

**Einfluss von Argininen und Lysinen innerhalb des gp120
V3-loop von R5X4-dualtropen HIV-1- Mutanten
auf den Tropismus des Virus**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von Dr. med. Birco Schwalbe

Hamburg, 2015

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2004 bis März 2009 in der Laborgruppe Schreiber, Abteilung für Virologie, am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin der Freien und Hansestadt Hamburg angefertigt.

Gutachter der Dissertation:

Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach

Dr. Michael Schreiber

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Morphologie des Humanen Immunodefizienz Virus Typ-1	1
1.2	Der Viruseintritt in die Zelle	5
1.2.1	Die Anlagerung des Virus an die Wirtszelle	5
1.2.2	Die Bindung des viralen gp120 an den CD4-Rezeptor	6
1.2.3	Die Bindung des viralen gp120 an zelluläre Korezeptoren und die darauf anschließende Fusion von Virus- und Wirtszellmembran	8
1.3	Aufbau und Funktion des viralen Hüllproteinkomplexes	12
1.3.1	Das Transmembranprotein gp41	12
1.3.2	Das Oberflächenprotein gp120	13
1.4	Die Rolle des gp120-V3-Loop für die Korezeptornutzung	15
1.5	Die Bedeutung der gp120 N-Glykane für die HIV-1-Infektion	19
1.6	Freies gp120 und seine Auswirkungen auf die HIV-1-Infektion	22
1.7	Ziele der Arbeit	24
2	Methoden	
2.1	Molekularbiologische Methoden	25
2.1.1	Verwendete Bakterienstämme	25
2.1.2	Ausplattieren von Bakterien	25
2.1.3	Kompetente Bakterien	25
2.1.4	Transformation von Bakterien	26
2.1.5	Einfrieren von Bakterien	26
2.1.6	Extraktion von Plasmid-DNA	26
2.1.7	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	27
2.1.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	28
2.1.9	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen	28
2.1.10	Dephosphorylierung von DNA	29

2.1.11	Kinasierung von DNA-Fragmenten	29
2.1.12	Ligation von DNA	29
2.1.13	Klonierung in den pNL Δ env Vektor	29
2.1.14	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.1.15	<i>Nested</i> -PCR	30
2.1.16	<i>Touchdown</i> -PCR	31
2.1.17	Single overlap extension-PCR	31
2.1.18	<i>Site directed</i> -Mutagenese	31
2.1.19	DNA-Sequenzierung	32
2.1.20	Synthetische Oligonukleotide	32
2.2	Elektrophorese	33
2.2.1	Elektrophorese von DNA-Molekülen in Agarosegelen	33
2.2.2	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.2.4	<i>Coomassie</i> -Färbung von Polyacrylamidgelen	34
2.3	Zellkultur & Proteinbiochemische Methoden	34
2.3.1	Verwendete Zellen	34
2.3.2	Kultivierung von Zellen	35
2.3.3	Trypsinieren von adhärennten Zellen	35
2.3.4	Lagerung von Zellen	35
2.3.5	Bestimmung der Zellzahl in einer Zellkultur	36
2.3.6	Transfektion von Zellen	36
2.3.7	Lyse von Zellen	37
2.3.8	Immunpräzipitation von gp120	37
2.3.9	Dot-Blot zur Quantifizierung von gp120	38
2.4	Virologische Methoden	39
2.4.1	Anzucht von Viren	39
2.4.2	Replikationskinetik	39
2.4.3	p24-Antigen Nachweis mittels ELISA	40

2.4.4	<i>Single Round</i> -Infektion	41
2.4.5	Virustitration und Bestimmung der TCID ₅₀ nach Reed & Muench	41
2.4.6	Synzytientest	43
2.4.7	Kompetitionsanalysen und Inhibitionsanalysen	44
2.4.8	β-Galaktosidase-Reportergen-Nachweis	44
2.4.9	Der GFP-Reportergen-Nachweis	45
2.4.10	Detektion HIV-1 infizierter Zellen durch Immunfärbung	45
3	Material	
3.1	Chemikalien und Enzyme	47
3.2	Antikörper	49
3.3	Verwendete Puffer und Medien	50
3.4	Geräte	51
3.5	Aminosäuren	53
3.6	Abkürzungen	54
3.7	Oligonukleotide	57
4	Ergebnisse	
4.1	Herstellung der rekombinanten Virusvarianten	61
4.1.1	Beschreibung der HIV-Varianten des NL-952 Virus	61
4.1.2	Herstellung von NL-952-Mutanten mit Arginin und Lysin Austauschen an den Positionen 304-306 des gp120 V3-Loop	63
4.2	Infektiosität der NL-952.1-, NL-952.2- und NL-952.3-Virusmutanten	65
4.2.1	Infektion von CD, CXCR4 und CCR5 exprimierenden TZM-bl- Zellen mit RRR > KKK V3-Loop-Varianten	65
4.2.2	Infektion von CD, CXCR4 und CCR5 exprimierenden TZM-bl- Zellen mit NL-952-Virusvarianten welche die Aminosäuren N, Q, S und T an den Positionen 304-306 des gp120-V3-Loop besitzen	67

4.2.3	Infektion von Ghost-X4- und Ghost-R5-Zellen mit NL-952-Virusmutanten	71
4.2.4	Infektion von X4- und R5-U87-Zellen mit Mutanten des NL-952 Virus	75
4.3	Bestimmung der Infektiosität der NL-952-Virusmutanten	79
4.4	Virus Neutralisationsexperimente	81
4.4.1	Neutralisation von NL-952-Virusmutanten durch den CXCR4-Liganden SDF-1 α	81
4.4.2	Neutralisation von NL-952-Virusmutanten durch den CCR5- Liganden RANTES	84
4.4.3	Neutralisation von NL-952-Virusmutanten mit HOCl-modifiziertem humanem Serumalbumin (mHSA)	87
4.5.	Infektionsexperimente mit NL-952-Virusmutanten in Anwesenheit von autologen und heterologen rekombinantem gp120	90
4.5.1	Freies rekombinantes gp120 _{KKK} hat keinen Einfluss auf die Infektiosität von NL-952 _{RRR}	90
4.5.2	Steigerung der Infektiosität von NL-952-Viren mit K-Austauschen durch freies gp120 mit R-Austauschen	92
4.5.3	Neutralisation von X4-tropen NL-952.2 _{KKK} ; -3 _{KKK} Virusmutanten durch X4-tropes freies gp120 952.2 _{RRR} ; -3 _{RRR} auf Polybrene vorbehandelten TZM-bl- Zellen	94
4.5.4	Verdrängung von NL-952.1 _{KKK} durch freies gp120 952.1 _{RRR} auf Ghost-X4-Indikatorzellen	97
4.6	Auswirkungen der N-Glykosylierungsstelle g15 auf den Tropismus der X4-tropen Glykovariante NL-930	99
4.6.1	Auswirkungen der N-Glykane g13-g17 auf die Infektiosität von NL-930-Glykovarianten	101
4.6.2	Spezifische Infektiosität der NL-930-Glykovarianten	103

4.6.3	Die Neutralisation von NL-930-Glykovarianten durch mHSA ist abhängig von der N-Glykosylierung des V3-Loop	105
5	Diskussion	
5.1	Aminosäure Austausch an den Positionen 304-306 innerhalb des V3-Loop und ihre Auswirkungen auf Infektiosität, Tropismus und Neutralisierbarkeit des NL-952 Virus	107
5.1.1	Untersuchung des Aminosäure Austausches an der V3-Loop Position 304	114
5.1.2	Untersuchung des Aminosäure Austausches an der V3-Loop Position 305	114
5.1.3	Untersuchung des Aminosäure Austausches an der V3-Loop Position 306	115
5.2	Auswirkungen der V3-Loop-Glykosylierung des HIV-1 auf die Infektiosität und die Neutralisierbarkeit am Beispiel des X4-monotropen NL-930	121
5.3	Freies gp120 und seine Wirkung auf die Infektiosität des NL-952	123
6	Zusammenfassung	129
7	Literatur	131
8	Veröffentlichungen	153
9	Danksagung	155
10	Anhang	157
	Gefahrstoffverzeichnis	

1 Einleitung

1.1 Morphologie des Humanen Immundefizienz Virus Typ-1

Das Humane-Immundefizienz-Virus-Typ-1 (HIV-1) gehört zur Familie der Lentiviren und wird in vier Hauptgruppen eingeteilt:

M ("major")

N ("non-M, non-O")

O ("Outlier")

P ("pending the identification of further human cases")

Am häufigsten kommt bei HIV-1 die Hauptgruppe M vor. Diese kann phylogenetischen in eine Reihe von Subtypen (A-D, F-H, J und K) untergliedert werden. Weltweit am häufigsten ist hierbei der Subtyp C, dieser ist in Afrika, Indien und Asien am weitesten verbreitet. Bei HIV-Infizierten in Europa und Nordamerika kommt dagegen am häufigsten Subtyp B vor (Abb. 1).

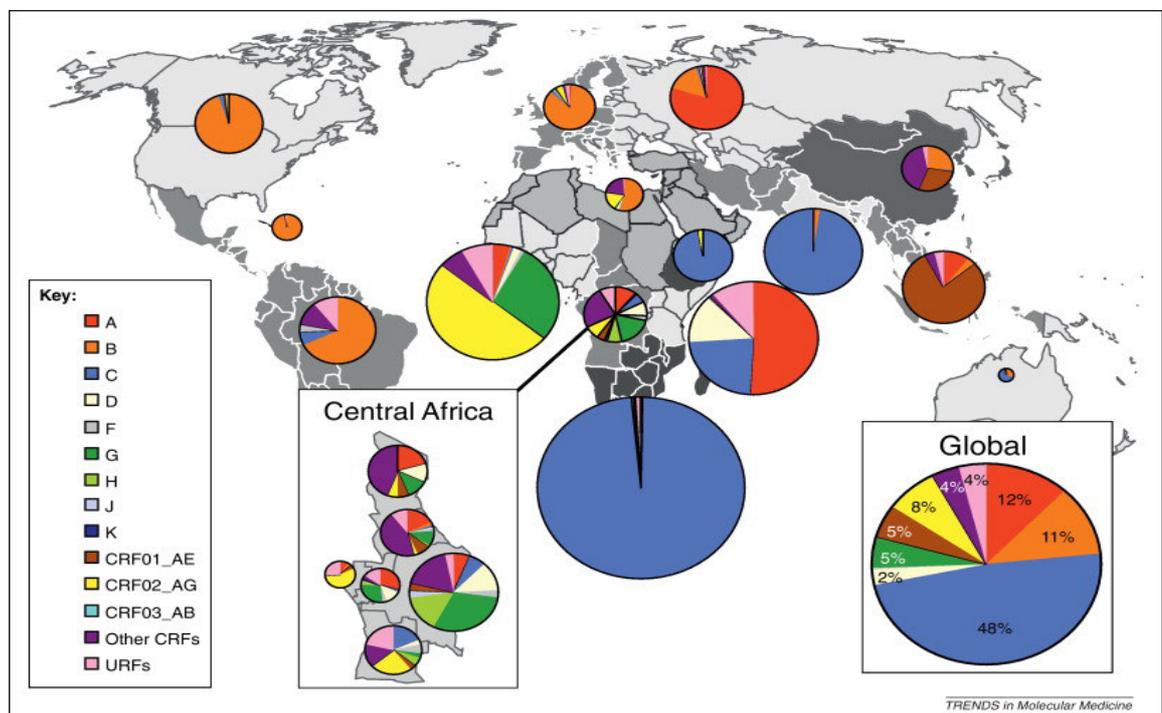


Abb. 1 Weltweite Verteilung der HIV-1-Subtypen

Die Angaben in der Abbildung beziehen sich auf die Jahre 2004-2007 und zeigen die weltweite Verteilung der HIV-1-Subtypen zwischen 2004-2007 [Bildquelle: The origin and diversity of the HIV-1 pandemic 2012].

Das HIV-1 ist ein sphärisches, Viruspartikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm. Im Inneren befindet sich das Virusgenom. Es besteht aus zwei identischen Molekülen einer jeweils einzelsträngigen RNA. An jeden der beiden RNA-Stränge sind eine Primer-tRNA, die retrovirale Protease (PR), die Reverse-Transkriptase (ReT), die Integrase (IN) und das kleine phosphorylierte, basische Nukleokapsidprotein (NC, p7) gebunden. Das Genom des HIV-1 lässt sich in drei Gen-Abschnitte unterteilen. Der erste Abschnitt, das *gag*-Gen (*gruppenspezifisches Antigen*) kodiert für die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine. Der zweite Abschnitt, das *pol*-Gen kodiert für die Enzyme Protease, Reverse-Transkriptase (mit RNase H) und Integrase. Der dritte Abschnitt, das *env*-Gen kodiert für die viralen Hüllproteine gp41 und gp120.

Die beiden RNA-Genome werden von einer konischen Nukleokapsidhülle, welche von dem hydrophoben Kapsidprotein p24 gebildet wird eingeschlossen (Abb. 2 / S. 4). Die isometrische Struktur des Virions wird durch das Matrixproteine p17 hervorgerufen. Es ist mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden und bildet dort eine netzartige Struktur aus. Über die am aminoterminalen Ende kovalent gebundenen Myristinsäurereste ist das p17-Protein mit der Hüllmembran verbunden [1]. Die Hüllmembran des Virus ist mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle identisch [2, 3]. In der Hüllmembran sind die heterotrimeren Komplexe aus den beiden viralen Glykoproteinen eingebettet, die viralen *spikes*. Sie bestehen aus dem viralen Transmembran-Protein gp41 und dem externen Glykoprotein gp120. Das externe gp120 ist über nichtkovalente Bindungen mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil von gp41 mit der Virusoberfläche verbunden. Der gesamte Glykoproteinkomplex wird über eine hydrophobe, 20 Aminosäure lange, Transmembrandomäne des gp41, in Form von Heterotrimeren in der Membranhülle verankert (Abb. 2 / S. 4).

