

**Bedeutung von N-Glycanen
im V1- und V2- Bereich des HIV-1 Hüllproteins gp120 für die
Infektiosität und Neutralisierbarkeit von HIV-1**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Tobias Wolk
aus Hamburg

Hamburg 2003

1	<u>EINLEITUNG</u>	4
1.1	HIV IST DER ERREGER DES AIDS	4
1.2	DIE STRUKTUR DES HIV-1	6
1.3	DIE ERSTEN SCHRITTE DER HIV-INFEKTION: INTERAKTION MIT ZELLULÄREN REZEPTOREN	8
1.4	DER ZELLTROPISMUS DES HIV-1	11
1.5	DIE STRUKTUR DES HIV-1 OBERFLÄCHENPROTEINS GP120	12
1.6	DIE N-GLYCOSYLIERUNG DES GP120 UND DIE BEDEUTUNG FÜR DAS HIV-1	14
1.7	DIE ROLLE DER N-GLYCOSYLIERUNG INNERHALB DES V1- UND V2-LOOP DES HIV-1 UND DES SIV-1	18
1.8	ZIEL DIESER ARBEIT	20
2	<u>MATERIALIEN</u>	21
2.1	BAKTERIEN UND ZELLEN	21
2.1.1	BAKTERIEN	21
2.1.2	ZELLEN	21
2.1.3	ENZYME	22
2.2	PLASMIDE	22
2.3	SEREN	25
2.4	ANTIKÖRPER	25
2.5	LIGANDEN	25
2.6	REAKTIONSSYSTEME	25
2.7	OLIGONUCLEOTIDE	26
2.8	CHEMIKALIEN	28
2.9	PLASTIKWAREN	29
2.10	MEDIEN	29
2.10.1	MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	29
2.10.2	MEDIEN FÜR DIE BAKTERIENKULTUR	29
2.11	VERWENDETE PUFFER	30
3	<u>METHODEN</u>	31
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	31
3.1.1	ANZUCHT UND LAGERUNG VON BAKTERIEN	31
3.1.2	PRÄPARATION CHEMISCH KOMPETENTER BAKTERIEN (INOUE ET AL., 1990)	31
3.1.3	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	32

3.1.4	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA	32
3.1.5	REINIGUNG VON DNA	32
3.1.6	DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	32
3.1.7	HYDROLYSE VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	33
3.1.8	LIGATION VON DNA	33
3.1.9	HYBRIDISIERUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN	34
3.1.10	POLYMERASE-KETTENREAKTION	34
3.1.11	ZIELGERICHTETE MUTAGENESE	36
3.1.12	DNA-SEQUENZIERUNG	39
3.1.13	GELELEKTROPHORESEN	39
3.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	40
3.2.1	LYSE VON HIV-1-INFIZIERTEN ZELLEN	40
3.2.2	KULTIVIERUNG ADHÄRENTER ZELLEN	40
3.2.3	BESTIMMUNG VON ZELLZAHL UND ZUSTAND DER KULTUR	40
3.2.4	TRANSFEKTION VON ZELLEN	41
3.3	VIROLOGISCHE METHODEN	42
3.3.1	INFEKTION VON ZELLEN MIT HIV-1-VARIANTEN	42
3.3.2	MESSUNG DER INFEKTIOSITÄT VON HIV-VARIANTEN	42
3.3.3	DETEKTION INFIZIERTER ZELLEN DURCH IMMUNFÄRBUNG	42
3.3.4	HIV-1-REPLIKATIONSKINETIK	44
3.3.5	HIV-1 NEUTRALISATIONSTEST MIT HUMANEM SERUM	44
3.3.6	HIV-1 NEUTRALISATIONSTEST MIT MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN UND LÖSLICHEM CD4	45
3.3.7	HIV-1-INFEKTIVITÄTSASSAY	45
3.3.8	p24-ANTIGEN-ELISA	48
4	ERGEBNISSE	49
4.1	HERSTELLUNG DER KLONIERUNGSVEKTOREN	49
4.2	HERSTELLUNG EINER GENKASSETTE FÜR DEN V1- UND V2-LOOP	50
4.2.1	HERSTELLUNG DES VEKTORS pUCENVΔV1	50
4.2.2	HERSTELLUNG DES VEKTORS pUCENVΔV2	51
4.3	ERSTELLUNG DER REKOMBINANTEN VIRUSVARIANTEN	55
4.3.1	HERSTELLUNG DER NL4-3 V1-LOOP GLYCOVARIANTEN	55
4.3.2	HERSTELLUNG DER NL4-3 V2-LOOP GLYCOVARIANTEN.	56
4.3.3	GENERIERUNG REKOMBINANTER V1- UND V2-LOOP-GLYCOVARIANTEN DES NL4-3 VIRUS DURCH TRANSFEKTION VON HeLa-ZELLEN MIT RETROVIRALEN VEKTOREN	61
4.3.4	INFEKTION VON GHOST-INDIKATORZELLEN MIT NL4-3 GLYCOVARIANTEN	64

4.3.5	INFEKTION VON U87-CXCR-4 ZELLEN MIT NL4-3 V1/V2-LOOP GLYCOVARIANTEN	66
4.3.6	BESTIMMUNG DER MITTLEREN INFEKTIOSEN DOSIS (TCID ₅₀) DER V1- UND V2-LOOP-GLYCOVARIANTEN	68
4.3.7	EXPRESSION VON REKOMBINANTEM GP160 IN HELA-T4-ZELLEN	71
4.3.8	EINFLUSS DER V1- UND V2 LOOP GLYCOSYLIERUNG AUF DIE NEUTRALISATION DURCH HUMANE HIV-1 POSITIVE SEREN	73
4.3.9	NEUTRALISATION VON NL4-3 V1/V2-LOOP GLYCOVARIANTEN DURCH MONOKLONALE ANTIKÖRPER GEGEN DIE V2- UND V3-REGION	77
4.3.10	NEUTRALISATION VON NL4-3 V1/V2-LOOP GLYCOVARIANTEN DURCH LÖSLICHES CD4	81
5	<u>DISKUSSION</u>	83
5.1	HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEN NL4-3 VIREN MIT UNTERSCHIEDEN IN DER V1/V2-LOOP GLYCOSYLIERUNG	83
5.2	DIE N-GLYCOSYLIERUNG DES V1/V2-LOOP BEEINFLUSST DIE FUSIONSAKTIVITÄT UND REPLIKATIVEN EIGENSCHAFTEN DES HIV	85
5.3	DIE N-GLYCOSYLIERUNG DES V1/V2-LOOP HAT KEINEN EINFLUSS AUF DEN ZELLTROPISMUS	89
5.4	DAS FEHLEN BESTIMMTER N-GLYCANE IM V1/V2-LOOP MACHT DAS VIRUS SENSITIVER GEGENÜBER NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN	89
5.5	DAS FEHLEN BESTIMMTER N-GLYCANE IM V1/V2-LOOP MACHT DAS VIRUS RESISTENTER GEGEN NEUTRALISATION DURCH MONOKLONALE ANTIKÖRPER	91
5.6	DAS FEHLEN SPEZIFISCHER N-GLYCANE IM V1/V2-LOOP MACHT DAS VIRUS RESISTENTER GEGEN NEUTRALISATION DURCH LÖSLICHES CD4	93
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	95
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	96
8	<u>ANHANG</u>	109
8.1	ABKÜRZUNGEN	109
8.2	AMINOSÄUREN	112
8.3	VERÖFFENTLICHUNGEN	113
8.4	DANKSAGUNGEN	114
8.5	LEBENS LAUF	115

1 EINLEITUNG

1.1 HIV ist der Erreger des AIDS

Anfang der 80er Jahre wurde in Kalifornien bei einer Gruppe homosexueller Männer eine epidemische Zunahme eines bis dahin relativ seltenen Krankheitsbildes beobachtet, das schwere opportunistische Infektionen hervorrief und mit einem rapiden Abfall der CD4-T-Zell Population einherging (BRENNAN & DURACK, 1981; GOTTLIEB ET AL., 1981) - es wurde als AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) definiert. Der Übertragungsweg ließ schon damals auf ein, in Blut oder Blutprodukten vorhandenes, Virus schließen. Wenig später gelang es, aus den Lymphocyten von AIDS-Patienten ein Retrovirus zu isolieren (BARRE-SINOUSSE ET AL., 1983; GALLO ET AL., 1984; LEVY ET AL., 1984), das als Verursacher der Krankheit identifiziert und als HIV (*human immunodeficiency virus*) bezeichnet wurde (COFFIN ET AL., 1986). Trotz intensiver, sowohl grundlagenorientierter wie klinischer Forschung, die gewisse Erfolge in der Therapie der Erkrankung zeigen, sind bislang alle klassischen Ansätze für die Entwicklung eines präventiv wirkenden Impfstoffes gescheitert. Bis zum Ende des Jahres 2001 waren weltweit etwa 40 Millionen Menschen mit dem Erreger infiziert, und es sterben jährlich 3-4 Millionen Menschen an den Folgen von AIDS. Die höchsten Todesraten sind dabei auf dem afrikanischen Kontinent zu verzeichnen (AIDS EPIDEMIC UPDATE, UNAIDS/WHO, 2001). Die HIV-Infektion hat sich mittlerweile zu der bedeutendsten Infektionskrankheiten entwickelt, die weltweit die meisten Todesfälle fordert (BALTER ET AL., 1999).

HIV ist ein Vertreter der Familie der Retroviridae, deren Enzym Reverse Transkriptase (RT) das Virus in die Lage versetzt, nach der Infektion sein RNA-Genom in DNA umzuschreiben. Diese DNA-Kopie, das Provirus, wird in das Genom der Wirtszelle integriert und von deren Replikationsapparat vermehrt. In dieser Form ist das Virus vor der Immunabwehr geschützt und kann so im Wirt über lange Zeit persistieren. HIV gehört zur Unterfamilie der Lentiviren (*lenti* = griechisch: langsam), die chronische Infektionen mit teilweise jahrelangen asymptomatischen Phasen etablieren. Neben humanpathogenen Arten werden zu dieser Gruppe auch einige tierpathogene Viren, wie das *Bovine Immunodeficiency Virus* (BIV) bei Rindern, das *Feline Immunodeficiency Virus* (FIV) bei Katzen und das *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) bei Halbweaffen, gezählt.

HIV infiziert primär Zellen des menschlichen Immunsystems, vor allem T-Lymphocyten,

Makrophagen und dendritische Zellen. Nach der häufig inapparent verlaufenen Primärinfektion schließt sich eine oft jahrelange asymptomatische Phase an, in der das Virus in den Zellen persistiert. Im weiteren Verlauf der Pathogenese, dem Eintritt in die symptomatische Phase, erfolgt eine starke Abnahme der CD4-positiven oder T-Helferzellen (T_H -Zellen), was zu einer kontinuierlichen Schwächung der adaptiven Immunabwehr und dem Auftreten opportunistischer Infektionen, wie Candidosen und Herpes zoster führt. Wird ein Schwellenwert von 200 T_H -Zellen pro μ l Blut unterschritten, ist das klinische Vollbild des AIDS-Stadiums erreicht. Für diese Krankheitsphase spezifische Erkrankungen sind *Pneumocystis carinii*-Pneumonien, chronische *Herpes simplex*-Infektionen und maligne Tumoren, wie das *Karposi*-Sarkom und Lymphome. In der Spätphase der tödlichen Erkrankung können auch Demenzsyndrome und Gehirnatrophien beobachtet werden.

Es sind bislang zwei HIV-Typen beschrieben worden - HIV-1 und HIV-2. Das HIV-2 weist auf molekularer Ebene grosse Ähnlichkeiten mit dem SIV der Halbweltaffen auf und ist hauptsächlich in Westafrika verbreitet. Das HIV-1 wird aufgrund von Sequenzvariationen in die drei Gruppen M, O und N unterteilt. Während die Varianten der M- („Main“) Gruppe auf allen Kontinenten zu finden sind, treten die O- („Outlier“) und N- („New“-) Gruppen vor allem in Gebieten Westafrikas auf (SIMON ET AL., 1998). Weiterhin definiert man für HIV-1 zehn Subtypen (A bis I, sowie HIV-0), die jeweils in bestimmten geographischen Regionen überwiegen. So dominieren in Afrika die Subtypen A und C, in Südostasien der Subtyp E, während in Europa und Nordamerika derzeit etwa 1,5 Millionen Menschen mit dem Subtyp B infiziert sind.

1.2 Die Struktur des HIV-1

HIV-1 bildet etwa 100 nm große, umhüllte Viruspartikel (Abb.1). Das Capsid, welches von dem Capsidprotein p24 gebildet wird, enthält das Virusgenom im Form zweier Kopien einzelsträngiger Positiv-Strang-RNA. Die RNA ist mit den Nucleocapsidproteinen (p7) und der viralen Reversen Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, assoziiert. In reifen Viruspartikeln finden sich innerhalb des Capsides zudem die Enzyme HIV-Integrase und HIV-Protease, die für das proteolytische Trimmen viraler Vorläuferproteine und die Integration in das Wirtszellgenom zuständig sind. Über das Linkerprotein p6 ist das Capsid mit der Innenseite der Virusmembran verbunden. Hier finden sich auch das Matrixprotein p17, sowie die Lateralkörperchen. Das Matrixprotein ist über aminoterminalen Myristinsäurereste mit der Virusmembran assoziiert und somit für Form und Stabilität des Partikels verantwortlich. In die von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleiteten Virushülle sind zwei virale Glykoproteine eingelagert, die vom *env* (*envelope*)-Gen kodiert werden. Das gemeinsame Vorläuferprotein gp160 wird im Endoplasmatischen Reticulum gefaltet, glycosyliert (LEONARD ET AL., 1990) und schließlich im Golgi-Apparat proteolytisch in gp120 und gp41 gespalten, bevor es in die Zellmembran eingelagert wird (STEIN & ENGLEMAN, 1990). Das Transmembranprotein (TM) gp41 ist hierbei über seine Ektodomäne nicht kovalent mit dem externen Oberflächenprotein (SU, *surface unit*) gp120 assoziiert und scheint in der Membran als Trimer vorzuliegen (FARZAN ET AL., 1998; WEISSENHORN ET AL., 1997). Die Hauptaufgabe des gp120/gp41 Oligomers ist die Einleitung der viralen Infektion einer Wirtszelle durch Bindung an die zellulären Rezeptoren und die Katalyse des viralen Eintritts durch die Zellmembran. Die Hüllproteine bieten somit besonders gute Ziele für neutralisierende Antikörper (SATTENTAU & MOORE, 1995).

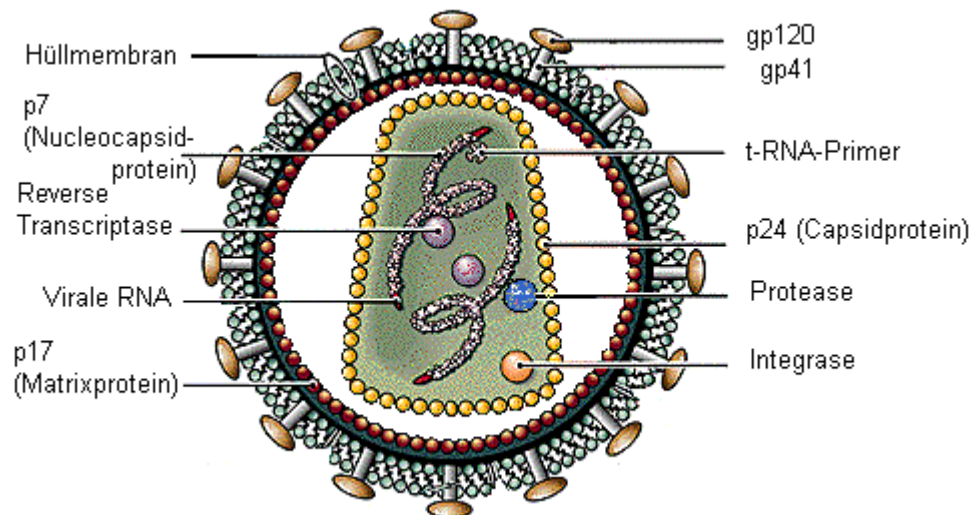


Abb. 1 Aufbau und Struktur des HIV-1

Das Viruspartikel ist von einer Hüllmembran ummantelt. In diese Lipidmembran ist das Transmembranprotein gp41, das mit dem externen Hüllprotein gp120 assoziiert ist, eingelagert. An der Innenseite der Membran findet man die Matrixproteine. Die Virusmembran umschließt das Capsid, das von dem Capsidprotein p24 gebildet wird und die beiden Kopien der viralen RNA umschließt, welche an die t-RNA Primer angelagert sind. Nucleocapsidproteine p7 und die Reverse Transkriptase sind mit der RNA assoziiert. Im Capsid befinden sich außerdem die Integrase, sowie die Protease.

1.3 Die ersten Schritte der HIV-Infektion: Interaktion mit zellulären Rezeptoren

Die HIV-Infektion wird durch eine hochaffine Bindung des externen HIV-Hüllproteins gp120 an das CD4-Protein in der Membran von T_H-Zellen eingeleitet (DALGLEISH ET AL., 1984; KLATZMANN ET AL., 1984A,B; MADDON ET AL., 1986). Der primäre HIV-Rezeptor CD4 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und stellt einen Oberflächenmarker der T_H-ZELLEN dar. Eine Zugabe von löslichem CD4 (sCD4) verhindert kompetitiv die Infektion von T_H-Zellen (WEISS, 1988 A,B) (Abb.2). Die CD4-Bindung induziert konformationelle Änderungen innerhalb des gp120, die zur Ausrichtung oder Bildung von Bindestellen für spezifische Chemokinrezeptoren führen. Diese G-Proteingekoppelten Rezeptoren aus der Familie der 7-Transmembranproteine gehören zu einer Gruppe von über 200 verschiedenen Membranproteinen, deren Funktion die Bindung von Chemokinen (*chemoattractant cytokines*) und die daraus resultierende Signaltransduktion ist (BERGER ET AL., 1999; MURPHY ET AL., 2000). Die Chemokine bestehen aus etwa 60 bis 75 Aminosäuren und gehören zur Familie der Cytokine. Ihre Nomenklatur leitet sich aus Aminosäuresequenzen ab, in denen zwei Cysteinreste entweder nebeneinander (CC-Chemokine) oder durch eine, bzw. drei beliebige Aminosäuren getrennt sind (CXC- bzw. CX₃C-Chemokine). Der erste identifizierte HIV-1 Korezeptor war CXCR4, der auf T-Lymphocyten lokalisiert wurde (FENG ET AL., 1996; BERSON ET AL., 1996). Sein natürlicher Ligand, das CXC-Chemokin SDF-1 (*stroma cell derived factor*) verhindert bei Zugabe *in vitro* die HIV-Infektion CXCR4-positiver Zellen. Wenig später gelang die Identifizierung eines weiteren wichtigen Korezeptors, CCR5, dessen natürliche Liganden MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sind (ALKHATIB ET AL., 1996; CHOE ET AL., 1996; DENG ET AL., 1996).

Nach der Bindung des Korezeptors führen weitere strukturelle Änderungen in den viralen Glycoproteinen dazu, dass die aminoternale hydrophobe Fusionsdomäne des Transmembranproteins gp41 in die Membran der Zielzelle inseriert wird. Dadurch fusioniert die Virusmembran mit der Membran der Zellen, und das Capsid gelangt in das Cytoplasma der Zielzelle. Dort wird das virale RNA-Genom von der viralen Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA transkribiert.

Entscheidend dafür, welcher Korezeptor von einer bestimmten HIV-1 Virusvariante genutzt wird, ist die dritte variable Region des Oberflächenproteins gp120, der sogenannte V3-Loop (SHIODA ET AL., 1991; CHENG-MAYER ET AL., 1990; COCCHI ET AL., 1996). Der V3-Loop

besteht aus einer Schleife von 35-37 Aminosäuren, deren Form von einer Disulfidbrücke gebildet wird. Die direkte Interaktion des V3-Loops mit den Korezeptoren konnte durch die Bindung von V3-Loop-Peptiden an CCR5 bzw. CXCR4 gezeigt werden (SAKAIDA ET AL., 1998; RABEHI ET AL., 1998; MEYER ET AL., UNVERÖFFENTLICHTE DATEN). Der V3-loop gilt als immundominante Neutralisationsdomäne von HIV-1 (JAVAHERIAN ET AL., 1989), gegen die im Patienten die Mehrzahl neutralisierender Antikörper gebildet wird (PROFY ET AL., 1990; LAMAN ET AL. 1992). Auch der V1- und V2-loop des Virus weist immunogene Eigenschaften auf und enthält eine Reihe linearer und konformationeller Epitope für die Bindung neutralisierender monoklonaler Antikörper (MOORE ET AL., 1993, MCKEATING ET AL., 1993, PINTER ET AL 1998). Die Aminosäuresequenzen des V1/V2-loop innerhalb der verschiedenen HIV-Stämme und Isolate weisen eine hohe Variabilität auf, wobei besonders der V2-loop im Verlauf der Erkrankung ein hohes Maß an Längenpolymorphismen zeigt (LAMERS ET AL., 1993; WANG ET AL., 1996). Die sechs N-Glycane g2 –g7 von V1/V2 hingegen sind zu über 90% konserviert, was auf eine besondere Bedeutung für funktionelle Zusammenhänge hinweist (MYERS ET AL., 1996).

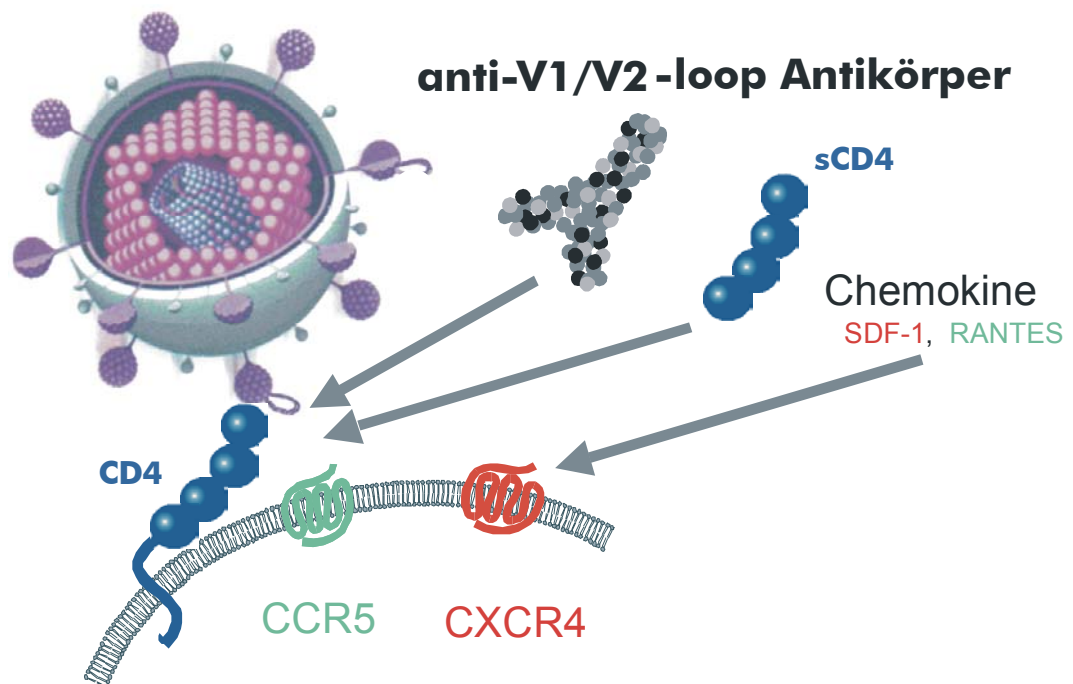


Abb. 2 HIV-1 – Rezeptorinteraktionen und deren Inhibition

HIV-1 bindet über sein Hüllprotein gp120 an CD4 und nach konformationeller Änderung innerhalb des Proteins an die virusspezifischen Korezeptoren CXCR4 oder CCR5. Diese Bindung wird über den V3-loop des gp120 vermittelt. Der V3-loop ist Hauptepitop neutralisierender Antikörper. Lösliches CD4 (sCD4), sowie die Chemokine SDF-1 und RANTES, als natürliche Liganden der Korezeptoren von HIV-1, sind in der Lage eine Infektion zu hemmen.

1.4 Der Zelltropismus des HIV-1

Schon früh nach Entdeckung des HIV-1 wurde beobachtet, dass aus dem Blut von Patienten isolierte HI-Viren *in vitro* unterschiedliche Replikationseigenschaften zeigten. Die langsam replizierenden Viren konnten sowohl in T-Zellen, als auch in Makrophagen kultiviert werden. Diese Eigenschaft unterschied sie von den schnell wachsenden Viren, die nur in T-Zell-Kulturen replizieren konnten. Daher wurde in einer ersten Nomenklatur zwischen T-tropen und M-tropen Virusvarianten unterschieden (CHENG-MAYER ET AL., 1988; CONNOR ET AL., 1994; FENYÖ ET AL., 1989). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal war die Bildung von mehrkernigen Riesenzellen, den Syncytien. T-trope Viren verursachten im Gegensatz zu M-tropen Viren in Zellkulturen die Bildung von Syncytien (SI = *syncytium inducing*). Die von den T-tropen Viren induzierten Riesenzellen dienten *in vitro* als ein sehr leichtes Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Phänotypen. Interessant war die Beobachtung, dass zu Beginn der HIV-1 Infektion die M-tropen (NSI = *non syncytium inducing*)-Virustypen dominieren (SCARLATTI ET AL., 1997). Nach einer zwei bis zehn Jahre andauernden asymptomatischen Phase erfolgt ein Wechsel des viralen Phänotypes, und es lassen sich neben NSI-Viren auch die T-tropen SI-Viren in Patienten nachweisen (SCARLATTI ET AL., 1997, BJÖRNDAL ET AL., 1997, TERSMETTE ET AL., 1989). Einige M-trope Viren verlieren die Fähigkeit, Makrophagen zu infizieren und verändern sich zu einem rein T-tropen Virustyp. Generell ist jedoch der dualtrope Virustyp in der späten Phase der HIV-Infektion vorherrschend. Das Auftreten von Viren des SI-Typus korreliert mit dem Fortschreiten der Erkrankung und dem Beginn der AIDS-Phase (CONNOR ET AL., 1993). Aufgrund der Eigenschaft von HIV, verschiedene Korezeptoren für die Infektion von Zellen nutzen zu können, hat sich die Nomenklatur der HIV-Typen grundlegend geändert. Man bezeichnet heute HI-Viren, die nur CXCR4 nutzen können, als R4-trope Virusvarianten und Viren, die ausschließlich CCR5 nutzen können, als R5-trop. Viren, die beide Korezeptoren nutzen, gelten als dualtrop oder als R5X4-Viren (BERGER ET AL., 1998). Zusätzlich sind auch multitrope Viren bekannt, die neben CCR5 und CXCR4 noch weitere Korezeptoren nutzen können. CXCR4 und CCR5 gelten jedoch als die beiden wichtigsten Korezeptoren, die von jedem bislang bekannten HIV-1-Isolat genutzt werden.

1.5 Die Struktur des HIV-1 Oberflächenproteins gp120

Das HIV-1 Oberflächenprotein gp120 (Abb.3) besteht je nach HIV-Variante aus ca. 470-500 Aminosäuren und enthält ca. 25 Erkennungssequenzen für N-Glycosylierungen. Da davon ausgegangen wird, dass sämtliche dieser Sequenzen genutzt werden (LEONARD ET AL., 1990A), tragen die Zuckerreste somit zu etwa der Hälfte der Molekülmasse bei. Ein Vergleich der Sequenzmuster der gp120 Glycoproteine unterschiedlichster HIV-Isolate ergab, dass sich fünf konservierte Regionen (C1 – C5) identifizieren lassen, die von fünf variablen Bereichen (V1-V5) unterbrochen sind (MYERS ET AL., 1992; STARCICH ET AL., 1986). Diese variablen Regionen, von denen die Bereiche V1, V2, V3 und V4 durch Disulfidbrücken zu Schleifen, den sogenannten Loops, geformt sind (LEONARD ET AL., 1990B), sind von entscheidender Bedeutung für die viralen Eigenschaften, sowie die Antigenität des HIV-1. Über eine Kokristallisation eines modifizierten gp120-Moleküls zusammen mit Teilen des CD4-Moleküls sowie dem Fab-Bereich eines Antikörpers, gelang es, die Kristallstruktur von gp120 teilweise aufzuklären (KWONG ET AL., 1998). In dieser Struktur bildet das modifizierte gp120 eine innere und eine äußere Domäne, die durch ein viersträngiges β -Faltblatt (*bridging sheet*) verbunden sind. Die Bindungsstelle für das CD4-Protein wird im Bereich der konservierten Basis im 3'-Bereich der drei Loop-Strukturen vermutet. Es bestehen zudem Hinweise darauf, dass die variablen loops V1 und V2 im Zusammenspiel mit dem V3-loop, der je nach Konformation oder Ladung den viralen Tropismus bestimmt (SHIODA ET AL., 1991; CHENG-MAYER ET AL., 1990; COCCHI ET AL., 1996), wichtige modulierende Funktionen in der Interaktion mit den viralen Korezeptoren spielen.

Aufgrund von Antikörperbindungsstudien geht man davon aus, dass die variablen Bereiche des gp120 an der Oberfläche exponiert sind, während die konservierten Regionen einen zentralen Kern bilden (MOORE UND SODROSKI, 1996). Die exponierten Bereiche des gp120 werden dabei durch N-Glycane verdeckt, was die Zugänglichkeit dieser Bereiche für Antikörper beeinträchtigt (WYATT ET AL., 1998).

gp120

477 Aminosäuren
24 N-Glycane

V1-V2 loop

67 Aminosäuren
6 N-Glycane
g2-g7

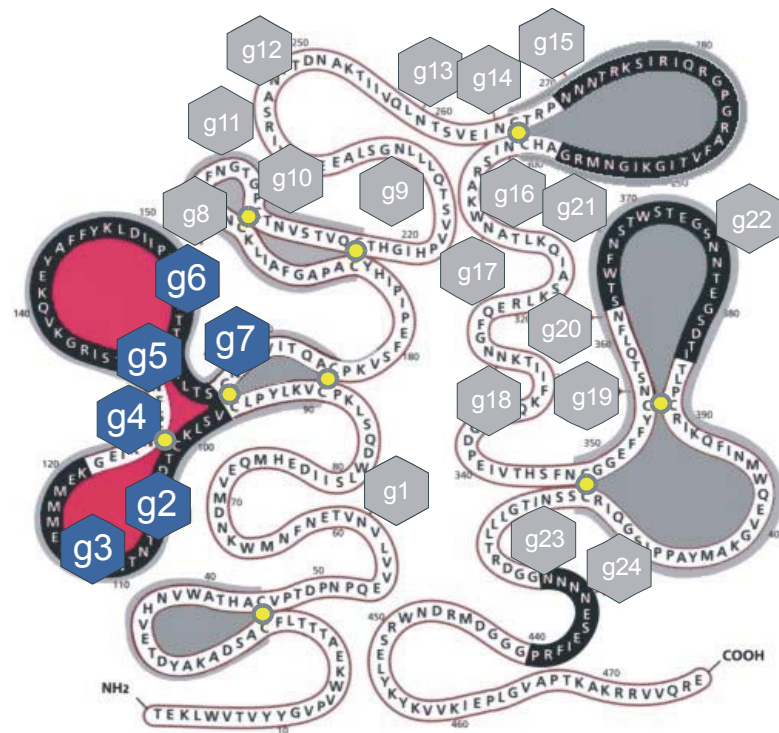


Abb. 3 Das HIV-1 Hüllprotein gp120

Dargestellt ist das gp120 des HIV-Stammes IIIB. Das Hüllprotein besteht aus 477 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz des gp120 lässt sich in fünf variable (schwarz unterlegt) und sechs konservierte (weiß unterlegt) Bereiche unterscheiden. Die variablen Bereiche V1 bis V4 sind über Disulfidbrücken zu Schleifen, den sog. Loops geschlossen. Zwischen den variablen Bereichen liegen die konservierten Regionen C1-C5. In der Sequenz des gp120 findet man 24 Erkennungssequenzen, NXS und NXT, für die N-Glycosylierung, die hier mit ,g1‘ bis ,g24‘ bezeichnet sind. Man unterscheidet zwischen verschiedenen N-Glycanen, den hochmannosidischen Polysacchariden, den Polysacchariden vom Komplex-Typ und einem Hybridtyp.

Die Bereiche des V1/V2-loop (rot unterlegt) umfassen insgesamt 67 Aminosäuren mit insgesamt sechs N-Glycanen g2-g7 vom Komplex-Typ (blau unterlegt). Für den V1- und V2-loop ist eine Rolle bei der Exponierung der Korezeptorbindestelle auf gp120 bekannt. Gerade der V2-loop ist ein immunogenes Epitop für eine Reihe von monoklonalen Antikörpern. Im Patienten findet man spezifische Antikörper gegen beide Bereiche.

1.6 Die N-Glycosylierung des gp120 und die Bedeutung für das HIV-1

Zu den zahlreichen posttranslationalen Modifikationen, die bei der Proteinsynthese erfolgen können, gehört auch die N-Glycosylierung. Die N-Glycosylierung erfolgt im Endoplasmatischen Reticulum (ER) sowie im Golgi-Apparat der Zelle. Als N-Glycosylierungssignal werden die Aminosäuremotive NXS und NXT erkannt, wobei X mit jeder beliebigen Aminosäure außer Prolin (P) besetzt werden kann. Das N-Glycan wird über eine N-glycosidische Bindung an das Asparagin (N) des N-Glycosylierungsmotives angehängt. Es ist bekannt, dass in eukaryotischen Zellen durchschnittlich 90% der Erkennungssequenzen für die N-Glycosylierung genutzt werden (GAVEL UND VON HEIJNE, 1990). Untersuchungen zur N-Glycosylierung des gp120 haben gezeigt, dass alle vorhandenen N-Glycosylierungsstellen genutzt werden (LEONARD ET AL., 1990).

