N M W K N N M V E Q M H E D I I S L W
161 AGAAAATGTAACAGAAGAGTTTAAACATGTGGAAAATAACATGGTAGAGCAGATGCATGAAGATATAATTAGTCTATGG 240
161 ATCTTTTACATTGTCTTCTCAAATTGTACACCTTTTTATGTACCATCTCGTCTACGTACTTCTATATTAATCAGATACC 240
PciI BfrBI
NsiI

D Q S L K P C V K L T P L C V T L N C S D V T F N R T
241 GACCAAAGCCTAAAGCCATGTGTAAAGCTAACCCCTCTCTGCGTTACATTAATTTGTTCTGACGTACCTTCAACAGAAC 320
241 CTGGTTTCGGATTTTCGGTACACATTTTCGATTGGGGAGAGACGCAATGTAATTTAACAAGACTGCAGTGGAAAGTTGTCTTG 320
ZraI
AatII

F D S E M K K E I K N C T F N T T T E R I D K K E K
321 CTTTGATAGTGAAATGAAAAAGGAAATAAAAACTGCACCTTTCAATACGACCACAGAAAGAATAGATAAAAAAGAGAAAG 400
321 GAAACTATCACTTTACTTTTTCCTTTATTTTTTTGACGTGAAAGTTATGCTGGTGTCTTTCTTATCTATTTTTTCTCTTTC 400

A Y A L F Y K L D I K E L E G S K D N S S N S S Q F I
401 CATATGCACCTTTTTTATAAACTTGATATAAAAAGAACTTGAGGGAAGTAAGGATAATAGTAGTAATAGTAGCCAGTTTATA 480
401 GTATACGTGAAAAAATATTTGAACTATATTTTCTTGAACCTCCCTTCATTCCTATTATCATCATTATCATCGGTCAAATAT 480
NdeI PsiI

L I H C N T S T I A Q A C P K V S F E P I P I H Y C A
481 CTAATACATTGTAATACCTCGACCATTGACAGGCTTGTCCAAAGGTGTCCTTTGAGCCAATTTCCCATACATTATTGTGC 560
481 GATTATGTAACATTATGGAGCTGGTAACGTGTCCGAACAGGTTTCCACAGGAAACTCGGTTAAGGGTATGTAATAACACG 560

P A G F A I L E C K E K N F N G T G P C K N V S T V
561 CCCAGCTGGTTTTGCGATTCTGGAGTGTAAAGAGAAGAATTTCAATGGAACAGGGCCATGCAAGAATGTCAAGTACAGTAC 640
561 GGGTGCACAAAACGCTAAGACCTCACATTTCTCTTCTTAAAGTTACCTTGTCGCCGGTACGTTCTTACAGTCATGTCATG 640
BseYI
PvuII

Q C T H G I K P V V S T Q L L L N G S L A E E E V M I
641 AATGCACACATGGAATCAAACCAGTAGTGTCAACTCAACTGCTACTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAGAGGTAATGATT 720
641 TTACGTGTGTACCTTAGTTGGTTCATCACAGTTGAGTTGACGATGATTTACCGTACAGATCGTCTTCTTCTCCATTACTAA 720

R S E N I T N N A K T I I V Q L V K P V R I N C T R P
721 AGATCTGAAAATATCACAACAATGCCAAAACCATAATAGTACAATGGTTAAGCCTGTAAGAATCAATTGTACCAGACC 800
721 TCTAGACTTTTATAGTGTGGTTACGGTTTTGGTATTATCATGTTAACCAATTCGGACATTCCTTAGTTAATCATGGTCTGG 800
BglII MfeI MfeI

Anhang

N N N T I Q S V R I G P G Q T F Y A T G Q I V G D I
801 TAACAACAATACAATACAGAGTGTACGTATAGGACCAGGGCAAACATTCTATGCAACAGGTCAAATAGTAGGGATATAA 880
801 ATGTGTGTTATGTTATGTCTCACATGCATATCCTGGTCCCCTTTGTAAGATACGTTGTCCAGTTTATCATCCCCTATATT 880
SnaBI