Zusätzlich zu den beschriebenen Bestandteilen besitzt das HIV-1 noch sechs weitere, die sogenannten akzessorischen Proteine: Rev; Tat; Nef; Vif; Vpr und Vpu. Die Proteine Rev und Tat regulieren die Bildung viraler Transkripte und Strukturproteine, indem sie im Zellkern der infizierten Zelle akkumulieren und an spezifische Sequenzen der proviralen DNA bzw. RNA binden. Während Tat (*transactivator of transcription*) die Menge an kompletten viralen Transkripten (virale RNA und mRNA für Gag, Gag-Pol und Env) erhöht, reguliert Rev (*regulator of viral expression*) die Expression von HIV-Proteinen. Dieses geschieht zum einen indem Rev an das *rev-response-element* (RRE) einer Sequenz

im *env*-Gen bindet und so den Transport von nicht geschnittener oder einfach geschnittener mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma ermöglicht. Ohne Rev ist ein Transport des vollständigen Genoms in das Cytosol nicht möglich. Das früh im Replikationszyklus produzierte Nef-Protein reguliert in den infizierten CD4 T-Zellen die Expression von CD4-Molekülen sowie in *antigen presenting cells* (APC) die Expression von *Major-Histocompatibility-Complex-Klasse-I und II-Antigen* (MHC-1) herunter [4, 5]. Das vif-Protein (*viral infectivity factor*) verhindert den Abbau viraler RNA durch die Wirtszelle, indem es an APOBEC3 (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3*) bindet. Dieses Protein ist zusammen mit den Proteinen Tetherin und TRIM5 α (*Tripartite motif-containing protein 5*) ein wichtiger Bestandteil der angeborenen antiviralen Abwehr [5]. Das APOBAC3G wird von der Wirtszelle gezielt in retrovirale Virionen verpackt und trägt über Desaminierung von dC-Resten zu dU-Resten im retroviralen Genom, zu dessen Destabilisierung bei [6, 7]. Das Vpr-Protein (*viral protein r*) ist am Transport des Präintegrationskomplexes zum Nukleus beteiligt. Das Vpu-Protein (*viral protein u*) verhindert die Komplexbildung des neu synthetisierten gp160 mit dem CD4-Protein im Bereich des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates, so daß CD4 degradiert und seine Oberflächenexpression verhindert wird [8]. Zusätzlich ist das Vpu-Protein für den effizienten Transport der Virionen aus der Zelle verantwortlich [9, 10]. Es bindet allerdings auch das in Wirtszellen vorhandene antivirale Protein Tetherin (CD317). Dieses ist ein Vertreter der *cluster of differentiation* Proteine und spielt eine wichtige Rolle beim Schutz menschlicher Zellen vor einer Virusinfektion. Tetherin verhindert die Freisetzung von Retroviren und anderer behüllter Viren indem es die Virusnachkommen an der Wirtszellmembran festklebt und somit deren *budding* und anschließende Diffusion in das extrazelluläre Milieu blockiert [7,11,12]. Durch die Bindung eines Vpu-Proteins an Tetherin wird dieses inaktiviert. Vor allem die Hautgruppe M des HIV-1 besitzt die Fähigkeit, humanes Tetherin durch Bindung an ihr Vpu-Protein auszuschalten, ohne dabei die zweite wichtige Funktion des Vpu-Proteins, den Abbau des CD4-Rezeptors einzubüßen [13, 14].

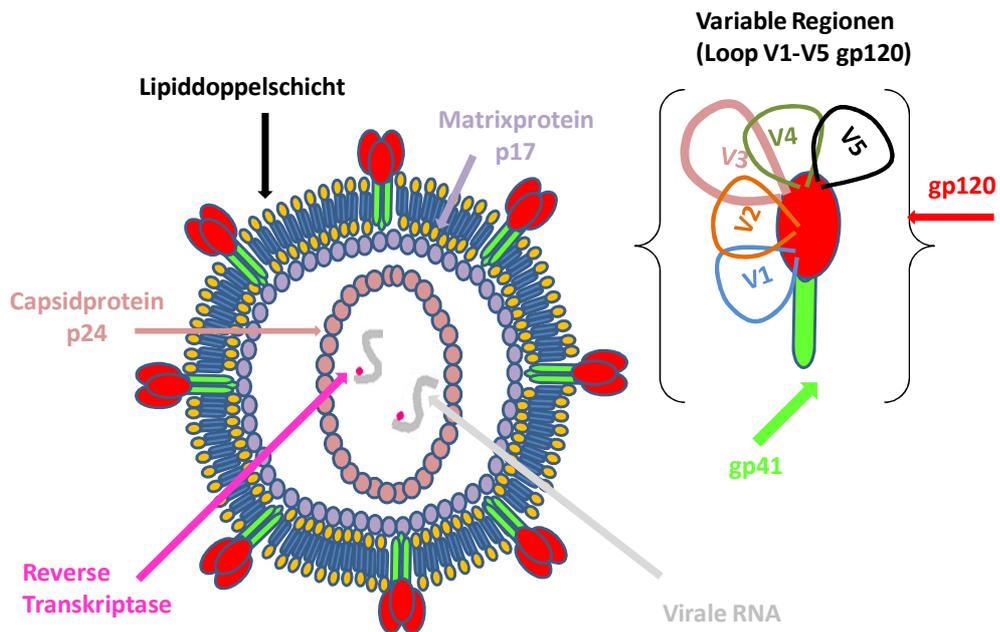


Abb. 2 Aufbau des HIV-1

Die virale RNA ist ca. 9,2kb lang und es liegen zwei identische Kopien als Einzelstränge in Plusstrangorientierung vor. An der RNA ist die Reverse-Transkriptase, welche die Umschreibung von RNA in DNA katalysiert, gebunden. Das Kapsidprotein p24 [●] bildet aus ca. 3000 Einzeleinheiten das Nukleokapsid, welches das virale Genom sowie die zentralen Proteine (Reverse Transkriptase, Integrase, Protease) schützt. Das Matrixprotein p17 [●] umschließt das Nukleokapsid und legt sich der Virushülle von innen an. Es dient vor allem der Verankerung des gp41/gp120 Proteinkomplexes [| gp41 und ● gp120] in der Hüllmembran. Die Lipiddoppelschicht, welche die Virushülle darstellt, stammt ursprünglich von der Wirtszelle und wird bei der Knospung des Virus übernommen. Vergrößert dargestellt ist eine gp41/gp120-Einheit. Drei dieser Einheiten bilden einen *viralen Spike*. Dieser heterodimere Glykoprotein-Komplex ist maßgeblich an der HIV-1 Infektion beteiligt. Insbesondere das gp120 spielt hier durch seine Bindung an CD4 eine initiale Rolle.

1.2 Der Viruseintritt in die Zelle

1.2.1 Die Anlagerung des Virus an die Wirtszelle

Für die Infektion der Wirtszelle sind bestimmte Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen, CD4⁺-Zellen, CD8⁺-Zellen und NKT-Zellen zwingend erforderlich. Die Art und Weise wie diese Rezeptoren durch die verschiedensten HIV-1-Typen benutzt werden, bestimmt den Tropismus des jeweiligen HIV-1-Typs. Der primäre virale Rezeptor ist das CD4-Protein (*cluster of differentiation 4*) auf der Oberfläche von T-Lymphozyten (Abb. 3 / S. 7). Im weiteren Verlauf der Infektion benötigt das Virus zusätzlich zum CD4-Protein noch weitere Korezeptoren. Diese sind Chemokinrezeptoren aus der Familie der 7-Transmembranproteine. Die beiden am häufigsten verwendeten Chemokinrezeptoren sind erstens CCR5 (R5-trop), der Rezeptor für die Chemokine CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) und CCL8 (MCP-2) und zweitens CXCR4 (X4-trop) der Rezeptor für das Chemokin CXCL12 (SDF-1 α). Die Korezeptoren CCR5 oder CXCR4 können einzeln oder auch in Kombination vom Virus genutzt werden (Abb. 3 / S. 7). Man spricht dann von R5-tropen, X4-tropen oder R5X4-dualtropen Viren.

Neben diesen Rezeptoren spielen noch weitere Faktoren wie z.B. Adhäsionsmoleküle, Glukosaminoglykane oder Lektine bei der Infektion eine Rolle. Die Ausbildung der einzelnen Moleküle variiert jedoch zwischen den HIV-1 permissiven Zelltypen erheblich. So exprimieren z.B. dendritische Zellen, oder Mikroglia große Mengen an Glukosaminoglykanen, während z.B. die Oberflächen von T-Zellen diese Glykanstrukturen nicht aufweisen [15, 16]. Zu diesen für die Virus-Wirtszell-Interaktion wichtigen Glukosaminoglykanen gehören Heparan-Sulfat-Proteoglykane (HSPG). Diese sind Proteine, welche mindestens eine kovalent gebundene Heparan-Sulfat-Seitenkette aufweisen und durch verschiedene Modifikationen eine starke negative Ladung aufweisen. Die Interaktion dieser negativen Ladungen mit den positiven Ladungen des gp120, spielt eine entscheidende Rolle bei der Anlagerung des Virus an die Wirtszelle. Aus diesem Grund interagieren CCR5-trope HIV-1-Typen schlechter mit HSPG als X4-trope, da letztere eine höhere positive Ladung innerhalb des gp120-V3-Loops aufweisen (Abb. 3 / S. 7, Abb. 4 / S. 10) [17, 18].

Ein weiterer Effekt, wie HIV-1 verschiedene Rezeptoren, wie z. B. Glukosaminoglykane

oder Lektine nutzen kann, bezieht sich auf die Infektion von T-Zellen. Hierbei fördern Lektine wie DC-SIGN (ein C-Lektin) oder Mannoserezeptoren wie z.B. CD206, die Aggregation von dendritischen Zellen mit T-Zellen, das Engagement des T-Zellrezeptors, die wechselseitige Infektion zwischen den Zellen und damit die Verbreitung des Virus im Körper. DC-SIGN bindet dabei als Anheftungsfaktor das HIV-1 über eine Interaktion mit den Mannose-Karbohydraten innerhalb des gp120. Diese Bindung ist für den infektiösen Eintritt zwar nicht erforderlich, sie kann jedoch die Infektionseffizienz stark erhöhen. Der Anheftungsfaktor DC-SIGN wird vor allem auf submukosalen und dermalen dendritischen Zellen exprimiert und scheint somit neben CD4 und CCR5 bei der vertikalen und mukosalen Transmission von HIV-1 von Bedeutung zu sein, indem es die HIV-Infektion benachbarter T-Zellen *Trans-Infektion* verstärkt. Dieser Effekt lässt sich auch bei Endothelzellen nachweisen. Hier bindet das HIV-1 an Sydekane, die zu den Heparan-Sulfat-Proteoglykanen zählen. Diese Bindung begünstigt hierbei allerdings nicht nur eine *Trans-Infektion* von T-Zellen [16], sondern kann auch die Transzytose des HIV-1 durch die Blut-Hirn Schranke vermitteln [19, 20].

1.2.2 Die Bindung des viralen gp120 an das CD4-Protein

Bei der Fusion mit der Wirtszelle bindet primär das virale Oberflächenprotein gp120 an ein CD4-Protein auf der Oberfläche von T-Lymphozyten. Das CD4-Protein kommt auf den Wirtszellen hauptsächlich als Monomer, aber auch in geringerer Anzahl, als Dimer vor. Da HIV-1 bevorzugt an monomeres CD4 bindet, ist das Verhältnis von monomerem zu dimerem CD4 mitentscheidend für die Effizienz des Zelleintritts durch HIV-1 [21]. CD4-Proteine werden vor allem von T-Zellen exprimiert, kommen aber auch auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen vor. Das CD4 gehört zur Immunglobulin Superfamilie und ist an der Antigenerkennung beteiligt. Es ist in vier extrazelluläre Domänen D1-D4 eingeteilt [22], von denen insbesondere positive Ladungen in einem 22 Aminosäuren langen Loop, innerhalb der D1-Domäne, sowie eine Gelenkregion zwischen der D2- und D3-Domäne, eine wichtige Rolle für die HIV-Infektion spielen [23-28]. Diese binden über Ionische- und Wasserstoffbrückenbindungen in einer negativen Tasche zwischen der inneren und äußeren Domäne des gp120. Die Bindung des gp120 an das CD4-Protein induziert eine Konformationsänderung des viralen gp120-Komplexes, was eine Exposition des *bridging-sheet* und des V3-Loop zur

Folge hat [29]. Zwar gibt es *in vitro* HIV-1-Typen, welche Zellen CD4-unabhängig infizieren können, dieses Phänomen wird allerdings *in vivo* nicht beobachtet [30], da solche Viren äußerst leicht neutralisierbar sind. Wie viele CD4-Moleküle notwendig sind, um eine Konformationsänderung des gp120-Komplexes auszulösen ist allerdings bis heute nicht genau bekannt [31, 32].

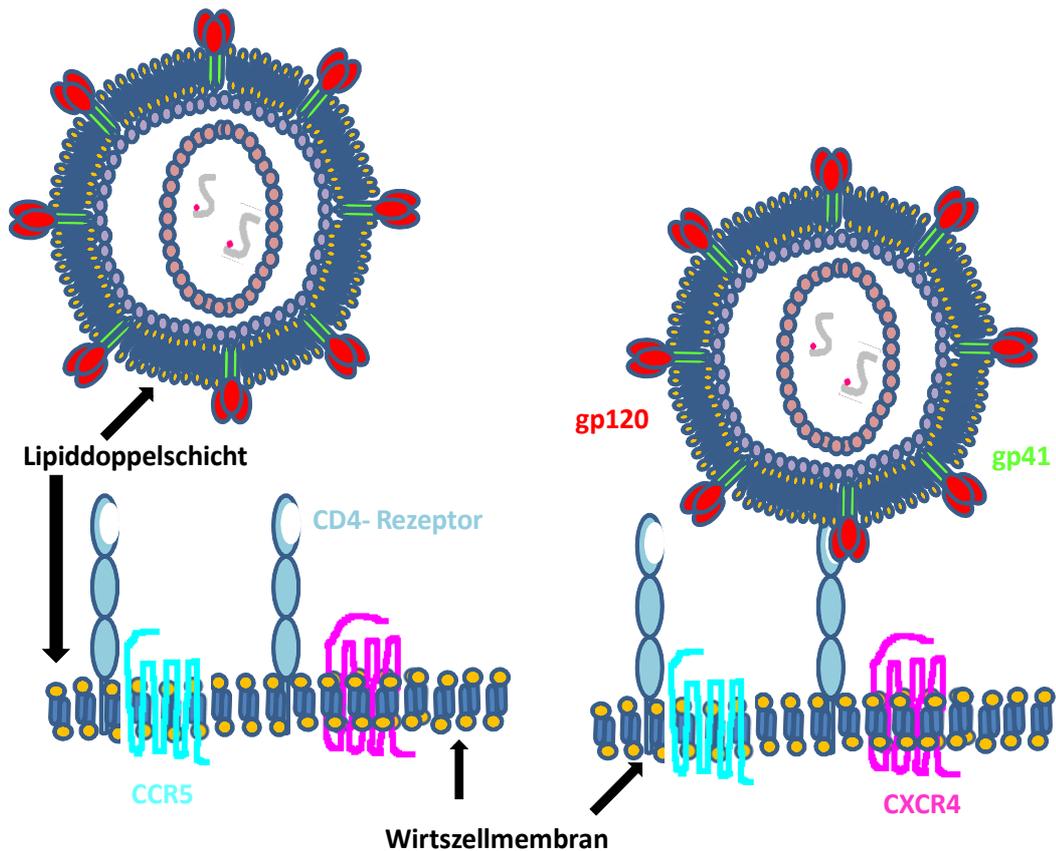


Abb. 3 Bindung des primären HIV-1-Rezeptors CD4 durch virales gp120

Eine der wesentlichen Hauptaufgaben des viralen gp120 ist die Bindung des HIV-1 an eine Wirtszelle. Dieses passiert, indem virales gp120 [●] zunächst einen auf Wirtszellen (Lymphozyten, Makrophagen) vorkommenden Rezeptor binden. Dieser Rezeptor ist CD4. Da HIV-1-Typen diesen Rezeptor als ersten Schritt einer Infektion binden müssen, heißt CD4 auch primärer HIV-Rezeptor. In dieser Abbildung ist eine Wirtszelle zu sehen, die zum einen den primären Rezeptor CD4 sowie die beiden möglichen Korezeptoren CCR5 und CXCR4 auf Ihrer Oberfläche exprimiert. Letztere spielen im weiteren Verlauf der Infektion eine wichtige Rolle (Abb. 4 / S. 10).