Fast alle Schlüsselmoleküle, die an der angeborenen oder adaptiven Immunabwehr beteiligt sind, sind Glykoproteine. Die vielzähligen Möglichkeiten der Glycosylierung von Proteinen spielen zum Beispiel eine wichtige Rolle in der Biosynthese und biologischen Aktivität von Glycoproteinen, die an der Antigenerkennung beteiligt sind. Die Zucker haben essentielle Funktionen in der Proteinfaltung und deren Zusammenbau, der Qualitätskontrolle von Proteinvorläufern und dem ER-assoziierten retrograden Transport fehlgefalteter Proteine. Zucker sind beteiligt an der Generierung und dem Beladen antigener Peptide an MHC Klasse I-Moleküle und beeinflussen auch den Umfang antigener Peptide, die im Verlauf des endosomalen Pfades für die Präsentation auf MHC Klasse II-Molekülen gebildet werden. So werden bestimmte Endopeptidasen, die an der Prozessierung antigener Peptide beteiligt sind, von der N-Glycosylierung blockiert. Glycane können somit körpereigene Proteine und einige virale Glycopeptide vor dem Abbau schützen, während Mikroben, die keine N-Glycane aufweisen vollständig zu antigenen Peptiden prozessiert werden. Aufgrund ihrer Größe können Glycane grosse Bereiche von Proteinoberflächen abdecken. Somit sind beispielsweise Immunglobuline in Serum und Sekreten, und Moleküle in der T-Zell-Synapse vor Proteaseabbau geschützt, zudem werden nichtspezifische Protein-Protein-Interaktionen verhindert. Die dreidimensionale Struktur eines Proteins schließlich definiert das Muster seiner Zuckerstruktur (RUDD ET AL., 1999), sodass ein vollkommen unterschiedliches Repertoire an Oligosacchariden auf der Oberfläche einer einzelnen Zelle dargestellt werden kann. Somit wird die Wahrscheinlichkeit herabgesetzt, dass Lektine, als Komponenten der nativen Immunabwehr, an Zellen binden, da Lektine als Erkennungsmuster normalerweise

repetitive Zuckerstrukturen erfordern.

Einige dieser Vorteile, die eine Glycosylierung bietet, werden von bestimmten Viren, wie HIV-1, ausgenutzt, indem sie die Glycosylierungsmaschinerie der Wirtszellen zur Bildung ihrer eigenen Hüll-Glycoproteine verwenden, um so der Immunabwehr zu entgehen.

N-Glycane an gp120 machen mehr als 50% des Molekulargewichtes eines Proteins aus (LASKY ET AL., 1986; MIZUOCHI ET AL., 1988; GEYER ET AL., 1988). In Eukaryoten findet man verschiedene Formen von N-Glycanen, des hochmannosidischen, komplexen und hybriden Types (Abb. 4). Alle Formen weisen ein identisches Kern-Oligosaccharid auf, das sich aus zwei N-Acetylglucosamin- und drei Mannoseeinheiten zusammensetzt. An die Mannoseeinheiten sind, je nach N-Glycosylierungstyp, verschiedene Zuckerbausteine addiert. Der hochmannosidische Typ besteht ausschließlich aus Glucose- und Mannoseeinheiten, die in Form von bi- oder triantennären Strukturen an das Kern-Pentasaccharid angehängt sind. Der komplexe Typ weist dagegen Strukturen mit bis zu vier Antennen auf, die neben Mannose und Glucose auch N-Acetylglucosamin und Fucose, sowie endständige Sialinsäuren tragen. Bei der hybriden Form handelt es sich um eine Mischform von komplexen und hochmannosidischen Glycanen (Abb. 4). Innerhalb dieser Hauptformen findet man eine Vielzahl von Varianten, die sich vor allem in der Zusammensetzung und Verzweigung der Oligosaccharide unterscheiden. Somit ergibt sich eine Vielzahl von verschiedenen N-Glycanen auf einem Protein, weswegen man auch von einer Mikroheterogenität der N-Glycosylierung spricht. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung der Mikroheterogenität von N-Glycanen, wie sie auf rekombinantem und virus-assoziiertem gp120 zu finden sind. Analysen haben gezeigt, dass sich auf gp120, das in der embryonalen Stammzelllinie H9 exprimiert wurde, mehr als 50 verschiedene Varianten der drei Hauptformen der N-Glycane befinden. Die enorme Variabilität der Aminosäuresequenz, die die verschiedenen HIV-Varianten und Subtypen auszeichnet, wird durch die Komplexität der N-Glycosylierung weiter gesteigert.

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

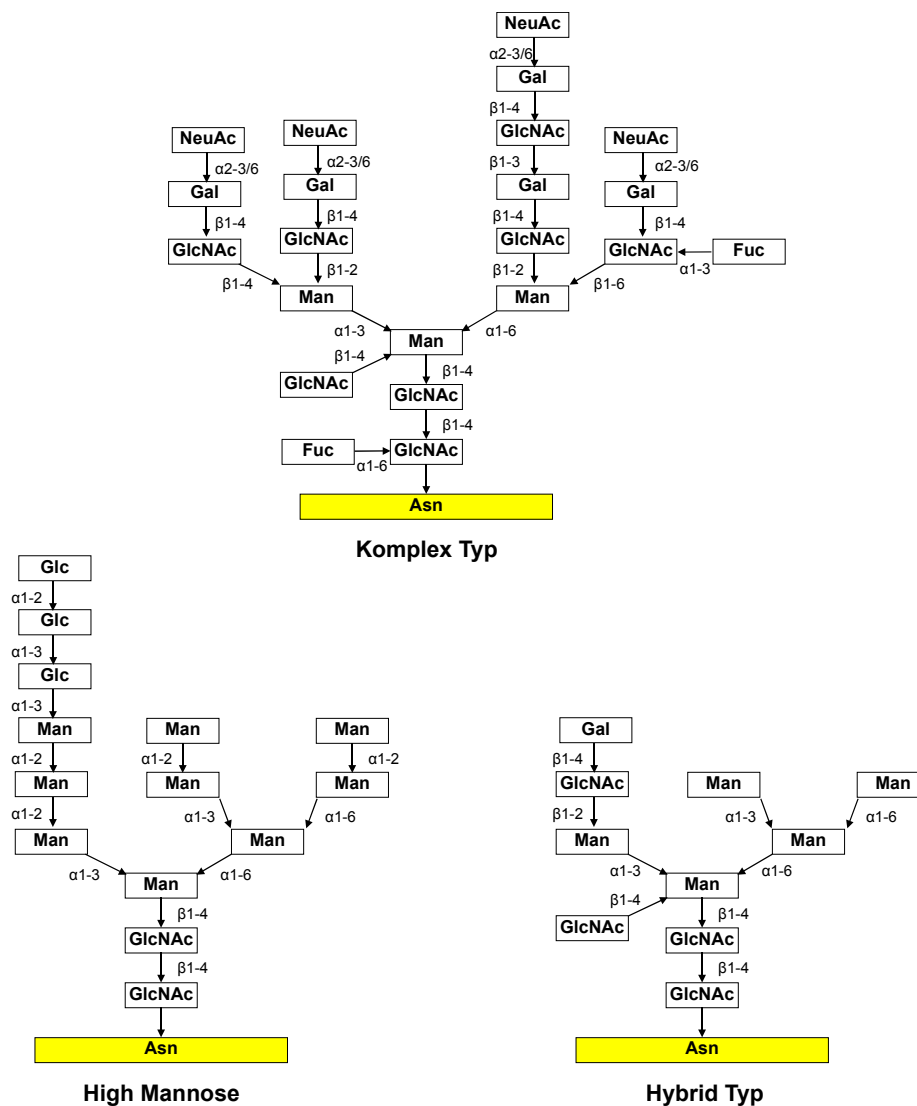


Abb. 4 Formen der N-Glycosylierungen

Bei der N-Glycosylierung unterscheidet man prinzipiell drei Formen: High-Mannose, Hybrid Typ und Komplex Typ. Die Darstellung gibt die möglichen Verknüpfungen der Zucker an. An das Grundgerüst, bestehend aus drei Mannoseeinheiten, werden die verschiedenen Zuckerstrukturen angehängt. Asn: Asparagin; GlcNAc: N-Acetylglucosamin; Man: Mannose; Gal: Galaktose; NeuAc: Neuraminsäure; Fuc: Fucose.

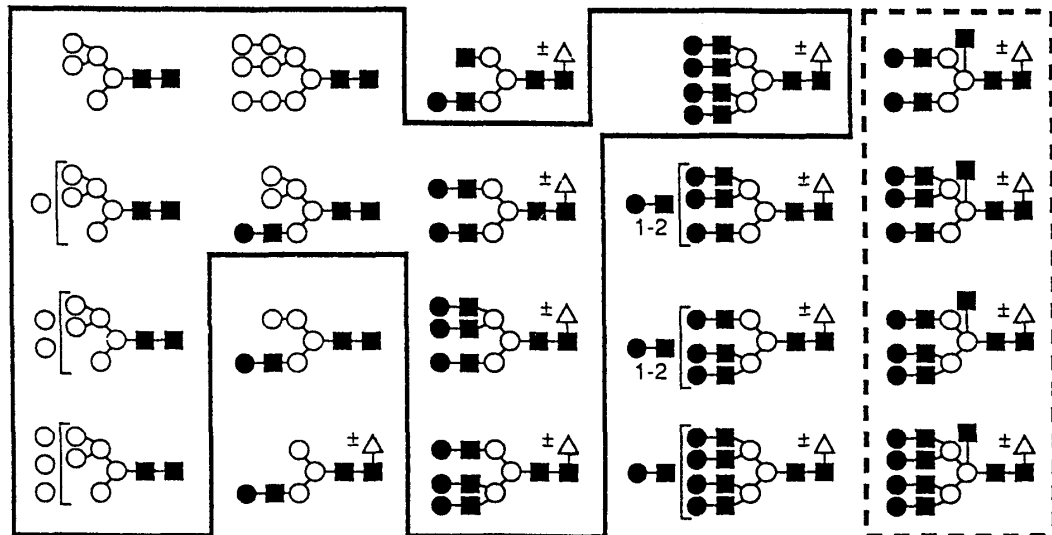


Abb. 5 Die verschiedenen Formen der N-Glycosylierung des gp120

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

Schwarzer Rahmen: Glycane die auf rekombinantem und virus-assoziiertem gp120 gefunden wurden.

Gestrichelter Rahmen: Glycane auf virus-assoziiertem gp120.

Alle anderen Symbole: gefunden auf rekombinantem gp120.

(Abb. aus TEN FEIZI ET AL., 1990)

1.7 Die Rolle der N-Glycosylierung innerhalb des V1- und V2-loop des HIV-1 und des SIV-1

Für das HIV-1 Oberflächenprotein gp120 wurde ein Einfluss der N-Glycosylierung auf die korrekte Faltung und damit auf die CD4-Bindung beschrieben (LI ET AL., 1993). Sobald gp120 von Zellen gebildet wurde, die Proteine nicht glycosylieren konnten, war gp120 nicht in der Lage, an CD4 zu binden. Enzymatisch deglycosyliertes gp120 dagegen bindet in gleichem Maße an CD4, wie die glycosylierte Form (FENOUILLET ET AL., 1989, 1990, 1991; LI ET AL., 1993). Der Einfluss von einzelnen N-Glycanen des gp120 auf die Replikationsfähigkeit der Viren konnte für CXCR4-trope HIV-1 Laborstämme gezeigt werden. Die Elimination von N-Glycanen im V1/2 und V3 Bereich des gp120 von HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{HXB2} führten zu einer verminderten Replikationsfähigkeit dieser Viren (WILLEY ET AL., 1988; LEE ET AL., 1992).

Die Funktion der N-Glycane des gp120, insbesondere des V1- und V2- loop, war zu Beginn dieser Arbeit nur wenig untersucht. Es gab jedoch Hinweise darauf, dass diese Zuckerstrukturen eine wichtige Rolle für die Interaktion der Immundefizienzviren mit dem Immunsystem des infizierten Wirtes spielen, indem die Erkennung bestimmter Epitope durch T-Lymphocyten reduziert (BOTARELLI ET AL., 1991) und die generelle Immunogenität von Epitopen herabgesetzt wird (REITTER ET AL., 1998). Für das Hüllprotein gp130 des SIV konnte gezeigt werden, dass die Entfernung der N-Glycosylierung im V1/V2 Bereich des SIV gp130 zu einer drastischen Abnahme der Virämie im Affen führte (REITTER ET AL., 1998). Viren ohne diese N-Glycosylierung waren hochimmunogen, und die induzierte humorale Immunantwort war in den infizierten Tieren entsprechend stark ausgeprägt. Nach einiger Zeit erfolgte jedoch ein Ansteigen der Viruslast, und es zeigte sich, dass in den infizierten Tieren eine Virusvariante generiert worden war, die im Bereich des eliminierten N-Glycans eine neue N-Glycosylierungsstelle im V1-Bereich aufwies. Dieses Glycan (g6) induzierte einen Schutz vor der humoralen Immunantwort. Zum ersten Mal konnte somit eine Bedeutung der N-Glycane für die Infektion mit Immundefizienzviren nachgewiesen werden. Indem bei SIV der V1/V2-Bereich immundominante Epitope aufweist, übernimmt er bei diesem Immundefizienzvirus die Rolle, die der V3-Loop für das HIV-1 spielt. Zur Untersuchung der Rolle der immunogenen Bereiche von HIV-1 *in vivo* wurden Viruschimären generiert, die unter anderem *env*-Bereiche des HIV-1 Gens im Hintergrund der SI-Viren trugen. Untersuchungen mit diesen sogenannten SHIV-Varianten haben ergeben, dass bei humanem gp120 der V3-Loop das Hauptepitop für neutralisierende Antikörper darstellt. N-Glycane im

V3-Bereich blockieren neutralisierende Antikörper, so dass SHIV-Varianten, die in diesem Bereich N-Glycane tragen, im Tierexperiment der Immunantwort entkommen (CHENG-MAYER ET AL., 1999).

Die Kristallstruktur des HIV-gp120 (KWONG ET AL., 1998) lässt vermuten, dass der V1- und V2-loop nach Bindung des CD4-Rezeptors eine konformationelle Änderung erfährt und dadurch direkt an der Bildung, bzw. der Exponierung der Bindestelle für die HIV-1 spezifischen Korezeptoren beteiligt ist. Offensichtlich scheint der V1/V2-loop- Bereich, im funktionell gefalteten Protein, räumlich in direkter Nähe zum V3-loop zu stehen, bzw. ihn abzudecken. Es wird vermutet, dass nach Bindung des gp120 an CD4 eine konformationelle Änderung innerhalb des Proteins zu einer Verschiebung des V1/V2-loops in Relation zum V3-loop führt, was letztendlich die Korezeptorbindungsstelle exponiert. Dass die Glycosylierung des V1- und V2- loops sowohl die CD4-Bindefähigkeit, wie auch die Korezeptorinteraktion beeinflusst, ist sowohl für X4-, wie auch R5- Isolate gezeigt worden (MONDOR ET AL., 1998; CHO ET AL., 1998; BOYD ET AL., 1993).

Für die konformationell eng benachbarten V1- und V2-Bereiche des HIV-1 gibt es Hinweise, dass auch ihre, je nach Isolat, sechs bis sieben N-Glycane eine entscheidende Rolle für die Funktionalität des gp120 und den Schutz bestimmter immunogener Epitope spielen. Rekombinante HIV-1_{BRU} Viren, denen bestimmte Zuckermotive in der V1-loop fehlten, zeigten erhöhte Resistenz gegen eine Neutralisation mit Antikörpern gegen Epitope des V3-loop sowie Neutralisation mit löslichem CD4 (GRAM ET AL., 1994). Diese Beobachtung legt nahe, dass N-Glycane des V1 loop die dreidimensionale Struktur des gp120 modulieren können ohne die gesamte funktionelle Integrität des Proteins zu beeinflussen. Eine Rolle des V1 loop für die Immunogenität des gp120 konnte an Experimenten mit rekombinanten HIV-1_{HXB2} Viren gezeigt werden. Nach Maskierung von immundominanten Epitopen innerhalb des V3-loop mit zusätzlich eingefügten N-Glycanen wurde die Antikörper-Antwort vom V3-Epitop zum V1-Epitop verlagert (GARRITY ET AL., 1997). Die Beobachtung, dass in den V1/V2 loop- Domänen von Patientenisolaten eine Reihe neutralisierender Epitope gefunden wurde (PINTER ET AL., 1998), ist ein weiterer Beleg für eine mögliche Rolle der Glycosylierung für die Maskierung immunogener Epitope.

Die Untersuchung der Funktion von N-Glycanen innerhalb des V1-und V2- loop des HIV-1 gp120 versprach, genauere Einblicke in die Interaktion des Virus mit seinen Wirtszellrezeptoren, sowie ihren Einfluss auf Neutralisierbarkeit durch polyklonale Seren und monoklonale Antikörper zu erhalten. Es war zudem von Interesse, ob das Fehlen bestimmter

N-Glycane innerhalb des V1/V2-loop-Bereiches einen Einfluss auf die gp120-Expression und die replikativen Eigenschaften des HIV haben würde. Die Fragestellung hat somit eine direkte Implikation auf die Entwicklung effektiver Vakzine oder Therapien gegen die HIV-Erkrankung.

1.8 Ziel dieser Arbeit

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Dissertation war an Studien mit SIV (*simian immunodeficiency virus*) gezeigt worden, welche dramatische Effekte das Entfernen von Glycanen innerhalb eines SIV-Hüll-Glycoproteins haben kann (REITTER ET AL., 1998). Affen, die mit Virusmutanten infiziert worden waren, denen N-Glycosylierungsstellen im V1-loop fehlten, produzierten hohe Antikörpertiter gegen das mutierte Virus. Ausgehend von diesen Daten war es das vorrangige Ziel der Arbeit, die Bedeutung der N-Glycosylierung im V1- und V2-Bereich des HIV-1 Hüllproteins gp120, für die Replikation, die Haupt- und Korezeptornutzung, sowie Neutralisierbarkeit des HIV-1 zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten im Hintergrund des gut charakterisierten X4-tropen Laborstammes HIV-1_{NL4-3} Virusmutanten hergestellt werden, die Veränderungen ihrer N-Glycosylierungsmuster im V1- und V2- loop trugen. Die Aminosäuresequenz in diesen Bereichen sollte durch zielgerichtete Mutagenese derart verändert werden, dass die N-Glycosylierungsmotive NXS und NXT in unterschiedlichen Kombinationen eliminiert wurden. Zur Generierung dieser Virusmutanten war es zunächst erforderlich, durch Konstruktion einer Genkassette die Voraussetzung für den Austausch der mutierten Bereiche in ein provirales Plasmidkonstrukt zu erhalten. Die Eigenschaften der so erhaltenen V1- bzw. V2 loop – Glycovarianten sollten hinsichtlich verschiedener Parameter anhand von Infektionsstudien mit CXCR4 exprimierenden GHOST- und U87-Indikatorzelllinien untersucht werden. Das Ziel der Arbeit war zu klären, ob und welche Bedeutung die N-Glycosylierung im V1- und V2-Bereich des gp120 für die HIV-Infektion aufweist.

2 MATERIALIEN

2.1 Bakterien und Zellen

2.1.1 Bakterien

Bakterienstamm	Phänotyp	Medium	Herkunft/Referenz
<i>E.coli</i> XL-1 Blue	(<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)])	LB- Medium	Stratagene, (Heidelberg)
<i>E.coli</i> GM 2163	<i>dam- dcm- hsdR17 supE44 thi leu rpsL lacY galK galT ara tonA thr tsx Δ(lacproAB)</i> F' { <i>traΔ36 proAB+</i> <i>lacIqZΔM15</i> }	LB- Medium	DSMZ, Braunschweig

2.1.2 Zellen

Zelllinie	Charakterisierung	Medium	Herkunft/Referenz
HeLaP4-CXCR4	humane Cervixkarzinom Zelllinie	DMEM	zur Verfügung gestellt von M. Dittmar
GHOST/parental	humane Osteosarkom-Zelllinie stabil transfiziert mit CD4 und CXCR4 bzw. CCR5	DMEM	
GHOST/CXCR4			
GHOST/CCR5			
U87/CXCR4	humane Gliom-Zelllinie stabil transfiziert mit CD4 und CXCR4	DMEM	DENG ET AL., 1996

2.1.3 Enzyme

<i>Bst</i> EII, <i>Bam</i> HI	Roche, Mannheim
<i>Afl</i> III, <i>Pst</i> I, <i>Bcl</i> II, <i>Eco</i> RI	MBI-Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> DNA Polymerase	MBI-Fermentas, Vilnius
HotStar- <i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
T4 DNA Ligase	MBI-Fermentas, Vilnius
Proteinase K	Merck, Darmstadt

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

2.2 Plasmide

pNL4-3 mit modifiziertem <i>env</i> -Gen	ADACHI ET AL., 1986, modifiziert zur Verfügung gestellt von H.-G. Kräusslich
pUC _{env}	Zur Verfügung gestellt von S.Polzer

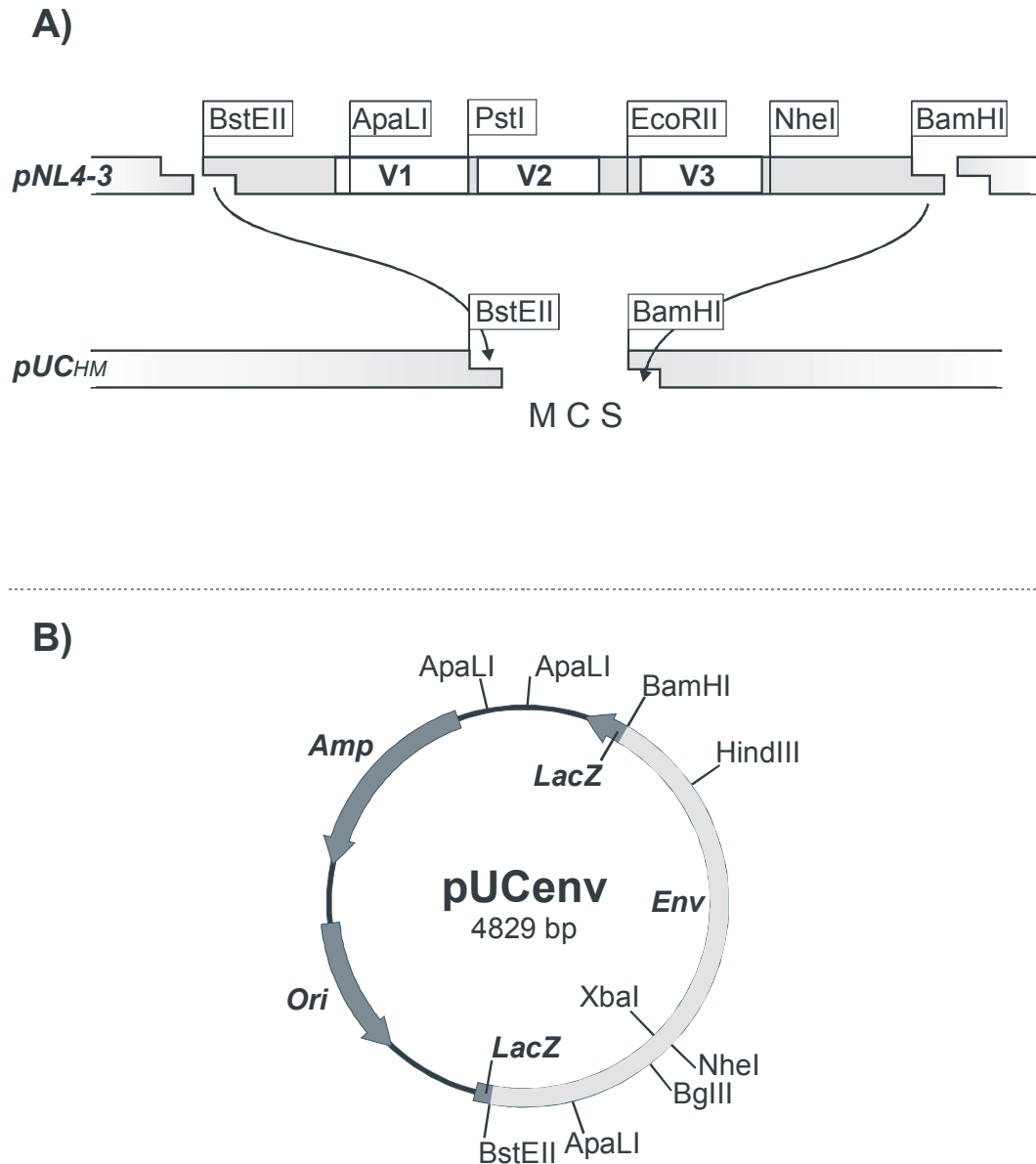


Abb. 6 Schematische Darstellung des Vektors pUC_{env}

A) In den modifizierten Klonierungsbereich (MCS, *multiple cloning site*) des pUC18-Derivates pUC_{HM} wurde der gesamte *env*-Bereich von NL4-3 über die Restriktionsschnittstellen *BstEII* und *BamHI* kloniert. So erhielt man das Vektorkonstrukt pUC_{env} mit einmaligen Restriktionsschnittstellen für den Austausch des V3loop.

B) Vektorkarte von pUC_{env}. Für den Austausch des V1/V2loop-Bereiches ist es erforderlich, zusätzliche Restriktionsschnittstellen einzuführen, da die *ApaLI*-Schnittstelle in der Vektorsequenz mehrfach vorhanden ist.

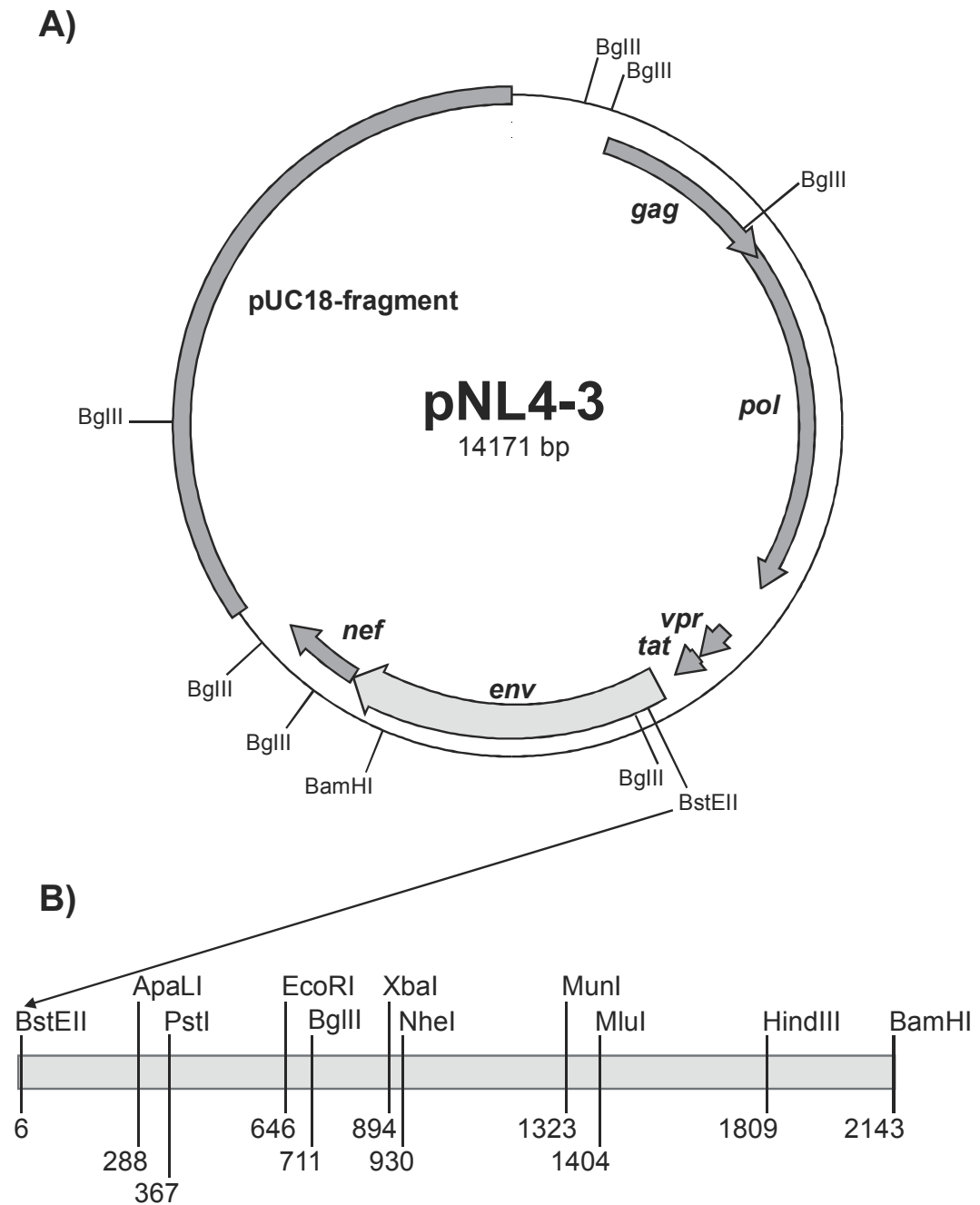


Abb. 7 Vektor pNL4-3

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

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

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

2.3 Seren

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

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

2.4 Antikörper

Anti-HIV-1-p24, D7320 (Schaf)	Biochrom, Berlin
Anti-HIV-1-p24, monoklonal (Maus)	Aalto, Dublin, Irland
Anti-Maus-IgG, β-Galaktosidase-konjugiert (Ziege)	Southern Biotech, Birmingham
Anti-Kaninchen-IgG, alkalische Phosphatase-konjugiert (Ziege)	Sigma-Aldrich, München
Anti HIV-1 gp120 (V2), IgG1, ARP3075 (Ratte)	NIBSC, Hertfordshire, UK
Anti HIV-1 IIIB gp120 (V3), ARP3025 (Maus)	NIBSC, Hertfordshire, UK

2.5 Liganden

Humanes sCD4	R&D Systems, Wiesbaden
--------------	------------------------

2.6 Reaktionssysteme

NucleoSpin-Plasmid Minipräp Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel, Düren
PCR-Purification Kit	Roche, Mannheim
CEQ2000 DTCS-QuickstartKit	Beckmann Coulter, Fichtenheim
GeneRuler™ 100 bp-plus DNA Leiter	MBI-Fermentas, Vilnius
GeneRuler™ 1000 bp-plus DNA Leiter	MBI-Fermentas, Vilnius

Alkalische Phosphatase Substrat Kit	Bio Rad, München
Fugene® 6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim

2.7 Oligonucleotide

Oligonucleotide für die Einführung der Restriktionsschnittstelle *Afl*III in den Klonierungsvektor pUCenv

<i>Bst</i> ENf #4550	5'-TGGGTCACCGTCTATTATGGGGTGCCTGTGTGG
<i>Afl</i> IIIr #7889	5'-TACACATGGCTTAAGGCTTT
<i>Afl</i> III f #7888	5'-AGTTTATTGGATCAAAGCCTTAAGCC
<i>Pst</i> Ir #7890	5'-GCTGATATTGAAGCTGCAGTT

Oligonucleotide für die Einführung der Restriktionsschnittstelle *Bcl*II in den Klonierungsvektor pUCenv

<i>Apa</i> LIf #7887	5'-AGTTTAAAGTGCACTGAT
<i>Bcl</i> If #8113	5'-CCTCAGTGATCACACAGG
<i>Nhe</i> Ir #5444	5'-AAATTGTTCTCTTAATTTGCTAGCTAT
<i>Bcl</i> Ir #8114	5'-CCTGTGTGATCACTGAGG
<i>Pst</i> If #8328	5'-GGAGAGATAAAAACTGCAGCTTCAAT
<i>Eco</i> RIr #8329	5'-TACTACTGGTCGAATTCATGTGTACA