R Q A H C T V N G T E W K E A L Q K V T E Q L G K H F
881 GACAAGCACATTGTACTGTCAATGGAACAGAGTGAAGGAAGCTTTACAAAAGGTAACGAACAATTAGGGAAGCACTTT 960
881 CTGTTCGTGTAACATGACAGTTACCTTGTCTCACCTTCTTCGAAATGTTTTCCATTGACTTGTTAATCCCTTCGTGAAA 960
HindIII

N V S T I N F T K S S G G D V E I T T H S F N C G G E
961 AATGTTAGCACAATAAACTTTACTAAATCCTCAGGAGGGGATGTAGAAATTACAACACATAGTTTTAATTGTGGAGGAGA 1040
961 TTACAATCGTGTATTGTTGAAATGATTTAGGAGTCTCCCCTACATCTTTAATGTTGTGTATCAAAATTAACACCTCTCT 1040

F F Y C N T S G L F N S T W S R N S T D N S T W N I
1041 GTTTTTCTATTGCAATACATCAGGACTATTTAATAGCACTTGGAGTAGGAATAGCACTGATAACAGCACTTGGAAATATCA 1120
1041 CAAAAAGATAACGTTATGTAGTCTGATAAAATATCGTGAACCTCATCTTATCGTGACTATTGTCTGTAACCTTATAGT 1120

N D T V S S N H T G N I T L Q C R I R Q V V R M W Q R
1121 ATGACACTGTCAGCTCAAATCACACAGGAAATATAACTCTCCAATGCAGAATAAGGCAAGTTGTAAGAATGTGGCAGAGG 1200
1121 TACTGTGACAGTCGAGTTTAGTGTCTCTTTATATTGAGAGGTTACGTCTTATTCCGTTCAACATTCTTACACCGTCTCC 1200

V G Q A M Y A P P I P G E I K C K S N I T G I L L T R
1201 GTAGGACAAGCAATGTATGCCCTCCCATCCCAGGAGAAATTAAGTGAAATCAAACATTACAGGAATACTATTGACAAG 1280
1201 CATCCTGTTCGTTACATACGGGGAGGGTAGGGTCTCTTTAATTCACATTTAGTTTGTAATGTCCCTTATGATAACTGTTT 1280

D G G T K N Q N A S E E F N T T E V F R P G G G D M
1281 AGATGGAGGGACAAAAAATCAGAATGCAAGTGAGGAATTTAATACAACACTGAGGTATTTCAGACCTGGAGGAGGAGACATGA 1360
1281 TCTACCTCCCTGTTTTTTAGTCTTACGTTCACTCCTTAAATTAATGTTGACTCCATAAGTCTGGACCTCCTCCTCTGTACT 1360

R D N W R S E L Y K Y K V V Q I E P I G V A P T R A K
1361 GGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAGGTAGTACAAATGAACCAATAGGTGTGGCACCCACCCGTGCAAAA 1440
1361 CCCTGTTAACCTCTTCACTTAATATATTTATATTCATCATGTTTAACTTGGTTATCCACACCGTGGGTGGGCACGTTTT 1440
MfeI

R R V V Q K E K R A V G L G A F F L G F L G V A G S T
1441 AGAAGAGTGGTGCAGAAAGAAAAAGAGCAGTTGGACTGGGAGCTTTCTTCCTTGGGTTCTTAGGAGTTGCAGGAAGCAC 1520
1441 TCTTCTCACCACGTCTTTCTTTTCTCGTCAACCTGACCCTCGAAAGAAGGAACCCAAGAATCCTCAACGTCCTTCGTG 1520

M G A A S I T L T V Q A R Q L L S G I V Q Q Q S N L
1521 TATGGGCGCAGCGTCAATAACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATATTGTCTGGTATAGTGCAACAGCAGAGCAATCTGC 1600
1521 ATACCCGCGTCGCAGTTATTGCGACTGCCATGTCCGGTCTGTTAATAACAGACCATATCACGTTGTCTGCTCGTTAGACG 1600