1.2.3 Bindung des viralen gp120 an zelluläre Korezeptoren und die darauf anschließende Fusion der Virus- und Wirtszellmembranen

Nach erfolgreicher Bindung des gp120 an CD4 und der dadurch verursachten gp120-Konformationsänderung erfolgt, über die nun exponierten Epitope, die sekundäre Bindung des gp120 an den Korezeptor (Abb. 4A / S. 10). Als Korezeptoren fungieren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus der Gruppe der 7-Transmembranproteine, welche selber in die über 20 verschiedene Membranproteine große Familie der Chemokinrezeptoren gehören [33, 34]. Chemokine sind Proteine bestehend aus ca. 60-75 Aminosäuren. Sie fungieren als Botenstoffe und werden bei verschiedenen Entzündungsprozessen regulatorisch wirksam. Die Nomenklatur der Chemokine basiert auf der unterschiedlichen Anordnung von zwei Cysteinresten, die entweder direkt nebeneinander (CC-Chemokin) oder variabel bis zu drei Aminosäuren weit voneinander entfernt sein können (CX₃C). Das HIV-1 nutzt mehrere unterschiedliche dieser Chemokinrezeptoren (Kap. 1.2.1 / S. 5) und ist somit in der Lage eine große Anzahl von Zellen des Immunsystems zu infizieren. Diese Fähigkeit verschiedene Chemokinrezeptoren zu binden beruht bei HIV-1 vor allem auf der hohen Variabilität im V3-Loop des gp120 Hüllproteins [35, 36]. Vor allem zwei unterschiedliche Chemokinrezeptoren fungieren für die HIV-1-Infektion als Korezeptor (Abb. 3 / S. 7). Diese werden in unterschiedlichen Infektionsphasen vom Virus genutzt und determinieren so den Tropismus des Virus [36, 37]. Zunächst nutzt das HIV-1 den Korezeptor CCR5. HIV-1-Typen, die ausschließlich CCR5 nutzen werden als R5-trope oder als *non-syncytium inducing* NSI-Viren bezeichnet. Als natürliche Liganden für CCR5 dienen die Substanzen MIP-1 α , MIP-1 β sowie RANTES, welche alle in der Lage sind R5-trope HIV-1-Typen zu inhibieren [38-40]. R5-trope Viren dominieren den Beginn der HIV-1-Infektion [41].

Der zweite vom Virus genutzte Korezeptor ist CXCR4 [42, 43]. HIV-1-Typen die CXCR4 nutzen, werden als X4-trop oder auch als *syncytium inducing* SI-Viren bezeichnet. Synzytien sind Verschmelzungsprodukte ursprünglich voneinander getrennter, einkerniger Zellen zu einem polyenergidem (vielkernigen) Plasmakörper. Die X4-tropen HIV-1-Typen treten erst nach einer 2-10 Jahren andauernden asymptomatischen Phase im Patienten zusammen mit dualtropen R5X4 HIV-1-Typen auf und dominieren in dieser "späten" Phase der Infektion [41-44]. Zusätzlich können eine

Reihe weiterer Chemokinrezeptoren von HIV-1-Typen in Verbindung mit den beiden Hauptkorezeptoren CCR5 und CXCR4 als Korezeptoren genutzt werden. Die Bindestelle des Korezeptors wird vom *bridging sheet* und dem V3-Loop gebildet und liegt an der Basis zwischen den ersten drei Loops (V1/V2 und V3) des gp120. Der V3-Loop bestimmt durch seine Konformation und seine Ladungsverhältnisse die Korezeptorspezifität (Kap. 1.4 / S. 15).

Nach Bindung des Korezeptors erfolgt der finale Schritt der HIV-1-Infektion (Abb. 4B / S. 10). Die Bindung des Korezeptors resultiert in einer Annäherung des viralen gp41/gp120-Komplexes an die Zellmembran. Nach der Bindung an CD4 und den Korezeptor erfolgt eine weitere Konformationsänderung und das gp41 wird freigelegt (Abb. 4B / S. 11). Dadurch wird die Möglichkeit geschaffen, daß sich die α -Helices *heptad-repeats 1&2* (HR1/HR2), sowie das hydrophobe Fusionspeptid am aminoterminalen Ende des gp41 entfalten und in Richtung Wirtszellmembran ausrichten [45, 46]. Es entsteht die sogenannte *early pre-bundle* Konformation. Im weiteren Verlauf wird durch die Einlagerung des Fusionspeptids in die Wirtsmembran eine Verbindung geschaffen *bridging pre-bundle*. Durch die Verbindung von Fusionspeptid mit Wirtszellmembran werden die beiden α -Helices HR1/HR2 einander angenähert, was ebenfalls zur Annäherung der beiden Membranen führt. Dieser Vorgang führt zur Senkung des Energieniveaus wodurch eine kleine Fusionspore gebildet werden kann. Es entsteht ein *fusiogenetic pre-bundle*. Durch die antiparallele Zusammenführung der trimeren HR1 und HR2 α -Helices entsteht schließlich ein *six-helix-bundle*, daß eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung und Erweiterung der Fusionspore hat. Das Endresultat dieses Prozesses ist die Verschmelzung der Virus- und Zellmembran und der damit verbundene Eintritt des viralen Kapsids in die Wirtszelle [47-52].

A

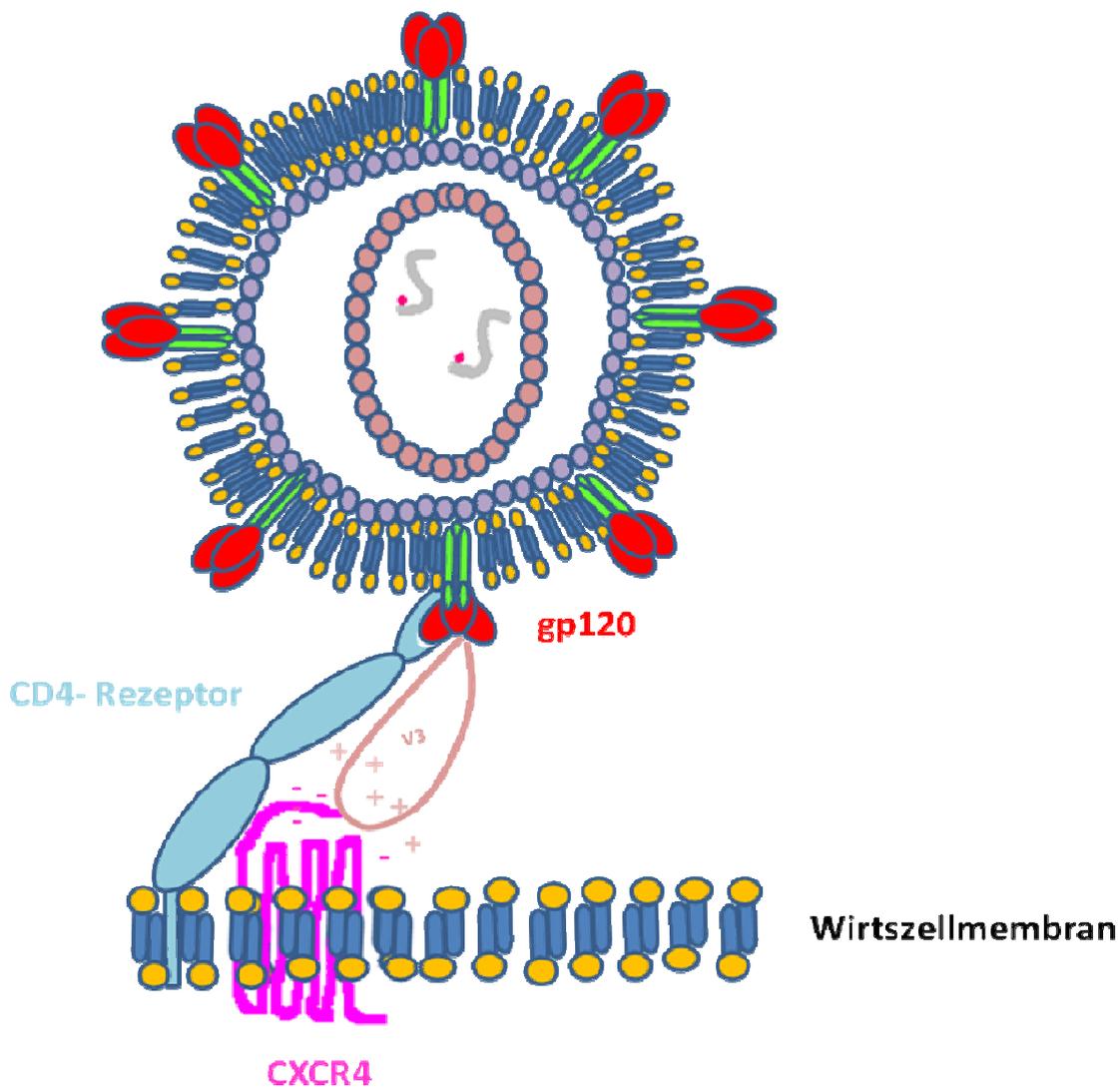
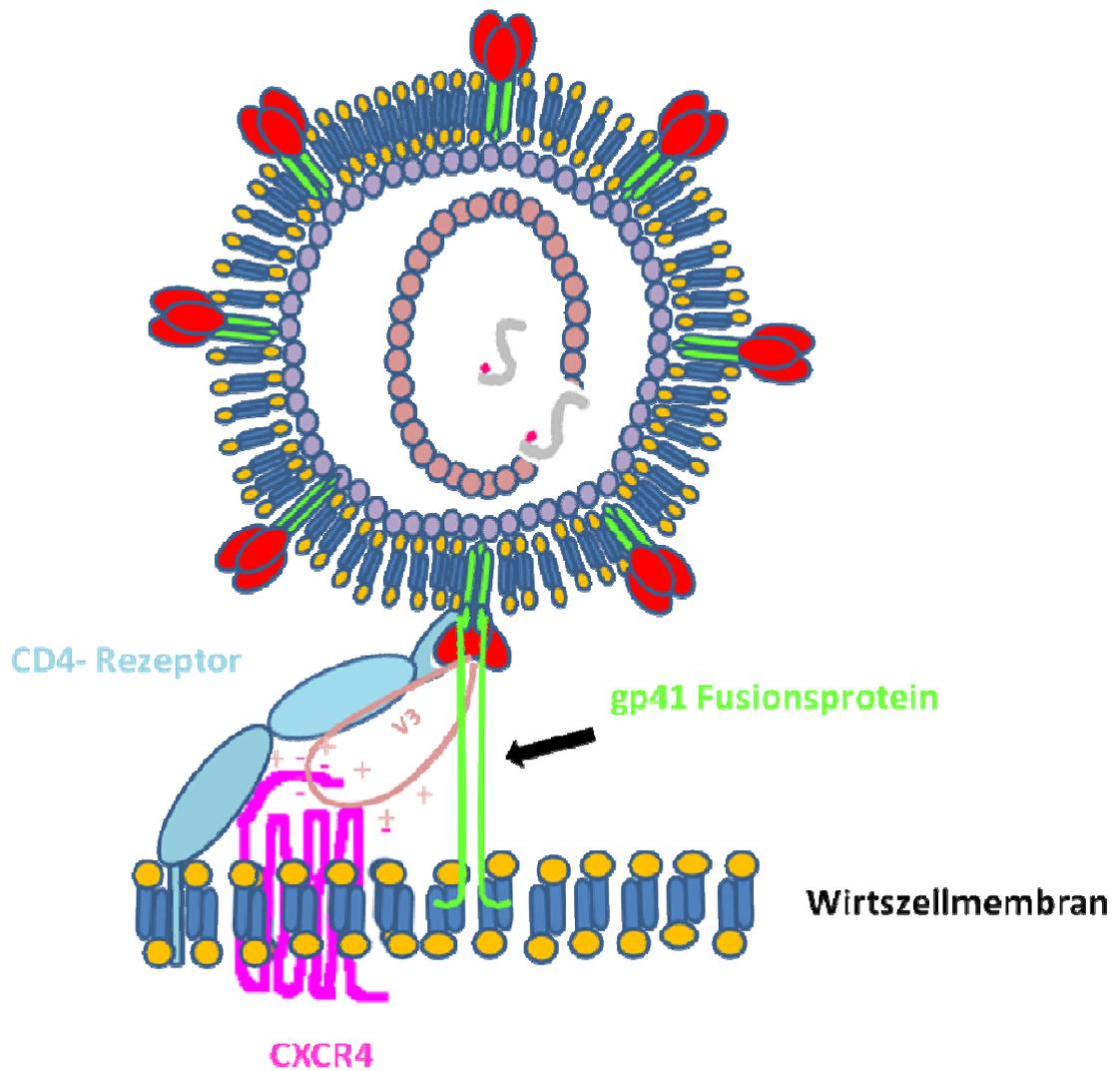


Abb. 4 Interaktion des HIV-1_{IIIB} gp120-V3-Loop mit dem CXCR4-Korezeptor

A: Nach der Bindung des primären Rezeptors CD4 kommt es im gp120 zu einer Konformationsänderung. Der V3-Loop welcher zunächst im Inneren des gp120 gelegen ist, wird nun exponiert und vermittelt ladungsabhängig, die sekundäre Bindung des gp120 an den Korezeptor. Dabei besitzt der V3-Loop je nach HIV-1-Typ eine positive Nettoladung von +2 bis +10. Abhängig von dieser Ladung wird der zu bindende Korezeptor gewählt, welcher negativ geladen ist. Hierbei ist zu beachten, daß CXCR4 mehr negative Ladungen besitzt als CCR5. Somit binden HIV-1-Typen mit einer hohen positiven V3-Loop Nettoladung eher an CXCR4 als an CCR5.