Oligonucleotide für die Erstellung des Klonierungsvektors pUCenvΔV1

#8300	5'-TTAAGGTACGCGGATCCGCGATGCTGCA
#8301	5'-AGCATCGCGGATCCGCGTACC

Oligonucleotide für die Erstellung des Klonierungsvektors pUCenvΔV2

#8302	5'-GCTGTACGCGGATCCGCGATGGT
#8303	5'-GATCACCATCGCGGATCCGCGTACAGCTGCA

Oligonucleotide zur Substitution von N-Glycosylierungsstellen

NL4-3 V1

<i>g2 r</i>	5'-CACCTTATCTCTTATGCTTGTGCTGATTTGGAAGCTGCAGTTTTT TATCTCTCCTTTCTCCATTATCATTCTCCCGCTACTACTATTGGTATTA GTATCTTGCTTCAAATCAGTGCACCTTTAAACT
<i>g3 r</i>	5'-CACCTTATCTCTTATGCTTGTGCTGATATTGAAGCTGCAGTTTTT TATCTCTCCTTTCTCCATTATCATTCTCCCGCTACTACTTTGGGTATTA GTATCATTCTTCAAATCAGTGCACCTTTAAACT
<i>g4 r</i>	5'-CACCTTATCTCTTATGCTTGTGCTGATATTGAAGCTGCAGGTTTT TATCTCTCCTTTCTCCATTATCATTCTCCCGCTACTACTATTGGTATTA GTATCATTCTTCAAATCAGTGCACCTTTAAACT
<i>g2/3 r</i>	5'-CACCTTATCTCTTATGCTTGTGCTGATTTGGAAGCTGCAGTTTTT TATCTCTCCTTTCTCCATTATCATTCTCCCGCTACTACTTTGGGTATTA GTATCTTGCTTCAAATCAGTGCACCTTTAAACT
<i>g3/4 r</i>	5'-CACCTTATCTCTTATGCTTGTGCTGATATTGAAGCTGCAGGTTTT TATCTCTCCTTTCTCCATTATCATTCTCCCGCTACTACTTTGGGTATTA GTATCATTCTTCAAATCAGTGCACCTTTAAACT
<i>g2/4 r</i>	5'-CACCTTATCTCTTATGCTTGTGCTGATTTGGAAGCTGCAGGTTTT TATCTCTCCTTTCTCCATTATCATTCTCCCGCTACTACTATTGGTATTA GTATCTTGCTTCAAATCAGTGCACCTTTAAACT
<i>g2/3/4 r</i>	5'-CACCTTATCTCTTATGCTTGTGCTGATTTGGAAGCTGCAGGTTTT TATCTCTCCTTTCTCCATTATCATTCTCCCGCTACTACTTTGGGTATTA GTATCTTGCTTCAAATCAGTGCACCTTTAAACT
<i>V1f</i>	5'-AGTTTATGGGATCAAAGCCTTAAGCCATGTGTAAAATTAACCCC ACTC TGTGTTAGTTTAAAGTGCACCTGATTTGAAG

NL4-3 V2

<i>g5 f</i>	5'- CAAATCAGCACAAGCATAAGAGATAAGGTGCAGAAAGAATATGCAT TCTTTTATAAACTTGATATAGTACCAATAGATA AATACCAGCTATAGG TTGATAAGTTGT AACACCTCAGT GATCACACAGGCC
<i>g6 f</i>	5'- AATATCAGCACAAGCATAAGAGATAAGGTGCAGAAAGAATAT GCATTCTTTTATAAACTTGATATAGTACCAATAGAT CAAACCAGCTA TAGGTTGATAAGTTGT AACACCTCAGT GATCACACAGGCC

<i>g7 f</i>	5'- AATATCAGC ACAAGCATAAGAGATAAGGTGCAGAAAGAATAT GCATTCTTTTATAAACTTGATATAGTACCAATAGATA AATACCAGCTA TAGGTTGATAAGTTGT CAAACCTCAGT GATCACACAGGCC
<i>g5/6 f</i>	5'- CAAATCAGC ACAAGAATAAGAGATAAGGTGCAGAAAGAATAT GCATTCTTTTATAAACTTGATATAGTACCAATAGAT CAAACCAGCTA TAGGTTGATAAGTTGT AACACCTCAGT GATCACACAGGCC
<i>g6/7 f</i>	5'- AATATCAGC ACAAGCATAAGAGATAAGGTGCAGAAAGAATAT GCATTCTTTTATAAACTTGATATAGTACCAATAGAT CAAACCAGCTA TAGGTTGATAAGTTGT CAAACCTCAGT GATCACACAGGCC
<i>g5/7 f</i>	5'- CAAATCAGC ACAAGCATAAGAGATAAGGTGCAGAAAGAATAT GCATTCTTTTATAAACTTGATATAGTACCAATAGATA AATACCAGCTA TAGGTTGATAAGTTGT CAAACCTCAGT GATCACACAGGCC
<i>g5/6/7 f</i>	5'- CAAATCAGC ACAAGCATAAGAGATAAGGTGCAGAAAGAATAT GCATTCTTTTATAAACTTGATATAGTACCAATAGAT CAAACCAGCTA TAGGTTGATAAGTTGT CAAACCTCAGT GATCACACAGGCC

Oligonucleotide für die pUCenv-PCR-Analyse (3.1.10.3)

<i>AflIII</i> #7888	5'-AGTTTATTGGATCAAAGC CTTAAGCC
<i>EcoRI</i> #8329	5'-TACTACTGGT CGAATTCC ATGTGTACA

Oligonucleotide für die pNL4-3-PCR-Analyse (3.1.10.3)

#8724	5-AGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAG
#8694	5'-ATACATTGCTTTTCCTACTTCCTGC

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

2.8 Chemikalien

Agarose, ultrapure	Gibco BRL, Eggenstein
Ampicillin-Dinatriumsalz	Roth
Bacto Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	MBI Fermentas, Vilnius
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Boehringer, Mannheim
Glycerol	Merck, Darmstadt
H ₂ O ad inject	Braun
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Penicillin	Gibco, BRL, Eggenstein
Streptomycin	Gibco, BRL, Eggenstein
Tween 20	Serva, Heidelberg

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

2.9 Plastikwaren

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

2.10 Medien

2.10.1 Medien für die Zellkultur

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

2.10.2 Medien für die Bakterienkultur

YT-Medium	8 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl ; pH 7,0
dYT-Medium	16 g/l Bacto-Trypton; 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl ; pH 7,0
LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl ; pH 7,0
LB-Agar	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Bacto-Agar; pH 7,0

SOB-Medium 20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl,
10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ ; pH 6,7- 7,0

Die Medium wurden mit H₂O ad inject. angesetzt und bei 121 °C und 1,5 bar für 20 Minuten autoklaviert. Nach Bedarf wurde nach dem Abkühlen 200 mg/l Ampicillin -Dinatriumsalz zugesetzt.

2.11 Verwendete Puffer

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

3 METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Zur Gewinnung von Bakterienkulturen wurde eine flüssige Bakterienkultur als Vereinzelausstrich auf eine LB-Agarplatte gespatelt und 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert, um aus den vereinzelter Bakterien Kolonien entstehen zu lassen. Die Platte konnte für einen begrenzten Zeitraum mit Parafilm verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Für eine längerfristige Lagerung war es erforderlich, eine Glycerol-Gefrierkultur anzulegen. Hierzu wurde eine einzelne Bakterienkolonie in LB-Medium für 12-16 h bei 37°C im Bakterienrüttler inkubiert. In einem sterilen Einfrieröhrchen wurden dann 0,75 ml der Flüssigkultur mit 0,25 ml sterilem Glycerol vermischt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kultur wurde bei -70°C gelagert.

3.1.2 Präparation chemisch kompetenter Bakterien (INOUE ET AL., 1990)

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

3.1.3 Transformation von *E. coli*

(HANAHAN, 1983)

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

3.1.4 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Verfahren der alkalischen Lyse angewendet. Sämtliche DNA-Präparationen erfolgten unter Verwendung des Plasmid-Aufreinigungs-Kits „NucleoSpin Plasmid“ der Firma Macherey & Nagel nach Angaben des Herstellers.

3.1.5 Reinigung von DNA

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

3.1.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

(Sambrook *et al.*, 1989)

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

Hierzu wurde die DNA-Lösung 1:100 in Wasser verdünnt und die Extinktion bei den beiden

Wellenlängen in einer Quarzküvette im UV-Spektrometer (Shimazu-160A) gemessen.

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

3.1.7 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(Sambrook *et al.*, 1989)

Das Schneiden von doppelsträngiger DNA erfolgte unter Verwendung sequenzspezifischer Restriktionsendonukleasen. Die enzymatischen Reaktionen wurden hierbei in den für die jeweiligen Enzyme vom Hersteller vorgegebenen Puffern durchgeführt.

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

1 μl	10 x Puffer
1-2 μg	DNA
2 U	Restriktionsenzym/ μgDNA
ad 10 μl	H_2O ad inject.

verwendet.

Der Ansatz wurde bei der jeweils optimalen Reaktionstemperatur zwischen 15 und 60 min. inkubiert.

Die geschnittene DNA wurde anhand einer Agarose-Gelelektrophorese auf ihre korrekte Länge überprüft.

3.1.8 Ligation von DNA

(Bolivar *et al.*, 1977)

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

Die Ligation des linearisierter Vektoren mit den entsprechenden DNA-Fragmenten wurde in einem $10 \mu\text{l}$ Ansatz durchgeführt: Hierzu wurden

1 μl	10x Ligase-Puffer
1 μl	T4 Ligase
2 μl	linearisierter Vektor($100 \text{ ng}/\mu\text{l}$)
3 μl	DNA-Fragment
ad 10 μl	H_2O ad inject.

zusammenpipettiert.

Das molare Verhältnis von Fragment zu Vektor betrug hierbei 1:3 bis 1:5. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank oder für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert und für eine Transformation von (3.1.3) verwendet.

3.1.9 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um kurze DNA-Fragmente für eine anschliessende PCR-Amplifikation zu generieren, wurden auf chemischem Wege komplementäre Oligonukleotide synthetisiert (2.8). Die Oligonukleotide wurden in gleichen Konzentrationen zusammengegeben und für 5 min. auf 70°C erhitzt. Anschließend wurden der Ansatz langsam (über ca. 1h) auf RT abgekühlt. Die hybridisierten Oligonukleotide konnten dann für eine Ligation (3.1.8) verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion

(Saiki *et al.*, 1988)

3.1.10.1 Polymerase-Kettenreaktion von cDNA

Für einen 100 µl Ansatz wurden

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

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

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

Nach einem abschließenden Elongationsschritt von 5 min. bei 72°C erfolgte die Aufreinigung

der Proben (3.1.5), die somit für weitere Anwendungen zur Verfügung standen.

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

Zur Amplifikation von proviraler DNA aus HIV-infizierten Zellen war es zunächst erforderlich, die Zellen zu lysieren (3.2.1). Die in dem Lysat enthaltene DNA wurde als Matrize in die PCR-Reaktion eingesetzt. Unter Verwendung der HotStar DNA-Polymerase der Firma Qiagen erfolgte die Reaktion nach Angaben des Herstellers.

Der PCR Ansatz enthielt:

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

„Lösung Q“ ist ein vom Hersteller mitgeliefertes Agens, das die Amplifikation unspezifischer Nebenprodukte reduzieren soll.

Nach einer initialen Denaturierung (15 min, 95°C), die die Abspaltung des mit der HotStar-*Taq*-DNA-Polymerase verbundenen Antikörper induzierte, der zunächst die Aktivität der Polymerase blockiert und somit unspezifische Interaktionen mit der DNA verhindert, wurde die Amplifikation in 40 Zyklendurchgeführt.

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

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

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

Die Durchführung einer analytischen PCR galt dem Zweck, Bakterienklone daraufhin zu überprüfen, ob eine Insertion des gewünschten DNA-Fragmentes durch die Ligation (3.1.8) erfolgt war. Aufgrund des Grössenunterschiedes des Vektors nach der Ligation mit dem gewünschten Fragment im Vergleich zum leeren Vektor wurden die Oligonukleotidprimer so gewählt, dass man die erfolgreiche Ligation anhand der Größe des PCR-Amplifikates unterscheiden konnte. Es wurden

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

zusammengegeben. Bakterienkolonien wurden von der LB-Agarplatte einzeln mit einer sterilen Pipettenspitze sowohl in ein steriles 1,5 ml PCR-Reaktionsgefäß überführt und zudem auf eine Referenzplatte übertragen, wobei die überimpften Bakterienklone auf dem Plattenboden numeriert wurden. Jeweils 10 µl des Reaktionsgemisches wurden in die PCR-Reaktionsgefäße gegeben. Nach einem initialen Denaturierungsschritt für 2 min. bei 94°C, durch den ein Aufschluss der Bakterienzellwand erfolgte, fand die Amplifikation der in den Bakterien enthaltenen Plasmid-DNA in 25 Zyklen statt:

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

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

3.1.11 Zielgerichtete Mutagenese

Um spezifische Aminosäuren bzw. kurze Sequenzmotive auszutauschen, wurde die Methode der *PCR Overlap Extension* (Higuchi et al., 1988) angewendet. Hierbei findet die Reaktion zunächst in zwei getrennten PCR-Ansätzen statt, wobei jeweils an einem Ende des zu amplifizierenden Fragmentes der Mutageneseprimer und am anderen Ende ein

sequenzspezifischer Gegenprimer verwendet wird (Abb. 8). Die daraus resultierenden Fragmente werden anschließend in einem gemeinsamen Reaktionsansatz aneinander-gelagert, was aufgrund der komplementären Basenpaarung in den mutierten Bereichen vermittelt wird. In einer PCR-Reaktion wird nun das gesamte Fragment, das sich aus den überlappenden PCR-Amplifikaten der ersten Reaktionen gebildet hat, amplifiziert (Landt et al., 1990).

Für die Generierung der verschiedenen V1- und V2-loop-Virusmutanten wurde ein abgewandeltes Protokoll verwendet

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

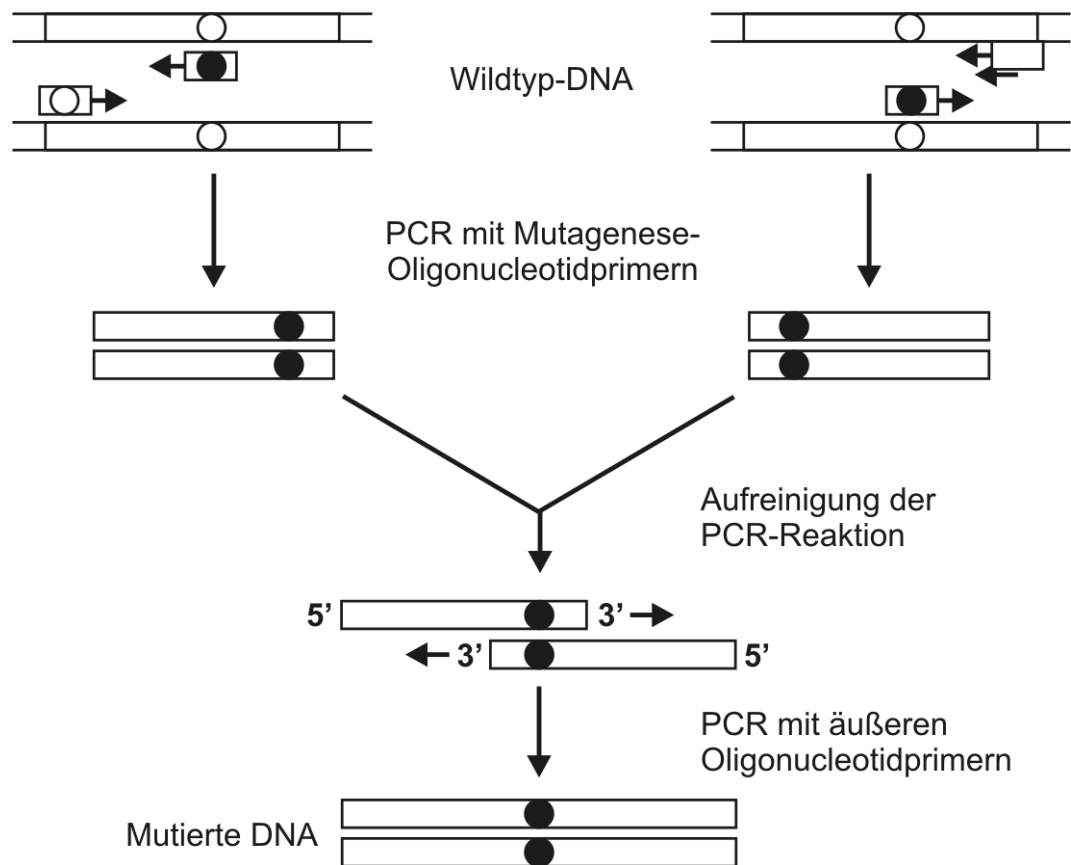


Abb. 8 Zielgerichtete Mutagenese durch die ‚overlap extension PCR‘

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

3.1.12 DNA-Sequenzierung

(Sanger *et al.*, 1977)

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

3.1.13 Gelelektrophoresen

3.1.13.1 Analytische Gelelektrophorese

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

Die elektrophoretische Auftrennung wurde bei einer Spannung von 60-90 Volt durchgeführt, was etwa 10 Volt pro cm Gellänge entsprach. Nach der Elektrophorese konnte die DNA aufgrund der Interkalation des Ethidiumbromids auf einem UV-Durchlichttisch (Kodak, Deutschland) bei $\lambda=254$ nm als gelbliche Bande sichtbar gemacht werden und mit einer Videodokumentationsanlage (Sony, Deutschland) fotografiert werden.

3.1.13.2 Präparative Gelelektrophorese

Zur Isolierung einzelner Banden wurden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel (0,75-1,5%) elektrophoretisch aufgetrennt und auf einem UV-Durchlichttisch detektiert. Die entsprechende DNA-Bande wurde mit Hilfe eines DNA-Größenstandards identifiziert und mit einem sauberen Skalpell excisiert. Anschließend erfolgte die Extraktion der DNA aus dem Gel (3.1.5).

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Lyse von HIV-1-infizierten Zellen

1×10^5 infizierte Zellen wurden sedimentiert (2 min. max upm, Eppendorf Tisch-zentrifuge) und in 100 μ l Lysispuffer resuspendiert. Während der Inkubation des Ansatzes bei 56°C für 2 h erfolgte die Lyse der Zellen. Zur Inaktivierung der in dem Lysispuffer enthaltenen Proteinase K wurde der Ansatz für 10 min. auf 96°C erhitzt. Das Zelllysate wurde entweder direkt in eine PCR eingesetzt (3.1.10.2) oder bei -20°C gelagert.

3.2.2 Kultivierung adhärenter Zellen

Die ausschliesslich adhärent wachsenden Zelllinien wurden in dafür geeigneten Zellkulturschalen und -flaschen (Greiner) kultiviert. Als Wachstumsmedium wurde DMEM verwendet, welches mit 50 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin sowie FKS supplementiert war. Die Menge des zugegebenen FKS war hierbei auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien abgestimmt, wobei bei den schnell wachsenden GHOST- und HeLa-Zellen 5 % FKS und den langsamer wachsenden U87-Zellen 15 % FKS zugesetzt wurden.

Alle 3-4 Tage wurden die Zellen in sterilem PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (Gibco) von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst (5 min. 37°C). Nach Zugabe von 5-10 ml Zellkulturmedium wurden jeweils 1/20 (GHOST und HeLa-Zellen) bzw. 1/5 (U87-Zellen) der Zellsuspension zurückbehalten und mit frischem Medium aufgefüllt, um die Kultivierung der Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ fortzusetzen.

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

3.2.3 Bestimmung von Zellzahl und Zustand der Kultur

Zur Ermittlung der Anzahl und des physiologischen Zustandes von Zellen in einer Suspension wurde eine kleine Portion der Zellsuspension in Trypanblau 1:5-1:20 verdünnt. Durch den Einbau von Trypanblau in die Membran abgestorbener Zellen kann das Verhältnis lebender Zellen zu abgestorbenen Zellen ermittelt und somit der Zustand der Kultur kontrolliert werden. Die Zellzahl wurde unter dem Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierbei wurden in der Kammer eingravierte Zählfelder zu Hilfe genommen, deren Volumen jeweils 0,1 μ l betrug.

3.2.4 Transfektion von Zellen

Um aus proviralen Plasmidkonstrukten funktionelle Viren zu erhalten, wurden die pNL4-3-Vektoren, welche die gewünschten Veränderungen im V1- und V2-Bereich trugen, in HeLa-Zellen transfiziert. Hierzu wurde das FuGene-Transfektionsreagenz nach Angaben des Herstellers verwendet. In Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen (*6-well*-Zellkulturplatte) wurden $1-3 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach 16-20 h hatten die Zellen eine geeignete Dichte erreicht, um mit der Plasmid-DNA transfiziert zu werden. Dazu wurde zunächst das FuGene-Transfektionsreagenz in ca. 100 µl serumfreien RPMI-Medium gelöst. Zu diesem Ansatz wurden 1-2 µg Plasmid DNA gegeben. Nach 30 min. Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz in die vorbereiteten HeLa-Zellkulturen verteilt. Nach einer Inkubationszeit der Zellen von 3 Tagen (37°C, 5 % CO₂) waren in den Kulturen nach erfolgreicher Transfektion im Lichtmikroskop cytopathische Effekte in Form einer ausgeprägten Synzytienbildung zu sehen. Nach Sedimentation von Zellresten wurde der virushaltige Kulturüberstand in Einfrierröhrchen (Nunc, USA) in Aliquots zu 0,5-0,8 ml aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3 Virologische Methoden

3.3.1 Infektion von Zellen mit HIV-1-Varianten

Die zu verwendenden Zellen wurden in 96-well-Zellkulturplatten ausgesät und für 18-20 h inkubiert (37°C, 5% CO₂). Virushaltige Transfektionsüberstände (3.2.4) wurden in geeignetem Zellkulturmedium auf die gewünschte Viruskonzentration eingestellt.

Für die Infektion der Zellen wurde das Kulturmedium gegen das virushaltige Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden 18 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Den Zellen wurde frisches Kulturmedium ohne Virus zugesetzt. Die infizierten Zellen wurden für die Untersuchung der Virusreplikation (3.3.4), der Virusneutralisation (3.3.5) oder für Untersuchungen der Infektiosität (3.3.2) eingesetzt.

3.3.2 Messung der Infektiosität von HIV-Varianten

Zur Quantifizierung von HIV-Infektionsereignissen in Zellkulturen wurden GHOST- oder U87-Indikatorzellen in 48-well-Zellkulturplatten ausgesät (5×10^3 Zellen/well). Die Zellen wurden 16-20 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Infektion erfolgte mit virushaltigen Zellkulturüberständen, die für 18 h auf den Zellen verblieben. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit sterilem PBS gewaschen und weiter inkubiert. Die Zahl der Infektionsereignisse wurde nach 48 h durch Immunfärbung (3.3.3) ermittelt.

3.3.3 Detektion infizierter Zellen durch Immunfärbung

Zur Detektion der infizierten Zellen wurde intrazelluläres p24 nachgewiesen (Sonza et al., 1991). Die Zellen wurden mit -20°C kaltem Methanol/Aceton 1:1 fixiert und mit PBS/1% FKS gewaschen. Die Detektion von p24 erfolgte mit einem monoklonalen anti-p24-Antikörper (Aalto; 1:2000 in PBS/1% FKS). Es wurden 200 µl der Antikörperlösung pro Kavität eingesetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und zweimal mit PBS/1 % FKS gewaschen. Als Detektionsantikörper wurde hierbei ein β -Galaktosidase-konjugierter anti-Maus-Antikörper (Southern Biotech) verwendet. Der Ansatz wurde 1 h inkubiert (37°C) und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Substratreaktion erfolgte durch Zugabe einer X-Gal-Färbelösung (2.12). Nach 2-4 h Inkubation bei 37°C färbten sich die infizierten Zellen blau. Die infizierten Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

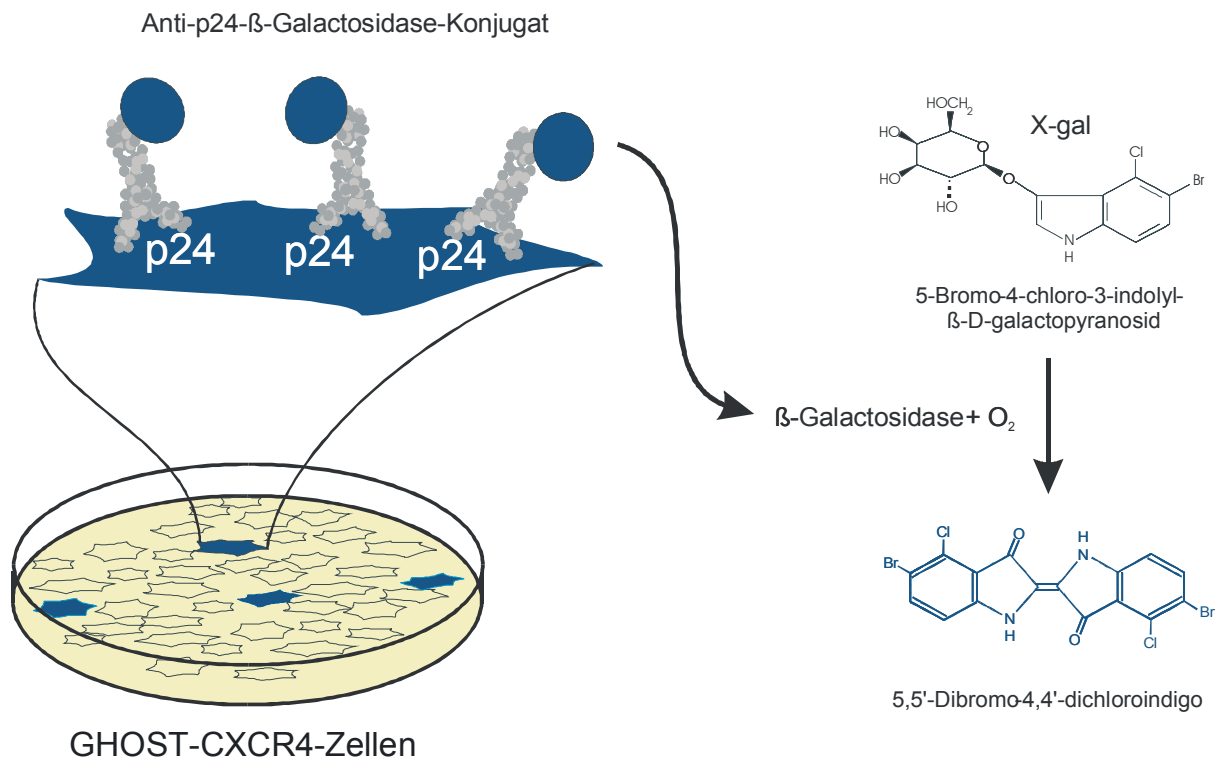


Abb. 9 Detektion infizierter Zellen durch Immunfärbung

Mit HIV-1 infizierte GHOST-Indikatorzellen wurden in der Kulturschale mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Strukturprotein p24 inkubiert (blaue Fläche). Als Detektionsantikörper wurde ein β -Galactosidase-(blauer Punkt) gekoppelter Anti-Maus-Antikörper auf das Konjugat gegeben (graue Antikörper-Modelle). Nach Zugabe der X-Gal-Färbelösung erfolgte bei Bindung der Antikörper ein blauer Farbumschlag durch Entstehung des Indigoderivates. Die Menge blau gefärbter Zellen entspricht somit direkt der Anzahl infizierter Zellen und lässt sich mikroskopisch auszählen.

3.3.4 HIV-1-Replikationskinetik

In einer 96-*well*-Zellkulturplatte wurden $1-3 \times 10^4$ Zellen pro Kavität ausgesät und 16-20 h bei 37°C/5 % CO₂ inkubiert. Es wurden dann virushaltige Zellkulturüberstände der Virusvarianten, die in Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt wurden, (0,25-5 ng p24/ml) zu den Zellen gegeben. Nach 18 h wurden die Zellen dreimal mit sterilem PBS gewaschen, und virus-freies Medium wurde zugegeben. Ab Tag 1 wurden im Abstand von 1-3 Tagen Überstände abgenommen, und die Virusmenge wurde in einem p24-Antigen-ELISA (3.3.8) ermittelt.

3.3.5 HIV-1 Neutralisationstest mit humanem Serum

In einer 96-*well*-Zellkulturplatte wurden $1-3 \times 10^4$ U87 CXCR-4-Zellen pro Kavität ausgesät und 24 h bei 37°C/5 % CO₂ inkubiert. HIV-1-Positivserum und HIV-1-Negativserum (2.3) wurde 15 min. bei 56°C inaktiviert und anschließend in Zellkulturmedium 1:100 verdünnt. Die rekombinanten HIV-1-Varianten wurden in Zellkulturmedium auf eine p24 Konzentration von 0,1–2 ng/ml oder eine infektiöse Dosis von 100 – 200 TCID₅₀/ml verdünnt und mit dem HIV-1-Positivserum inkubiert (1 h, 37°C, 5 % CO₂). Anschließend wurden je 200 µl des Serum-Virusgemisches auf die Zellen gebracht, von denen zuvor das Medium abgenommen wurde. Es ergab sich somit eine Virusmenge von 0,05-1 ng p24 pro Kavität. Nach 18 h Inkubation bei 37°C/5 % CO₂ wurde die Zellkulturplatte dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde 200 µl Zellkulturmedium pro Kavität, welches HIV-1 Serum enthielt, zugegeben. Als Kontrolle wurden alle Ansätze parallel mit HIV-1-Negativserum in einer Verdünnung von 1:100 durchgeführt. Ab Tag 1 nach der Infektion wurden im Abstand von 2 Tagen Kulturüberstände abgenommen und pro Kavität 150 µl in eine 96-*well*-Platte, in welcher pro Kavität 16 µl Empigen (10 % in Zellkulturmedium) zur Virus-Inaktivierung vorgelegt waren, überführt. Nach 30 min. Inkubation bei RT konnten die Überstände zur Virusbestimmung mittels eines p24-Antigen-ELISA eingesetzt werden (3.3.8). Hierzu wurde auf jeder zu messenden Platte eine halblogarithmische Verdünnungsreihe bekannten p24-Gehaltes als Standard mitgeführt.

3.3.6 HIV-1 Neutralisationstest mit monoklonalen Antikörpern und löslichem CD4

In einer 96-*well*-Zellkulturplatte wurden $1-3 \times 10^4$ U87 CXCR-4-Zellen pro Kavität ausgesät und 24 h bei 37°C/5 % CO₂ inkubiert. Monoklonale HIV-1-Antikörper und lösliches CD4 (sCD4) wurden in Konzentrationen von 0,5-5 µg/ml in Zellkulturmedium verdünnt. Die rekombinanten HIV-1-Varianten wurden in Zellkulturmedium auf eine p24 Konzentration von 0,1–2 ng/ml oder eine infektiöse Dosis von 200 – 400 TCID₅₀/ml gebracht und mit den jeweiligen monoklonalen Antikörpern oder sCD4 inkubiert (1 h, 37°C, 5 % CO₂). Anschließend wurden je 200 µl des Serum-Virusgemisches auf die Zellen gebracht, von denen zuvor das Medium abgenommen wurde. Es ergab sich somit eine Virusmenge von 0,05-1 ng p24, bzw. 100 – 200 TCID₅₀/ml pro Kavität. Nach 18 h Inkubation bei 37°C/5 % CO₂ wurde die Zellkulturplatte dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde 200 µl Zellkulturmedium pro Kavität, welches HIV-1 Serum enthielt, zugegeben. Als Kontrolle wurden alle Ansätze parallel ohne Zugabe von Antikörpern oder sCD4 durchgeführt. An Tag 7 nach der Infektion wurden die Kulturüberstände abgenommen und pro Kavität 150 µl in eine 96-*well*-Platte, in welcher pro Kavität 16 µl Empigen (10 % in Zellkulturmedium) zur Virus-Inaktivierung vorgelegt waren, überführt. Nach 30 min. Inkubation bei RT konnten die Überstände zur Virusbestimmung mittels eines p24-Antigen-ELISA eingesetzt werden (3.3.8). Hierzu wurde auf jeder zu messenden Platte eine halblogarithmische Verdünnungsreihe bekannten p24-Gehaltes als Standard mitgeführt.

3.3.7 HIV-1-Infektivitätsassay

(BONIN, 1973; REED & MUENCH, 1988)

Dieser Infektivitätsassay dient dazu, die 50%-Zellkultur-infektiöse Dosis (TCID₅₀ : *tissue culture infective dose*) eines HIV-1-Virusüberstandes zu titrieren. Man erhält über diese Methode die Möglichkeit, die Menge infektiösen Virus in einem gegebenen Ausgangsvolumen Kulturüberstand zu erhalten und die einzusetzende Menge an Viren unterschiedlicher replikativer Eigenschaften für z.B. Neutralisationsassays zu ermitteln.

In einer 96-*well*-Zellkulturplatte wurden $1-3 \times 10^4$ U87 CXCR-4-Zellen pro Kavität ausgesät und 24 h bei 37°C/5 % CO₂ inkubiert. In einer 96-*well*-Flachbodenplatte wurden in den zentralen 60 Kavitäten je 120 µl Zellkulturmedium vorgelegt. Je 40 µl HIV-1-Kulturüberstand pro Kavität wurde nun in einer sechsfachen Dilutionsreihe in zehn Verdünnungsschritten von links nach rechts über die vertikalen Reihen titriert. Anschließend

wurden 160 µl einer jeden Virusverdünnung auf die Zellen gebracht, von denen zuvor das Medium abgenommen worden war. Nach 18 h Inkubation bei 37°C/5 % CO₂ wurde die Zellkulturplatte dreimal mit sterilem PBS gewaschen. An Tag 7 nach der Infektion wurden die Kulturüberstände abgenommen und pro Kavität 150 µl in eine 96-well-Platte, in welcher pro Kavität 16 µl Empigen (10 % in Zellkulturmedium) zur Virus-Inaktivierung vorgelegt waren, überführt. Nach 30 min. Inkubation bei RT konnten die Überstände zur Virusbestimmung mittels eines p24-Antigen-ELISA eingesetzt werden (3.3.7). Hierzu wurde auf jeder zu messenden Platte eine halblogarithmische Verdünnungsreihe bekannten p24-Gehaltes, sowie ein 150µl- Aliquot des inaktivierten Original-Virusüberstandes als Standard, bzw. Kontrolle mitgeführt. Die sich anschließende Berechnung zur Ermittlung der TCID₅₀ der jeweiligen Viruskultur ist im folgenden beispielhaft erläutert. Zunächst wird optisch innerhalb der vertikalen Kavitätsreihen bestimmt, zwischen welchen beiden Verdünnungsstufen ein Zustand erreicht wurde, bei dem partielle Infektionsereignisse stattfanden, sich also sowohl infizierte als auch uninfizierte Kavitäten befinden.