L K A I E A Q Q H I L R L T V W G I K Q L Q A R V L A
1601 TGAAGGCTATAGAGGCTCAACAACATATATTGAGACTCACGGTCTGGGGCATTAAACAGCTCCAGGCAAGAGTCTGGCT 1680
1601 ACTTCCGATATCTCCGAGTTGTTGTATATAACTCTGAGTGCCAGACCCCGTAATTTGTTCGAGGTCCGTTCTCAGGACCGA 1680

L E R Y L K D Q Q L L G I W G C S G K L I C T T N V P
1681 CTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGGAATTTGGGGCTGCTCTGGAAAACCTCATCTGCACCACTAATGTGCC 1760
1681 GACCTTTCTATGGATTTCTAGTTGTGCGAGGATCCTTAAACCCCGACGAGACCTTTTGTGAGTAGACGTGGTGATTACACGG 1760
AvrII

W N S S W S N K T Y D K I W D N M T W M Q W D R E I

Anhang

1761 CTGGAACCTCTAGTTGGAGTAATAAAACTTATGATAAGATATGGGACAATATGACCTGGATGCAATGGGATAGAGAAATTA 1840
 1761 GACCTTGAGATCAACCTCATTATTTTGAATACTATTCTATACCCTGTTATACTGGACCTACGTTACCCTATCTCTTTAAT 1840

S N Y T E I I Y D L I E E S Q K Q Q E K N E Q E L L A

1841 GCAATTACACAGATAAATATATGATCTAATTGAAGAATCGCAGAAGCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGCA 1920
 1841 CGTTAATGTGTCTCTATTATATACTAGATTAACCTTCTTAGCGTCTTCGTCGTTCTTTTCTTACTTGTCTTAATAACCGT 1920

L D K W T S L W N W F S I S N W L W Y I R I F I M I V

1921 TTGGACAAGTGGACAAGTCTGTGGAATTGGTTTAGCATATCAAACCTGGCTATGGTATATAAGAATATTCATAATGATAGT 2000
 1921 AACCTGTTACCTGTTTCAGACACCTTAACCAAATCGTATAGTTTGACCGATACCATATATTCTTATAAGTATTACTATCA 2000

SspI

G G L I G L R I V C A V L N V I N R V R Q G Y S P L

2001 AGGAGGCTTGATAGGCTTAAGAATAGTTTGTGCTGTGCTTAATGTAATAAAATAGAGTTAGGCAGGGATACTCACCTTTGT 2080
 2001 TCCTCCGAACCTATCCGAATTCTTATCAAACACGACACGAATTACATTATTTATCTCAATCCGTCCTATGAGTGGAACA 2080

AflIII

S F Q T L T H H Q R E P D R P E R I E E G G G E R D R

2081 CATTCCAGACCCTTACCCACCACCAGAGGGAACCCGACAGACCCGAAAGAATCGAAGAAGGAGGTGGCGAGCGAGACAGA 2160
 2081 GTAAGGTCTGGGAATGGGTGGTGTCTCCCTTGGGCTGTCTGGGCTTTCTTAGCTTCTTCCTCCACCCTCGCTCTGTCT 2160

D R S V R L V S G S L A L

2161 GACAGATCCGTGCGCTTAGTGAGCGGATCCTTAGCACTTGC 2201
 2161 CTGTCTAGGCACGCGAATCACTCGCCTAGGAATCGTGAACG 2201

BsrBI

BamHI

Enzyme	Recognition	frequency	Position
BamHI	G'GATC_C	1	2186
BglII	A'GATC_T	1	722
BstEII	G'GTnAC_C	1	3
HindIII	A'AGCT_T	1	921

8.6 Lebenslauf:

Persönliche Daten:

Name: Heiko Hauser
Geburtsdatum: 28.05.1975
Geburtsort: Haan

Schulbildung:

1981-1985 Grundschole "Uhlandstrasse" in Solingen
1985-1991 Humboldt-Gymnasium in Solingen
1991-1992 Schüleraustausch USA
Comanche High School, Oklahoma
Abschluss: High School Diploma
1992-1995 Humboldt-Gymnasium in Solingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10/1995-07/2000 Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum
Nebenfach: Humanbiologie und Molekularbiologie
Abschluss: Diplom
Titel der Diplomarbeit: Charakterisierung der U6-spezifischen-TUTase
Gesamtnote: "gut"