B



B: Nach der Bindung des V3-Loops an den Korezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des gp41. Dadurch wird das Fusionsprotein freigelegt. Dieses integriert sich dann in die Wirtszellmembran. Es beginnt die Fusion von Virus und Wirtszelle.

1.3 Aufbau und Funktion des viralen Hüllproteinkomplexes

Die beiden Glykoproteine gp120 und gp41 entstehen aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein dem gp160. Die Angaben 160, 120 und 41 im Namen bedeuten, daß ihre jeweilige Molekülmasse 160, 120 oder 41 kDa beträgt. Das gp160 Vorläuferprotein wird vom *env*-Gen kodiert. Es wird an der Außenseite des rauen endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und anschließend ins Lumen abgegeben. Intraluminal erfolgen weitere Modifikationen wie z. B. die N- und O-Glykosylierung des Proteins. Anschließend wird das fertige Vorläuferprotein im Lumen trimerisiert [2], in Golgivesikel verpackt und zur Wirtszellmembran transportiert. Hier wird das gp160 unter anderem durch eine zelluläre Protease [53] in das externe Glykoprotein gp120 und das Transmembran Glykoprotein gp41 gespalten [54-56]. Beiden Proteine bleiben dabei durch nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden [57]. Dadurch das der Glykoproteinvorläufer im Lumen trimerisiert worden ist, entstehen auf der Oberfläche virale Spikes aus jeweils drei gp120- und drei gp41-Einheiten [58, 59], wobei Ihre genaue Struktur sowie ihr Aktivierungsmechanismus aktuell die Basis mehrerer Theorien darstellen [28, 60]. Auch variiert die Anzahl der Spikes auf der Oberfläche von HIV-1-Typ zwischen 72 Spikes [1] und 6-10 Spikes [61]. In der Regel weisen R5-trope Viren mehr Spikes auf als X4-trope Viren [62, 63].

1.3.1 Das Transmembranprotein gp41

Aufgebaut ist das Transmembranprotein gp41 aus drei Domänen. Zuerst eine C-terminale intrazelluläre Domäne, die eine Rolle bei der Assoziation der Partikel in *lipid rafts*, der basolateralen Sortierung und der Knospung der Vironen spielt. Dann eine Transmembrandomäne und zuletzt eine N-terminale-extrazelluläre Domäne, welche das für die Infektion notwendige Fusionspeptid, eine hydrophobe glycerinreiche Domäne am N-Terminus, enthält. Dieses Fusionspeptid wird nach einer Konformationsänderung exponiert und später in die Wirtszellmembran integriert (Kap. 1.2.3 / S. 8). Weiter befinden sich in der extrazellulären Domäne noch zwei für die Fusion wichtige hydrophobe α -Helices (HR1/HR2), von denen sich eine am N-terminalen Ende (HR1) und die andere am C-terminalen Ende (HR2) der extrazellulären Domäne befindet [45, 46]. Innerhalb des trimeren gp41 liegen diese Helices in *coiled-coil*-Strukturen vor.

Die primäre Aufgabe des gp41 besteht in der Vermittlung der Virusfusion über ein in diesem Protein enthaltendes Fusionspeptid. Nach Bindung von gp120 an CD4 und anschließender Bindung an einen der beiden Korezeptoren CCR5 oder CXCR4 kommt es zu einer Konformationsänderung, welche das zunächst verdeckte gp41 freilegt und dessen Fusionspeptid exponiert. Letzteres integriert sich in die Wirtszellmembran und leitet dadurch die Virusfusion ein (Kap. 1.2.3 / S. 8)

1.3.2 Das virale Oberflächenprotein gp120

Das Glykoprotein gp120 (Abb. 5 / S. 14) befindet sich, wie bereits weiter oben diskutiert, auf der Oberfläche des HIV-1. Seine modifizierte Kristallstruktur zeigt, daß es vom Aufbau her in eine äußere- und eine innere Domäne gegliedert ist. Diese beiden Domänen sind über ein sogenanntes *bridging sheet*, miteinander verbunden [24]. Innerhalb des Oberflächenproteins gp120 befinden sich 5 hypervariable Regionen (V1-V5). In ihnen liegt der Anteil an konservierten Aminosäuren bei weniger als 30% [64, 65]. Hierbei ist die strukturelle Variabilität in den Domänen V1 bis V3 größer als in den Domänen V4 und V5 [66]. Die genetischen Veränderungen innerhalb dieser fünf hypervariablen Abschnitte scheinen unabhängig voneinander zu erfolgen [67] denn es wurden bisher keine Beziehungen von Mutationen innerhalb eines Loops mit Mutationen innerhalb eines anderen Loops gefunden. Die Loop-Struktur der hypervariablen Regionen V1-V4 bildet sich durch eine Disulfidbrücke, anhand zweier hochkonservierter Cystein Reste, an der Basis der Loops [68]. Eingebettet sind die variablen Regionen in ein Gerüst aus konservierten Sequenzabschnitten C1-C5 [69, 70].

Die Oberfläche von gp120 kann man aufgrund dessen, daß sie wichtige Determinanten für neutralisierende Antikörper enthält [71, 72] in drei Bereiche gliedern. Das *neutralizing face* ist der Teil der Oberfläche gegen den Antikörper gerichtet sind, das *non-neutralizing face* liegt innerhalb des Spikes verdeckt und ist mit gp41 assoziiert, sowie das *silent face* welches die Bereiche darstellt, die zwar auf der Oberfläche exponiert sind, jedoch durch Glykosylierung vor Antikörpern geschützt werden.

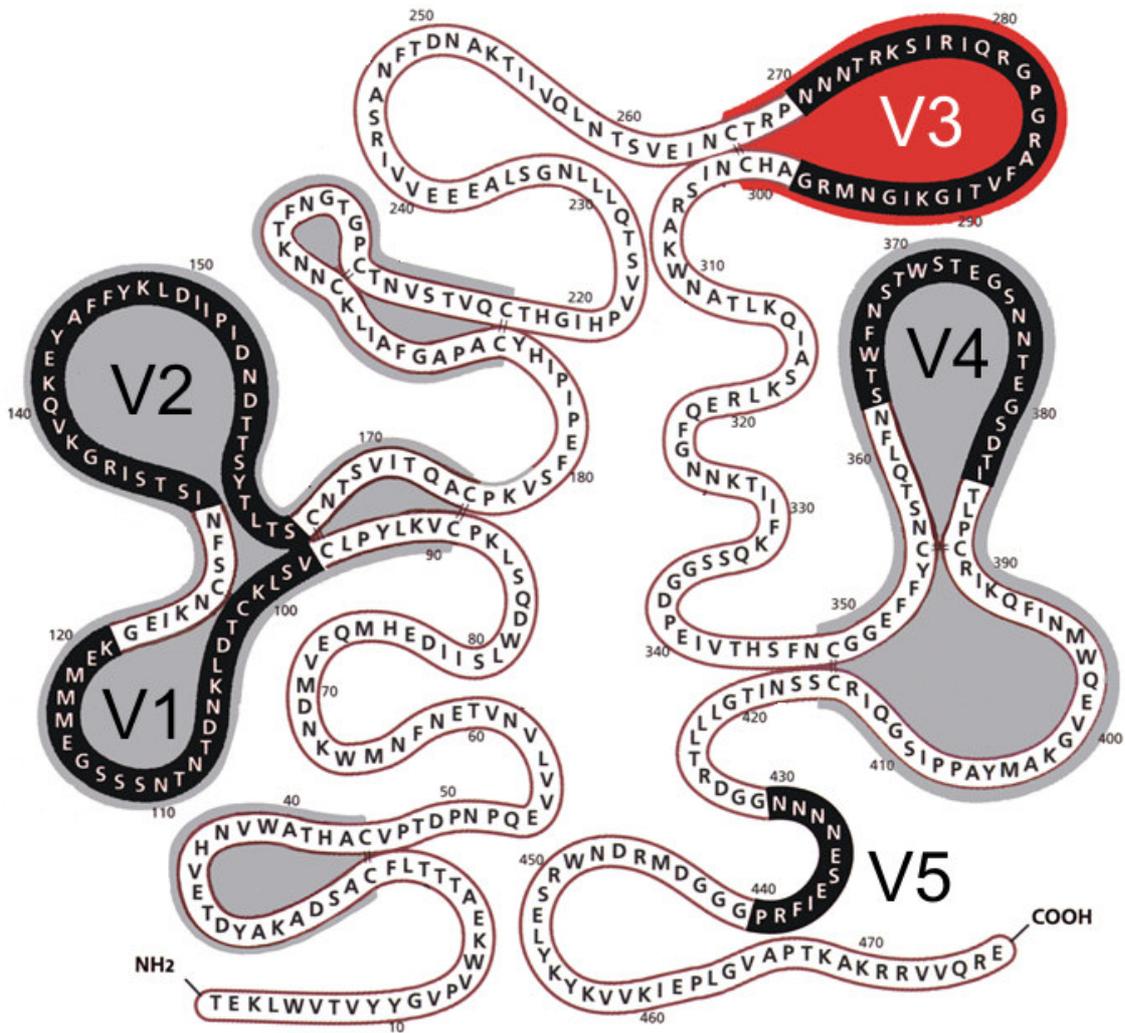


Abb. 5 Darstellung des gp120 des HIV-1-Isolats HIV-1_{III}B

Das gp120 besteht aus 479 Aminosäuren und der V3-Loop besitzt 8 Aminosäuren vom Typ Lysin (K) und Arginin (R). Aufgrund der Anzahl von D und E, K und R Aminosäuren besitzt der gp120_{III}B V3-Loop eine positive Ladung von +8. Damit ist HIV-1_{III}B X4-monotrop. Die hypervariablen Regionen V1-V5 sind schwarz gezeichnet. Die hypervariable Region V3 ist zusätzlich rot markiert. [Abbildung übernommen und modifiziert von Leonard et al. 1990] [68].

1.4 Die Rolle des gp120-V3-Loop für die Korezeptornutzung

Der V3-Loop ist die dritte hypervariable Region innerhalb des HIV-1 gp120 (Abb. 5 / S. 14). Er ist die Schlüsselregion für die Wahl des Korezeptors [35-37] und hat je nach HIV-1-Typ eine Länge von 31-39 Aminosäuren. Geformt wird er durch zwei Cysteine, welche an der ersten und letzten Stelle des V3-Loop befinden und untereinander eine Disulfidbrücke ausbilden (Abb. 6 / S. 18). Er gliedert sich in drei wesentliche, voneinander unabhängige, Domänen.

Als erstes die *crown* Region, welche die Aminosäuren 11-20 an der Spitze des V3-Loops einschließt und deren Mitte aus einem hoch konserviertes GPG-Motiv besteht, welches das β -turn Motiv der Loop-Struktur bildet. Als zweites befinden sich *Up-* und *downstream* von der *crown-Region* die hochvariablen Bereiche des V3-Loops. Diese bilden den V3-Loop-*stem*, bestehend aus den Aminosäuren an den Positionen 5-10 und 21-30. Als drittes schließt sich an den V3-Loop-*stem* beidseits eine konservierte β -sheet-Konformation an. Sie wird als V3-Loop-*base* bezeichnet und besteht aus den V3-Loop-Aminosäuren 1-4 und 31-35. In der *base-Region* befinden sich die zwei Cysteine, welche eine Disulfidbrücke ausbilden, die dem V3-Loop seine Form gibt [73-77]. Im N-terminalen Bereich des V3-Loops (Aminosäuren 6-8) befindet sich zusätzlich bei vielen HIV-1-Typen noch eine N-Glykosylierungsstelle (Nomenklatur bezogen auf HIV-1_{III}B: N-Glykan g15).

Am Bindungsvorgang an einen Korezeptor sind alle 3 Domänen des V3-Loop beteiligt, nutzen aber unterschiedliche Korezeptor-Regionen. Bezogen auf den Korezeptor CCR5, bindet die V3-Loop-*base* zusammen mit Anteilen des *bridging-sheets* an den N-terminus des CCR5. Die V3-Loop-*crown* und Teilen des V3-Loop-*stem* binden dagegen an den CCR5-Körper [78-81].

Der V3-Loop ist die entscheidende Struktur welche die Auswahl des Korezeptors CCR5 oder CXCR4 bestimmt [35-37]. Ersetzt man den V3-Loop eines R5-tropen Virus durch einen X4-tropen V3-Loop, erhält das so veränderte Virus die Eigenschaft, an CXCR4 zu binden und verliert gleichzeitig seine CCR5-Bindungseigenschaft [82]. Bei der Wahl, ob CCR5 oder CXCR4 gebunden wird, spielt die Anzahl der positiven Nettoladung innerhalb des V3-Loop eine sehr wichtige Rolle. Sie kann bei unterschiedlichen Virus-Varianten Werte von +2 bis +10 annehmen [79]. Dabei haben HIV-1-Typen, welche den

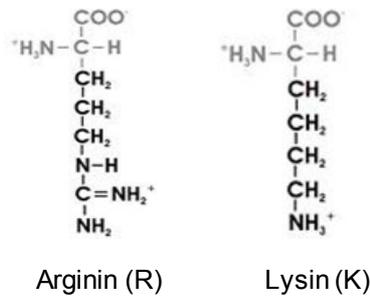
Korezeptor CCR5 nutzen eine geringere Nettoladung (+1 bis +5) als Viren, die den Korezeptor CXCR4 nutzen (+6 bis +10) [83, 84]. Wenn die Nettoladung des Virus einen mittleren Wert hat, dann kann der Austausch von einer einzelnen basischen oder sauren Aminosäure einen Tropismuswechsel von CCR5 zu CXCR4 hervorrufen [85-89]. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von R5-tropen und X4-tropen Viren miteinander, dann fällt auf, daß HIV-1-Typen welche an den Positionen 11-14 innerhalb des V3-Loop die sehr häufige Aminosäuresequenz SIHI haben, in der Regel R5-trop sind, während HIV-1-Typen mit der Aminosäuresequenz RIHI den Korezeptor CXCR4 nutzen. Damit zeigt sich, daß die Aminosäure Arginin an der Position 11 eine wichtige Rolle für die Wahl des Korezeptors spielt [85].