	4 ⁻¹	4 ⁻²	4 ⁻³	4 ⁻⁴	4 ⁻⁵	4 ⁻⁶	4 ⁻⁷	4 ⁻⁸	4 ⁻⁹	4 ⁻¹⁰
1										
2										
3										
4										
5										
6										

Datenanalyse der Virustitration zur Bestimmung der TCID₅₀. Die Grafik stellt schematisch den Infektionszustand der verwendeten 60 zentralen Kavitäten einer 96-well-Flachbodenplatte nach Auswertung per p24-Antigen-ELISA dar. Grau abgehoben sind infizierte, weiß uninfizierte Kavitäten. An der oberen Achse sind die jeweiligen Titrationsstufen des Virusüberstandes aufgeführt.

Innerhalb dieser drei Verdünnungsstufen werden nun die kumulativen Werte infizierter wie auch uninfizierter Kavitäten ermittelt, um die 50%-ige Endpunktdilution zu erhalten.

Verdünnung	Infiziert	Uninfiziert	Infiziert	Uninfiziert	Mortalität	
	(kumulativ)	(kumulativ)	(total)	(total)	Ratio	Prozentual
4^{-7}	6 ↑	0	10	0	10/10	100
4^{-8}	4	2 ↓	4	2	4/6	66,7
4^{-9}	0	6 ↓	0	8	0/8	0

Im oberen Beispiel liegt die 50%-ige Endpunktdilution zwischen den Verdünnungsstufen 4^{-8} und 4^{-9} . Der PD-Wert (proportionelle Distanz) errechnet sich aus den Verdünnungsstufen, in denen der Anteil infizierter Ansätze jeweils ober- und unterhalb von 50% liegen.

$$PD = \frac{66,7\% - 50\%}{66,7\% - 0\%} = \frac{16,7}{66,7} = 0,25$$

Der erhaltene PD-Wert wird zum logarithmischen Wert der Verdünnungsstufe addiert, bei welcher über 50% der Kavitäten infiziert sind und der Logarithmus nach 10 konvertiert.

$$\begin{aligned} (-8,25) (\log 4) &= x \\ (-8,25) (0,602) &= x \\ -4,967 &= x \end{aligned} \quad 50\% \text{ Endpunktdilution (TCID}_{50}) = 10^{-4,967}$$

Zur abschließenden Berechnung der TCID₅₀/ml wird der Wert mit dem Faktor der Verdünnungsstufe des Virusüberstandes (z.B.x 25) multipliziert. Über das Verhältnis von gemessenem p24-Antigen/ml lässt sich nun TCID₅₀/p24 über einen einfachen Dreisatz erhalten.

3.3.8 p24-Antigen-ELISA

Zunächst wurde der peptidspezifische anti-p24-Antikörper (D7320, Biochrom) an eine MAXIsorp-Platte (Nunc, USA) mit 96 Kavitäten (*96-well* Platte) gebunden. Der lyophilisierte Antikörper wurde in *Coating*-Puffer in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. In jede Kavität wurden 100 µl der Antikörperlösung gegeben. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und nach der Bindung des *Catching*-Antikörpers sechsmal mit PBS/Tween gewaschen. Die Platte wurde trocken geschlagen und mit 200 µl Blockpuffer pro Kavität für 1-2 Stunden inkubiert, um freie Bindungsstellen abzublocken und so unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Nach der Inkubation wurde die Platte einmal gewaschen, getrocknet und 100 µl der zu untersuchenden Zellkulturüberstände je Kavität zugegeben. Die Bindung des p24-Antigens erfolgte für 2 h bei RT oder ÜN bei 8°C. Nach der Antigen-Bindung wurde die Platte sechsmal gewaschen und trocken geschlagen. Der zweite Antikörper, ein anti-HIV-Kaninchenserum, wurde in einer Verdünnung von 1:2000 auf die trockene Platte gebracht (100 µl je Kavität). Die Platte wurde für 1 h bei RT inkubiert. Es wurde erneut sechsmal gewaschen und die Platte trocken geschlagen. Der dritte Antikörper (anti-Kaninchen-IgG, Alkalische Phosphatase-gekoppelt, Sigma) wurde in einer Verdünnung von 1:2000 auf die trockene Platte aufgebracht (100 µl je Kavität). Nach 1h Inkubation bei RT wurde die Platte wieder gewaschen und trocken geschlagen, jedoch wurde für die letzten drei Waschschrte H₂O bidest. verwendet. Es wurden 100 µl p-Nitrophenylphosphat-Substratlösung (*Alkaline Phosphatase Substrate Kit*, BioRad), die zuvor nach Herstellerangaben angesetzt wurde, auf die trockene Platte gebracht. Die Reaktion wurde nach 5-10 min. mit 100 µl 0,4 M NaOH gestoppt und die Enzym-Substratreaktion, die mit der Menge an p24-Antigen korreliert, mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei einer OD von 405 nm ausgewertet. Der p24-Gehalt der Proben wurde anhand einer Standardkurve ermittelt. Diese ergab sich aus der Messung der OD_{405nm} einer halblogarithmischen Verdünnung von standardisiertem p24-Protein.

4 ERGEBNISSE

4.1 Herstellung der Klonierungsvektoren

Mit Hilfe rekombinant erstellter Virusvarianten wurde der Einfluss der N-Glycosylierung im Bereich des V1- und V2-Loops des HIV-1 Hüllproteins gp120 auf die Infektiosität und Neutralisierbarkeit des HIV-1 untersucht. Unter Verwendung chemisch hergestellter Oligonucleotide wurden V1- und V2-loop-Sequenzen generiert, die an den entsprechenden N-Glycosylierungsstellen Aminosäureaustausche aufwiesen. Für die Klonierung dieser DNA-Fragmente war es zunächst erforderlich, den pUCenv-Klonierungsvektor, in dem das *env*-Gen (2129 bp) des X4-tropen Stammes HIV-1_{NL4-3} bereits als vollständiges 2145 bp Konstrukt als Kassette für die Klonierung unterschiedlicher V3-Varianten vorgelegen hatte (POLZER, DISSERTATION, 2002), mit geeigneten Restriktionsschnittstellen für den Austausch der V1/V2 Bereiche zu versehen. Mit Hilfe des neuen Vektorkonstrukts wurden anschließend die V1- und V2- modifizierten *env* Gene in ein provirales Plasmidkonstrukt des HIV-1_{NL4-3} Virus kloniert. Auf diese Weise wurden neben dem Wildtyp-Virus insgesamt 15 Virusvarianten hergestellt, die sich in unterschiedlicher Kombination hinsichtlich der N-Glycosylierung im V1- und V2-Bereich unterschieden. In dieser Arbeit wurden die verwendeten Vektoren und Viruskonstrukte wie folgt benannt:

NL4-3:	HIV-1-Laborstamm NL4-3
pUCenv	pUC18-Derivat mit dem 2129 bp <i>BstEII/BamHI</i> <i>env</i> -Fragment
pUCenv _{V1/V2}	pUCenv mit Schnittstellen für den Austausch des V1/V2-loop
pUCΔV1	pUCenv ohne den V1-Loop-Bereich zwischen <i>AflIII</i> und <i>PstI</i>
pUCΔV2	pUCenv ohne den V2-Loop-Bereich zwischen <i>PstI</i> und <i>BclI</i>
pNL4-3	Vektor trägt das vollständige Genom des NL4-3 Virus.
pNLΔenv	pNL4-3 ohne das 708 bp <i>BstEII/BglII</i> Fragment im 5'-Bereich des <i>env</i> -Gens
pNL4-3-V1-g2	NL4-3 mit mutierter g2 N-Glycosylierungsstelle im V1 loop
pNL4-3-V2-g6	NL4-3 mit mutierter g6 N-Glycosylierungsstelle im V2 loop
pSVATGrev	Expressionsvektor für gp160 mit SV40 Promotor

4.2 Herstellung einer Genkassette für den V1- und V2-loop

Im pNL4-3 Vektor waren in unmittelbarer Nähe des V1- und V2-loop keine geeigneten Restriktionsschnittstellen für einen gezielten Austausch dieser Bereiche vorhanden. Die im 5'-Bereich des V1-loop an Position 288 gelegene *ApaLI*-Schnittstelle konnte für Klonierungszwecke nicht verwendet werden, da sie in der Vektorsequenz mehrfach vorhanden war. Über eine Sequenzanalyse wurde festgestellt, dass sich über Punktmutation innerhalb des *env*-Gens an Position 244 im 5'-Bereich des V1-loop eine *AflII*-Restriktionsschnittstelle und an Position 490 im 3'-Bereich des V2-loop eine *BclI*-Restriktionsschnittstelle inserieren lässt. Die Einfügung dieser beiden Schnittstellen erfolgte innerhalb des Vektorkonstruktes pUC*env*. Die bereits an Position 369 befindliche *PstI*-Restriktionsschnittstelle konnte für den Austausch beider Bereiche genutzt werden (Abb.10, Abb.11). Die Generation der *AflII*- und *BclI*-Schnittstellen erfolgte unter Verwendung synthetischer Oligonucleotide (2.8). Der resultierende Vektor pUC*env*_{V1/V2} ermöglichte nun den Austausch veränderter Genbereiche innerhalb des V1/V2-loop und den Austausch des gesamten modifizierten *env*-Gens in den proviralen Vektor pNL4-3. Für die spätere Verwendung der *dam*⁻ sensitiven *BclI*-Schnittstelle beim Austausch veränderter V2-loop-Bereiche wurden sämtliche Vektorkonstrukte in den *E.coli*-Stamm GM2163 transformiert, der die benötigte *dam*⁻ Eigenschaft besitzt. (2.1.1).

4.2.1 Herstellung des Vektors pUC*env*ΔV1

Die Klonierung der verschiedenen V1-Glycomutanten erfolgte in den genetischen Hintergrund des NL4-3 *env*-Gens, das in dem Klonierungsvektor pUC*env* inseriert war (Abb. 12.). Der V1-Bereich wurde jeweils über die Restriktionsschnittstellen *AflII* und *BclI* ausgetauscht. Um die Herstellung der Virusvarianten zu erleichtern, wurde zunächst der Vektor pUCΔV1 erstellt (Abb.10). Dazu wurde der 125bp große V1-Bereich zwischen *AflII* und *PstI* gegen ein 21 bp DNA-Fragment (4.2.1) ausgetauscht. Dieses bestand aus zwei Oligonucleotiden (#8300, #8301), die nach Hybridisierung am 5'- und 3'- Ende zu den verwendeten Schnittstellen komplementäre Überhänge aufwiesen. Das so hergestellte DNA-Fragment wurde mit dem *AflII/PstI* geschnittenen Vektor pUC*env*_{V1/V2} ligiert. In dem resultierenden Vektorkonstrukt pUCΔV1 konnte der deletierte V1-Bereich durch eine PCR-Analyse von dem vollständigen V1-Bereich unterschieden werden. Die Amplifikation des V1-

Bereichs mit dem Oligonucleotidprimerpaar *BstEII*/*PstI* ergab für den Vektor pUCΔV1 ein 257 bp großes Fragment, während der vollständige V1-Bereich des pUCenv ein Amplifikat von 383 bp zeigte (Abb.12). Der Vektor pUCΔV1 war der Klonierungsvektor für die Konstruktion aller V1-Varianten.

4.2.2 Herstellung des Vektors pUCenvΔV2

Die Klonierung der verschiedenen V2-Glycomutanten erfolgte in den selben genetischen Hintergrund des NL4-3 *env*-Gens, wie in 4.2.1 beschrieben. (Abb.14). Der V2-Bereich wurde in diesem Fall über die Restriktionsschnittstellen *PstI* und *BclI* ausgetauscht. Um die Herstellung der Virusvarianten zu erleichtern, wurde auch hier zunächst der Vektor pUCΔV2 erstellt (Abb.10). Dazu wurde der 121bp große V2-Bereich zwischen *PstI* und *BclI* gegen ein 21 bp DNA-Fragment (4.2.2) ausgetauscht. Dieses bestand aus zwei Oligonucleotiden (#8302, #8303), die nach Hybridisierung am 5'- und 3'- Ende zu den verwendeten Schnittstellen komplementäre Überhänge aufwiesen. Das so hergestellte DNA-Fragment wurde mit dem *PstI/BclI* geschnittenen Vektor pUCenv_{V1/V2} ligiert. Aufgrund der *dam*-Methylase-Sensitivität des Enzyms *BclI* war es erforderlich, die DNA aus dem *E.coli dam⁻* Stamm GM2163 zu isolieren. In dem resultierenden Vektorkonstrukt pUCΔV2 konnte dann der deletierte V2-Bereich durch eine PCR-Analyse vom vollständigen V2-Bereich unterschieden werden. Die Amplifikation des V2-Bereichs mit dem Oligonucleotidprimerpaar *BstEII*/*BclI* ergab für den Vektor pUCΔV2 ein 381 bp großes Fragment, während der vollständige V2-Bereich des pUCenv ein Amplifikat von 505 bp zeigte (Abb.12). Der Vektor pUCΔV2 wurde als Klonierungsvektor für die Konstruktion sämtlicher V2-Varianten verwendet.

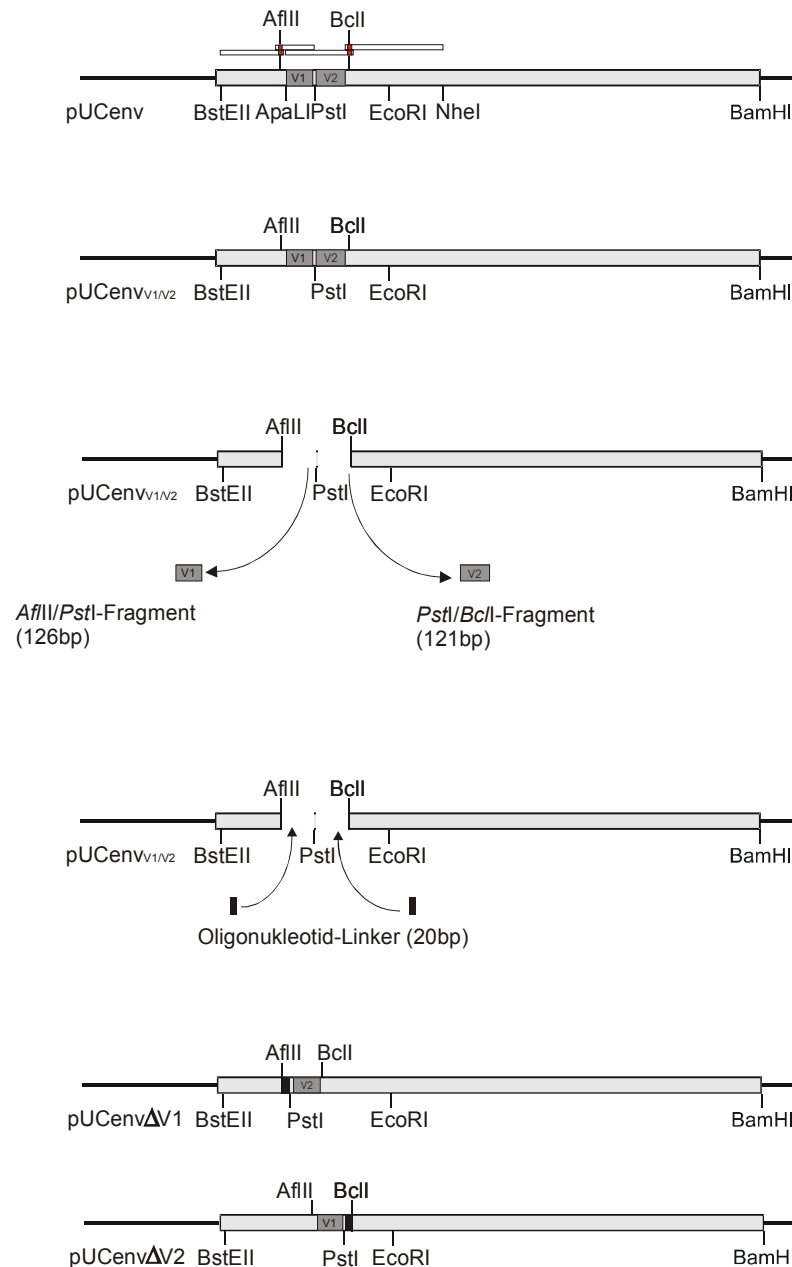


Abb. 10 Generierung von Vektoren für den Austausch des HIV-1 V1/V2-loop

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden die beiden für den Austausch des V1- und V2-loop erforderlichen Restriktionsschnittstellen *AflII* und *BclI* erzeugt. Um für die folgenden Klonierungen von, an unterschiedlichen N-Glycosylierungsstellen modifizierten V1- und V2-loop Fragmenten, per PCR-Kontrolle leichter identifizierbare Vektorkonstrukte zu erhalten, wurden die ursprünglichen V1- bzw. V2-Bereiche gegen kurze Linker ausgetauscht. Man erhielt somit Vektoren mit V1- oder V2-Deletionen. Dadurch liess sich der Vektor klar von den mutierten Glycomutanten durch eine PCR unterscheiden.

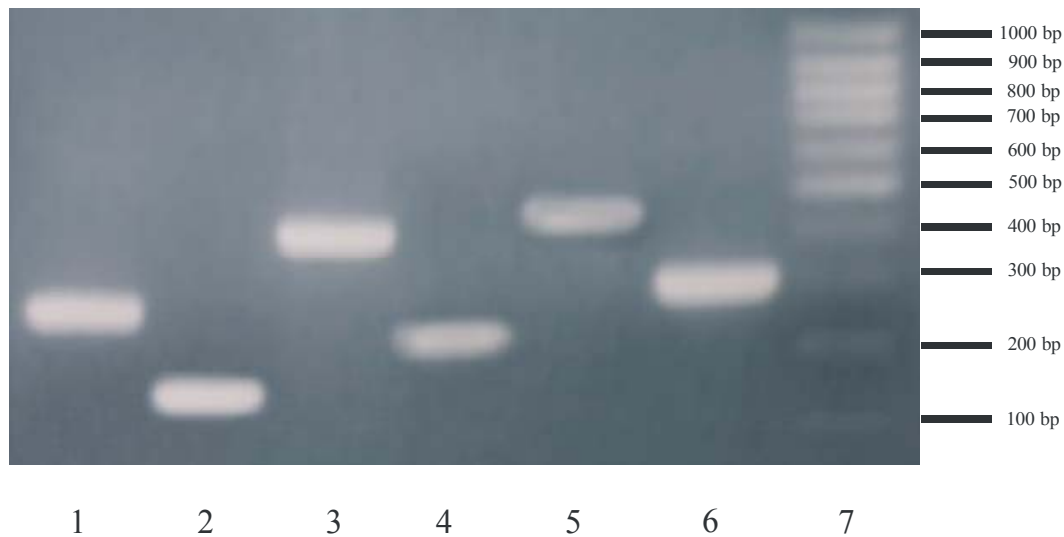


Abb. 11 Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Amplifikate für die Generierung der *Afl*III- und *Bcl*I-Restriktionsschnittstelle in pUC*env*

In getrennten Ansätzen wurden zunächst die Fragmente *Bst*EII-*Afl*III (258bp, Spalte1) und *Afl*III-*Pst*I (155bp, Spalte2) generiert, deren Größe anhand eines DNA-Längenstandards abgeschätzt wurde. In einem weiteren Amplifikationsschritt wurden beide Produkte dann als Matrize für die Generierung des kompletten *Bst*EII-*Pst*I-Fragmentes (384bp, Spalte 3), welches die *Afl*III-Restriktionsschnittstelle enthielt, verwendet.

Für die Erzeugung der *Bcl*I-Schnittstelle wurde das Prinzip der *Nested* (= verschachtelt)-PCR angewendet. Durch die Generierung der Fragmente *Apa*LI-*Bcl*I (215bp, Spalte4) und *Bcl*I-*Nhe*I (462bp, Spalte5) wurden Produkte erhalten, die jeweils die neue Schnittstelle trugen. In einem weiteren Amplifikationsschritt wurden Primer verwendet, die jeweils näher zum 3'-Ende der als Matrize verwendeten Produkte der ersten Amplifikationsrunde lagen. Das resultierende *Pst*I-*Eco*RI-Fragment konnte anschließend über die entsprechenden Schnittstellen in pUC*env* kloniert werden

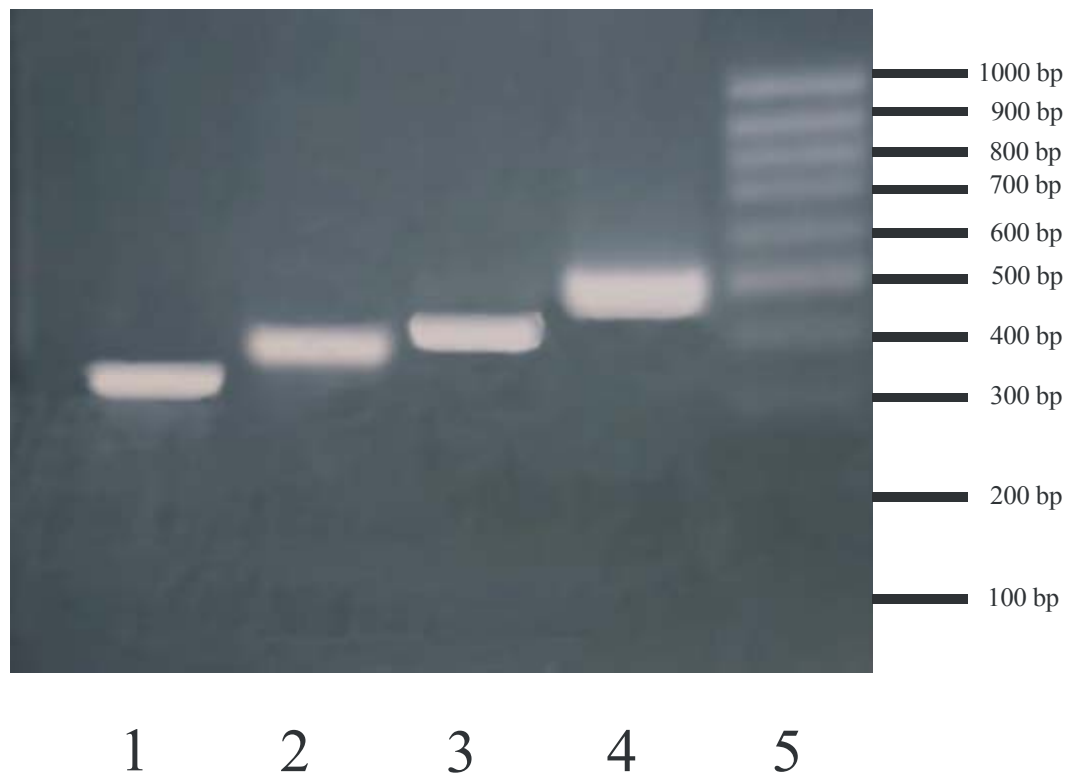


Abb. 12 Agarosegel-Elektrophorese der PCR-Amplifikate des V1- und V2-Bereiches von pUCenv, pUCΔV1, und pUCΔV2

Der V1-Bereich der Vektoren pUCenv und pUCΔV1 wurde mit den Oligonucleotidprimern *Bst*EIIIf und *Pst*IIr amplifiziert. Der V2-Bereich der Vektoren pUCenv und pUCΔV2 wurde mit dem Primerpaar *Bst*EIIIf und *Bc*IIr amplifiziert. Die DNA wurde in einem 1,5% igen Agarosegel aufgetrennt. Ein Vergleich mit dem DNA-Längenstandard (Spalte 5) belegt, dass die um den jeweiligen Bereich deletierten Vektoren Banden von ca. 280bp (pUCΔV1 in Spalte 1) und ca. 390bp (pUCΔV2 in Spalte 3) ergeben. Die Differenz zu den jeweiligen Amplifikaten des Vektors pUCenv von ca. 380bp (Spalte 2), bzw. ca. 500bp (Spalte 4) entspricht der Größe des deletierten Loops.

4.3 Erstellung der rekombinanten Virusvarianten

4.3.1 Herstellung der NL4-3 V1-loop Glycovarianten

Der X4-trope HIV-1 Laborstamm NL4-3 verfügt im V1-Bereich an allen drei möglichen Positionen (g2-g4) über eine Erkennungssequenz für die N-Glycosylierung. Die Erkennungsmotive werden in diesem Fall von den Aminosäuresequenzen NDT, NSS und NCS gebildet. Diese Motive wurden durch den Austausch von Aminosäuren so modifiziert, dass eine N-Glycosylierung nicht mehr erfolgen konnte (Abb.13, Abb.15).

Um das *Afl*III- *Pst*I 125 bp Fragment mitsamt der V1-Region austauschen zu können, wurden zwei Oligonucleotide mit einer Länge von 129 bp bzw. 78 bp mit einer 24 bp Überlappung (pNL4-3 env Position 282 bis 306) hergestellt. Die Oligonucleotide wurden hybridisiert und per PCR amplifiziert, wobei *Afl*III – und *Pst*I- spezifische Primer verwendet wurden (Abb.16). Die Mutationen innerhalb der Glycosylierungsstellen g2 und g3 wurden durch den Austausch eines Kodons für Asparagin (N) in Glutamin (Q) erzeugt. Glutamin ähnelt hinsichtlich seiner chemischen Eigenschaften Asparagin, wird aber nicht als Teil eines N-Glycosylierungsmotives erkannt. Aufgrund einer innerhalb Position g4 lokalisierten *Pst*I – Restriktionsstelle, die für die Klonierung der modifizierten V1-loop-Fragmente genutzt werden sollte, erfolgte hier ein Austausch von Asparagin (N) in Threonin (T), das konformationell Ähnlichkeiten zu Asparagin aufweist, ohne innerhalb eines Glycosylierungsmusters erkannt zu werden. Unter Anwendung eines Sets von Oligonucleotiden mit unterschiedlichen Glycosylierungsmustern und zielgerichteter Mutagenese durch PCR-Amplifikation wurden neben dem voll glycosylierten Wildtyp V1 – Fragment insgesamt sieben mögliche V1-Glyco-Varianten konstruiert – g2, g3, g3, g2/3, g3/4, g2/4, sowie das komplett deglycosylierte Fragment g2/3/4 (die Positionsnummern zeigen hierbei die jeweils fehlende N-Glycosylierungsstelle an).

Sämtliche erhaltene Fragmente wurden in pUCenv ΔV1 Vektor kloniert. Nach Bestätigung der Mutationen durch Sequenzierung wurden zur Herstellung der proviralen Plasmide aus den jeweiligen pUCenv-Konstrukten 2,1 kb große *Bst*EII- *Bam*HI-Fragmente isoliert und über die entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pNL-Δenv kloniert. Die resultierenden Klone wurden mit folgender Nomenklatur belegt: pNL4-3-V1-g2, pNL4-3-V1-g3, pNL4-3-V1-g4 pNL4-V1-g2/3, pNL4-3-V1-g3/4, pNL4-3-V1-g2/4, sowie pNL4-3-V1-g2/3/4.

4.3.2 Herstellung der NL4-3 V2-loop Glycovarianten.

Im V2-loop werden die Erkennungsmotive für eine N-Glycosylierung von den Aminosäuresequenzen NIS und NTS gebildet. Die Veränderung dieser Motive erfolgte über die Verwendung synthetischer Oligonucleotide wie in 1.2.1 beschrieben. Hierzu wurden zwei Oligonucleotide mit einer Länge von 129 bp bzw. 126 bp mit einer 30 bp Überlappung (pNL4-3 env Position 376 bis 406) hergestellt. Die Oligonucleotide wurden hybridisiert und per PCR amplifiziert, wobei *PstI*- und *BclI*- spezifische Primer verwendet wurden. Die Mutationen innerhalb der Glycosylierungsstellen g5, g6 und g7 wurden durch den Austausch eines Kodons für Asparagin (N) in Glutamin (Q) erzeugt (Abb.14, Abb.15).

Nach Amplifikation der modifizierten V2-loop-Fragmente mit *PstI* und *BclI*-spezifischen Primern wurden die nach Verdau erhaltenen 121bp-Fragmente (Abb.16) mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und in das Vektorkonstrukt pUCenvΔV2 ligiert. Auf diese Weise wurden sieben mögliche V2-Glyco-Varianten konstruiert – g5, g6, g7, g5/6, g6/7, g5/7, sowie das komplett deglycosylierte Fragment g5/6/7 (die Positionsnummern zeigen hierbei die jeweils fehlende N-Glycosylierungsstelle an). Eine achte in beiden Loops komplett deglycosylierte Variante g2-7 wurde durch den Austausch des modifizierten V1-loops der Variante V1-g2/3/4 in die Variante V2-g5/6/7 konstruiert, wobei hier der Austausch über die Schnittstellen *BstEII* und *PstI* erfolgte.

Nach Bestätigung der gewünschten Mutationen durch DNA-Sequenzierung wurden zur Generierung der entsprechenden proviralen Plasmide aus den jeweiligen pUC env-Konstrukten 2,1 kb große *BstEII*- *BamHI*-Fragmente isoliert und über die entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pNL-Δenv kloniert. Die resultierenden Klone wurden mit folgender Nomenklatur belegt: pNL4-3-V2-g5, pNL4-3-V2-g6, pNL4-3-V2-g7, pNL4-V2-g5/6, pNL4-3-V2-g6/7, pNL4-3-V2-g5/7, pNL4-3-V2-g5/6/7, sowie pNL4-3-V1/V2-g2-7.

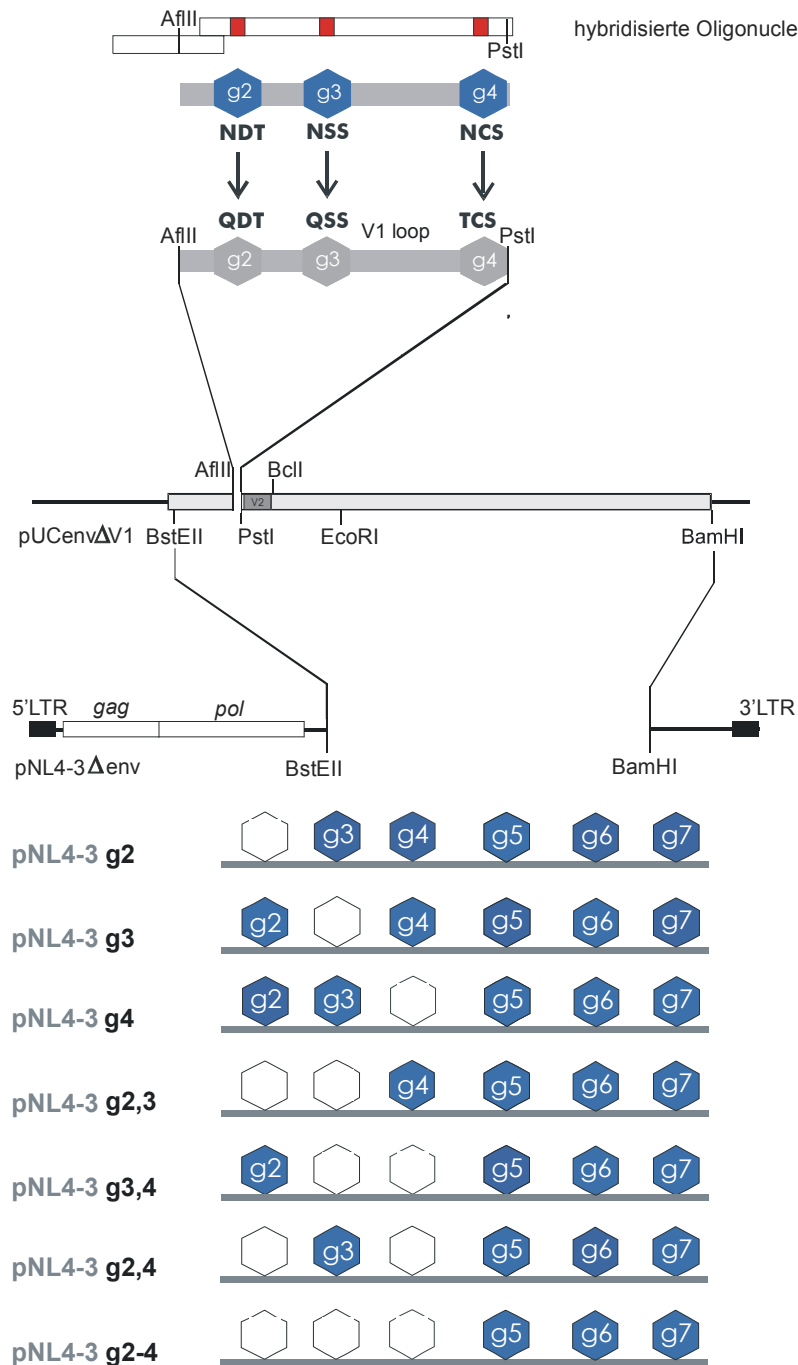


Abb. 13 Generierung von V1-loop-Mutanten mit veränderter N-Glycosylierung

Synthetische Oligonucleotide mit veränderten Sequenzen im Bereich der drei N-Glycosylierungsstellen wurden hybridisiert und mit dem Primerpaar *AflIII/PstI* amplifiziert. So wurden sieben DNA-Fragmente generiert, denen in unterschiedlicher Kombination V1-loop N-Glycosylierungsstellen fehlten. Die entsprechenden Fragmente wurden in pUCΔV1 kloniert. Danach wurde das BstEII-BamHI env Fragment in den proviralen Vektor pNL-Δenv kloniert.