Zivildienst:

08/2000-06/2001 Kinderklinik Mainz, Labor von Prof. Dr. Zabel

Weiterbildung/Berufspraxis:

08/2001-02/2006 Wissenschaftliche Stelle am Bernhardt Nocht Institut für Tropenmedizin zur Anfertigung einer Doktorarbeit.
Thema : Die Bedeutung der N-Glykane für die HIV-Subtypen-A und -C

8.7 Veröffentlichungen:

Paper:

Chichutek A, Brueckmann T, Seipel B, Hauser H, Schlaubitz S, Prawitt D, Hankeln T, Schmidt ER, Winterpacht A, Zabel BU

Comparative architectural aspects of regions of conserved synten on human chromosome 11p15.3 and mouse chromosome 7 (including genes WEE1 and LMO1)

Cytogenet Cell Genet. 2001, 93(3-4):277-83

Vortrag:

First International Meeting in Glycoviropology (2003):

Viruses and Glycans

The role of V3 Loop sequences showing the lack of N-linked glycosylation sites in HIV-1 clades A,C and B

SFB 470, Glycostrukturen in Biosystemen (2005)

Bedeutung der N-Glykane für die Infektiosität von HIV-1 Subtyp A Viren

Poster:

Frequency of V3-loop sequences showing the lack of N-linked glycosylation sites in HIV-1 clades A, C and B and characterization of HIV A glycosylation mutants

Heiko Hauser, Ingo Thordsen, Manfred Dietrich, Herbert Schmitz,

Jan terMeulen, Michael Schreiber.

HIV Pathogenesis. Whistler, Kanada 2004

The role of V3 Loop sequences showing the lack of N-linked glycosylation sites in HIV-1 clades A,C and B

Heiko Hauser, Ingo Thordsen, Manfred Dietrich, Herbert Schmitz,

Jan terMeulen, Michael Schreiber.

First International Meeting on Glycoviropology: Viruses and Glycans. Göteborg, Schweden, 2003

Frequency of V3-loop sequences showing the lack of N-linked glycosylation sites in HIV-1 clades A, C and B

Heiko Hauser, Ingo Thordsen, Manfred Dietrich, Herbert Schmitz,

Jan terMeulen, Michael Schreiber.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Erlangen 2002

Frequency of V3-loop sequences showing the lack of N-linked glycosylation sites in HIV-1 clades A, C and B

Heiko Hauser, Ingo Thordsen, Manfred Dietrich, Herbert Schmitz,

Jan terMeulen, Michael Schreiber.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Berlin 2003

Direct analysis of gp120-receptor binding using infectious viral particles and a new developed surface plasmon resonance assay

Voßmann M, Kirst M, Hauser H, Schreiber M

HIV Pathogenesis. Whistler, Kanada 2004

Direct analysis of gp120-receptor binding using infectious viral particles and a new developed surface plasmon resonance assay

Voßmann M, Kirst M, Hauser H, Schreiber M

First International Meeting on Glycoviropology: Viruses and Glycans. Göteborg, Schweden, 2003

8.8 Danksagungen

Meinem Chef, Michael, danke ich für das interessante Thema, seine überragenden Fotos und seine Diskussionsbereitschaft.

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

Herrn Prof. Dr. Günter Adam danke ich ebenfalls für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Meinen ehemaligen Arbeitskollegen und Freunden, Markus und Martin, danke ich für die Unterhaltung im und außerhalb des Labors. Unvergessen auch unsere gemeinsamen Tagungen.....

Meinen derzeitigen Arbeitskollegen, Birco und Melanie, danke ich für ein nettes Arbeitsklima.

Ferner danke ich natürlich meiner Solinger-”Crew”, ohne euch macht es nur halb so viel Spaß.

Natürlich danke ich meinen lieben Eltern, welche diese Arbeit durch ihre Unterstützung erst ermöglicht haben.

Zuletzt möchte ich Nina danken, für gutgemeinte Ratschläge und Korrekturen an dieser Arbeit. Am meisten danke ich ihr aber dafür, dass sie einfach nur für mich da ist. Respekt !