In der Tat hat sich gezeigt, daß für die Bestimmung des Tropismus eines HIV-1-Typs die Aminosäure 11; 24 und 25 innerhalb des V3-Loop besonders wichtig sind. Diese drei Positionen werden in die 11/24/25-Regel [85-87, 90] eingebunden, mit deren Hilfe es möglich ist, den Tropismus eines Virus vorauszusagen. Dabei scheint die Lage der Aminosäure eine wichtige Rolle zu spielen. So liegen die drei Aminosäuren an gegenüberliegenden Enden der *V3-crown*-Region und stehen in direktem Kontakt zu einander.

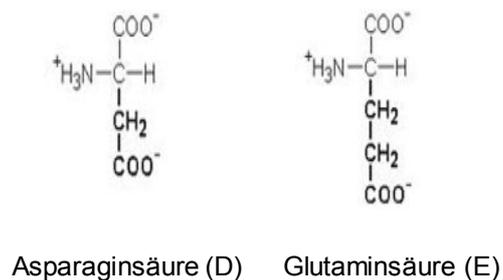
Die 11/24/25-Regel besagt:

- 1.) Befindet sich an Position 11 eine basische Aminosäure (z.B. K306) und an den Positionen 24/25 ebenfalls eine basische oder keine saure Aminosäure, ist das Virus X4-trop.
- 2.) Befindet sich an Position 11 keine basische Aminosäure (z.B. Q306) und an den Positionen 24/25 eine saure, ist das Virus R5-trop.

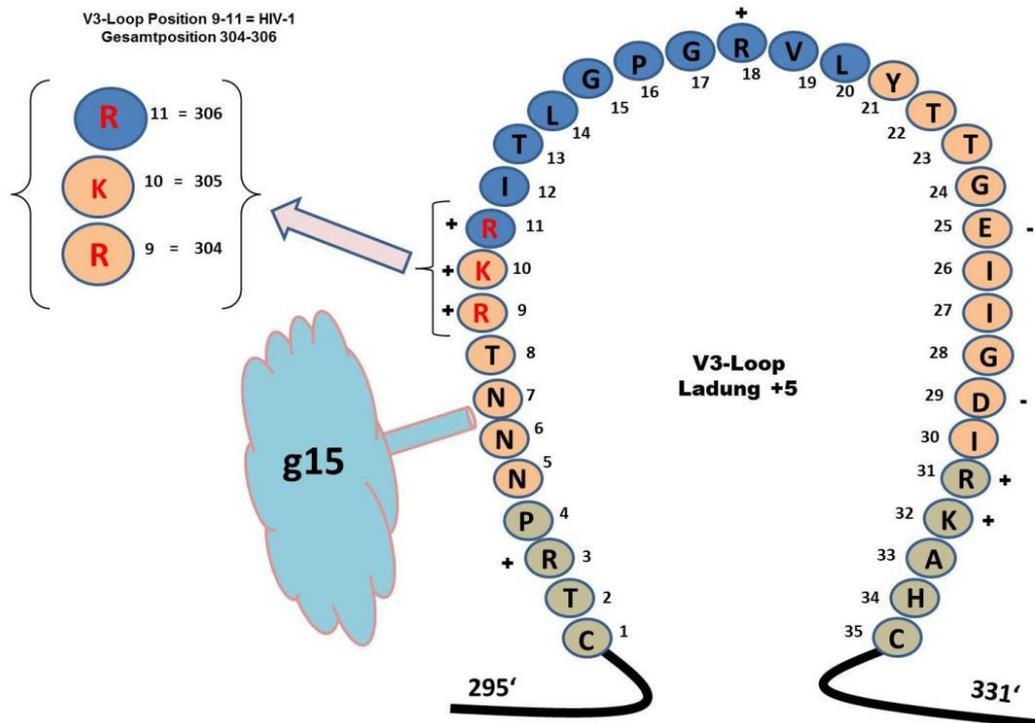
Die 11/24/25-Regel berücksichtigt generell die Anwesenheit oder Abwesenheit von sauren (E, D) und basischen Aminosäuren (R, K). Dabei wird nicht unterschieden, ob eine bestimmte Aminosäure dieser Auswahl an einer der Positionen auftaucht. Es zählen nur die generellen Ladungsverhältnisse. Im Unterschied zu E und D gibt es allerdings zwischen den basischen Aminosäuren K und R deutliche strukturelle Unterschiede.



Ein Vergleich von verschiedenen HIV-Sequenzen zeigt, daß eine bestimmte basische Aminosäure an bestimmten Positionen hoch konserviert vorkommt und auch nicht gegen eine andere (R/K) ausgetauscht wird. So kommt z. B. Arginin an der Position 9 (R304) innerhalb des V3-Loop in >98% der Fälle vor [91]. Fraglich ist diesbezüglich ob ein Wechsel von Arginin (R) zu Lysin (K) oder umgekehrt an einer dieser hoch konservierten Regionen auch bei verschiedenen HIV-1-Typen zu einer Veränderung der Infektiosität führt. Im Unterschied zu R und K sind die strukturellen Unterschiede zwischen den sauren Aminosäuren E und D von geringer Natur.



Neben den Ladungsverhältnissen, welche in der 11/24/25-Regel dargestellt werden, spielt auch die Ausbildung des N-Glykans innerhalb des V3-Loop (Kap. 1.5 / S. 19) eine bedeutende Rolle bei der Auswahl des Korezeptors [92].



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

Abb. 6 Der NL-952 V3-Loop

Das NL-952 ist eine R5X4-dualtrophe Variante des X4-monotropen Laborstammes NL4-3. Bei der NL-952 Variante befinden sich die untersuchten basischen Aminosäuren K und R an den Positionen 9-11. Zur Herstellung des NL-952 wurde der V3-Loop aus dem Patientenisolat PI-952 in den Laborstamm NL4-3 kloniert. Er hat eine positive Nettoladung von +5 und ist damit R5/X4 dualtrop. Daher unterscheidet sich die Variante NL-952 nur durch die V3-Loop-Sequenz von dem Virus NL4-3.

Die 35 Aminosäuren des NL-952 V3-Loop gliedern sich in eine V3-base (●), einen V3-stem (●) und eine V3-crown (●) Region. Die darunter liegende Tabelle zeigt einen Sequenzvergleich der V3-Sequenz von NL-952 mit allen, bei HIV-1-Subtyp B vorkommenden Aminosäure Variationen. Die Aminosäuren 9-11 sind **rot** markiert. Die vorgenommenen Aminosäure Austausche sind **grün** markiert. [Datenquelle: Los Alamos Database].

1.5 Die Bedeutung der gp120 N-Glykane für die HIV-1-Infektion

N-Glykane sind komplexe, verzweigte Karbohydratstrukturen. Sie sind aus unterschiedlichen monomeren Einheiten aufgebaut und werden zusätzlich durch verschiedene biochemische Prozesse z. B. durch Sulfatierung oder Sialylierung modifiziert. Durch diese Prozesse erreichen N-Glykane eine große Vielfalt und Komplexität, die es ihnen ermöglicht wichtige Funktionen in vielen biologischen Prozessen einzunehmen. Eine bedeutende Rolle spielen N-Glykane bei Membran umhüllten Viren, wie z. B. dem HIV-1.

Das für diese Infektion verantwortliche virale Hüllprotein gp120 wird posttranslational zunächst im endoplasmatischem Reticulum (N-glycosidisch) und anschließend, im Golgi-Apparat (O-glycosidisch) der Wirtszelle glykosyliert.

Als N-Glykosylierungssignale fungieren die Aminosäuremotive NXS und NXT, wobei jede Aminosäure außer Prolin in die Erkennungssequenz für X eingebaut werden kann. Die einzelnen Kohlenhydrateinheiten werden schrittweise über eine N-glykosidische Bindung an das Asparagin (N) des jeweiligen Glykosylierungsmotivs angehängt. Die N-Glykosylierung stellt in eukaryotischen Zellen die häufigste posttranslationale Modifikation für membrangebundene Proteine dar. Dabei werden ca. 90% aller Glykosylierungsmotive zur N-Glykosylierung genutzt [93]. Hierbei unterscheidet man prinzipiell drei Formen (Abb. 7 / S. 20), die alle eine gemeinsame Basis, ein Pentasaccharid bestehend aus drei Mannose- und zwei N-Acetylglucosaminresten besitzen. An diese Basis werden bei der terminalen Glykosylierung weitere Karbohydratbausteine angehängt. Die erste Form ist dabei der High-Mannose-Typ. Bei diesem Typ sind alle, an die Basis angehängten Karbohydratbausteine entweder Glucose- oder Mannoseeinheiten. Die zweite Form ist der komplexe Typ. Bei dieser Form können außer den beiden Bausteinen der ersten Form noch Fructose, N-Acetylglucosamin sowie Sialinsäure angehängt werden. Die dritte Form stellt eine Mischung aus den beiden ersten da. Innerhalb dieser drei Grundformen gibt es viele Variationen und somit auf einem Protein viele verschiedene N-Glykan-Strukturen (Abb. 7 / S. 20). Dieses Phänomen wird auch als Mikroheterogenität der N-Glykosylierung bezeichnet.

Das virale gp120 besitzt maximal bis zu 30 N-Glykosylierungsstellen (Abb. 8 / S. 21), die mehr als die Hälfte der Masse des Proteins ausmachen [67, 94, 95]. Diese

N-Glykosylierungsstellen spielen eine wichtige Rolle für die korrekte Faltung des gp120 [96] sowie für die Expression und Prozessierung des gp160 [97]. Die Anwesenheit von N-Glykanen innerhalb des V3-Loop oder in seiner Nähe schirmen den V3-Loop selber, die Korezeptor- sowie die CD4-Bindestelle ab und sind maßgeblich an der Auswahl des Korezeptors beteiligt [92, 98-101]. Dabei wird vermutet, daß N-Glykane positive Ladungen innerhalb des V3-Loop maskieren. Durch Maskierung oder Freigabe von V3-Loop-Bereichen, wird die Interaktion und die Auswahl des Korezeptors mit beeinflusst. Dabei spielt neben den Ladungsverhältnissen und der Glykosylierung des V3-Loop, auch das Glykosylierungsmuster in den Loops V1/V2 eine Rolle [102, 103]. So sind R5-trope Viren, bei denen das N-Glykan innerhalb des V3-Loop fehlt (-g15 Mutante) in ihrer Infektiosität abgeschwächt. Gleichzeitig werden diese Viren durch V3-gerichtete Antikörper effizienter neutralisiert. Bei X4-tropen Viren führt das Fehlen des N-Glykans g15 innerhalb des V3-Loops zu einer gesteigerten Infektiosität [92] der Viruspartikel.

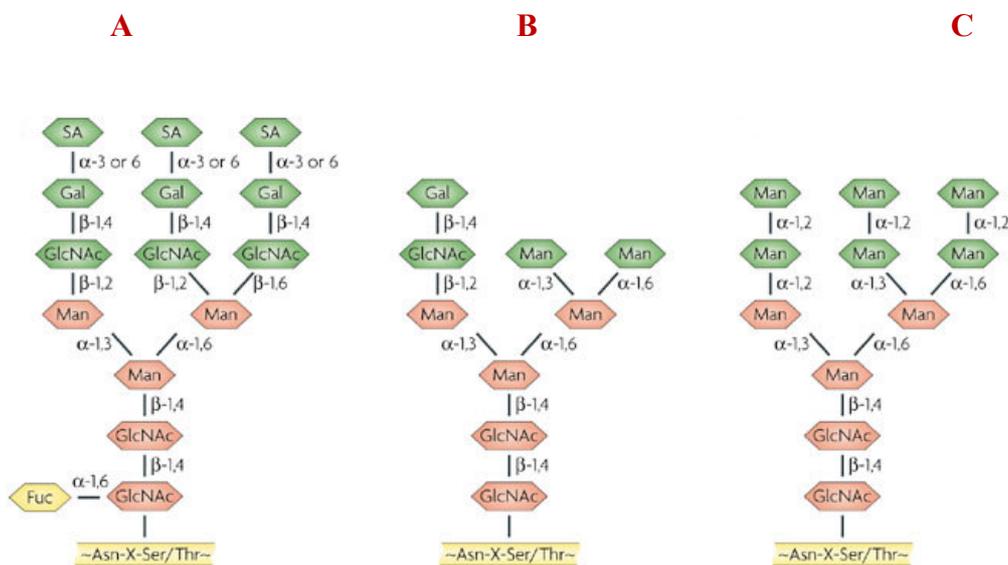


Abb. 7 Komplexen Karbohyratstrukturen

Dargestellt ist der Komplexe Typ (A), der gemischte Typ (B) und der High-Mannose-Typ (C). High-Mannose-Typ N-Glykane kommen reichlich auf gp120 vor, sind jedoch auf Säugetierzellen selten anzutreffen. Neben dem High-Mannose-Typ gibt es in der Natur noch zwei weitere N-Glykan-Typen: Zum einen sind das N-Glykane vom komplexen Typ und zum anderen N-Glykane vom gemischten Typ. (Abbildung übernommen von Balzarini 2007) [99].