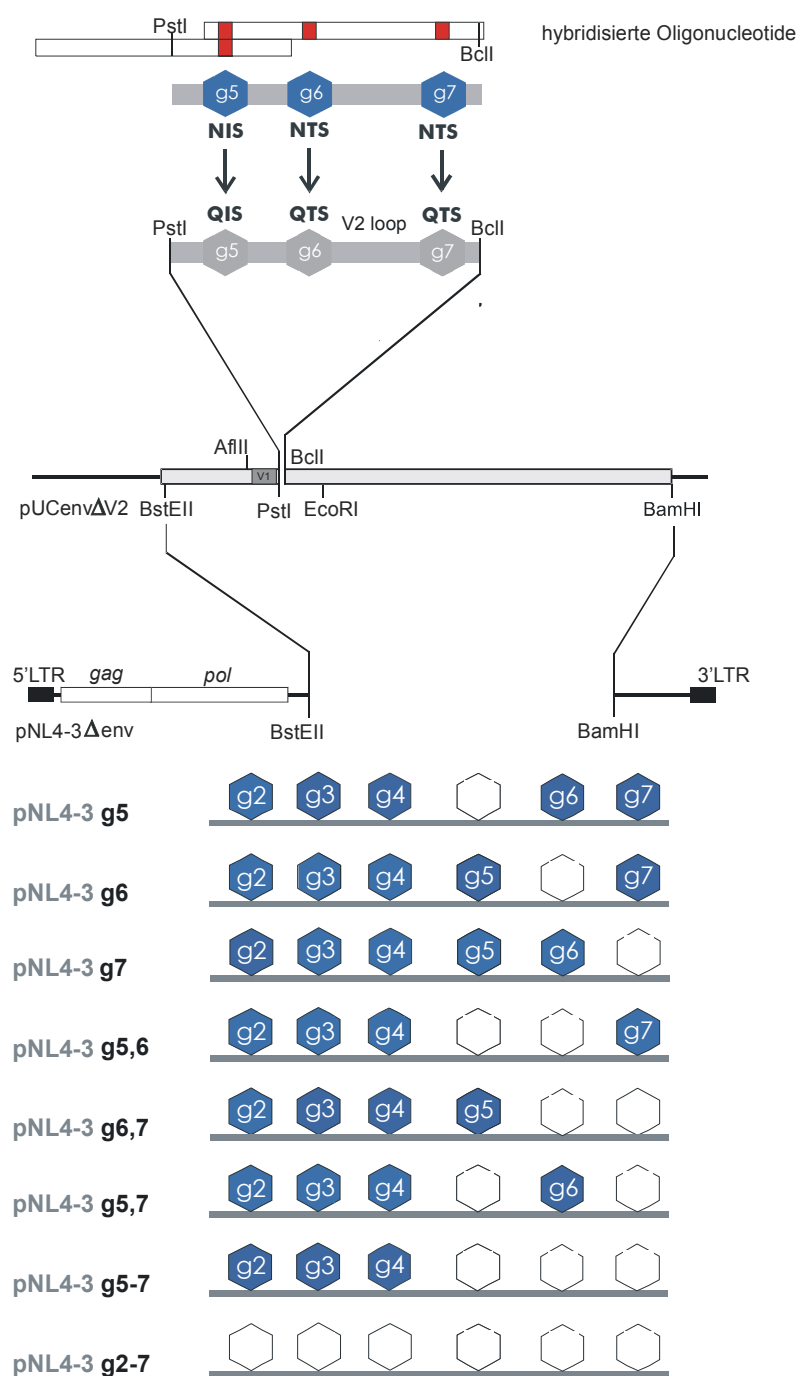


Abb. 14 Generierung von V2-loop-Mutanten mit veränderter N-Glycosylierung

Die Klonierung der V2 Mutanten erfolgte wie in Abb. 13 beschrieben. Anstelle der V1 spezifischen Primer und Oligonucleotide wurden V2-loop DNA Sequenzen als Oligonucleotide eingesetzt und mit dem Primerpaar *PstI/BclII* amplifiziert. Auf diese Weise wurden ebenfalls sieben Fragmente generiert, denen in unterschiedlicher Kombination die V2 N-Glycosylierungsstellen fehlten.

		V1-loop						V2-loop					
		g2		g3		g4		g5		g6		g7	
NL4-3	LKPCV	KLTPLC	VSLK	CTDLK	NDTNT	NSS	SGRMIMEK	GEIK	NCSFNIS	TSIRDKVQKEY	AFFYKLDIVPID	NTSYRLISC	NTSVII
NL4-3-g2		-----	-----	Q-----	---	-----	-----	---	---	-----	-----	---	---
NL4-3-g3		-----	-----	---	Q-----	---	---	---	---	-----	-----	---	---
NL4-3-g4		-----	-----	---	---	---	T-----	---	---	-----	-----	---	---
NL4-3-g2/3		-----	-----	Q-----	Q-----	---	---	---	---	-----	-----	---	---
NL4-3-g3/4		-----	-----	---	Q-----	---	T-----	---	---	-----	-----	---	---
NL4-3-g2/4		-----	-----	Q-----	---	---	T-----	---	---	-----	-----	---	---
NL4-3-g2/3/4		-----	-----	-----	Q-----	---	T-----	---	---	-----	-----	---	---
NL4-3-g5		-----	-----	---	---	---	---	---	Q--	-----	-----	---	---
NL4-3-g6		-----	-----	---	---	---	---	---	---	Q-----	-----	---	---
NL4-3-g7		-----	-----	---	---	---	---	---	---	---	-----	Q-----	---
NL4-3-g5/6		-----	-----	---	---	---	---	---	Q--	-----	-----	Q-----	---
NL4-3-g6/7		-----	-----	---	---	---	---	---	---	Q-----	-----	Q-----	---
NL4-3-g5/7		-----	-----	---	---	---	---	---	Q--	-----	-----	---	Q-----
NL4-3-g5/6/7		-----	-----	---	---	---	---	---	Q--	-----	-----	Q-----	Q-----
NL4-3-g2-7		-----	-----	Q-----	Q-----	---	T-----	Q--	---	-----	-----	Q-----	Q-----

Abb. 15 Sequenzen der V1/V2- Glycomutanten des HIV-1 NL4-3 Virus

Die Darstellung zeigt die Sequenzbereiche des V1- und V2-loop des HIV-1 NL4-3 im Vergleich zu den hergestellten NL4-3. Glycovarianten. Durch zielgerichtete Mutagenese mit Hilfe von sequenzspezifischen Oligonucleotiden wurden die Aminosäurecodons verändert und auf diese Weise die Erkennungssequenzen für N-Glycosylierung eliminiert.

(-) Strich: Identische Aminosäuren,

Kasten: N-Glycosylierungsstellen g2-g7.

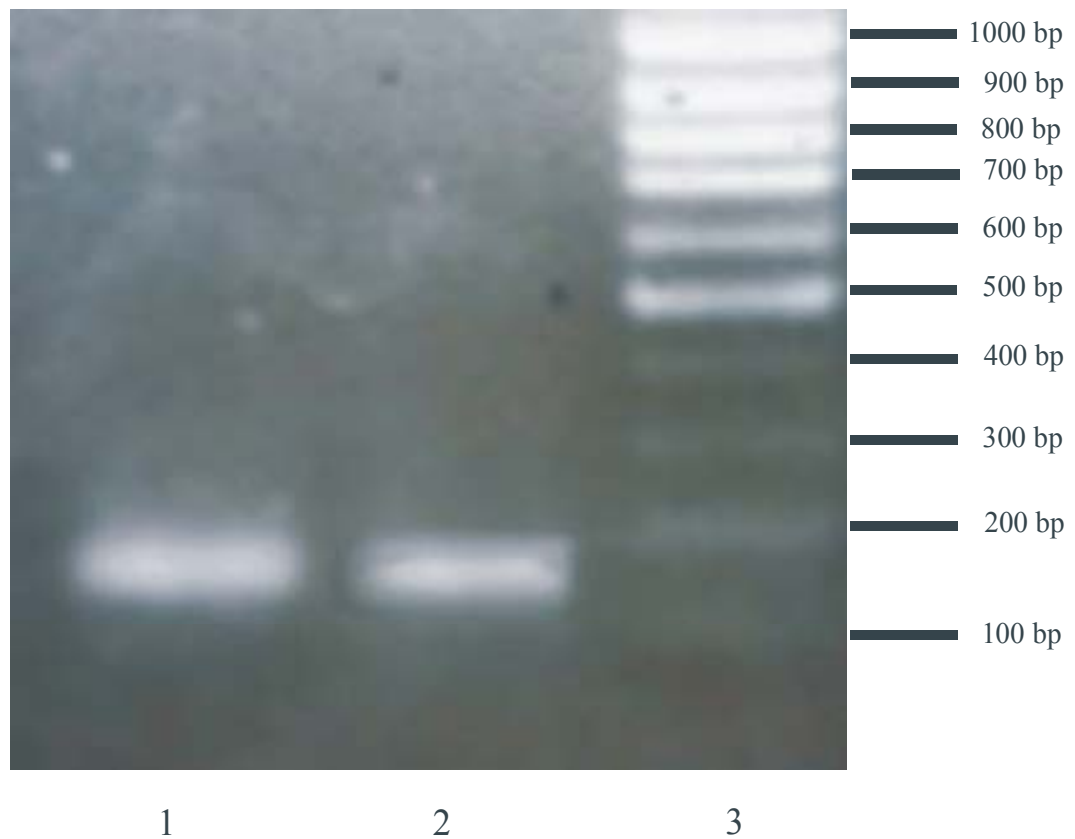


Abb. 16 Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikate von V1- und V2-loop Fragmenten mit Mutationen innerhalb der N-Glycosylierungsstellen

Synthetische Oligonucleotide mit Codonaustauschen im Bereich bestimmter N-Glycosylierungsstellen wurden hybridisiert und mit spezifischen Primern amplifiziert. Exemplarisch sind hier ein auf diese Weise generiertes V1-loop-Fragment von 157 bp (Spalte-1) und ein V2-loop-Fragment von 153 bp Länge (Spalte 2) dargestellt.

4.3.3 Generierung rekombinanter V1- und V2-loop-Glycovarianten des NL4-3 Virus durch Transfektion von HeLa-Zellen mit retroviralen Vektoren

Die proviralen pNL4-3 Plasmide mit veränderten N-Glycosylierungsstellen innerhalb des V1- und V2-loops wurden mit Hilfe der Lipofectamin-Methode in HeLa-CXCR4 –Zellen transfiziert. Diese Zelllinie exprimiert neben CD4 den Chemokinrezeptor CXCR4 auf ihrer Oberfläche und eignet sich daher für die Produktion von X4-tropen Viren, wie z.B. an das NL4-3 Virus. Aufgrund der Reinfektion, die bei der Transfektion von CD4/CXCR4 positiven Zellen stattfindet, kommt es zu hohen Virusmengen von bis zu 100 ng p24/ml.

Der cytopathische Effekt einer HIV-1 Infektion stellt sich in der Zellkultur bei X4-tropen Isolaten besonders deutlich durch die Bildung mehrkerniger Riesenzellen, den Syncytien, dar. Für die Einleitung der Fusionsereignisse wird die Ausbildung von gp120/41-CD4-Komplexen, auch unter Beteiligung des V2- und V3-loop und mit Interaktion von Glycanen auf der Zelloberfläche beschrieben (HANSEN, ET AL., 1989; FREED ET AL., 1992, ANDEWEG ET AL., 1993).

Die mit den unterschiedlichen V1/V2-Glycovarianten in der Transfektion erhaltenen Virusmengen (bezogen auf die p24 Menge/ml) wichen sehr stark voneinander ab (Tabelle 1). Bei den V1-loop-Glycovarianten fiel auf, dass ein Entfernen der Zucker g2 und g3 an der N-terminalen Basis und an der Spitze des Loops alleine (-g2; -g3) oder auch in Kombination (-g2/3) keinen Einfluss auf die Virusproduktion hatte. Im Vergleich zum Wildtyp war bei diesen Varianten die Menge der zu beobachtenden Syncytien ebenfalls erhöht. Bei Mutanten mit einer mutierten g4 Glycosylierungsstelle, die an der C-terminalen Basis des Loops liegt, wurden dagegen nur niedrige Virusmengen nach der Transfektion erhalten. Wurden weitere Glycosylierungsstellen entfernt, z.B. NL4-3-V1-g2/4 oder NL4-3-V1-g2/3/4, wurde eine weitere Abnahme der Virusmengen beobachtet. Diese Beobachtungen einer verringerten Virusmenge, nach der Transfektion gleicher Mengen proviraler DNA, korrelierten mit einer verringerten Syncytienbildung der V1-loop Varianten.

Für die V2-loop Varianten zeigte sich ein ähnliches Bild. Ein Fehlen der beiden ersten N-Glycane g5 und g6 (-g5; -g6) oder ein Fehlen beider Glycane (-g5/6) hatte keinen Einfluss auf die Virusproduktion und die Ausbildung cytopathischer Effekte. Varianten, denen das C-terminale Glycan g7 fehlte, zeigten hingegen einen deutlichen Rückgang an viraler Produktion und der Ausbildung von Syncytien.

Für V1/V2-loop Varianten mit fehlenden N-Glycanen g4 oder g7 stellte es sich als schwierig heraus, ausreichende Mengen an Virus für funktionelle Assays zu produzieren. Die beiden C-terminalen Glycane des V1- und V2-loop scheinen offenbar eine essentielle Rolle für die Vitalität des pNL4-3 Virus zu spielen.

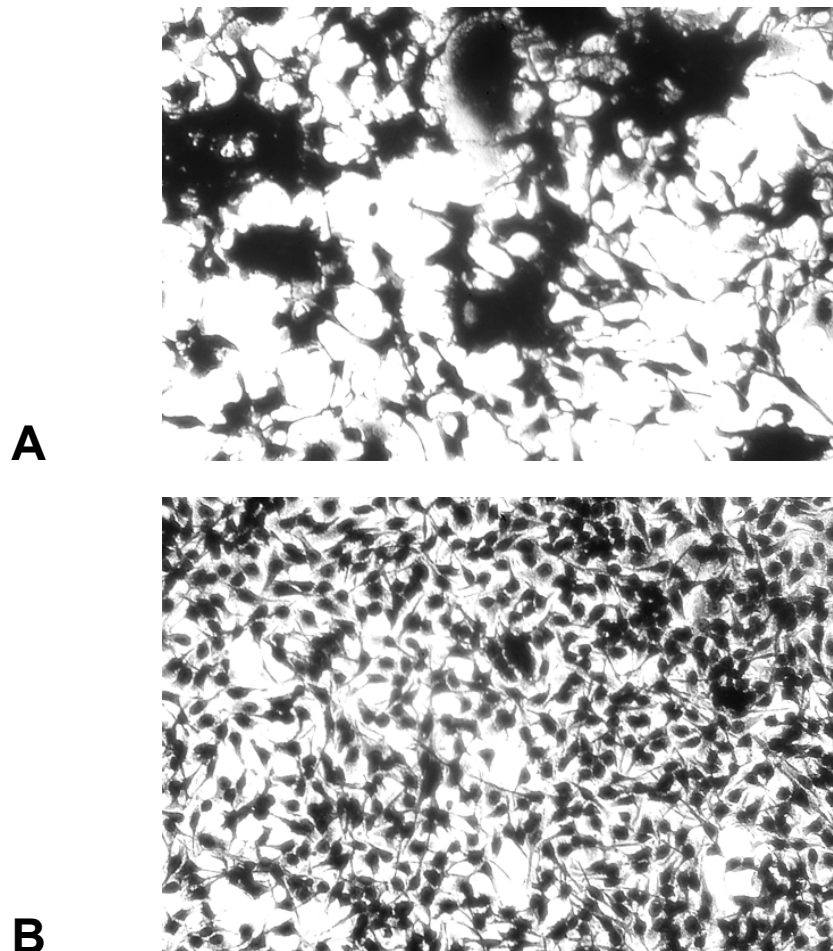


Abb. 17 Syncytienbildung in pNL4-3 DNA transfizierten HeLa-Zellen

(A) HeLa-Zellen, die CD4 und CXCR4 exprimieren, wurden mit pNL4-3 DNA transfiziert. Durch die Virusproduktion kommt es zur Ausbildung von Riesenzellen (Syncytien). Nach ca. 4-6 Tagen sterben diese Syncytien ab und lösen sich auf. Der Zellrasen aus adhärennten HeLa-Zellen wird durch die Virusproduktion, die Produktion von gp120/gp41, aufgelöst. (B) Nicht-infizierte HeLa-CD4-CXCR4 Zellen.

Tabelle 1 Virustiter und Syncytienbildung von V1/V2-loop-Glycovarianten nach Transfektion in Hela-CD4-CXCR4 Zellen^a

HeLa-CXCR4-Zell-Transfektion (2×10^5 Zellen/Ansatz)^a

Virus-Mutanten	Ø p24 ng/ml	Syncytien/Ansatz
NL4-3	100	+++
NL4-3-V1-g2	100	++++
NL4-3-V1-g3	100	++++
NL4-3-V1-g4	20	++
NL4-3-V1-g2/3	100	++++
NL4-3-V1-g3/4	15	+
NL4-3-V1-g2/4	15	+
NL4-3-V1-g2/3/4	<5	+
NL4-3-V2-g5	100	+++
NL4-3-V2-g6	100	+++
NL4-3-V2-g7	20	++
NL4-3-V2-g5/6	>50	+++
NL4-3-V2-g6/7	15	+
NL4-3-V2-g5/7	10	+
NL4-3-V2-g5/6/7	<5	+
NL4-3-V1/V2-g2-7	<5	+

a, Die erhaltenen Virustiter wurden durch p24-Antigen-ELISA bestimmt und stellen gemittelte Werte aus ca. 25 Transfektionsansätzen dar. Die Anzahl der Syncytienbildung ergibt sich aus mikroskopischer Auszählung der fusionierten Zellen und ist dargestellt als Anzahl von Syncytien/ 10^3 Zellen. ++++: >100; +++: >50; ++: >20; +: >5

4.3.4 Infektion von GHOST-Indikatorzellen mit NL4-3 Glycovarianten

Um in einem ersten Experiment den Einfluss der Glycosylierung im V1- und V2-Bereich auf die Infektiosität und Korezeptornutzung von NL4-3 zu ermitteln, wurde ein Teil der in 4.3.1 und 4.3.2 hergestellten rekombinanten Viren in einem Infektionsversuch getestet. Hierzu wurden drei GHOST-Indikatorzelllinien, die entweder ausschließlich CD4 oder zusätzlich die Korezeptoren CXCR4 oder CCR5 auf ihrer Oberfläche exprimierten, mit unterschiedlichen Virusmengen (bezogen auf ng p24/ml) infiziert. Als zu testende rekombinante Viren wurden neben dem vollständig glycosylierten NL4-3 Wildtyp die beiden deglycosylierten Varianten NL4-3-V1-g2/3/4 und NL4-3-V2-g5/6/7, sowie die vollständig deglycosylierte Variante NL4-3-V1/V2-g2-7 eingesetzt. Die Infektionsereignisse wurden über eine Immunfärbung (3.3.3) nachgewiesen und anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Infektiosität der verschiedenen Glycovarianten wurde als Anzahl gefärbter Zellen (*foci forming units, ffu*) pro 1 ng p24 dargestellt. Die Werte ergaben sich aus Doppelbestimmungen. Das Virus wurde jeweils in drei Konzentrationen eingesetzt (entsprechend, 1, 5 und 10 ng p24-Virusantigen pro Ansatz). In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Infektion der GHOST-Korezeptorzellen mit den verschiedenen NL4-3-Glycomutanten dargestellt. Keine der untersuchten NL4-3-Glycovarianten war in der Lage, die GHOST-CCR5-Zelllinie zu infizieren. Ein Fehlen von N-Glycanen im V1/V2-Bereich von NL4-3 bewirkt somit keine Änderung des X4-Tropismus und verursacht keinen Wechsel der Korezeptornutzung zu CCR5.

Im Falle der GHOST-CXCR4-Zelllinie zeigten sich hingegen große Unterschiede in der Infektiosität zwischen den verschiedenen NL4-3-Glycovarianten. Die Anzahl der Infektionsereignisse der deglycosylierten Varianten war deutlich geringer als beim Wildtyp. Auffallend ist hierbei, dass die Variante NL-4-3-V1/V2-g2-7 mit sechs fehlenden Glycanen keinen additiven Effekt in der verringerten Infektiosität im Vergleich zu den beiden anderen Varianten mit je drei fehlenden Glycanen aufwies. Für die parentale GHOST-Zelllinie zeigte sich ein ähnliches Infektionsmuster innerhalb der getesteten rekombinanten Viren, die Infektiositätsrate war jedoch deutlich geringer als bei den GHOST-CXCR4 Zellen. Die parentale GHOST Zelllinie exprimiert einen geringen CXCR4-Hintergrund, der von einigen X4-tropen Virusvarianten genutzt werden kann (VÖDRÖS *ET AL.*, 2001).

Der vollglycosylierte Wildtyp NL4-3 zeigt für X4-positive GHOST-Zelllinien eine etwa 20-fach höhere Infektiosität, als Varianten mit drei bis sechs fehlenden N-Glycanen innerhalb des V1- und V2-loop.

Tabelle 2 Infektionsraten von NL4-3-Varianten mit unterschiedlicher V1- und V2-Loop N-Glycosylierung

Virus-Mutanten	GHOST-Zell-Infektion (ffu/ng p24) ^a		
	parental	CXCR4	CCR5
NL4-3	4	32	-
NL4-3-g2/3/4	0,03	8	-
NL4-3-g5/6/7	0,01	5	-
NL4-3-g2-7	0,03	6	-

^a Die Infektionsereignisse wurden in einem Infektionstest (GHOST Indikatorzelllinien) durch Immunfärbung nachgewiesen und quantifiziert. Die Anzahl der Infektionsereignisse (ffu, *foci forming units*) wurde jeweils in Doppelbestimmungen für drei Virusverdünnungen (1, 5 und 10ng p24 /Ansatz) ermittelt und auf 1 ng/p24 bezogen.

4.3.5 Infektion von U87-CXCR-4 Zellen mit NL4-3 V1/V2-loop Glycovarianten

Aufgrund der unterschiedlichen Ausbeuten an infektiösem Virus bei der Transfektion von Hela-Zellen sollten weitere Infektionsteste zeigen, wie sich die verschiedenen Virusvarianten in der Zellkultur verhalten, wenn die Infektion mit einer identischen Virusmenge (bezogen auf ng p24/ml) vorgenommen wird.

Für diese Untersuchungen wurden U87-CXCR4-Zellen mit gleichen Virusmengen, entsprechend 0,5 ng p24/Ansatz infiziert. Zellkulturüberstände wurden über die Dauer von 10 Tagen in Abständen von 2 Tagen abgenommen und die Menge des produzierten p24 gemessen. In Abbildung 18 sind die Kinetiken der V1- (Abb. 18A) und V2-loop-Glycovarianten (Abb. 18B), sowie des NL4-3 Wildtyps dargestellt. In Abb.18A erkennt man, dass sich die gemessenen Kurven in zwei Gruppen einteilen lassen. Die Varianten NL4-3-V1-g2, NL4-3-V1-g3 und Variante NL4-3-V1-g2/3 mit zwei fehlenden Zuckern erreichen nach 7 Tagen die höchsten Werte von ca. OD=2,8, liegen also sogar noch oberhalb der Werte für den NL4-3-Wildtyp, der nach 7 Tagen einen Wert von OD=2,5 erreicht. Die schlechter replizierende Gruppe von Virusvarianten setzt sich aus den Varianten pNL4-3-V1-g4, -V1-g2/4, V1-g3/4 und-V1-g2/3/4 zusammen,. Diese Virusvarianten zeigen auch nach 10 Tagen Werte < OD=1,0. Allen diesen Varianten fehlt der Zucker g4, wogegen die besser replizierenden Varianten alle g4 besitzen. Glycan g4 scheint also eine Rolle für die verbesserte, bzw. ein Fehlen eine Rolle für die schlechtere Replikation der Virusvarianten zu spielen. Ein ähnliches Bild zeichnet sich für die Replikation der V2-loop-Glycovarianten ab (Abb. 18B). Während die Variante NL4-3-V2-g5 an Tag 10 ähnliche Werte wie der Wildtyp erreicht, folgt als nächstes NL4-3-V2-g6 und die Variante NL4-3-V2-g5/6 mit Werten von ca. OD=1,5. Sämtliche rekombinante Viren ohne den C-terminalen Zucker g7 innerhalb des V2-loop replizieren hingegen schlechter und erreichen nach 10 Tagen nur Werte < OD=0,5. NL4-3 V2-g5/6/7, sowie die komplett deglycosylierte Variante NL4-3-V1/V2-g2-7 sind bei der eingesetzten Virusmenge nicht mehr infektiös. Die C-terminalen N-Glycane des V1-und V2-loop scheinen somit für die Replikationseigenschaften des NL4-3 Virus von erheblicher Bedeutung zu sein. Varianten, denen diese Zuckerstrukturen fehlen, zeigen schlechtere replikative Eigenschaften und verlieren ihre Infektiosität, wenn zusätzlich weitere Zucker fehlen.

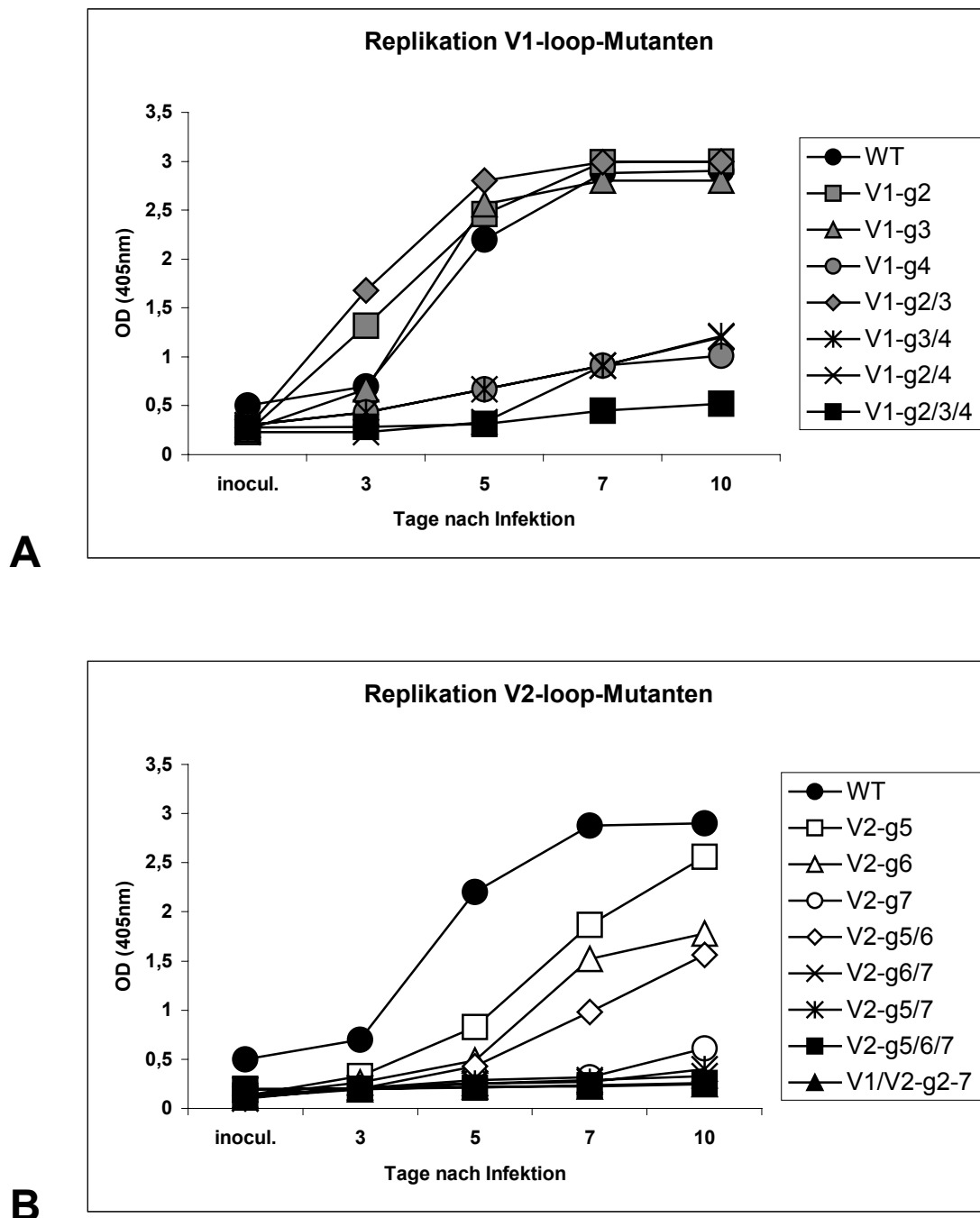


Abb. 18 Replikation der V1/V2-loop-Mutanten auf U87-CXCR4 Zellen.

U87-CXCR4 Indikatorzellen wurden mit gleichen Mengen (0,5 ng p24/ml) Virus infiziert. Die Infektion erfolgte in 96-well Zellkulturplatten. Nach 3, 5, 7 und 10 Tagen wurde der Virusgehalt mit Hilfe eines p24-Antigen ELISA ermittelt. Die Menge des produzierten Virus ist dargestellt als OD_{405nm}. Der lineare Bereich des p24-Testes war zwischen OD_{405nm}=0,2 und OD_{405nm}=2,0 [(OD_{405nm} - 2,0) / 0,4 = ng p24].

4.3.6 Bestimmung der mittleren infektiösen Dosis (TCID₅₀) der V1- und V2-loop-Glycovarianten

Bei der weiteren Charakterisierung der Virusvarianten wurden Infektionstests mit gleichen Mengen Virus, bezogen auf die TCID₅₀ durchgeführt. Die Bestimmung der mittleren infektiösen Dosis einer Viruskultur erlaubt im Zusammenhang mit der Bestimmung des p24-Gehalts der Ausgangsverdünnung eines Virusüberstandes die Darstellung der Infektiosität bezogen auf die Virusantigenmenge: TCID₅₀/ng p24.

Die Abb. 19 zeigt die ermittelten Werte für NL4-3 und fünfzehn verschiedene V1- bzw. V2-loop-Glycovarianten. Die untersuchten rekombinanten Viren ließen sich hierbei in zwei Gruppen unterschiedlicher Infektiosität einteilen. Die erste Gruppe, zu der auch der NL4-3 Wildtyp zu zählen ist, erreichte Werte von 10^{-3} bis 10^{-5} TCID₅₀/ng p24. V1-loop-Glycovarianten ohne die N-Glycane g2 oder g3 erreichten sogar höhere Werte als der Wildtyp, fehlten beide N-Glycane g2 und g3 wurden die höchsten TCID₅₀/ng p24-Werte erzielt. In der Gruppe dieser hochinfektiösen Virusvarianten lagen auch drei V2-loop-Glycovarianten. Wie im Falle der oben erwähnten V1-loop-Glycovarianten ist ihnen gemeinsam, dass die jeweils ersten N-Glycane des V2-loop (g5 und g6) fehlen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen der V1-loop Varianten, werden diese Viren jedoch sukzessiv weniger infektiös. Sobald das N-Glycan g7 fehlt, sinkt bei den V2-loop Varianten die Infektiosität um das 10-100fache. Dieser Effekt ist im Falle der V1-loop-Glycovarianten sogar noch größer. Sämtliche V1-loop-Varianten ohne den C-terminalen Zucker g4 zeigen eine um das 300fache niedrigere Infektiosität als der Wildtyp. Im Vergleich zu den schnell replizierenden Varianten pNL-V1-g2, -g3 und -g2/3 (4.3.5) liegt der Unterschied in der Infektiosität um das 400-fache niedriger.

Für die V1-loop-Glycovarianten zeigte sich, dass das N-Glycan g4 eine essentielle Rolle für den Erhalt der Infektiosität spielt, während die N-Glycane g2 und g3 entbehrlich zu sein scheinen und bei Abwesenheit die Infektiosität sogar noch steigern.

Für die V2-loop Glycovarianten zeigt sich auch in diesen Tests wieder eine essentielle Rolle des C-terminalen N-Glycans g7 für den Erhalt der Infektiosität. Die Wichtigkeit der Glycane innerhalb des V2-loop scheint sich hierbei auch vom N- zum C-Terminus des Loop zu ordnen. Das N-Glycan g5 ist für die Vitalität des Virus eher zu vernachlässigen, während ein Fehlen von g6 und g7 oder ein Fehlen beider Zucker die infektiösen Eigenschaften negativ beeinflusst.

		TCID ₅₀ / ng p24
pNL4-3 g2,3		19400
pNL4-3 g3		14350
pNL4-3 g2		14000
pNL4-3 g5		12790
pNL4-3 wt		12700
pNL4-3 g6		5390
pNL4-3 g5,6		2030
pNL4-3 g5,7		360
pNL4-3 g7		122
pNL4-3 g6,7		110
pNL4-3 g5-7		76
pNL4-3 g3,4		51
pNL4-3 g4		40
pNL4-3 g2,4		29
pNL4-3 g2-4		25
pNL4-3 g2-7		23

10^8 - 10^5

10^1 - 10^3

Abb. 19 Bestimmung der mittleren infektiösen Dosis (TCID₅₀) der V1- und V2-loop Mutanten

U87-CXCR-4 Zellen (2×10^4 Zellen/Kavität) wurden mit Hela-Zellkulturüberständen in fortschreitenden Verdünnungsreihen (1:4) infiziert. Zum Erhalt der 50%igen Endpunkt-Verdünnung wurde die virale Infektiosität an Tag 7 mit einem Standard-p24-Antigen ELISA bestimmt und nach der Methode von *Reed & Muench* berechnet. Die Werte wurden aus 10 Ansätzen gemittelt, die Standardabweichung lag unterhalb von 15%.

4.3.7 Expression von rekombinantem gp160 in HeLa-T4-Zellen

Die funktionelle Expression des HIV-1 *env*-Gens ist die Voraussetzung für die Infektion von Zellen und für die Charakterisierung der verschiedenen V1- und V2-loop-Glycomutanten. In den durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung der Infektiosität (4.3.3) zeigten sich zwischen den deglycosylierten Varianten Unterschiede hinsichtlich der infektiösen Dosis in einer Größenordnung von bis zu zwei Log-Stufen. Es wurde deshalb überprüft, ob die Sequenzveränderungen der N-Glycosylierungsmotive dazu führten, dass gp160 in unterschiedlichem Maß exprimiert wurde. Die rekombinanten *env*-Gene wurden dafür in HeLa-T4-Zellen exprimiert und das gp120 anschließend in einem Immuno-Blot mit anti-gp160 Antikörpern nachgewiesen. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Heiner Schaal (Universität Düsseldorf) durchgeführt. Aufgrund der großen Unterschiede in den infektiösen Titern innerhalb der verschiedenen NL4-3 V1-loop-Glycovarianten wurden exemplarisch die *env*-Gene der Einzelmутanten NL4-3 V1-g2; -g3 und -g4, sowie der Mutanten NL4-3 V1-g2/3/4 und NL4-3 V2-g5/6/7 mit je drei fehlenden Glycanen und der komplett deglycosylierten Variante NL4-3 V1/V2-g2-7 exprimiert. Dazu wurden die jeweiligen *env*-Bereiche über die Schnittstellen *Bst*EII und *Bam*HI aus dem Vektor pUC*env* in den Expressionsvektor pSVATG*rev* übertragen. Dieser Vektor kontrolliert über einen SV40- Promotor die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen. Das exprimierte gp160 konnte in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Zelllysate wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteinbanden nach einer Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die dann mit einer anti-gp160-Antikörperlösung behandelt wurde. Durch einen Meerrettich-Peroxidase gekoppelten gp160-Detektionsantikörper wurde die gp120-Bande sichtbar gemacht. In Abbildung 20 ist der Immuno-Blot zum Nachweis der gp160 Expression der oben aufgeführten Viren dargestellt. Während die Mutanten mit jeweils einem fehlenden N-Glycan im Vergleich zum Wildtyp gleich starke gp120-Banden aufweisen, ist das Signal der gp160-Expression bei den drei- bis sechsfach deglycosylierten Varianten deutlich geringer. Ein Fehlen der N-Glycosylierung innerhalb des V1- und V2-loop scheint somit direkte negative Auswirkungen auf die Menge an gp160 zu haben, die in infizierten Zellen exprimiert wird. Daher wird angenommen, dass die verminderte Replikation und Infektiosität dieser Varianten durch die gestörte Expression des gp160 verursacht wird.

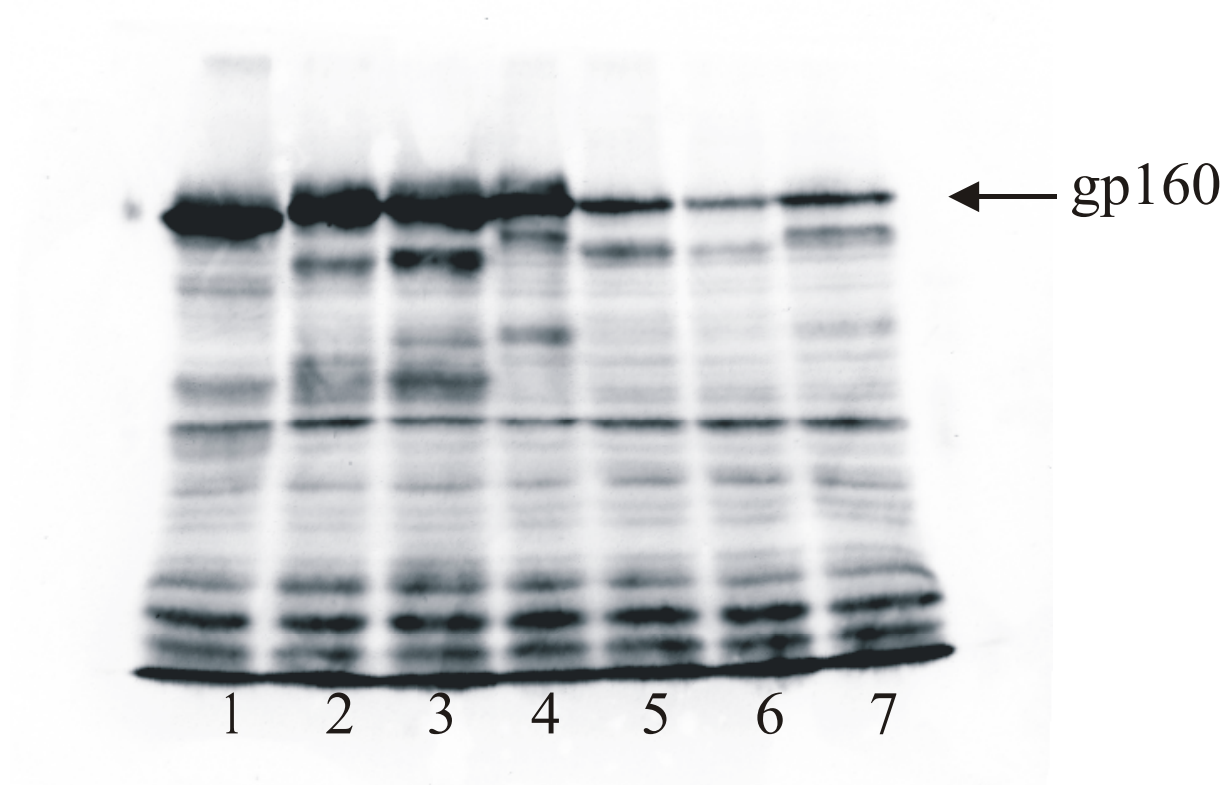


Abb. 20 Immuno Blot zum Nachweis der gp160-Expression von V1- und V2-loop env-Varianten in transfizierten Hela-T4-Zellen

Hela-T4-Zellen wurden mit den gp160 Expressionsvektoren transfiziert, die *env*-Gene von verschiedenen V1- bzw. V2-Glycovarianten enthielten. Nach 2 Tagen wurden die Zellen geerntet und in SDS-Probenpuffer lysiert. Die Detektion des gp160 erfolgte mit einem Kaninchen anti-gp120-Antikörper und einem Chemilumineszenz-Detektionssystem (Amersham). Die transfizierten Zellen exprimierten gp160 der Virusvarianten NL4-3 (Spalte 1), NL4-3-V1-g2 (Spalte 2) NL4-3-V1-g3 (Spalte 3) und NL4-3-V1-g4 (Spalte 4) mit gleicher Intensität. Die zwei- und dreifach deglycosylierten Varianten NL4-3- V1-g2/3/4 (Spalte 5), NL4-3-V2-g5/6/7 (Spalte 6), sowie NL4-3-V1/V2-g2-7 (Spalte7) zeigten deutlich schwächere Banden gp120/gp41-Bereich. Die Experimente wurden zusammen mit Heiner Schaal, Universität Düsseldorf, durchgeführt.

4.3.8 Einfluss der V1- und V2 loop Glycosylierung auf die Neutralisation durch humane HIV-1 positive Seren

Für die weiteren Untersuchungen der Virusvarianten wurden die Teste immer mit gleichen Mengen Virus, bezogen auf die TCID₅₀/ml durchgeführt. Untersucht werden sollte, wie sich das Fehlen bestimmter Zucker auf die Neutralisation durch humane Seren auswirkt. Humane Seren besitzen neutralisierende Antikörper, die gegen gp120 gerichtet sind. Für die nachfolgenden Neutralisationsuntersuchungen wurden ausschließlich die Virusvarianten verwendet, die im Infektiositätstest (4.2.6) Werte $> 10^{-3}$ TCID₅₀/ng p24 erreicht hatten.

In einer Voruntersuchung wurden neben dem NL4-3-Wildtyp die V1-loop- Glycovarianten NL4-3-V1g2, -g3 und g2,3, sowie die V2-loop-Varianten NL4-3-V2g5, -g6, sowie -g5,6 mit normalem humanen Serum (HIV-1 negativ) inkubiert (1:100 in Medium verdünnt). Anschließend wurden U87-CXCR4 Indikatorzellen infiziert. Dem Zellkulturmedium wurde ebenfalls normales humanes Serum (HIV-1 negativ) zugesetzt (1:100), sodass die Serumkonzentration (1:100) im Zellkulturmedium über den Zeitraum von neun Tagen konstant war. Die Messung der Virusvermehrung erfolgte über einen Zeitraum von neun Tagen, wobei alle zwei Tage Überstand zur Messung der p24 Antigenmenge abgenommen wurde. Wie aus der Abb. 21 zu entnehmen ist, verlief die Virusvermehrung, sowohl bei den V1-loop-(A), wie auch V2-loop-Varianten (B) bis Tag 3 gleichmäßig und es wurde eine lineare Zunahme beobachtet, was auf die gleiche infektiöse Dosis der rekombinanten Viren zu Beginn des Experimentes zurückzuführen ist. Ab Tag 3 wurden verschiedene Wachstumskurven beobachtet, die den vorher bestimmten Werten für die unterschiedliche Infektiosität (4.3.5) der Viren entsprach. Die V1-loop-Mutanten NL4-3 V1-g2, g-3 und-g2/3, sowie NL4-3 V2-g5 erreichten nach neun Tagen Virustiter von über 2,5 OD und lagen damit noch über dem Wildtyp mit einer OD von ca.2. Die V2-loop Variante NL4-3-V2-g5/6 hatte eine flachere Wachstumskurve, als NL4-3 V2-g6 mit nur einem fehlenden N-Glycan an der Spitze des V2-loop. Die Viruskultur in normalem humanem Serum beeinflusst daher nicht die vorher in Serumfreiem Medium gemessenen Werte für die Infektiosität der V1- und V2-loop Glycomutanten.

Gleiche infektiöse Mengen rekombinanter V1/V2-loop-Glycovarianten (1000 TCID₅₀/ml) wurden in Gegenwart von HIV-1 Antikörper-positivem Serum auf U87-CXCR4 Zellen verbracht. Wie bei den zuvor durchgeführten Tests wurde über einen Zeitraum von neun Tagen, im Abstand von zwei Tagen, virushaltiger Kulturüberstand entnommen und die Menge des p24-Antigens quantifiziert.

Abbildung 22 zeigt, dass der NL4-3 Wildtyp zu etwa 30% durch das Patientenserum (Verdünnung 1:100) neutralisiert wird. Die sechs V1/V2-loop-Varianten wurden annähernd vollständig inhibiert, wobei sogar eine Abstufung hinsichtlich der Anzahl an fehlenden N-Glycanen vorgenommen werden kann. Die beiden Varianten NL4-3-V1-g2/3, sowie NL4-3-V2-g5/6 werden hierbei besser neutralisiert, als die Glycovarianten mit jeweils einem fehlenden N-Glycan.

Durch den Verlust von N-Glycanen innerhalb des V1-und V2-loops werden die entsprechenden Virusvarianten besser neutralisiert. Ähnlich wie bei der Neutralisation des HIV-1 durch V3-loop spezifische Antikörper werden auch durch die V1/V2-N-Glycane antigene Epitope auf dem gp120 maskiert und die Bindung neutralisierender Antikörper blockiert.

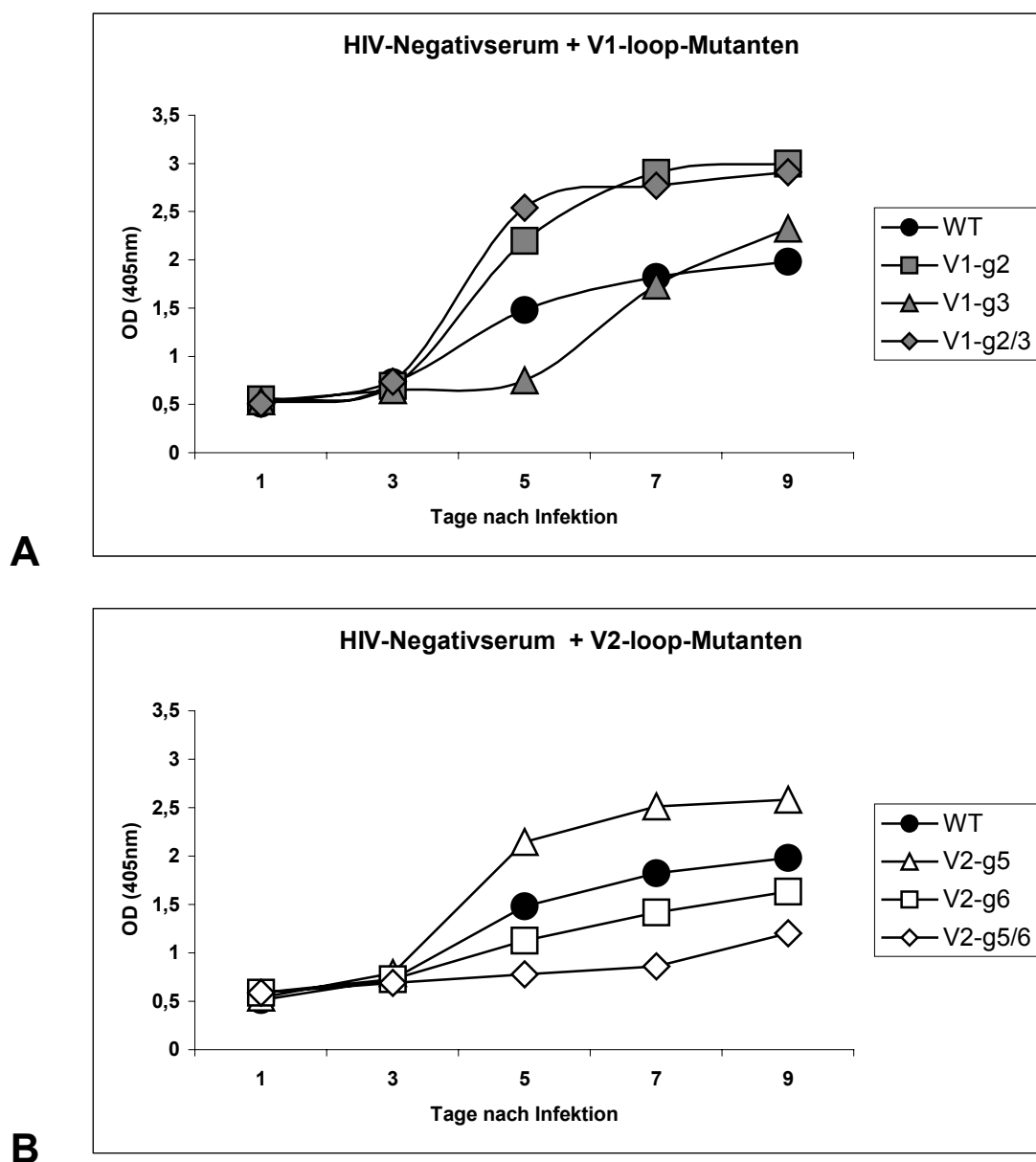


Abb. 21 Replikation der Glycovarianten in Medium mit normalem humanem Serum

U87-CXCR4-Indikatorzellen wurden mit NL4-3-Wildtyp, NL4-3-V1-g2, -g3 und -g2/3, sowie den Varianten NL4-3-V2-g5, -g6 und -g5/6 (1000 TCID₅₀/ml) infiziert. Nach 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen wurde die Virusmenge im Zellkulturüberstand gemessen. Dem Kulturmedium wurde HIV-1 Negativserum zugesetzt (1:100 verd.). Die Werte ergaben sich aus Doppelbestimmungen, wobei die Standardabweichung unter 10% lag.

- (A) Replikation der V1-loop-Glycovarianten in U87-CXCR4-Zellen.
 (B) Replikation der V2-loop-Glycovarianten in U87-CXCR4-Zellen.

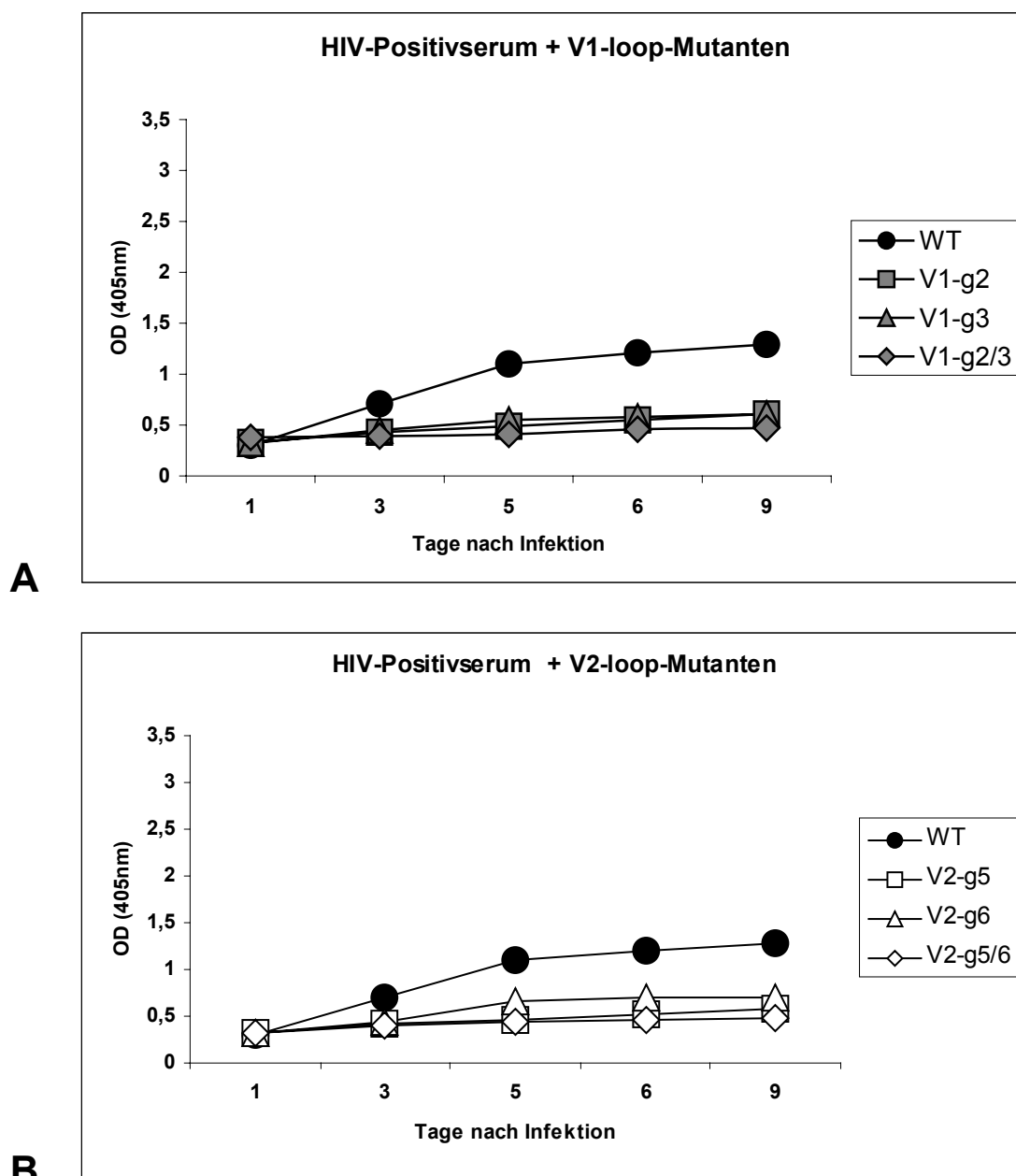


Abb. 22 Neutralisation der V1/V2-loop-Glycovarianten durch HIV-1 positive Seren

U87-CXCR4-Indikatorzellen wurden mit NL4-3-Wildtyp, NL4-3-V1-g2, -g3 und-g2/3, sowie den Varianten NL4-3-V2-g5, -g6 und-g5/6 (1000 TCID₅₀/ml) infiziert. Nach 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen wurde die Virusmenge im Zellkulturüberstand gemessen. Dem Kulturmedium wurde aus Patienten erhaltenes HIV-1 Positivserum zugesetzt (1:100 verd.). Die Werte ergaben sich aus Doppelbestimmungen, wobei die Standardabweichung unter 10% lag.

- (A) Neutralisation der V1-loop-Glycovarianten in U87-CXCR4-Zellen.
 (B) Neutralisation der V2-loop-Glycovarianten in U87-CXCR4-Zellen.

4.3.9 Neutralisation von NL4-3 V1/V2-loop Glycovarianten durch monoklonale Antikörper gegen die V2- und V3-Region

Der V3-loop des HIV-1 gp120 ist die immundominante Neutralisationsdomäne des HIV-1, und monoklonale Antikörper gegen diesen Bereich können effektiv das Virus neutralisieren (KINNEY-THOMAS ET AL., 1988; GORNY ET AL., 1991). Für den V2-loop sind ebenfalls eine Reihe gut charakterisierter Antikörper beschrieben, die eine Neutralisation des HIV-1 bewirken (HO ET AL., 1991; FUNG ET AL., 1992; MOORE ET AL., 1993).

Aufgrund der Beobachtung, dass rekombinante Viren mit fehlenden N-Glycanen im N-terminalen Bereich des V1- und V2-loop deutlich sensibler gegen Neutralisation mit polyklonalem Serum wurden (4.3.8.), sollte als nächstes untersucht werden, welchen Einfluss die Zucker auf die Neutralisation durch monoklonale Antikörper gegen den V2-loop und den V3-loop des gp120 haben.

Aus diesem Grunde wurden U87-CXCR4-Zellen mit dem NL4-3 Wildtyp und den sechs zu testenden Glycovarianten (wie in Abb. 21, 22) (1000 TCID₅₀/ml) infiziert, wobei dem Kulturmedium unterschiedliche Konzentrationen an monoklonalen Antikörpern (0,05-5 µg/ml) zugesetzt wurden. Die verwendeten Antikörper waren spezifisch für konformationelle Epitope innerhalb des V2- und V3-loops. Aufgrund der konformationellen Nähe zwischen V3- und V1/V2-loop (SODROSKI ET AL., 1997) ist es sinnvoll, V1-loop Glycomutanten mit neutralisierenden Antikörpern gegen den V3-loop zu testen. Außerdem waren gegen den V1 loop keine monoklonalen Antikörper, sowohl in unserem Labor, sowie in der AIDS Reagenz Bank verfügbar.

Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die Neutralisation der rekombinanten Viren durch den V2-loop und V3-loop-Antikörper. Das NL4-3-Wildtypvirus zeigte eine konzentrationsabhängige Sensitivität gegen beide Antikörper, wobei der V3-loop-Antikörper bei Konzentrationen unter 0,2 µg/ml stärker neutralisierte. Für die V1-loop-Varianten fällt auf, dass NL4-3-V1-g3 von beiden Antikörpern, wie auch schon vom polyklonalen Patientenserum (4.3.8), vollständig neutralisiert wurde. Die Variante NL4-3-V1-g2/3 hingegen zeigte das entgegengesetzte Bild einer vollständigen Resistenz und erreichte bei allen Antikörperkonzentrationen OD-Werte > OD_{405nm}=2,5, die denen der Replikationskinetik ohne Zusatz von Serum glichen (4.2.8). Die Variante NL4-3-V1-g2 zeigte vollständige Resistenz gegenüber Neutralisation mit dem V3-loop-Antikörper (22A) und eine konzentrationsabhängige Verlaufskurve für Neutralisation durch den V2-loop-Antikörper. Diese Variante war jedoch deutlich weniger

sensitiv als das Wildtyp-Virus.

Die V1-loop-Glycovarianten zeigten hinsichtlich der Neutralisation durch V2- und V3-loop Antikörper eine Tendenz zur verringerten Sensitivität in der Reihenfolge ihrer Glycosylierung $g_{2,3} < g_2 < g_3$. Die zweifach deglycosylierte Variante war somit resistenter gegen eine Neutralisation, als die einfach deglycosylierten Varianten.

Für die untersuchten V2-loop-Glycovarianten ergab sich ein gegensätzliches Bild (Abb. 23B, Abb. 24B). Die zweifach deglycosylierte Variante NL4-3 V2-g5/6 ließ sich in beiden Fällen komplett neutralisieren. Weniger sensitiv war NL4-3-V2-g6, das sich vom antiV3-loop Antikörper gerade im Konzentrationsbereich von 0,1-1 µg/ml um etwa 20% stärker inhibieren ließ, als vom antiV2-loop-Antikörper. NL4-3-V2-g5 zeigte komplette Neutralisation nur bei hohen Antikörperdosen (5µg/ml).

Ein Entfernen von N-Glycanen im V1/V2-loop Bereich erhöht somit nicht notwendigerweise die Sensitivität gegen Neutralisation durch Antikörper, die gegen konformationelle Epitope in unmittelbarer Nähe dieser Bereiche gerichtet sind.

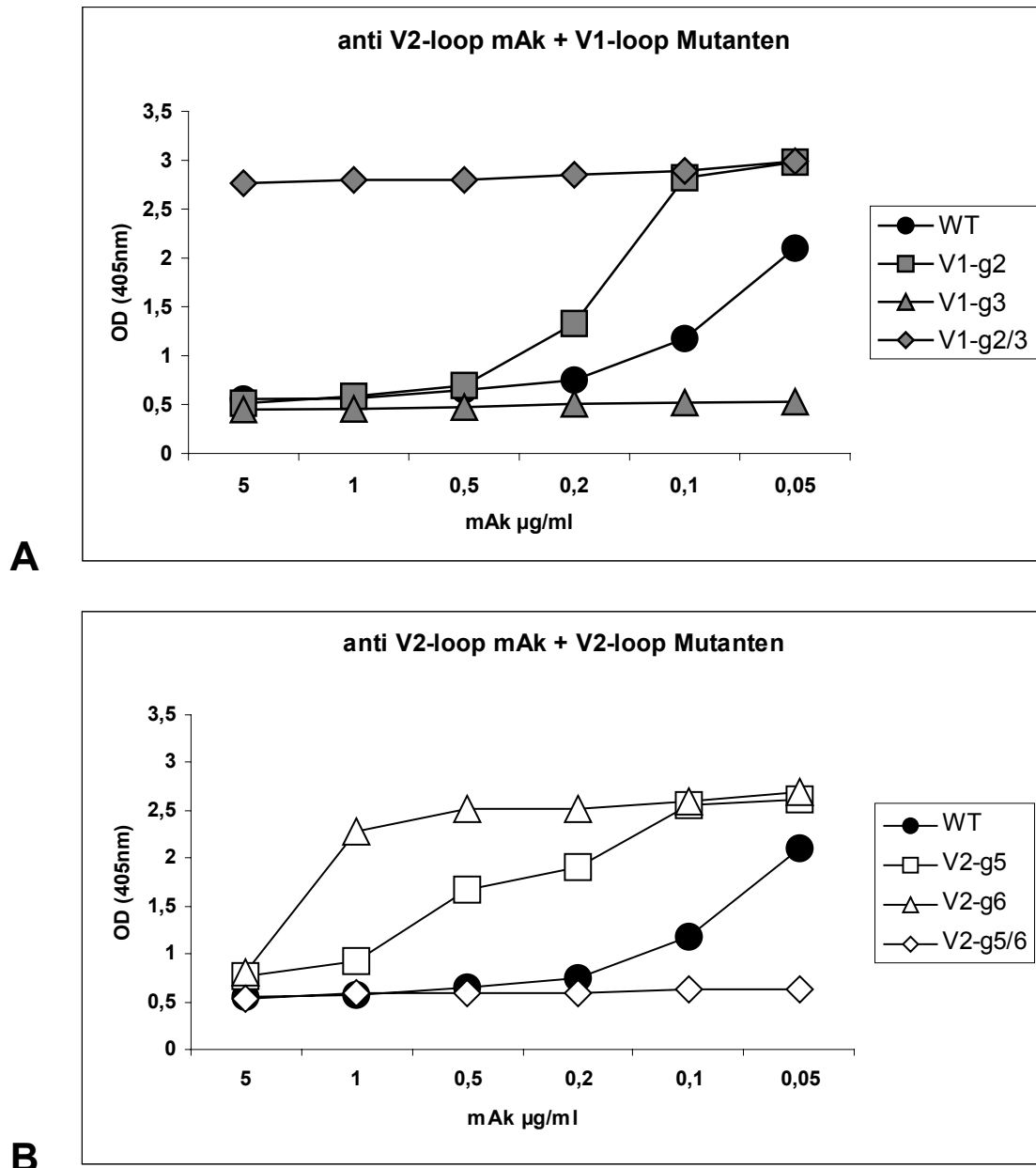


Abb. 23 Neutralisation der V1/V2-loop-Glycovarianten durch monoklonale V2-loop-Antikörper

U87-CXCR4-Indikatorzellen wurden mit NL4-3-Wildtyp, NL4-3-V1-g2, -g3 und -g2/3, sowie den Varianten NL4-3-V2-g5, -g6 und -g5/6 (1000 TCID₅₀/ml) infiziert. Dem Kulturmedium wurden monoklonale Antikörper in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt (0,05–5 $\mu\text{g/ml}$). Nach 7 Tagen wurde die Virusmenge im Zellkulturüberstand gemessen. Die Werte ergaben sich aus Doppelbestimmungen, wobei die Standardabweichung unter 10% lag.

- (A) Neutralisation der V1-loop-Glycovarianten in U87-CXCR4-Zellen.
 (B) Neutralisation der V2-loop-Glycovarianten in U87-CXCR4-Zellen.

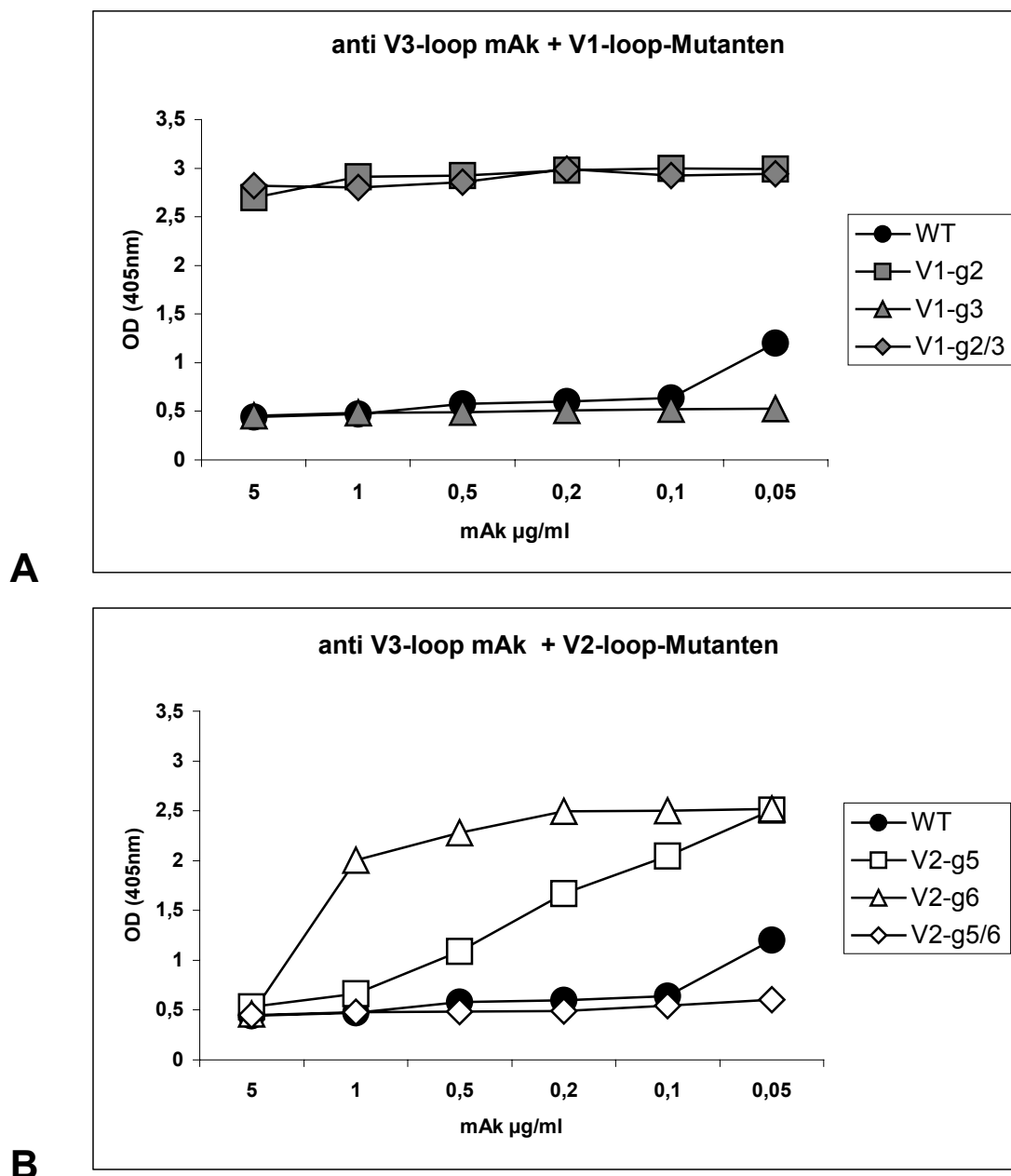


Abb. 24 Neutralisation der V1/V2-loop-Glycovarianten durch monoklonale V3-loop-Antikörper.