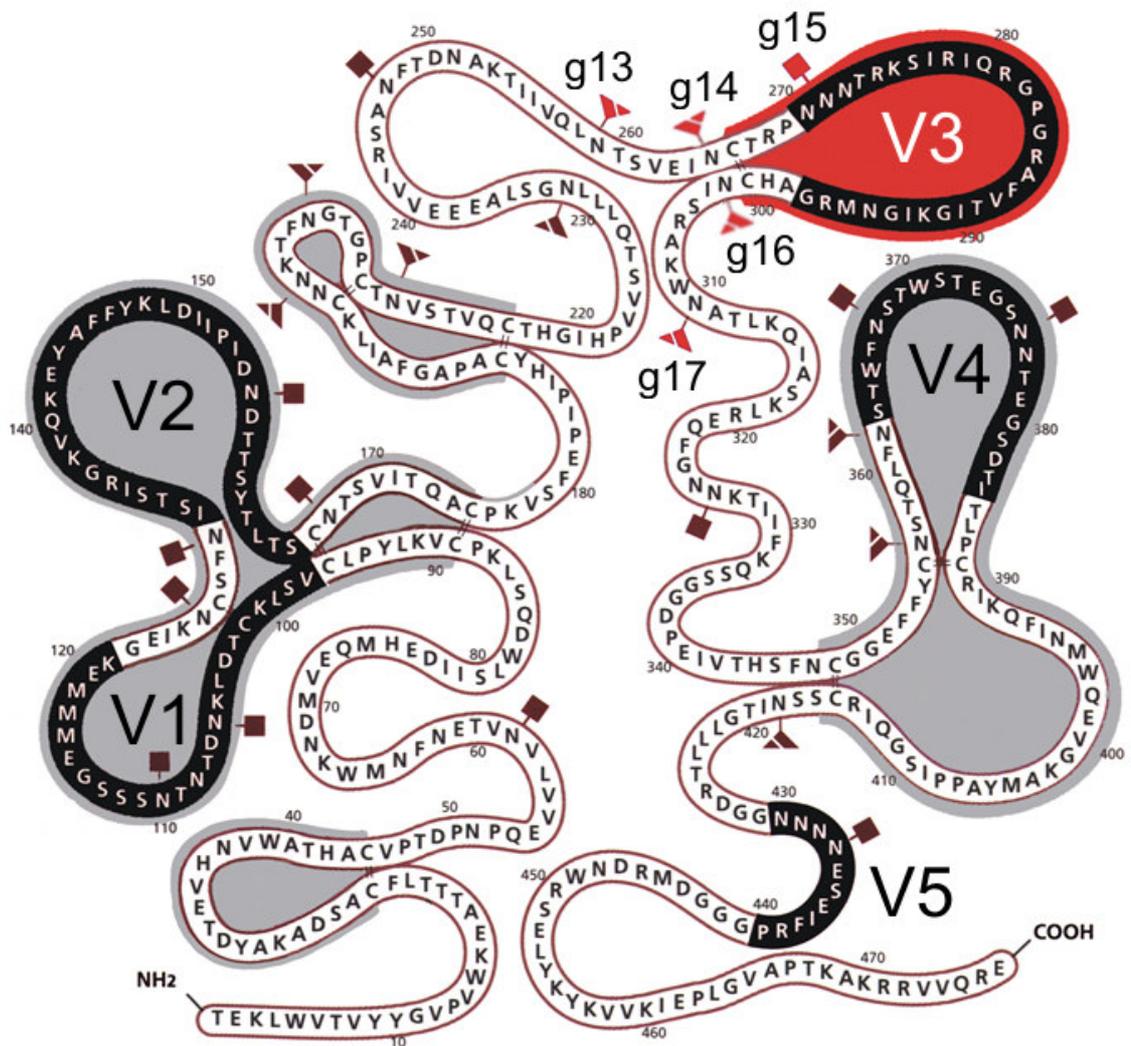


Abb. 8 Das gp120 des HIV-1-Isolats HIV-1_{IIIB} mit den N-Glykanen g1 bis g24

Bei den N-Glykanen findet man im HIV-1 gp120 zwei verschiedene Typen. Zum einen N-Glykane vom High-Mannose Typ (▼) und zum anderen N-Glykane vom Komplexen Typ (■). Der rot markierte V3-Loop enthält ein N-Glykan des komplexen Typs mit der Bezeichnung g15 (bezogen auf die Zählweise im gp120_{IIIB}) und wird an seiner Basis von zwei N-Glykanen vom High-Mannose Typ (g14 und g16) flankiert. [Abbildung übernommen und modifiziert von Leonard et al. 1990] [68]

Eine weitere wichtige Funktion der N-Glykane stellt der Schutz vor dem Immunsystem, speziell vor neutralisierenden Antikörpern, dar. Die HIV-1-Typen entwickeln aufgrund des auf sie einwirkenden Selektionsdruckes, durch die große Antikörpervielfalt des menschlichen Immunsystems, ein sich im Laufe der Erkrankung verschiebendes Glykosylierungsmuster. In diesem Zusammenhang spricht man auch von einem *evolving glycan shield*. [104]. Der Maskierungseffekt eines N-Glykans verringert die Zugänglichkeit eines Epitops für neutralisierende Antikörper. Auch kann die Faltung durch eine unterschiedliche Glykosylierung so verändert werden, daß Antikörper nicht mehr binden. Eine andere Möglichkeit wäre, daß sich durch Punktmutationen bekannte Glykosylierungsstellen verschieben, deletiert oder neu ausgebildet werden. Allerdings kann die Anwesenheit eines N-Glykans auch die Neutralisierbarkeit von HIV-1-Typen erhöhen, wenn sie, wie bei X4-tropen HIV-1-Typen, die Effizienz der Korezeptorbindung herab setzen. Alles in allem spielen variable Glykosylierungsstellen zusammen mit der hohen Variabilität innerhalb der hypervariablen Regionen von gp120 eine entscheidende Rolle beim erfolgreichen *immun escape* des HIV-1.

1.6 Freies gp120 und seine Auswirkungen auf die HIV-1-Infektion

Im Zellkulturüberstand HIV-infizierter Zellen findet sich freies gp120 in geringeren Mengen. So wurde in Zellkulturüberständen gp120 Konzentrationen von 7-28 ng/ml nachgewiesen [105]. Auch im Blut von Patienten bei denen AIDS bereits ausgebrochen ist konnten, je nach Studie, Konzentrationen von 0,24-2,4 ng/ml [106] und 12-96 ng/ml [107] an freiem gp120 gemessen werden.

Zwei verschiedene Theorien wurden zu diesem Phänomen vorgeschlagen. Die eine Theorie geht davon aus, daß zunächst alle vorhandenen gp41/gp120-Moleküle in Virionen eingebaut werden. Da gp120 und gp41 über nicht kovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sind, können äußere Einflüsse wie z. B. Hitze gp120 ab dissoziieren lassen. Diesen Vorgang nennt man *shedding*. Dabei wird freies gp120 nicht nur von Viruspartikeln, sondern auch von gp160 transfizierten Zellen in den Überstand abgegeben [101, 108]. Die zweite Theorie geht davon aus, daß gp41/gp120 in viel geringerer Anzahl in der Virusmembran eingebaut wird, dann aber sehr stabil verankert ist. Das gp120 muss demnach vor dem Einbau abdissoziieren [109]. Bekannt ist, daß

HIV-1-Typen eine minimale Anzahl an gp41/120 Spikes auf ihrer Oberfläche benötigen, um Target-Zellen effektiv infizieren zu können. Das dann überschüssige Material könnte als freies gp120 ins Serum abgeben werden.

In einem Patienten existiert zu einem definierten Zeitpunkt nicht nur ein bestimmtes HIV, sondern es existiert ein Schwarm von HIV-1-Typen, die sogenannte virale Quasispezies. Demnach befindet sich nicht eine bestimmte Variante des gp120 im Blut sondern eine Vielzahl unterschiedlicher Varianten des Proteins. Dieses gp120 Protein konkurrieren nun zum einen mit anderen gp120-Molekülen und zum anderen mit Viruspartikeln um die vorhandenen CD4- und Korezeptor-Bindungsstellen. Dabei kommt es zu einer Reihe von Phänomenen. So wird zu Beispiel die Infektiosität von X4-tropen Viren durch freies X4-tropes gp120 gesteigert. Gibt man allerdings zu R5-tropen Viren deren V3-Loop nicht glykosyliert ist (-g15), freies R5-tropes gp120 bei dem der V3-Loop glykosyliert ist (+g15), kommt es zur Inhibition des Virus [101]. Dieses passiert, da R5-trope Viren denen die Glykosylierung im V3-Loop fehlt (-g15), eine verringerte Infektiosität gegenüber HIV-I-Typen mit glykosylierten V3-Loop (+g15) haben [92]. Beide Effekte, die Steigerung sowie die Inhibierung der Infektiosität, lassen sich durch anti-gp120 Antikörper neutralisieren. In der vorliegenden Arbeit wird diese Methode eingesetzt um die Effizienz der V3-Loop-Korezeptor Interaktion von verschiedenen erzeugten HIV-Aminosäuremutanten zu untersuchen und so deren relative Infektiosität untereinander zu bestimmen. Damit konnte das von Heiko Hauser geschaffene Bild der V3-Loop-Korezeptor Interaktion [101] erweitert werden.

1.7 Ziele der Arbeit

Die in der Literatur etablierte Regel zur Vorhersage des Tropismus des HIV-1, die 11/24/25-Regel, ist eine mögliche Methode zur Vorhersage des viralen Tropismus. Grundlage ist die Aminosäuresequenz des gp120-V3-Loops. Die 11/24/25-Regel berücksichtigt dabei die Anzahl und Position der negativ geladenen Aminosäuren wie E und D sowie die der positiv geladenen Aminosäuren K und R. Die Aminosäuren K und R sind strukturell sehr unterschiedlich (Kap. 1.4 / S. 15) werden aber bei der 11/24/25-Regel gleich bewertet. Daher sollen in dieser Arbeit die folgenden Fragen bearbeitet werden:

Ändert sich die Infektiosität oder der Tropismus einer HIV-1-Variante wenn an einer V3-Loop Position die Aminosäure K gegen R ausgetauscht wird?

Welche Rolle spielt dabei das im V3-Loop vorhandene N-Glycan g15?

Kann die Voraussage des Tropismus anhand einer modifizierten 11/24/25-Regel verbessert werden?

Um diese Fragen zu beantworten, sollen V3-Loop-Aminosäure-Mutanten hergestellt werden, bei denen an vordefinierten Positionen die basische Aminosäure durch andere basische oder neutrale Aminosäure ausgetauscht ist. Als nächstes soll die spezifische Infektiosität ($TCID_{50}$) aller Virus-Mutanten in Zellkultursystemen bestimmt werden. Anhand dieser Daten sollen dann Neutralisationsstudien sowie Studien zur unterschiedlichen ladungsabhängigen Nutzung der Korezeptoren CCR5 und CXCR4 durchgeführt werden. Insbesondere eignet sich für diese Tests das dualtrophe NL-952 besonders gut, da bei dieser dualtropen Virusvariante sehr gut Veränderungen in der Korezeptornutzung untersucht werden können.

In einem weiteren Schritt soll das N-Glykans g15 in diese Studien einbezogen und seine Bedeutung für die Korezeptor abhängige Infektiosität untersucht werden. All diese Ergebnisse werden im Anschluss auf die 11/24/25-Regel übertragen. Parallel zu diesen Studien soll die Bedeutung von freiem gp120 für die Infektiosität verschiedener HIV-1-Virusmutanten untersucht werden. Anhand der Ergebnisse werden wir in dieser Studie versuchen, ein Modell zur Bestimmung der spezifischen Virus Infektiosität durch Neutralisationsstudien mit freiem gp120 zu erstellen.

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden in kompetenten Bakterien des *Escherichia Coli* Stammes XL1-Blue MRF['] durchgeführt. Im Folgenden ist der Genotyp des XL1-Blue Stammes aufgeführt:

XL1-Blue MRF[']: $\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr), 173\ endA1, supE44,$
thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F['], *proAB, laqIqZΔM15Tn10* (Tetr)]

2.1.2 Ausplattieren von Bakterien

Es wurden 50 µl einer *Escherichia Coli* XL1-Blue-Glycerinstockkultur mit einer sterilen Platinimpföse in einem Verdünnungsausstrich auf einer LB-, bzw. einer LB-Ampicillin (Amp)-Platte (Ø94 mm, 16 mm hoch) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Platten wurden bei 4°C aufbewahrt und mit Parafilm verschlossen [110].

2.1.3 Kompetente Bakterien

Die Präparation von chemisch kompetenten Bakterien erfolgte nach der PEG (Polyethylenglycol)-Methode.

Laborprotokoll: Präparation kompetenter Bakterien nach der PEG-Methode

1. Eine Einzelkolonie wurde in 3 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C auf einem Rotationsinkubator (TC-7) bei 400 rpm inkubiert
2. 2 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,3-0,4 unter Schütteln inkubiert
3. Sedimentation in 50 ml Greiner Röhrchen bei 5000 rpm, 10 min, 4°C, in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5804 R)
4. Resuspendieren in 20 ml eiskaltem steril filtriertem TSS/PEG Puffer

5. Aliquotieren auf Eis in vorgekühlte 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße
6. Schock gefrieren in flüssigem Stickstoff
7. Lagerung bei -70°C

2.1.4 Transformation von Bakterien

Zu 1-2 ng aufgereinigte Plasmid-DNA, beziehungsweise zu dem jeweiligen Ligationsansatz (Kap. 2.1.12 / S. 29), wurden 100 µl kompetente Bakterien (Kap. 2.1.3 / S. 25) gegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (42°C, 40 sec). Nach Zusatz von 600 µl LB-Medium wurde 15-30 Minuten bei 37°C inkubiert, so daß Bakterien mit aufgenommenem Plasmid Zeit hatten, β -Lactamase zu exprimieren, welche den Lactamring des Ampicillins hydrolysiert und somit eine Ampicillin-Resistenz ausbildet. Anschließend wurde der komplette Ansatz auf LB-Amp-Platten (\emptyset 94 mm, 16 mm hoch) ausgestrichen und diese über Nacht (ÜN) bei 37°C inkubiert [111].

2.1.5 Einfrieren von Bakterien

Um Flüssigkulturen von Bakterien über längere Zeit aufzubewahren, wurden 0,5 Volumen der entsprechenden Bakterienkultur mit 0,5 Volumen Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

2.1.6 Extraktion von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde aus einer *E. Coli* XL1-blue-Flüssigkultur mit Hilfe des *NucleoSpin-Plasmid*-Aufreinigungskit der Firma Macherey & Nagel nach Herstellerangaben extrahiert [112].

Alle verwendeten Reagenzien sowie die Nucleospin-Säulen waren im Extraktions-Kit enthalten.

Laborprotokoll: DNA-Extraktion aus einer *E. coli* XL1-blue-Flüssigkultur

1. *E. Coli* Einzelkulturen durch Ausplattieren (Kap. 2.1.2 / S. 25) auf LB/Ampicillin Platten gewinnen
2. 4 ml dYT-Medium in Gegenwart von 100 µg/ml Ampicillin mit einer *E. Coli* Einzelkolonien beimpfen
3. Einzelkolonie über Nacht bei 37°C auf einem Rotationsinkubator (TC-7) bei 400 rpm inkubiert.
4. Sedimentieren der Bakterien 2 min bei 13000 rpm (Biofuge *pico* Heraeus-Tischzentrifuge) bei Raumtemperatur (RT)
5. Präparation Plasmid-DNA nach alkalischen Lyse durch *NucleoSpin-Plasmid*-Aufreinigungskit (Macherey&Nagel)

2.1.7 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um Nukleinsäurelösungen von Proteinen zu trennen wurde eine Phenolextraktion durchgeführt. Dazu wurde die Lösung mit einem 1:1-Gemisch Phenollösung und Chloroform versetzt und die Schritte weiter nach Protokoll durchgeführt. Abschließend wurde das entstandene DNA-Pellet luftgetrocknet und im gewünschten Puffer resuspendiert.