U87-CXCR4 -Indikatorzellen wurden mit NL4-3-Wildtyp, NL4-3-V1-g2, -g3 und-g2/3, sowie den Varianten NL4-3-V2-g5, -g6 und-g5/6 (1000 TCID₅₀/ml) infiziert. Dem Kulturmedium wurden monoklonale Antikörper in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt (0,05-5 $\mu\text{g/ml}$) Nach 7 Tagen wurde die Virusmenge im Zellkulturüberstand gemessen.. Die Werte ergaben sich aus Doppelbestimmungen, wobei die Standardabweichung unter 10% lag.

- (A) Neutralisation der V1-loop-Glycovarianten in U87-CXCR4-Zellen.
 (B) Neutralisation der V2-loop-Glycovarianten in U87-CXCR4-Zellen

4.3.10 Neutralisation von NL4-3 V1/V2-loop Glycovarianten durch lösliches CD4

Ein enger Zusammenhang zwischen der Resistenz gegen Neutralisation durch anti-V3-loop-Antikörper und löslichem CD4 war von anderen Arbeitsgruppen gezeigt worden (BACK ET AL., 1994; MCKEATING ET AL., 1991). Es war bekannt, dass der V3-loop in engem Kontakt mit der CD4-Bindestelle steht (MOORE ET AL., 1993) und die Resistenz gegen sCD4 induzierenden Epitope konnten auf dem V3-loop lokalisiert werden (HWANG ET AL., 1992).

Daher wurde untersucht, inwieweit die V1/V2-loop Zucker die Bindung von löslichem CD4 beeinflussen können. Aus diesem Grunde wurden U87-CXCR4-Zellen mit dem NL4-3 Wildtyp und den sechs zu testenden Glycovarianten (1000 TCID₅₀/ml) infiziert, wobei dem Kulturmedium unterschiedliche Konzentrationen an löslichem CD4 (0,05-5µg/ml) zugesetzt wurden. Nach Infektion wurde an Tag 7 der Kulturüberstand abgenommen und die Virusmenge durch den p24-ELISA bestimmt.

Abbildung 25 zeigt die Neutralisation der verschiedenen Glycovarianten durch sCD4. Sowohl für die V1- wie auch die V2-loop-Varianten ergab sich ein ähnliches Bild, wie bei der Neutralisation durch antiV3-Antikörper. Während die Varianten NL4-3-V1-g3 und NL4-3-V2-g5/6 komplett neutralisiert wurden, zeigten NL4-3-V1-g2 und -g2/3 erhöhte Resistenz gegenüber einer Neutralisation, auch bei hohen sCD4-Konzentrationen, bei denen das Wildtyp-Virus komplett neutralisiert wurde. Bei Konzentrationen unterhalb von 0,2 µg/ml waren beide Varianten vollständig resistent gegenüber einer Neutralisation. Das NL4-3-V1-g2/3 konnte selbst mit 0,5µg/ml sCD4 nicht neutralisiert werden.

Auch die V2-loop Mutanten verhielten sich hinsichtlich ihrer Wachstumskurven in ähnlicher Weise wie bei Neutralisation durch antiV3-Antikörper. NL4-3-V2-g5 und -g6 konnten erst durch hohe Gaben von sCD4 neutralisiert werden, wogegen das NL4-3 Virus bereits durch 0,2 µg/ml zu >90% neutralisiert wurde.

Bei Gabe von 5µg/ml sCD4 ließen sich bis auf NL4-3-V1-g,2/3 sämtliche getesteten Glycovarianten hemmen. NL4-3-V1g2/3 war die Variante mit der höchsten gemessenen Infektiosität (4.3.6) und Fusionsaktivität (4.3.3)

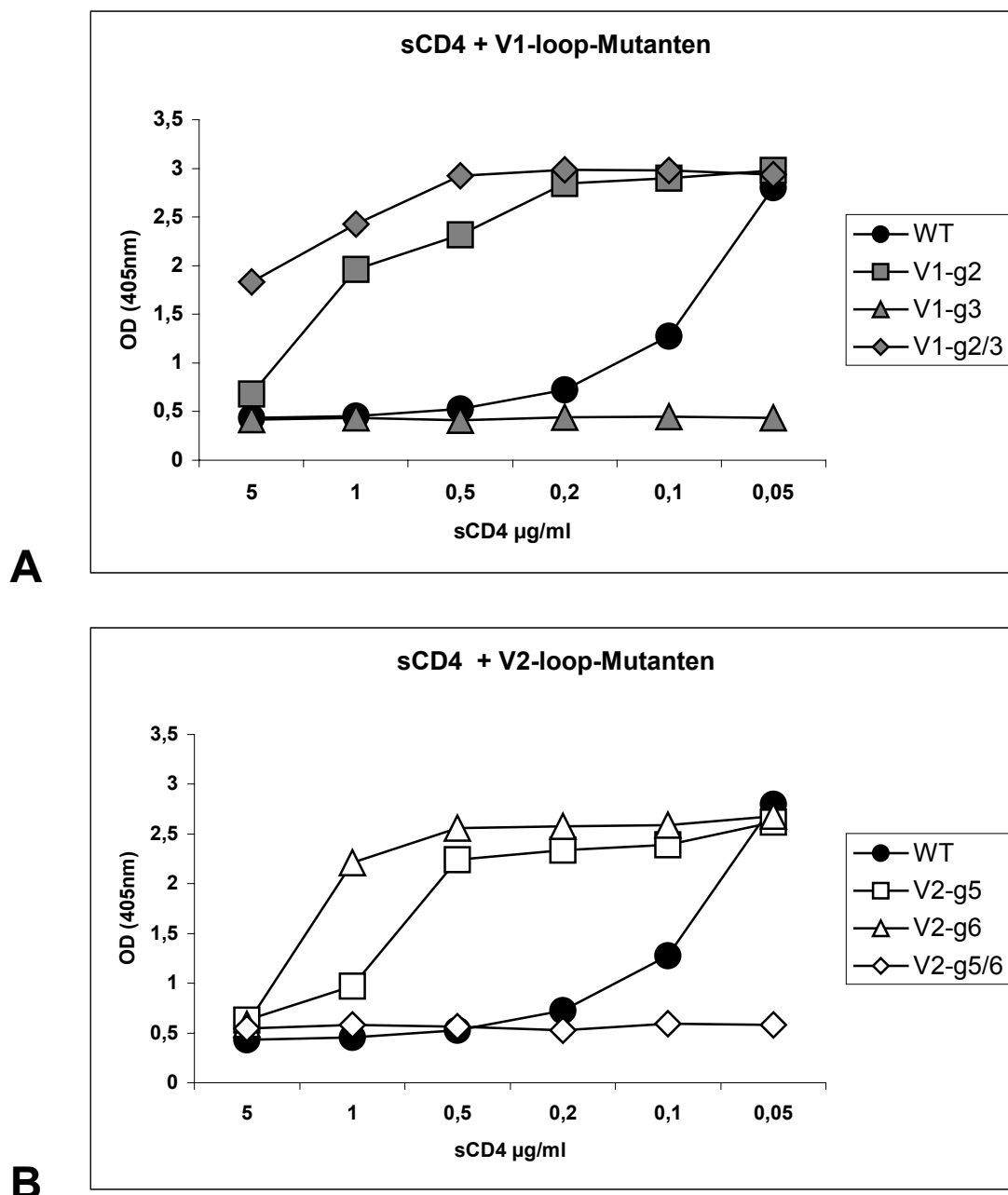


Abb. 25 Neutralisation der V1/V2-loop-Glycovarianten.

U87-CXCR4 -Indikatorzellen wurden mit NL4-3-Wildtyp, NL4-3-V1-g2, -g3 und-g2/3, sowie den Varianten NL4-3-V2-g5, -g6 und-g5/6 (1000 TCID₅₀/ml) infiziert. Nach 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen wurde die Virusmenge im Zellkulturüberstand gemessen. Dem Kulturmedium wurde aus Patienten erhaltenes HIV-1 Positivserum zugesetzt (1:100 verd.). Die Werte ergaben sich aus Doppelbestimmungen, wobei die Standardabweichung unter 10% lag.

- (A) Neutralisation der V1-loop-Glycovarianten in U87-CXCR4-Zellen.
 (B) Neutralisation der V2-loop-Glycovarianten in U87-CXCR4-Zellen.

5 DISKUSSION

5.1 Herstellung von rekombinanten NL4-3 Viren mit Unterschieden in der V1/V2-loop Glycosylierung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die N-Glycosylierung des V1- und V2-loop des HIV-1-Glycoproteins gp120 eine entscheidende Rolle, sowohl für die Replikationseigenschaften, wie auch für die Neutralisation durch Antikörper spielt.

Die Sequenzvariabilität innerhalb der gp120 Aminosäuresequenz lässt sich fünf hypervariablen Regionen, die V1-, V2-, V3-, V4- und V5-loop genannt werden, zuordnen. Die fünf Loops, V1-V5, werden von konservierten Regionen (C1-C5) flankiert (MODROW ET AL., 1987). Das gesamte Protein ist hochgradig glycosyliert und weist etwa 24 potentielle N-Glycosylierungsstellen mit der Konsensussequenz NXT und NXS für eine Addition von N-Glycanen (PINTER ET HONNEN 1988) auf, die auch vollständig genutzt werden (LEONARD ET AL., 1990). Während die Aminosäuresequenzen der V1- und V2-loops eine große Variabilität zeigen, sind die Erkennungssequenzen für eine N-Glycosylierung im V1/V2-Bereich hochgradig konserviert, was besonders für die Aminosäuren in unmittelbarer Nähe zu den Cystein-Resten gilt, über deren Disulfidbrückenbildung die Loops in ihrer strukturellen Form gehalten werden (MYERS ET AL., 1996). Während der V2-loop besonders im Verlauf der Pathogenese der HIV-Erkrankung ein hohes Maß an Längenpolymorphismen aufweisen kann (LAMERS ET AL. 1993; WANG ET AL. 1995), bleibt sein N-Glycosylierungsmuster vollständig erhalten, was impliziert, dass die N-Glycane in diesem Bereich eine wichtige Funktion aufweisen müssen.

Die dreidimensionale Struktur des gp120 konnte durch eine Kristall-Strukturanalyse teilweise aufgeklärt werden (KWONG ET AL., 1998; WYATT ET AL., 1998). Diese Struktur hat Einblicke über die Interaktion des gp120 mit seinem Rezeptor CD4 und den Korezeptoren CXCR4 und CCR5 während des Eintritts in die Wirtszelle ergeben. Es wird vermutet, dass die Bindung des gp120 an CD4 eine konformationelle Änderung bewirkt, die den V1/V2-loop von der äußeren zur inneren Domäne des Proteins bewegt und somit die Korezeptorbindungsstelle exponiert, bzw. freigibt. Nach dieser Theorie besteht diese Korezeptorbindestelle aus Aminosäureresten an der Basis des V1/V2-loop und der CD4-Bindestelle. Der Korezeptor bindet nun an dieses Epitop und die Basis des V3-loop, der die Korezeptorspezifität bestimmt.

Es scheint sehr wahrscheinlich, dass eine funktionelle Interaktion zwischen dem V1/V2-loop Bereich und dem V3-loop beim Eintritt des Virus von herausragender Bedeutung ist.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Bedeutung die N-Glycane im Bereich des V1/V2-loop für die Infektion und die Neutralisation haben. Zu diesem Zweck wurden im genetischen Hintergrund des gut charakterisierten T-Zell-adaptierten HIV-1- Stammes NL4-3 insgesamt 15 rekombinante Virusvarianten erstellt, die Unterschiede im N-Glycosylierungsmuster des V1/V2-Bereiches aufwiesen. Eine in der Literatur häufig verwendete Mutation der N-Glycosylierungsstellen ist der Wechsel von Asparagin (N) nach Glutamin (Q). Auf diese Weise wird die Sequenz des N-Glycosylierungsmotives NX(T/S) in die Sequenz QX(T/S) geändert, sodass eine Glycosylierung an dieser Position nicht mehr erfolgen kann. Die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren bleiben hierbei allerdings weitgehend erhalten. Ein derartiger Aminosäureaustausch, eine Punktmutation, ist eine in der Literatur oft angewandte Methode zur Untersuchung antigener Epitope, zur Charakterisierung von T-Zellepitopen oder für funktionelle Studien, die belegen sollen, ob eine postulierte Region in einem Protein für eine bestimmte Funktion verantwortlich ist.

Nach der Herstellung der *env*-Genkassette für den Austausch des V1- und V2-Bereiches lag für diese Arbeit ein geeigneter pUC18-*env*-Vektor vor, mit dem die insgesamt sechs N-Glycosylierungsstellen g2-g7 gegen die mutierte Sequenz QX(T/S) ausgetauscht werden konnten. Nach Überführung des veränderten *env*-Bereiches in den proviralen Vektor pNL4-3 konnte durch Transfektion von HeLa-Zellen rekombinantes Virus erhalten werden. Die Transfektion der HeLa-Zellen mit den hergestellten Virusvektoren gewährleistet eine zuverlässige Untersuchung der N>Q Punktmutanten. Für die verschiedenen Experimente wurden immer Virusüberstände von frisch transfizierten HeLa-Zellen verwendet. Dadurch wurde ausgeschlossen, dass, durch eine längere Passage der Virusvarianten in der Zellkultur, in den Viren Mutationen entstehen konnten, die die Experimente zusätzlich beeinflusst hätten.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit hergestellten Genkassette wurde ein Set von insgesamt 15 N-Glycosylierungsvarianten erstellt, die entweder einzeln (NL4-3-V1-g2, -g3, -g4, NL4-3-V2-g5, -g6, -g7) oder zweifach deglycosyliert waren (NL4-3-V1-g2/3, -g3/4, -g2/4;

NL4-3-V2-g5/6, -g6/7, -g5/7). Zudem wurden zwei rekombinante Viren erzeugt, die innerhalb der Loops vollständig deglycosyliert waren (NL4-3-V1-g2-4; NL4-3-V2-g5-7). Durch Kombination dieser beiden Varianten wurde die vollständig V1/V2 deglycosylierte Variante NL4-3 V1/V2-g2-7 hergestellt, der alle sechs Zucker fehlten. Alle konstruierten Glycomutanten wurden in Infektionsstudien mit standardisierten GHOST- oder U87-Indikatorzellen charakterisiert. Darüber hinaus wurde die Neutralisierbarkeit der verschiedenen Glycomutanten durch ein HIV-neutralisierendes Serumgemisch, durch definierte monoklonale Antikörper und durch lösliches CD4 untersucht.

5.2 Die N-Glycosylierung des V1/V2-loop beeinflusst die Fusionsaktivität und replikativen Eigenschaften des HIV

Eine wichtige Eigenschaft von X4-tropen HIV-Stämmen und Isolaten ist die nach Infektion *in vitro* zu beobachtende Bildung von mehrkernigen Riesenzellen, den sogenannten Syncytien. Dieser cytopathogene Effekt beruht auf einer Interaktion zwischen auf der Oberfläche von infizierten Zellen exprimiertem gp120 und den Rezeptoren CD4 und CXCR4 auf uninfizierten Zellen. Die Interaktion zwischen gp120 und den viralen Rezeptoren hat eine Membranfusion zur Folge. Offensichtlich sind bei diesem Prozess auch bestimmte Glycolipide und Zuckerstrukturen auf den Oberflächen der nicht-infizierten Zellen beteiligt. Die Fähigkeit, in der Zellkultur die Bildung von Syncytien zu induzieren, unterteilt HIV-Isolate in den SI (*syncytium inducing*)- und NSI (*non syncytium inducing*)-Typ. In der Pathogenese der HIV-Erkrankung beobachtet man mit fortschreitendem Verlauf eine Zunahme von Virustypen, die dem SI-Typ angehören und mit neutralisationsresistenten und stark replizierenden Phänotypen korreliert werden.

Der X4-trope HIV-1 –Stamm pNL4-3, der in dieser Arbeit untersucht wurde, ist als T-Zell-adaptierter Stamm dem SI-Typus zugehörig. Rekombinante NL4-3-Viren mit Veränderungen im N-Glycosylierungsmuster des V1- und V2-loop wurden daraufhin untersucht, ob sich Unterschiede in der Fusionsaktivität und Replikation nachweisen ließen.

Nach Transfektion von HeLa-CXCR4-Zellen zeigte sich für die 15 Virusmutanten ein sehr heterogenes Bild hinsichtlich Ausbeute der erhaltenen Virusmenge und dem Auftreten von

Syncytien. Sowohl für die Mutanten des V1-, wie auch V2-loop, konnte nachgewiesen werden, dass bei Fehlen des C-terminalen N-Glycans (g4, bzw. g7) die Ausbeute an Virus im Vergleich zum Wildtyp um mehr als 90 % sank. Zudem war für diese Mutanten die Fusionsaktivität stark verringert. Der Einfluss der C-terminalen Glycane zeigte hierbei einen kumulativen Effekt. So wiesen die zwei- bis dreifach deglycosylierten Virusmutanten deutlich niedrigere Titer und Syncytienbildungen auf, als die Einzelmutanten. In unmittelbarer Nähe zu den C-terminalen Zuckern beider Loops befindet sich jeweils ein Cystein-Rest, der an der Ausbildung der formgebenden Disulfidbrücke beteiligt ist.

Für Virusmutanten mit fehlenden N-Glycanen am N-Terminus und der Spitze des jeweiligen Loops ergab sich ein entgegengesetztes Bild. Die Varianten NL4-3-V1-g2, -g3 und -g2/3, sowie NL4-3-V2-g5, -g6 und -g5/6 erreichten nach Transfektion hohe Virusmengen und eine Fusionsaktivität, die teilweise noch über der des Wildtyp-Virus lag.

Infektiositätsexperimente mit den 15 V1/V2-Glycovarianten sollten einen Einblick geben, welchen Einfluss die N-Glycane auf die Replikation ausüben. Bei Einsatz gleicher Virusmengen (0,5 ng p24/ml) ließen sich die Virusvarianten in zwei Gruppen unterscheiden, die hinsichtlich ihrer replikativen Eigenschaften Unterschiede um zwei bis drei Log-Stufen aufwiesen. Nach Infektion von Indikatorzelllinien zeigte sich, dass die Mutanten ohne die C-terminalen Zucker g4, bzw. g7, deutlich schlechtere Wachstumskinetiken als der Wildtyp aufwiesen, während die Werte der Mutanten mit fehlendem Zucker am N-Terminus, g2, bzw. g5, und mit fehlendem Zucker an der Spitze des Loops, g3 bzw. g6, sogar noch über den Werten des Wildtyps lagen. Diese Unterschiede in der Virusvermehrung machten es für weitere Experimente erforderlich, die mittlere infektiöse Dosis der verschiedenen Glycovarianten zu ermitteln, um die Untersuchungen mit gleichen infektiösen Mengen der Viren durchführen zu können. Die Ergebnisse dieses Infektivitätsassays bestätigten die zuvor erhaltenen Daten aus der Replikationskinetik. Sämtliche Virusmutanten mit fehlendem Zucker am C-Terminus der Loops (g4 und g7) zeigten infektiöse TCID₅₀-Werte, die mit 20–360 TCID₅₀/ng p24 um eine Log-Stufe unterhalb der restlichen Varianten lagen. Hierbei ließ sich besonders für die V2-loop-Mutanten ein kumulativer Effekt nach Entfernen weiterer N-Glycosylierungssignale beobachten.

Die größte Diskrepanz war bei den V1-loop-Varianten zu beobachten. Während hier Varianten mit fehlender Glycosylierung im vorderen und mittleren Bereich des Loops die höchsten infektiösen TCID-Werte von $1,2 \times 10^4 - 1,9 \times 10^4$ TCID₅₀ /ng p24 aufwiesen und damit noch über den TCID-Werten des Wildtyp-Virus lagen, konnten V1-loop-Mutanten, denen der g4 Zucker fehlte, nicht mehr replizieren. Daher wurden diese Viren für weitere Experimente nicht mehr berücksichtigt.

Für den V1/V2-loop ergab sich, dass die C-terminalen Zucker eine kritische Rolle für die Replikationsfähigkeit der Viren aufwiesen. Ein Fehlen der N-terminalen und mittleren N-Glycane hingegen steigerte die Replikations- und Fusionsaktivitäten beider Loop-Varianten. Eine komplette Deglycosylierung, sowohl des V1-Loops, wie auch beider Loop-Bereiche, erzeugte Viren, die nicht mehr replizieren konnten.

In dieser Arbeit konnte über gp160-Expressionsstudien mit einem Teil der generierten Virusmutanten gezeigt werden, dass das Fehlen von drei oder sogar allen sechs N-Glycanen im V1/V2-Loop die Expression von gp160 stark reduzierte, während das Fehlen einzelner Glycane, zumindest des V1-loop-Bereiches keinen Einfluss auf die gp160-Produktion zu haben schienen. Um hier ein genaueres Bild für die kritische Funktion einzelner Glycane bei der env-Prozessierung zu erhalten, wären weitere Experimente mit den restlichen Varianten, unter Umständen auch in einem anderen Expressionssystem, erforderlich. Es steht zu vermuten, dass die N-Glycane in V1/V2 eine entscheidende Rolle für die Prozessierung und die Spaltung des gp160-Vorläuferproteins in gp120 und gp41 spielen.

Es ist bekannt, dass N-Glycane für die Ausbildung von funktionell gefaltetem und prozessierten gp160- bzw. gp120-Proteinen essentiell sind (LI ET AL. 1993; FENNIE & LASKY 1989). Andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Modifizierung einer vollständigen env-Glycosylierung die virale Infektiosität massiv beeinflussen kann (FISCHER ET AL. 1996; HUE ET AL., 1996, MONTEFIORI ET AL., 1988). So zeigte NG ET AL., 1990, dass deglycosylierte env-Proteine ein gestörtes Virus-Assembly aufwiesen, wobei dieses Phänomen auf einen möglichen Defekt in der Oligomerisierung des gp120 zurückgeführt wurde. Eine Reihe an Veröffentlichungen beschreibt einen Einfluss des V1- und V2-loop von HIV-1 auf Infektiosität und Fusionsaktivität der Viren (ANDEWEG ET AL., 1993; BOYD ET AL., 1993; CAO ET AL., 1997; SHIODA ET AL., 1991; WANG ET AL., 1996).

Die Mutation des C-terminalen N-Glycans des env-V2-loop in HIV-I_{HXB2} resultierte in einem quantitativ nicht nachweisbaren Virus (FOX ET AL., 1997). Dreifach oder individuelle Glycomutanten im HIV-1_{HXB2} V1/V2-loop führten zu gestörter Infektiosität (WANG ET AL., 1996).

QUINONES-KOCHS, 2002, zeigte, wie der Verlust bestimmter V1/V2-loop N-Glycosylierungsstellen im HIV-Primärisolat 89.6 die env-Produktion und env-Funktion beeinflusst. Eine Entfernung von vier bis fünf Zuckern reduzierte die Fusionsaktivität, der Verlust aller sechs N-Glycane unterband sie komplett. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die betreffenden 89.6-gp160-Varianten ineffizient prozessiert, langsam im Golgi-Apparat transportiert und in die Viruspartikel als teilweise unprozessierte Formen eingelagert wurden. Experimente an V1/V2-Glycomutanten des SIVmac239 zeigten, dass verschiedene Kombinationen von dreifachen Glycosylierungs-Mutanten zu replikationsinkompetenten Viren führten (OHGIMOTO ET AL., 1998; REITTER ET AL. 1998).

Im affenpathogenen Virus SIV ist der V1-Bereich der variabelste der hypervariablen Regionen innerhalb des *env*-Gens (ALMOND ET AL. 1993; BURNS ET AL. 1991). Trotzdem sind in diesem Bereich die N-Glycosylierungsstellen hochkonserviert (MYERS ET AL. 1996), insbesondere g4- g6, die bei HIV-1 g2-g4 entsprechen. REITTER ET AL. machten 1998 an SIV die Beobachtung, dass eine SIV-V1-g4-6-Glycomutante eine stark verringerte Produktion des gp120-Äquivalentes aufwies, was mit einem verstärkten Abscheren des Proteins in den Überstand einherging. Vermutlich war bei dieser Mutante die Interaktion mit dem membrangebundenem gp41 gestört.

Die Beobachtung aus dieser Arbeit, dass bestimmte Glycanmutationen in V1/V2 jedoch auch Vorteile für die Virusreplikation bieten können, wird ebenfalls durch neuere Veröffentlichungen untermauert. Im HIV-env89.6/SIV-Hybrid SHIV 89.6 ergab die Viruspassage in Affen ein pathogeneres Virus, dass ein fehlendes V2-g6 –Glycan aufwies, was zu einer verstärkten Fusionsaktivität führte (ETEMAD-MOGHADAM, ET AL. 2000).

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Mutation von Glycosylierungsstellen im V1- und V2-loop die Faltung des Proteins stören oder

konformationelle Änderungen, wichtig für die Membranfusion, blockiert werden. Die N-terminalen und mittleren N-Glycane im V1/V2-Bereich scheinen einen Einfluss auf die Fusionsaktivität und Pathogenität, eventuell über konformationelle Änderungen mit Auswirkungen auf die Zugänglichkeit des HIV-Rezeptors auszuüben.

5.3 Die N-Glycosylierung des V1/V2-loop hat keinen Einfluss auf den Zelltropismus

In dieser Arbeit wurde anhand der Infektion von GHOST-Indikatorzellen mit drei- und sechsfach deglycosylierten V1/V2-loop Mutanten versucht herauszufinden, ob der Verlust der Glycane einen Einfluss auf die Korezeptornutzung und damit den viralen Tropismus haben könnte. Während dem V1/V2-loop bislang keine entscheidende Rolle bei der Korezeptorbindung zugesprochen werden konnte, ist die Funktion von N-Glycanen im Bereich des V3-loop für die Korezeptorinteraktion schon seit längerem bekannt (NAKAYAMA ET AL., 1998). In unserer Arbeitsgruppe konnten POLZER ET AL (2002) zeigen, dass das V3-loop Glycan g15 beispielsweise die Bindung an CCR5 unterstützt und somit zur Ausbildung des R5- und oder R5X4-dualtropen Phänotyp beiträgt, während g15 die Replikation und Bindung an CXCR4 behindert. OGERT ET AL. (2001) zeigten eine mögliche Rolle von Glycanen des V2-loop von HIV-1 Primärisolaten für die Modulation der CXCR4-Nutzung. In dieser Arbeit konnte mit den getesteten drei Glycovarianten keinerlei Unterschied im viralen Phänotyp festgestellt werden, eine Infektion von CCR5-positiven Zellen wurde nicht beobachtet. Die Rolle von N-Glycanen im V2-Bereich scheint eher einen indirekten Effekt auf die Interaktion des V3-loop mit dem Korezeptor zu haben. Ein Entfernen der Glycane an der Basis des V2-loop und C2-Bereichs (Basis des V3 loop) könnte z.B. die nach CD4-Bindung erfolgende konformationelle Änderung, die eine räumliche Verlagerung des V1/V2-Bereiches bewirkt, verändern und somit die Exponierung der Korezeptorbindestelle verhindern (CHEN ET AL., 2001).

5.4 Das Fehlen bestimmter N-Glycane im V1/V2-loop macht das Virus sensitiver gegenüber neutralisierenden Antikörpern

Obwohl bis vor kurzem generell davon ausgegangen wurde, dass Glycane auf SIV- und HIV-env-Glycoproteinen dazu dienen könnten, effektive Antikörperantworten zu limitieren und das Virus gegen Antikörper abzuschirmen, gab es zu Beginn dieser Arbeit nur

wenig Belege für diese Hypothese. PINTER ET AL. lieferten 1998 Hinweise, dass im V1/V2-Bereich von Patientenisolaten immunogene Epitope lagen, die von Antikörpern in humanen Seren erkannt wurden. Dass diese immunogenen Epitope aber durch Glycane maskiert, und dadurch gegen neutralisierende Antikörper geschützt sind, konnte damals allerdings noch nicht gezeigt werden. REITTER ET AL (1998) zeigten im Affenmodell, dass die Abwesenheit von zwei N-Glycosylierungsstellen (g4, g5) im SIV V1-loop die Produktion neutralisierender Antikörper stark ansteigen ließ, was eine positive Implikation auf den Krankheitsverlauf der Tiere bewirkte. Die Arbeiten am SIV-Modell zeigten, dass sich durch das Entfernen der Zucker im SIV V1 loop die Replikation der Viren nicht wesentlich änderte. Die Neutralisation wurde dagegen durch die Zucker signifikant beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das Entfernen spezifischer N-Glycane im V1/V2-Bereich von HIV-1_{NL4-3} die rekombinanten Viren empfänglicher für eine Neutralisation durch HIV-positive Patientenserum machen würde. Für die Neutralisationsassays wurden die Viren ausgewählt, die sich in den vorangegangenen Infektiositätsstudien als replikationseffizient erwiesen hatten. Während die Zugabe des HIV-1 negativen Patientenserums keinen Einfluss auf die Replikation der Virusvarianten zeigte, ließen sich bei einer Serumkonzentration von 1:100 sämtliche getesteten Viren durch Seren von HIV-Patienten komplett inhibieren. Dieses ist insofern bemerkenswert, als die untersuchten Virusvarianten NL4-3-V1-g2, -g3, -g2/3 und NL4-3-V2-g5, -g6, und -g5/6 sich in Replikationsexperimenten als noch infektiöser im Vergleich zum Wildtypvirus herausgestellt hatten. Das Wildtypvirus zeigte eine etwa 30%ige Neutralisation durch das verwendete Serumgemisch.

Es steht zu vermuten, dass der Verlust der N-terminalen und mittleren V1/V2-loop Glycane den entsprechenden Viren, in einem *in vitro*-System ohne den immunogenen Selektionsdruck, Vorteile in Bezug auf die Bindung an Rezeptoren verschafft, dafür aber entscheidende Neutralisationsepitope demaskiert werden.

Man hat beobachtet, dass im Verlaufe der HIV-Pathogenese neutralisationsresistente Virusvarianten entstehen, die mit dem Verlust bestimmter N-Glycosylierungsstellen einhergehen. Interessant ist hierbei, dass alle Glycane, die in diesen Patientenisolaten verloren gehen, zur strukturell kleineren High-Mannose-Klasse gehören (CHENG-MAYER ET AL., 1999),

die eine geringere Abschirmungskapazität aufweisen, als die größeren Komplex-Typ-Zucker, die überwiegend an exponierten Regionen des Proteins, wie dem V1/V2-loop oder auch dem V3 loop (g15) vorzufinden sind (MOORE ET AL. 1994).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass auf dem V1/V2-loop entscheidende immunogene Epitope lokalisiert sind, die von N-Glycanen geschützt werden. Sind die Zucker nicht vorhanden, so ist das Virus sehr leicht durch Antikörper zu neutralisieren.

5.5 Das Fehlen bestimmter N-Glycane im V1/V2-loop macht das Virus resistenter gegen Neutralisation durch monoklonale Antikörper

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Addition oder Entfernung von N-Glycanen im HIV V1- loop die Fähigkeit von monoklonalen Antikörper beeinflussen kann, die entsprechenden Viren zu neutralisieren (BACK ET AL., 1994). Trotz dieser Beobachtungen gab es wenig Hinweise auf die Antigenität des V1-loops.

Einen möglichen konformationellen Zusammenhang zwischen dem V1- und V3-Bereich in der Abschirmung des V3-loops durch den V1-loop lieferte die Arbeitsgruppe von GRAM ET AL., 1994, die an HIV-1_{Bru} zeigten, dass der Verlust eines einzigen N-Glycans in V1 (g3) die Fähigkeit V3-loop-spezifischer Antikörper erhöhen konnte, das Virus zu neutralisieren.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit Änderungen im Glycosylierungsmuster vom V1/V2-Bereich die Neutralisation mit monoklonalen Antikörpern gegen konformationelle Epitope in V2 und V3 beeinflussen könnte, um die Idee einer möglichen Abschirmung des V3-Bereiches durch V1/V2 (WYATT ET AL., 1998) zu untermauern.

Bei der Neutralisation durch antiV2-Antikörper zeigte sich für die V1-loop-Glycomutanten, dass NL4-3-V1-g3 bei sämtlichen verwendeten Antikörperkonzentrationen (0,5-5 µg/ml) komplett neutralisiert wurde. Die Variante NL4-3-V1-g2 hingegen wies bei niedrigen Antikörperkonzentrationen von < 0,5µg/ml eine verringerte Sensitivität von etwa 50% auf, die noch unter der des Wildtyp-Virus lag, während es von Konzentrationen von unter 0,1µg/ml nicht mehr neutralisiert wurde. Die Variante NL4-3-V1-g2/3 zeigte eine komplette Resistenz gegenüber der Neutralisation. Es fällt auf, dass im Gegensatz zur Neutralisation

durch Patientenserum hier die zusätzliche Entfernung eines N-Glycans die Sensitivität gegenüber Neutralisation verringert, statt erhöht.

Die Ergebnisse aus den Neutralisationsassays mit antiV3-loop-Antikörpern stützen diese Beobachtung. Während NL4-3-V1-g3 komplett neutralisiert wurde, zeigen NL4-3-V1-g2 und -g2/3 vollständige Resistenz. Die Beobachtung, dass in beiden Fällen das Fehlen eines N-Glycans (g3), unter Beteiligung eines benachbarten Glycan (g2) vollkommen unterschiedliche Effekte induziert, lässt sich nur in einer signifikanten Änderung der Loop-Konformation durch das Entfernen des zweiten Glycans erklären. Der für die Erhaltung beider Neutralisationsepitope bestimmende Zuckerrest scheint hier g2 zu sein.

Ein Zusammenwirken von V1- und V3-loop bei der Ausbildung konformationeller Epitope für V3-spezifische Antikörper wurde auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet.

LOSMAN ET AL. (2001) zeigten, dass eine HIV-Mutante mit Veränderungen im N-Glycosylierungsmuster des V1 loop 25fach sensibler gegen die Neutralisation durch einen antiV3-Antikörper, als das entsprechende Wildtyp-Virus war. Aufgrund der Erkenntnis, dass der Zugang für V3-loop neutralisierende Antikörper durch die Präsenz des g15 Zuckers verhindert wird (BACK ET AL., 1994), schlugen LOSMAN ET AL. ein Palisadenmodell vor, in dem N-Glycane des V1-loop und der g15 V3 loop Zucker eine konformationelle Barriere gegen V3-loop spezifische Antikörper bilden.

Eine andere Gruppe beobachtete, dass die Maskierung eines immundominanten Epitopes im HXB2 V3-loop den Schwerpunkt der Immunantwort gegen das HXB2 gp120 auf den V1-loop verlagerte (GARRITY ET AL., 1997).

Die Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit mit den V2-loop-Glycovarianten erhalten wurden, deuten zumindest hinsichtlich der jeweils vollständig neutralisierten Variante NL4-3-V2-g5/6 auf eine direkte Maskierung der Neutralisationsepitope durch die entsprechenden Glycane hin. Bei Fehlen von g6 oder g5 alleine ergab sich eine in dieser Reihenfolge zunehmende Resistenz gegenüber beiden Antikörpern, die wesentlich ausgeprägter als die des Wildtyp-Virus war.

Die Beobachtung, dass V2-Glycane an der Abschirmung von V3-loop-Epitopen beteiligt sind, wird ebenfalls von anderen Veröffentlichungen gestützt (KAYMAN ET AL., 1994; LY ET AL., 2000).

5.6 Das Fehlen spezifischer N-Glycane im V1/V2-loop macht das Virus resistenter gegen Neutralisation durch lösliches CD4

Verschiedene Arbeiten hatten eine mögliche Interaktion zwischen dem V1/V2- und V3-loop und der Bindung an CD4 postuliert (FOUCHIER ET AL., 1992; SHIODA ET AL., 1992, SULLIVAN ET AL., 1993). Zudem gab es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Resistenz gegenüber Neutralisation durch antiV3-loop-Antikörper und löslichem CD4 (BACK ET AL., 1994; MCKEATING ET AL., 1991), da der V3-loop in engem Kontakt mit der CD4-Bindestelle zu stehen scheint (MOORE ET AL., 1993).

Um festzustellen, ob das Fehlen bestimmter N-Glycane im V1- und V2-Bereich einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber sCD4 hat, wurden die bereits erwähnten Virusvarianten in einem CD4-Neutralisationsassay untersucht.

Die erhaltenen Daten deckten sich weitgehend mit den Ergebnissen, die für die Neutralisation gegenüber antiV3-Antikörpern erhalten wurden. Während die V1-loop-Variante mit fehlendem g3-Zucker vollständig inhibiert wurde, war die g2-Variante gegenüber sCD4 resistenter als das Wildtyp-Virus. NL4-3-V-g2/3 ließ sich nur von hohen sCD4-Konzentrationen ($> 0,5 \mu\text{g/ml}$) bis zu 50% neutralisieren. Für die V2-loop-Varianten ergab sich eine Abstufung, bei der die zweifach deglycosylierte Variante mit fehlendem g5 und g6 am sensitivsten gegenüber sCD4 war.

Eine mögliche Interpretation dieser Ergebnisse läge in einer vom jeweiligen Glycosylierungsmuster abhängige unterschiedliche Konformation der Loop-Strukturen mit Einfluss auf andere Bereiche im gp120 begründet. Das sCD4 könnte eine veränderte Affinität für diese Konformationen aufweisen. Im Fall der kompletten Neutralisation blockiert das sCD4 offensichtlich die gp120-Interaktion mit dem CD4 auf der Zelloberfläche. Es gibt Hinweise darauf, dass sCD4 in diesem Fall ein Abscheren des gp120 von der Virusoberfläche induziert, was zu einem Verlust der Infektiosität führt (HART ET AL., 1991).

Interessant ist, dass die V1-loop-Varianten NL4-3-V1-g2 und -g2/3 mit der höchsten Infektiosität auch die höchste Resistenz gegenüber sCD4 zeigten. MCKEATING ET AL. entdeckten bereits 1991 HIV-Varianten mit fehlenden N-Glycanen im V3-loop, die erhöhte

Resistenz gegenüber sCD4 zeigten und trotzdem eine erhöhte Infektiosität aufgrund erhöhter Fusionsaktivität aufwiesen.

Da weder der V1/V2-loop noch der V3-loop an der direkten Bindung von CD4 beteiligt sind, muss eine, durch die Deglycosylierung veränderte env-Konformation, an diesem Phänomen beteiligt sein. Die gegenüber sCD4 resistenten Virusvarianten könnten nach Bindung von sCD4 in ihrer env-Konformation so verändert werden, dass die Fusionsdomäne des gp41 auf eine Weise exponiert wird, die eine Infektion verstärkt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden fünfzehn Varianten des X4-tropen HIV-1-Stammes NL4-3 hergestellt, deren N-Glycosylierung im V1- und V2-loop verändert war. Im V1/V2-Bereich befinden sich insgesamt sechs potentielle N-Glycosylierungsstellen. Die Glycomutanten wurden durch die Veränderung der Aminosäuresequenz der N-Glycosylierungsstelle NX (T/S) erzeugt, wobei N gegen Q ausgetauscht wurde. Für die Herstellung der verschiedenen Glycomutanten wurde als erster Schritt ein Klonierungsvektor hergestellt, eine *env*-Genkassette, mit Schnittstellen für *Afl*III, *Pst*I und *Bcl*I. Die Schnittstellen flankieren den V1- und V2-Bereich und ermöglichten so einen Austausch der V1- und V2-Sequenzen gegen chemisch synthetisierte DNA-Fragmente, die die entsprechenden Mutationen trugen. Mit dieser Klonierungsstrategie war es möglich, gezielt *env*-Mutanten herzustellen und anschließend das *env*-Gen in den retroviralen Vektor pNL4-3 zu überführen. Durch Transfektion der konstruierten pNL4-3-Vektoren in HeLa-Zellen wurden entsprechende Virusüberstände produziert. Die Viren wurden hinsichtlich ihrer Infektiosität und auf eine Neutralisation durch humane Patientenseren, monoklonale Antikörper und CD4 untersucht.

Es zeigte sich, dass die C-terminalen N-Glycane g4 und g7 im V1 und V2-loop eine wichtige Funktion für die Replikationsfähigkeit aufwiesen. Viren mit fehlender Glycosylierung an g4/g7 waren kaum noch replikationskompetent und zeigten bei zusätzlich fehlenden Glycanen eine verringerte Fusionsaktivität und gp160-Produktion. Die N-terminalen und mittleren Glycane des V1/V2-loops zeigen einen entgegengesetzten Effekt. Virusvarianten, die an diesen Positionen nicht glycosyliert waren, zeigten eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Infektiosität. Offensichtlich sind diese Glycane g2, g3, g5 und g6 an der Maskierung von Epitopen, die von neutralisierenden Antikörpern erkannt werden, beteiligt.

Für den V1-loop konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des g3 Zuckers das Virus sensitiv gegen anti-V2 und anti-V3-Antikörper, sowie sCD4 macht. Fehlt g2 verringert sich die Sensitivität, während das Fehlen beider N-Glycane zu einem resistenten Virus führt. Dieses Virus weist gleichzeitig die höchste Infektiosität aller getesteten Virusmutanten auf. Für den V2-loop konnte der genau entgegengesetzte Effekt beobachtet werden. Varianten ohne g5 und g6 ließen sich von den monoklonalen Antikörpern und von löslichem CD4 vollständig neutralisieren, während das Fehlen des g6 und g5 Zuckers das Virus, im Vergleich zum Wildtyp, noch resistenter gegen neutralisierende Antikörper und CD4 machte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M. A. Martin.** 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59**:284-291.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-8
- Andeweg, A. C., P. Leeflang, A. D. Osterhaus, and M. L. Bosch.** 1993. Both the V2 and V3 regions of the human immunodeficiency virus type 1 surface glycoprotein functionally interact with other envelope regions in syncytium formation. *J. Virol.* **67**:3232-3239.
- Back NK, Smit L, De Jong JJ, Keulen W, Schutten M, Goudsmit J, Tersmette M.** 1994. An N-glycan within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop affects virus neutralization. *Virology* **199**:431-8
- Balter, M.** 1999. AIDS now world's fourth biggest killer. *Science* **284**:1101.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
- Berger, E. A.** 1998. HIV entry and tropism. When one receptor is not enough. *Adv. Exp. Med. Biol.* **452**:151-157.
- Berson, J. F., D. Long, B. J. Doranz, J. Rucker, F. R. Jirik, and R. W. Doms.** 1996. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol.* **70**:6288-6295.
- 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.

- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*;2:95-113
- Botarelli, P., B. A. Houlden, N. L. Haigwood, C. Servis, D. Montagna, and S. Abrignani.** 1991. N-glycosylation of HIV-gp120 may constrain recognition by T lymphocytes. *J. Immunol.* **147**:3128-3132
- Boyd, M. T., G. R. Simpson, A. J. Cann, M. A. Johnson, and R. A. Weiss.** 1993. A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J. Virol.* **67**:3649-3652.
- Brennan, R. O. and D. T. Durack.** 1981. Gay compromise syndrome. *Lancet* **2**:1338-1339.
- Burns, D. P., C. Collignon, and R. C. Desrosiers.** 1993. Simian immunodeficiency virus mutants resistant to serum neutralization arise during persistent infection of rhesus monkeys. *J. Virol.* **67**:4104-4113.
- Cao, J., N. Sullivan, E. Desjardin, C. Parolin, J. Robinson, R. Wyatt, and J. Sodroski.** 1997. Replication and neutralization of human immunodeficiency virus type 1 lacking the V1 and V2 variable loops of the gp120 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **71**:9808-9812.
- Cecilia, D., V. N. KewalRamani, J. O'Leary, B. Volsky, P. Nyambi, S. Burda, S. Xu, D. R. Littman, and S. Zolla-Pazner.** 1998. Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates in the context of coreceptor usage. *J. Virol.* **72**:6988-6996.
- Chen, M., C. Shi, V. Kalia, S. B. Tencza, R. C. Montelaro, and P. Gupta.** 2001. HIV gp120 V(1)/V(2) and C(2)-V(3) domains glycoprotein compatibility is required for viral replication. *Virus Res.* **79**:91-101.
- Cheng-Mayer, C., J. Homsy, L. A. Evans, and J. A. Levy.** 1988. Identification of human immunodeficiency virus subtypes with distinct patterns of sensitivity to serum neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**:2815-2819.
- Cheng-Mayer, C., M. Quiroga, J. W. Tung, D. Dina, and J. A. Levy.** 1990. Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 T-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity, and CD4 antigen modulation. *J. Virol.* **64**:4390-4398.

- Cheng-Mayer, C., A. Brown, J. Harouse, P. A. Luciw, and A. J. Mayer.** 1999. Selection for neutralization resistance of the simian/human immunodeficiency virus SHIVSF33A variant in vivo by virtue of sequence changes in the extracellular envelope glycoprotein that modify N-linked glycosylation. *J. Virol.* **73**:5294-5300.
- 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
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P.** 1996. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* **2**:1244-7
- Coffin, J. M.** 1996. HIV viral dynamics. *AIDS* **10 Suppl 3**:S75-S84.
- Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD.** 1993. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **67**:1772-7
- Connor RI, Ho DD.** 1994. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virol* **68**:4400-8
- Dagleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-767.
- 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
- Etemad-Moghadam, B., Y. Sun, E. K. Nicholson, M. Fernandes, K. Liou, R. Gomila, J. Lee, and J. Sodroski.** 2000. Envelope glycoprotein determinants of increased fusogenicity in a pathogenic simian-human immunodeficiency virus (SHIV-KB9) passaged in vivo. *J. Virol.* **74**:4433-4440.

- Farzan, M., H. Choe, E. Desjardins, Y. Sun, J. Kuhn, J. Cao, D. Archambault, P. Kolchinsky, M. Koch, R. Wyatt, and J. Sodroski.** 1998. Stabilization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers by disulfide bonds introduced into the gp41 glycoprotein ectodomain. *J. Virol.* **72**:7620-7625.
- Feizi, T. and M. Larkin.** 1990. AIDS and glycosylation. *Glycobiology* **1**:17-23.
- 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.
- Fennie, C. and L. A. Lasky.** 1989. Model for intracellular folding of the human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* **63**:639-646.
- Fenouillet, E., B. Clerget-Raslain, J. C. Gluckman, D. Guetard, L. Montagnier, and E. Bahraoui.** 1989. Role of N-linked glycans in the interaction between the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its CD4 cellular receptor. Structural enzymatic analysis. *J. Exp. Med.* **169**:807-822.
- Fenouillet, E., J. C. Gluckman, and E. Bahraoui.** 1990. Role of N-linked glycans of envelope glycoproteins in infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **64**:2841-2848.
- Fenouillet, E. and J. C. Gluckman.** 1991. Effect of a glucosidase inhibitor on the bioactivity and immunoreactivity of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **72 (Pt 8)**:1919-1926.
- Fenyo, E. M., J. Albert, and B. Asjo.** 1989. Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV. *AIDS* **3 Suppl 1**:S5-12.
- Fischer, P. B., G. B. Karlsson, T. D. Butters, R. A. Dwek, and F. M. Platt.** 1996. N-butyldeoxynojirimycin-mediated inhibition of human immunodeficiency virus entry correlates with changes in antibody recognition of the V1/V2 region of gp120. *J. Virol.* **70**:7143-7152.
- Fouchier, R. A., M. Groenink, N. A. Kootstra, M. Tersmette, H. G. Huisman, F. Miedema, and H. Schuitemaker.** 1992. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J. Virol.* **66**:3183-3187

- Freed, E. O., E. L. Delwart, G. L. Buchschacher, Jr., and A. T. Panganiban.** 1992. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:70-74
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and .** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**:500-503.
- Garrity, R. R., G. Rimmelzwaan, A. Minassian, W. P. Tsai, G. Lin, J. J. de Jong, J. Goudsmit, and P. L. Nara.** 1997. Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope. *J. Immunol.* **159**:279-289.
- Gavel, Y. and G. von Heijne.** 1990. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* **3**:433-442.
- Geyer H, Holschbach C, Hunsmann G, Schneider J.** 1988. Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. *J Biol Chem* **263**:11760-11767.
- Gorny, M. K., A. Pinter, and S. Zolla-Pazner.** 1989. Specific immunity to HIV and other retroviral infections. *Prog. AIDS Pathol.* **1**:181-199
- Gram, G. J., A. Hemming, A. Bolmstedt, B. Jansson, S. Olofsson, L. Akerblom, J. O. Nielsen, and J. E. Hansen.** 1994. Identification of an N-linked glycan in the V1-loop of HIV-1 gp120 influencing neutralization by anti-V3 antibodies and soluble CD4. *Arch. Virol.* **139**:253-261.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Hansen, J. E., C. M. Nielsen, C. Nielsen, P. Heegaard, L. R. Mathiesen, and J. O. Nielsen.** 1989. Correlation between carbohydrate structures on the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 and HIV-2 and syncytium inhibition with lectins. *AIDS* **3**:635-641

- Hart, T. K., R. Kirsh, H. Ellens, R. W. Sweet, D. M. Lambert, S. R. Petteway, Jr., J. Leary, and P. J. Bugelski.** 1991. Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**:2189-2193.
- Higuchi, R., B. Krummel, and R. K. Saiki.** 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**:7351-7367.
- Ho, D. D., J. A. McKeating, X. L. Li, T. Moudgil, E. S. Daar, N. C. Sun, and J. E. Robinson.** 1991. Conformational epitope on gp120 important in CD4 binding and human immunodeficiency virus type 1 neutralization identified by a human monoclonal antibody. *J. Virol.* **65**:489-493
- Hwang, S. S., T. J. Boyle, H. K. Lyerly, and B. R. Cullen.** 1992. Identification of envelope V3 loop as the major determinant of CD4 neutralization sensitivity of HIV-1. *Science* **257**:535-537
- Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
- Javaherian K, Langlois AJ, McDanal C, Ross KL, Eckler LI, Jellis CL, Profy AT, Rusche JR, Bolognesi DP, Putney SD, et al.** 1989. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:6768-72
- Kayman, S. C., Z. Wu, K. Revesz, H. Chen, R. Kopelman, and A. Pinter.** 1994. Presentation of native epitopes in the V1/V2 and V3 regions of human immunodeficiency virus type 1 gp120 by fusion glycoproteins containing isolated gp120 domains. *J. Virol.* **68**:400-410
- Klatzmann, D., F. Barre-Sinoussi, M. T. Nugeyre, C. Danquet, E. Vilmer, C. Griscelli, F. Brun-Veziret, C. Rouzioux, J. C. Gluckman, J. C. Chermann, and .** 1984. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science* **225**:59-63.
- Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier .** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-768.

- 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.
- Lamers, S. L., J. W. Sleasman, J. X. She, K. A. Barrie, S. M. Pomeroy, D. J. Barrett, and M. M. Goodenow.** 1993. Independent variation and positive selection in env V1 and V2 domains within maternal-infant strains of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J. Virol.* **67**:3951-3960.
- Landt, O., H. P. Grunert, and U. Hahn.** 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* **96**:125-128.
- Lasky, L. A., J. E. Groopman, C. W. Fennie, P. M. Benz, D. J. Capon, D. J. Dowbenko, G. R. Nakamura, W. M. Nunes, M. E. Renz, and P. W. Berman.** 1986. Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein. *Science* **233**:209-212.
- Lee WR, Syu WJ, Du B, Matsuda M, Tan S, Wolf A, Essex M, Lee TH.** 1992. Nonrandom distribution of gp120 N-linked glycosylation sites important for infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:2213-2217.
- 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.
- Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, and L. S. Oshiro.** 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**:840-842.
- Li Y, Luo L, Rasool N, Kang CY.** 1993. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J Virol* **67**:584-8
- Linsley, P. S., J. A. Ledbetter, E. Kinney-Thomas, and S. L. Hu.** 1988. Effects of anti-gp120 monoclonal antibodies on CD4 receptor binding by the env protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **62**:3695-3702

- Losman, B., A. Bolmstedt, K. Schonning, A. Bjorndal, C. Westin, E. M. Fenyo, and S. Olofsson.** 2001. Protection of neutralization epitopes in the V3 loop of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 by N-linked oligosaccharides in the V1 region. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**:1067-1076.
- Ly A, Stamatatos L,** 2000. V2 Loop Glycosylation of the human immunodeficiency virus type 1 SF162 envelope facilitates interaction of this protein with CD4 and CCR5 Receptors and protects the virus from neutralization by anti-V3 loop and anti-CD4 binding site antibodies. *J Virol* **74**: 6769-74
- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-348.
- McKeating, J., P. Balfe, P. Clapham, and R. A. Weiss.** 1991. Recombinant CD4-selected human immunodeficiency virus type 1 variants with reduced gp120 affinity for CD4 and increased cell fusion capacity. *J. Virol.* **65**:4777-4785.
- McKeating, J. A., C. Shotton, J. Cordell, S. Graham, P. Balfe, N. Sullivan, M. Charles, M. Page, A. Bolmstedt, S. Olofsson, and .** 1993. Characterization of neutralizing monoclonal antibodies to linear and conformation-dependent epitopes within the first and second variable domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* **67**:4932-4944
- Mizuochi, T., M. W. Spellman, M. Larkin, J. Solomon, L. J. Basa, and T. Feizi.** 1988. Carbohydrate structures of the human-immunodeficiency-virus (HIV) recombinant envelope glycoprotein gp120 produced in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem. J.* **254**:599-603.
- Modrow, S., 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., M. Moulard, S. Ugolini, P. J. Klasse, J. Hoxie, A. Amara, T. Delaunay, R. Wyatt, J. Sodroski, and Q. J. Sattentau.** 1998. Interactions among HIV gp120, CD4, and CXCR4: dependence on CD4 expression level, gp120 viral origin, conservation of the gp120. *Virology* **248**:394-405

- Montefiori, D. C., W. E. Robinson, Jr., and W. M. Mitchell.** 1988. Role of protein N-glycosylation in pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**:9248-9252.
- Moore, J. P., H. Yoshiyama, D. D. Ho, J. E. Robinson, and J. Sodroski.** 1993. Antigenic variation in gp120s from molecular clones of HIV-1 LAI. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**:1185-1193.
- Moore, J. P., Y. Cao, D. D. Ho, and R. A. Koup.** 1994. Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**:5142-5155
- Moore, J. P. and J. Sodroski.** 1996. Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *J. Virol.* **70**:1863-1872.
- Myers, G. and R. Lenroot.** 1992. HIV glycosylation: what does it portend? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:1459-1460
- 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.
- Ng, D. T., S. W. Hiebert, and R. A. Lamb.** 1990. Different roles of individual N-linked oligosaccharide chains in folding, assembly, and transport of the simian virus 5 hemagglutinin-neuraminidase. *Mol. Cell Biol.* **10**:1989-2001.
- Ohgimoto, S., T. Shioda, K. Mori, E. E. Nakayama, H. Hu, and Y. Nagai.** 1998. Location-specific, unequal contribution of the N glycans in simian immunodeficiency virus gp120 to viral infectivity and removal of multiple glycans without disturbing infectivity. *J. Virol.* **72**:8365-8370.
- Ogert RA, Lee MK, Ross W, Buckler-White A, Martin MA, Cho MW.** 2001. N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J Virol* **75**:5998-6006

- Pinter, A., W. J. Honnen, S. C. Kayman, O. Trochev, and Z. Wu.** 1998. Potent neutralization of primary HIV-1 isolates by antibodies directed against epitopes present in the V1/V2 domain of HIV-1 gp120. *Vaccine* **16**:1803-1811.
- Pinter, A., W. J. Honnen, S. C. Kayman, O. Trochev, and Z. Wu.** 1998. Potent neutralization of primary HIV-1 isolates by antibodies directed against epitopes present in the V1/V2 domain of HIV-1 gp120. *Vaccine* **16**:1803-1811.
- 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
- Profy, A. T., P. A. Salinas, L. I. Eckler, N. M. Dunlop, P. L. Nara, and S. D. Putney.** 1990. Epitopes recognized by the neutralizing antibodies of an HIV-1-infected individual. *J. Immunol.* **144**:4641-4647.
- Quinones-Kochs, M. I., L. Buonocore, and J. K. Rose.** 2002. Role of N-linked glycans in a human immunodeficiency virus envelope glycoprotein: effects on protein function and the neutralizing antibody response. *J. Virol.* **76**:4199-4211.
- Rabehi, L., N. Seddiki, A. Benjouad, J. C. Gluckman, and L. Gattegno.** 1998. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein V3 loop with CCR5 and CD4 at the membrane of human primary macrophages. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**:1605-1615.
- Reitter, J. N., R. E. Means, and R. C. Desrosiers.** 1998. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat. Med.* **4**:679-684.
- Reitter, J. N. and R. C. Desrosiers.** 1998. Identification of replication-competent strains of simian immunodeficiency virus lacking multiple attachment sites for N-linked carbohydrates in variable regions 1 and 2 of the surface envelope protein. *J. Virol.* **72**:5399-5407.
- Rudd, P. M., M. R. Wormald, R. L. Stanfield, M. Huang, N. Mattsson, J. A. Speir, J. A. DiGennaro, J. S. Fetrow, R. A. Dwek, and I. A. Wilson.** 1999. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J. Mol. Biol.* **293**:351-366.

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-91
- Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, Hattori T, Uchiyama T.** 1998. T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J Virol* **72**:9763-70
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* **24**:104-108
- Sattentau, Q. J., J. P. Moore, F. Vignaux, F. Traincard, and P. Poignard.** 1993. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J. Virol.* **67**:7383-7393.
- 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.
- 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.
- Shioda, T., J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer.** 1991. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* **349**:167-169.
- Shioda, T., J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer.** 1992. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:9434-9438
- Starcich, B. R., B. H. Hahn, G. M. Shaw, P. D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E. S. Parks, W. P. Parks, S. F. Josephs, R. C. Gallo, and .** 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**:637-648.

- Stein, B. S. and E. G. Engleman.** 1991. Mechanism of HIV-1 entry into CD4+ T cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **300**:71-86.
- Sullivan, N., M. Thali, C. Furman, D. D. Ho, and J. Sodroski.** 1993. Effect of amino acid changes in the V1/V2 region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein on subunit association, syncytium formation, and recognition by a neutralizing antibody. *J. Virol.* **67**:3674-3679
- Tersmette, M., I. N. Winkel, M. Groenink, R. A. Gruters, R. P. Spence, E. Saman, G. G. Van Der, F. Miedema, and J. G. Huisman.** 1989. Detection and subtyping of HIV-1 isolates with a panel of characterized monoclonal antibodies to HIV p24gag. *Virology* **171**:149-155.
- UNAIDS/WHO.** 2001. AIDS epidemic update December 2001. UNAIDS/01.74EWHO /CDS/CSR/NCS/2001.2 ISBN 92-9173-132-3
- Vödrös D, Tscherning-Casper C, Navea L, Schols D, deClerq E and Fenyö M.** 2001. Quantitative Evaluation of HIV-1 Coreceptor Use in the GHOST(3) Cell Assay. *Virology* **291**:1-11
- Wang, N., T. Zhu, and D. D. Ho .** 1995. Sequence diversity of V1 and V2 domains of gp120 from human immunodeficiency virus type 1: lack of correlation with viral phenotype. *J. Virol.* **69**:2708-2715.
- Wang, W. K., M. Essex, and T. H. Lee.** 1996. Single amino acid substitution in constant region 1 or 4 of gp120 causes the phenotype of a human immunodeficiency virus type 1 variant with mutations in hypervariable regions 1 and 2 to revert. *J. Virol.* **70**:607-611.
- Warrier, S. V., A. Pinter, W. J. Honnen, M. Girard, E. Muchmore, and S. A. Tilley.** 1994. A novel, glycan-dependent epitope in the V2 domain of human immunodeficiency virus type 1 gp120 is recognized by a highly potent, neutralizing chimpanzee monoclonal antibody. *J. Virol.* **68**:4636-4642.
- Weiss, R. A.** 1988. Receptor molecule blocks HIV. *Nature* **331**:15.
- Weiss, R. A., P. R. Clapham, M. O. McClure, J. A. McKeating, A. McKnight, A. G. Dalgleish, Q. J. Sattentau, and J. N. Weber.** 1988. Human immunodeficiency viruses: neutralization and receptors. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **1**:536-541.
- Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**:426-430.

- Wu, Z., S. C. Kayman, W. Honnen, K. Revesz, H. Chen, S. Vih-Warrier, S. A. Tilley, J. McKeating, C. Shotton, and A. Pinter.** 1995. Characterization of neutralization epitopes in the V2 region of human immunodeficiency virus type 1 gp120: role of glycosylation in the correct folding of the V1/V2 domain. *J. Virol.* **69**:2271-2278.
- Wyatt, R., P. D. Kwong, E. Desjardins, R. W. Sweet, J. Robinson, W. A. Hendrickson, and J. G. Sodroski.** 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**:705-711.

8 ANHANG

8.1 Abkürzungen

μ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
Ca.	circa
C	Cytosin
C1-C5	konstante Regionen 1-5 des gp120
cDNA	revers transkribierte DNA
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DMSA	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“

engl.	englisch
Env, env	engl. envelope; Hüllprotein, Gen für das Hüllprotein
ffu	engl. <i>foci forming untis</i> ‘
FKS	Fötales Kälberserum
G	Gramm
G	Guanin
gp	Glycoprotein
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IN	Integrase
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	milli
M	Molar
MA	Matrix
min	Minute
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
M-trope	Makrophagen-trope
n	nano
NC	Nucleocapsid
NSI	nicht synzytium induzierend
NT	Neutralisationstest
p	pico
p24	Kapsid Protein

PBMC	mononukleäre Zellen des periphären Blutes
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	engl. <i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PND	Prinzipielle Neutralisations Domäne
Pol, <i>pol</i>	Polymeraseproteine PR, RT, IN, Gen der Polymeraseproteine
Pos.	Position
PR	Protease
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
SI	synzytium-induzierend
sog.	sogenannt
T	Thymin
Tat, <i>tat</i>	engl. <i>transactivator of transcription</i> , Gen des Tat-Proteins
TCID₅₀	engl. <i>50%-Tissue Culture Infectious Dose</i>
TM	Transmembranglycoprotein
Tris	Tis(hydroxymethyl)aminomethan
T-trope	T-zell-trope
U	engl. <i>Unit</i> , Einheit
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
upm	Umdrehungen pro Minute
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 Aminosäuren

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

8.3 Veröffentlichungen

T. Wolk, S. Polzer, H. Schmitz und M. Schreiber. (2001). ‚Einfluss der Glycosylierung der gp120 V1/V2-Region auf die Infektiosität und Neutralisation des Humanen-Immunodefizienz-Virus-Typ-1 (HIV-1).‘, GfV-Jahrestagung in Dresden im März 2001.
(Posterbeitrag)

T. Wolk, S. Polzer and M. Schreiber. (2001). ‚Role of V1- and V2-loop carbohydrates for HIV-1 infectivity and neutralization.‘ HIV-Pathogenesis, Keystone, Colorado, im April 2001.
(Posterbeitrag)

T. Wolk, Schmitz H. and Schreiber, M. (2002). V1- and V2-loop based carbohydrates of the HIV gp120 envelope are important for viral replication and play an important role in blocking neutralizing antibodies.‘ GfV-Jahrestagung in Erlangen im April 2002.
(Posterbeitrag)

Hellwage J, Jokiranta TS, Friese MA, Wolk TU, Kampen E, Zipfel PF, Meri S. 2002.
Complement C3b/C3d and cell surface polyanions are recognized by overlapping binding sites on the most carboxyl-terminal domain of complement factor H.
J Immunol;**169**(12):6935-44

8.4 Danksagungen

Herrn Dr. Michael Schreiber danke ich für die Überlassung des Arbeitsthemas, das Vertrauen in meine Leistungsfähigkeit und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion. Mein Dank gilt ihm auch dafür, mir die Teilnahme an zahlreichen, interessanten Kongressen ermöglicht zu haben.

Herrn Professor Schmitz danke ich für die Überlassung meines Arbeitsplatzes und seine Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Professor Heinz danke ich für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten für diese Arbeit erstellt zu haben.

Herrn Professor Meyer danke ich für die Einrichtung und Organisation des Graduiertenkollegs „Glycokonjugate“, das mir über drei Jahre hinweg meine Doktorandenstelle und etliche Kongressreisen finanziert hat und mir Einblicke in die bizarre Welt der Kohlenhydrate schenkte.

Herrn Dr. Heiner Schaal danke ich für die unkomplizierte und freundliche Zusammenarbeit bei den gp160-Expressionsstudien meiner Virusmutanten.

Herrn PD Dr. Matthias Dittmar danke ich sehr herzlich für die Einführung in die Viruszellkultur und seine Bereitschaft, bei meiner Prüfung als Fragesteller zu fungieren.

Herrn Professor Kräusslich danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Meinen aktuellen und ehemaligen Arbeitskollegen Svenja Polzer, Ingo Thordsen, Marcus Vossmann, Heiko Hauser, Martin Kirst, Sibylle Resemann, Sonja Ziegelmeier, Harm Müller, und Finn Zedler, sowie der gesamten virologischen Abteilung danke ich für das entspannte Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft.

Dem Team vom Kochsalon in der Bernhard-Nocht-Strasse danke ich für das grossartige Catering.

Meinem verstorbenen Grossvater danke ich für die noch zu Lebzeiten bereitgestellte Finanzspritze.

Suzi, no words can describe how much i would like to thank u for love and affection, support and understanding and for the patience to wait... It's done !!!

8.5 Lebenslauf

Name: Tobias Wolk

Geboren am 10.07.1971 in Hamburg

schulischer Werdegang / Bildungsweg

1977-1990 Sommer 1990	Schulausbildung Abschluß mit Hochschulreife
1992- 1993 Grundstudium der Biologie	Freie Universität, Berlin
1993- 1997 Grund- und Hauptstudium der Biologie 1997	Universität Hamburg Diplomprüfungen im Hauptfach Zoologie und den Nebenfächern Genetik und Biochemie
12/ 97-08/ 98	Diplomarbeit im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Abt. Molekulare Medizin, Thema "Funktionale Charakterisierung der Heparinbindenden Domäne von FHR-3"
01/ 99-10/ 02	Promotion am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in der Abteilung Virologie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. H. Schmitz zum Thema: "Bedeutung von N-Glycanen im V1- und V2-Bereich des HIV-1 Hüllproteins gp120 für die Infektiosität und Neutralisierbarkeit von HIV-1"