Laborprotokoll: Phenol/Chloroform- Extraktion

1. DNA-Pellet in 2 ml 1:1 Phenol/Chloroform auf Vortexmixer auflösen
2. 2 min bei 13000 rpm und RT zentrifugieren (Biofuge *pico* Heraeus-Tischzentrifuge)
3. Wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem 1 ml eiskaltem Chloroform überführen (entfernt Phenolreste)
4. Schritte 2 und 3 zweimal wiederholen
5. Anschließend wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß und mit 1/10 Volumen NaOAc-Lösung (pH 5,2) versetzen
6. Fällung mit 2,5 Volumen Ethanol (70%)
7. Präzipitation mit 0,6 fachen Volumen Isopropanol und 1/3 Volumen 10 M NH₄OAc-Lösung
8. 1 h bei -20°C inkubieren

9. 15 min bei 13000 rpm und RT zentrifugieren (Biofuge *pico* Heraeus-Tischzentrifuge)
10. Sediment mit 70% Ethanol waschen
11. 10 min Lufttrocknen
12. In gewünschtem Puffer aufnehmen

2.1.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäure in einer Lösung erfolgte nach der Methode von Sambrook *et al.*, 1989 [110] über die Messung der OD (optischen Dichte) bei 260 nm. Eine geeignete Verdünnung (1:25, 1:50) wurde in einer Quarzküvette in einem Photometer (Shimadzu, UV160-A) gemessen. Eine OD 260 nm von 1,0 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 40 µg/ml. Als Reinheitsgrad für die Nukleinsäuren wurde der Quotient aus OD 260nm/280nm gemessen (Ratio). Der Quotient für reine DNA beträgt 1,8, für reine RNA 2.

2.1.9 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Berechnung von Ansatzgröße sowie Inkubationszeit eines Restriktionsverdau wurde folgender Formel genutzt:

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

Eine Unit (U) entspricht dabei der Enzymmenge, die 1 µg λ-DNA in einer Stunde vollständig schneidet. Der Enzymanteil am Gesamtansatz durfte nicht mehr als 1/10 betragen, da die Enzyme in 50% Glycerin aufbewahrt werden, welches in zu hohen Konzentrationen störend bei dem Restriktionsverdau wirkt. Die verwendeten Puffer (10 fach konzentriert) konnten Tabellen der Herstellerfirmen entnommen werden, die Inkubationstemperatur wurde enzymspezifisch nach Herstellerangaben gewählt. Der Restriktionsverdau wurde durch Zugabe von 6x Elektrophoresepuffer und anschließender Elektrophorese auf einem Agarosegel (Kap. 2.2.1 / S. 33) abgestoppt oder die Enzyme nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

2.1.10 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von DNA dient dazu die Rezirkularisierung einer geschnittenen Plasmid-DNA zu verhindern. Bei diesem Vorgang wird die 5'-Phosphatgruppe entfernt [113].

Laborprotokoll: Dephosphorylierung von DNA

1. Plasmid-DNA mit 0,5 Einheiten alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) pro pmol 5'-Phosphat versetzt und im Reaktionspuffer 1 Stunde bei 37°C inkubieren
2. Hitzeinaktivierung 10 min bei 85°C

2.1.11 Kinasierung von DNA-Fragmenten

Es wurden ca. 2 µg DNA-Fragment eine Stunde bei 37°C in Gegenwart von 10 nmol ATP und 30 U T4-Polynukleotid-Kinase im Kinase-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (Kap. 2.1.7 / S. 27) oder durch Zugabe von Elektrophoresepuffer gestoppt.

2.1.12 Ligation

Die Fragment-DNA wurde in zwei- bis dreifachen molaren Überschuß zu 100-200 ng dephosphorylierter linearisierter Vektor-DNA eingesetzt. Die DNA wurde in einem 10 µl Ansatz aus Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase bei 8°C über Nacht inkubiert. Der komplette Ligationsansatz wurde anschließend in einer Transformation (Kap. 2.1.4 / S. 34) eingesetzt [114, 115].

2.1.13 Klonierung in den pNLΔenv Vektor

Da sich die Klonierung des *env*-Fragments über BstEII und BamHI in den 14 kb großen pNLΔenv Vektor besonders schwierig gestaltet, wurde ein Sonderprotokoll von Hauser verwendet [100].

Laborprotokoll: Klonierung in den pNLΔenv Vektor

1. 4 µg pNLΔenv Vektor genau 7 Minuten bei 37°C im BamHI-Puffer (Fermentas) mit jeweils 10 Units BstEII und BamHI in einem 20 µl Ansatz doppeltverdauen
2. 10 min bei 83°C hitzeinaktivieren
3. 1 min auf Eis
4. 1 Unit CIAP zugeben und genau 7 Minuten bei 37°C inkubieren
5. 10 min bei 83°C hitzeinaktivieren
6. Lagerung auf Eis für weitere Aufarbeitung (Ligation Kap. 2.1.12 / S. 38)

2.1.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Hybridisierungstemperatur für die PCR wurde berechnet, indem man für jedes GC-Paar 4°C und für jedes AT-Basenpaar 2°C im überlappendem Bereich der Primer addierte und von dieser Temperatur 3°C abzog. Die Reaktion erfolgte in einem 50 µl Ansatz in Anwesenheit von 3 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung, 5 µl eines 10x PCR-Puffers, 4 µl 25 mM dNTP-Mix, 10 U Pfu-Polymerase (für TA-Klonierungen Taq-Polymerase), 100 ng DNA und je 2 µl 10 pM Primerlösung [116].

Laborprotokoll: PCR [Mastercycler Gradient (Eppendorf)]

1. 30 sec 94°C (Aufbrechen der Doppelbindungen)
2. 30 sec auf Hybridisierungstemperatur (62°C)
3. 30 sec auf 72°C (Extension)
Schritte 1-3 für 30 Zyklen
4. Kühlen auf 4°C

Die Aufreinigung erfolgte indem der Ansatz auf ein 1%iges Agarosegel (Kap. 2.2.1 / S. 42) aufgetragen wurde. Anschließend wurden die Banden der richtigen Größen nach ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel eluiert (Kap. 2.2.2 / S. 42).

2.1.15 Nested-PCR

Um geringe Mengen an DNA zu amplifizieren, wurde eine *nested*-PCR durchgeführt. Der Unterschied zu einer normalen PCR ist, daß man erst eine normale PCR (Kap. 2.1.14 /

S. 30) durchführt und mit dem erhaltenen Amplifikat eine zweite PCR, mit Primern, welche innerhalb des Amplifikats hybridisieren, ausführt. Beide PCRs wurden nach (Kap. 2.1.14 / S. 30) durchgeführt.

2.1.16 Touchdown-PCR

Für PCRs, bei denen als Produkt mehrere Banden auftraten, wurde eine *touchdown*-PCR durchgeführt. Dabei startet man bei einer Hybridisierungstemperatur (*annealing*-Temperatur) und senkt sie pro Zyklus der PCR um einen Grad bis zu der niedrigsten gewählten Hybridisierungstemperatur (*touchdown*), welche dann für 10 oder mehr Zyklen verwendet wird. Da jeder Unterschied in der Temperatur (T_m) zwischen korrekter und inkorrekt Hybridisierung einen 4-fachen Unterschied in Produktmenge pro Grad Celsius und Zyklus ergibt, wird das korrekte Produkt über das inkorrekte angereichert. Bis auf die Änderung der *annealing* Temperatur, wurde die PCR nach (Kap. 2.1.14 / S. 30) durchgeführt.

2.1.17 Single overlap extension-PCR

Bei der *single overlap extension* (SOE)-PCR werden zwei Oligonukleotide so gewählt, daß sie in einem Bereich von mindestens 20 Nukleotiden komplementär sind. Mit diesen wird dann eine PCR nach (Kap. 2.1.14 / S. 30) durchgeführt und man erhält ein DNA-Produkt, welches beide Oligonukleotide als doppelsträngige DNA umfasst.

2.1.18 Site directed-Mutagenese

Diese Methode dient zum Austausch einzelner Basen innerhalb einer DNA-Sequenz. Dabei werden zwei komplementäre Primer, welche beide die gewünschte Mutation tragen, von etwa 20-30 Basenpaaren in einer PCR eingesetzt. Beide Primer, sowohl in Richtung 5'- als auch das 3'-Ende, müssen neben der Mutation mindestens 10 Basen komplementär zur Ausgangs-DNA sein, um eine korrekte Hybridisierung zu gewährleisten. Ausgehend von den beiden Primern werden zwei neue DNA-Stränge synthetisiert. Im Anschluss an die PCR wird die parentale DNA durch das Restriktionsenzym DpnI, welches nur methylierte und hemimethylierte DNA

(5'-Gm6ATC-3') erkennt, hydrolysiert. Diese Methode ist nur bis zu einer maximalen Größe der zu mutierenden DNA von 10 kb möglich. Die Reaktion erfolgte in einem 50 µl Ansatz in Anwesenheit von 3 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung, 5 µl eines 10x PCR-Puffers, 4 µl 25 mM dNTP-Mix, 10 U Pfu-Polymerase, 5-10 ng DNA und je 2 µl 10 pM Primerlösung.

Laborprotokoll: Positionsspezifische Mutagenese PCR [Mastercycler Gradient (Eppendorf)]

1. 30 sec 94°C (Aufbrechen der Doppelbindungen)
2. 30 sec auf Hybridisierungstemperatur (62°C)
3. 2 min/kb der zu mutierenden DNA auf 68°C (Extension)
Schritte 1-3 für 20 Zyklen
4. Kühlen auf 4°C
5. 10 U DnpI hinzu geben und 2h bei 37°C inkubieren

Anschließend wurden 5 µl des Restriktionsansatzes in kompetente Bakterien transformiert, deren Reparatursystem die doppelsträngige *nicked* DNA wieder zum zirkulären Plasmid repariert.

2.1.19 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Didesoxynucleotid-Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.*, 1992 [117]. Analog zur PCR werden in zyklischen Schritten fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotide in die entstehenden Produkte eingebaut, welche zum Abbruch der DNA-Synthese führen. Die so markierten Produkte können in einem Analysegerät mittels Kapillarelektrophorese getrennt und mit einem Laser detektiert werden. Dazu wurde das CEQ-Quickstart-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Auftrennung der Sequenzen erfolgte auf dem Beckman CEQ2000-Sequenzierer.

2.1.20 Synthetische Oligodesoxyribonucleotide

Synthetische Oligodesoxyribonucleotide wurden bei der Firma Metabion bestellt.

2.2 Elektrophorese

2.2.1 Elektrophorese von DNA-Molekülen in Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe entsprechend aufzutrennen werden 1-2%igen (w/v) Agarosegelen genutzt. Als flüssiges Medium wird TAE-Puffer verwendet. Zur Visualisierung der DNA enthielt das Agarosegel 0,25 µg/ml Ethidiumbromid, welches in die Nukleinsäuren interkaliert und sie bei UV-Licht (254 oder 300 nm) sichtbar macht. Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurden die aufzutrennenden Proben vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen 6x Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte etwa 30 Minuten bei einer Spannung von 90 V. Als DNA Größenmarker wurden je nach erwarteter Fragmentgröße die *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* oder die *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* von Fermentas eingesetzt [110].

2.2.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

2.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page). Die Trenngele (7%ige Acrylamidlösungen mit 0,18% Bisacrylamid) hatten die Dimensionen von 84 x 50 x 1,5 mm. Ihre Endkonzentration betrug 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,0024% v/v TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und 0,1% v/v SDS (Natriumdodecylsulfat). Das Sammelgel war 3%ig (mit 0,08% Bisacrylamid) und hatte eine Endkonzentration von 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,0024% TEMED und 0,1% SDS. Die Trennstrecke für die Proben durch das Sammelgel betrug 1 cm. Nach Zugabe von APS (0,01% w/v Ammoniumperoxidisulfat) und anschließendem Gießen wurde das Trenngel vorsichtig mit Wasser überschichtet, um eine gerade Oberfläche des polymerisierenden Gels zu erhalten. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Elektrophorese bei 20 mA, bis die Farbstofffront das Trenngel erreicht hatte. Man erhöhte die Stromstärke auf 30 mA und stoppte die Elektrophorese, wenn die unterste

Farbstofffront aus dem Gel lief. Als Marker für die Proteingrößen wurde ein geeignetes Proteingemisch als Größenstandard aufgetragen, bei Gelen für Westernblots wurde ein *Prestained* Marker verwendet [118].

2.2.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Bei der *Coomassie*-Färbung wird nach der Methode von Neuhoff *et al.*, (1988) [119] *Coomassie Blue G250* kolloidal in die Proteinbanden eingelagert. Zur Visualisierung wurde das *Colloidal-Blue*-Staining-Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Aufbewahrung wurde das Gel auch getrocknet.

2.3 Zellkultur & Proteinbiochemische Methoden

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

2.3.1 Verwendete Zellen

Tab. 1: Verwendete Zellen, ihre Charakteristika und die verwendeten Medien

Zelllinie	Charakteristika	Medium	Selektionsmedium
HelaP4	humane Zervixkarzinom Zelllinie, stabil transfiziert mit CD4, CXCR4, CCR5	DMEM, 5% FKS, Penicillin/ Streptomycin (50 µg/ml)	500 µg/ml G418 (CD4), 1 µg/ml Puromycin (Korezeptoren)
Ghost (nur CD4) Ghost CCR5, Ghost CXCR4,	humane Osteosarkomzelllinie, stabil transfiziert mit CD4, GFP-Reportergen und jeweiligen Korezeptor,	DMEM, 5% FKS, Penicillin/ Streptomycin (50 µg/ml)	500 µg/ml G418 (CD4), 1 µg/ml Puromycin (Korezeptoren), 100 µg/ml Hygromycin (GFP-Reportergen)

U87 CCR5, U87 CXCR4	Humane Gliomzelllinie, stabil transfiziert mit CD4 und jeweiligen Korezeptor	DMEM, 10% FKS, Penicillin/ Streptomycin (50 µg/ml)	500 µg/ml G418 (CD4), 1 µg/ml Puromycin (Korezeptoren)
TZM-bl	humane Zervixkarzinom Zelllinie, stabil transfiziert mit CD4, CXCR4, CCR5 und β- Gal Reportergen.	DMEM, 5% FKS, Penicillin/ Streptomycin (50 µg/ml)	keine Selektion nötig

2.3.2 Kultivierung von Zellen

Die adhärenenten Zelllinien wurden in geeigneten Zellkulturschalen (Sarstedt) in DMEM supplementiert mit FKS (Tab. 1) im 37°C-Inkubationsschrank (Heraeus, BBD 6220) in 5%iger CO₂-Atmosphäre mit maximaler Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage, je nach Zelldichte, trypsinisiert und verdünnt. Alle zwei Monate wurden die Zellen auf ihre Rezeptoren, Korezeptoren und Reportergene mit dem geeigneten Selektionsmedium selektioniert und in neue Kulturschalen überführt.

2.3.3 Trypsinieren von adhärenenten Zellen

Die Zellen wurden zweimal mit sterilem PBS gewaschen und anschließend 3-5 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Damit wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst. Von der entstandenen Suspension wurde 1 ml in 9 ml DMEM (5% FKS) in eine neuen Zellkulturschale gegeben.

2.3.4 Lagerung von Zellen

Um Zelllinienstocks zu erstellen wurden Zellen bei -70°C eingefroren. Alternativ ist auch eine Lagerung in flüssigem Stickstoff möglich.

Laborprotokoll: Lagerung von Zellen

1. Zellen trypsinieren (Kap. 2.2.3 / S. 43) ohne die Suspension zu verdünnen
2. Sedimentation bei RT und 1500 U/min in Tischzentrifuge (Eppendorf, Centrifuge 5804R)
3. Sediment zweimal mit sterilem PBS waschen

4. Sedimentierte Zellen in 1/1 vol. FKS und einer 20%igen DMSO-Lösung (DMSO in PBS) aufnehmen
5. 0,5 ml der Zellsuspension in 1 ml vorgekühlte Cryoröhrchen überführen
6. 10 min Inkubation auf Eis
7. 10 min Inkubation bei -20°C
8. Lagerung bei -70°C Zellen sind ca. ½ Jahr haltbar

2.3.5 Bestimmung der Zellzahl in einer Zellkultur

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

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

2.3.6 Transfektion von Zellen

Die Transfektion von eukaryontischen Zellen erfolgte mit dem Fugene 6 Transfektionsreagenz von Roche.

Laborprotokoll: Transfektion von Zellen

Erster Tag

1. 3000-5000 Zellen/Well wurden in Kulturgefäße mit 6 Wells (je 9,4 cm² Fläche) in 2 ml Medium/Well ausgebracht
2. 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂

Zweiter Tag

1. Die kultivierten Zellen sollen eine Konfluenz von 60-80% aufweisen.
2. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) wurden 100 µl DMEM-Medium vorgelegt

3. 6 µl Fugene6 Transfektionsreagenz hinzugeben
4. 5 min bei RT inkubieren
5. 1 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA [z.B. pGP-V3-B-Vektoren, pNLΔenv-Varianten] hinzugeben
6. 20 min bei RT inkubieren
7. Je ein Transfektionsansatz in jeweils ein Well der vorbereiteten Zellen gut verteilt tropfen
8. 4 h bei 37°C, 5% CO₂ bei maximaler Luftfeuchtigkeit inkubieren
9. Medium abnehmen und durch frisches DMEM, supplementiert mit 5% FKS ersetzen
10. Bei Proteinexpression 48 h, bei Provirus-Transfektionen 64 h bei 37°C, 5% CO₂ bei maximaler Luftfeuchtigkeit inkubiert

2.3.7 Lyse von Zellen

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

2.3.8 Immunopräzipitation von gp120

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

sedimentiert, zweimal in sterilem PBS gewaschen und in 30 µl Laemmli-Puffer aufgenommen, resuspendiert und für 10 Minuten bei 90°C inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese (für radioaktiv markierte Proteine) (Kap. 2.2.3 / S. 33).

Bei der Immunpräzipitation aus lysierten Zellen wurden die Zellen nach der Lyse (Kap. 2.3.7 / S. 37) mit 600 µl TNA-Puffer versetzt. Zu dem Ansatz wurden 50 µl einer 10%igen Protein-A-*Staphylococcus-Aureus*-Zellsuspension (Sigma) hinzugegeben und 3 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 5000 rpm (5 Minuten, Heraeus Biofuge *pico*) sedimentiert und der Überstand mit 5 µg polyklonalen gp120 (Ziege, Acris)-Antikörper versetzt. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht erfolgte die Präzipitation mit 50 µl Protein-A-Agarosesuspension (Sigma) und anschließender Inkubation bei 4°C für 4 Stunden. Die Protein-A-Agarose *Beads* wurden sedimentiert (5000 rpm, 5 Minuten, Heraeus Biofuge *pico*), dreimal mit TNA-Puffer gewaschen und in 30 µl Laemmli-Puffer aufgenommen, resuspendiert und für 10 Minuten bei 90°C inkubiert.

2.3.9 Dot-Blot zur Quantifizierung von gp120

Die Quantifizierung von gp120 im Zellkulturüberstand erfolgte über einen Dot-Blot. Dafür wurde auf einer Nitrozellulose-Membran je 1µl Zellkulturüberstand, 1µl Medium und je 1µl einer gp120_{III B} Eichlösung in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen und nach Protokoll bearbeitet. Die anschließende Detektion erfolgte mittels BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate p-toluidine Salz)-/NBT (“*Nitro-Blue Tetrazolium Chloride*”)-Substratlösung. Die Quantifizierung über ImageJ.

Laborprotokoll:

- 1 Auftragen von je 1µl Zellkulturüberstand, 1µl Medium und je 1µl einer gp120_{III B} Eichlösung mit den Konzentrationen, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 63 ng/ml, 35 ng/ml und 15 ng/ml auf eine Nitrozellulose-Membran
- 2 1 h mit 5% FKS in PBS-T bei RT absättigen
- 3 Über Nacht bei 4°C, in einer 1:1000 Verdünnung eines anti-gp120-AP (alkalische Phosphatase)-konjugierten Antikörpers in PBS-T mit 5% FKS inkubieren

- 4 3x mit PBS-T für 15 Minuten bei RT waschen
- 5 1x mit PBS für 15 Minuten bei RT waschen
- 6 Detektion des gebundenen Antikörpers mittels BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyolphosphate p-toluidine Salz)- /NBT (“Nitro-Blue Tetrazolium Chloride”)-Substratlösung
- 7 Quantifizierung mit ImageJ

2.4 Virologische Methoden

2.4.1 Anzucht von Viren

Um Viren zu gewinnen, wurden HeLaP4-Zellen mit verschiedenen pNL Δ env-Varianten transfiziert (Kap. 2.3.6 / S. 36). Der Überstand wurde nach 3 Tagen geerntet und in 200 μ l Aliquots bei -70°C bis zu drei Monaten gelagert. Für *single round* Infektionen (Kap. 2.4.4 / S. 52) wurden mit einem Aliquot die ffu (*focus forming units*) pro μ l Virusüberstand bestimmt und für Replikationskinetiken (Kap. 2.4.2) die Virusmenge mittels eines p24-ELISAs (Kap. 2.4.3 / S. 40) quantifiziert.

2.4.2 Replikationskinetik

Die Analyse der Replikationskinetik erfolgte in 96er-Mikrotiterplatten. Alle Versuche wurden jeweils in 20 einzelnen Wells durchgeführt.

Laborprotokoll: Replikationskinetik

Erster Tag:

1. 3×10^3 U87-Zellen/Well mit dem zu Untersuchenden Korezeptor auf 96er-Mikrotiterplatten aussähen
2. 20-24 Stunden Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit

Zweiter Tag:

1. Infektion der Zellen mit 5 ng p24/ml Virusüberstand/Well
2. Vier Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit inkubieren

3. Überstand abnehmen und Zellen mit 100 µl/Well sterilfiltriertem PBS vorsichtig waschen
4. 200 µl frisches DMEM/5%FKS-Medium pro Well hinzugeben Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und maximaler Luftfeuchtigkeit für 0, 3, 6, 9 und 12 Tage
5. Bestimmung Viruslast im Überstand mittels p24-ELISA (Kap. 2.4.3)

2.4.3 p24-Antigen Nachweis mittels ELISA

Um die Viruspartikel im Zellkulturüberstand zu quantifizieren, wurde die Methode von Neurath *et al.*, (1985) [120] genutzt. Dabei wurde das Kapsid-Protein p24, welches proportional zur Virusmenge ist, im Überstand nachgewiesen. Dafür wurde eine 96er-MAXIsorb-Platte (Nunc, USA) über Nacht bei 4°C mit 100 µl eines p24-Antikörpers (1 mg/ml, D7320, Biochrom) im *coating*-Puffer (10 µg/ml Natriumhydrogencarbonat, pH 9,6) beschichtet. Anschließend wurden die Wells dreimal mit PBS-T gewaschen und die freien Bindungsstellen mit 300 µl Blockpuffer (5% FKS in PBS-T) abgesättigt, um unspezifische Antigenbindung zu verhindern. Nach einer Inkubation über Nacht bei 8°C wurden die Wells erneut dreimal mit PBS-T gewaschen und je 100 µl Viruskulturüberstände, welche vorher mit 0,1% Empigen inaktiviert wurden, pro Well zugegeben. Die Bindung des p24-Antigens erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Wells wurden dreimal mit PBS-T gewaschen und mit 100 µl anti-HIV Kaninchenserum (1:2000 im Blockpuffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei erneuten Waschschrritten mit PBS-T wurden 100 µl eines alkalische-Phosphatase-konjugierten anti-Kaninchen IgG Antikörpers (1:2000 im Blockpuffer, Sigma) pro Well hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden zweimal mit PBS-T gewaschen und einmal mit zweifach destilliertem H₂O. Die Detektion erfolgte mit 100 µl einer Nitrophenylphosphat-Substrat Lösung (*Alkaline Phosphatase Substrate Kit*, BioRad). Die Farbreaktion wurde nach fünf Minuten mit 100 µl 0,4 M NaOH gestoppt und die OD bei 405 nm ausgewertet. Der p24-Gehalt wurde mittels einer Standardkurve, welche sich aus einer halblogarithmischen Verdünnung von standardisierten p24-Protein ergab, ermittelt.

2.4.4 Single Round-Infektion

In einer 96er-Mikrotiterplatte wurden 3×10^3 Zellen (Hela-P4 für Synzytientest, TZM-bl oder Ghost für Kompletionsanalysen) pro Well ausgesät und 16-20 Stunden im Inkubationsschrank bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden mit 100 ffu (auf TZM-bl-Zellen, 5-10 ng/ml p24 für Synzytien-Test) Virusüberstand infiziert und 48 Stunden im 37°C Inkubationsschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Synzytientest (Kap. 2.4.5), β -Galactosidase-Reporterger-Nachweis (Kap. 2.4.7 / S. 44) oder durch Messung der GFP-Fluoreszenz anhand des aktivierten GFP-Reportergerens (Kap. 2.4.8 / S. 44) [121].

2.4.5 Virustitration und Bestimmung der TCID₅₀ nach Reed & Muench

Die „50%-Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) ermöglicht die Quantifizierung der Infektiosität eines Überstandes und gibt die Verdünnungsstufe an, bei der innerhalb der definierten Zeit 50% der Ansätze infiziert werden. Durch sie lassen sich unterschiedliche Viren oder verschiedene Stämme eines Virus direkt miteinander vergleichen. Sie wird nach der Methode von Reed und Muench [122] (Tab. 2 / S. 42) bestimmt. Im Verlauf wird Ihre Berechnung an einem Beispiel vorgestellt.

Laborprotokoll:

1. 5 ng HIV-1-Virusüberstand 1:2 mit DMEM-Medium bei einem Gesamtvolumen von 100 μ l vorverdünnen
2. Fortlaufende Verdünnung 1:4 mit DMEM-Medium in parallelen Reihen
3. 100 μ l je Well auf 96er-Mikrotiterplatten auf der TZM-bl-Zellen in 100 μ l DMEM-5% FKS vorinkubiert sind (Kap. 2.4.4 / S. 41). Endvolumen 200 μ l
4. 20 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubieren
5. 125 μ l Überstand abnehmen und durch 125 μ l DMEM ersetzen
6. 96er-Zellkulturplatte zentrifugieren [1200 rpm, 2 min, RT (Sigma-GS6R)]
7. Schritte 5/6 dreimal wiederholen
8. Zugabe von 125 μ l je Well DMEM-5% FKS-Medium
9. Inkubation 4 Tage bei 37°C, 5% CO₂
10. Zentrifugation der 96er-Mikrotiterplatte (siehe Punkt 6)

11. 100 µl Überstand abnehmen und durch 100 µl DMEM- 5% FKS-Medium ersetzen.
Der Überstand wird in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und bei - 20°C gelagert
12. Inkubation 4 Tage bei 37°C, 5% CO₂
13. Zentrifugation der 96er-Mikrotiterplatte (siehe 6)
14. 100 µl Überstand in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführen und bei - 20°C lagern
15. Bestimmung der Viruslast mit einem p24-Antigen-ELISA (Kap. 2.4.3 / S. 51)

Für jeden Virusüberstand wurde in einer sechsfachen Verdünnungsreihe die Verdünnung bestimmt, bei der eine Infektion der jeweiligen Zellkultur nach 48 h nachzuweisen war. Die Berechnung wird an folgendem Beispiel erläutert:

Tab. 2: Beispiel Berechnung der TCID₅₀

Ansatz	Verdünnung				
	5 ⁻⁴	5 ⁻⁵	5 ⁻⁶	5 ⁻⁷	5 ⁻⁸
1	x	x	x	-	-
2	x	x	x	-	-
3	x	x	x	x	-
4	x	x	x	x	-
5	x	x	x	-	-
6	x	x	x	-	-

(X) = Infektion, (-) = Keine Infektion

Bis zu einer Verdünnung des Virusüberstandes von 5⁻⁶ ist in allen sechs Ansätzen eine Infektion zu detektieren, bei 5⁻⁷ nur noch bei zwei Ansätzen und bei 5⁻⁸ in keinem der Ansätze mehr. Die Berechnung der TCID₅₀ erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$$\log \text{TCID}_{50} = \log 1,0 - \log \text{int} * (S-0,5)$$

Dabei ist: $\log 1,0 = \log$ der höchsten Verdünnung mit $R = 1,0$ ($R = \text{Reaktionsrate}$)

$\log \text{int} = \log$ des Verdünnungsintervalls

$S = \text{Summe der Reaktionsraten}$

Die Reaktionsraten geben den Anteil der infizierten Ansätze einer Verdünnungsstufe von der Gesamtzahl der Ansätze an. In dem obigen Beispiel sind die Reaktionsraten $R = 1,0$ (6/6) für die Verdünnung 5^{-6} , $R = 0,33$ (2/6) für die Verdünnung 5^{-7} und $R = 0$ (0/6) für die Verdünnung 5^{-8} . Die Summe der Reaktionsraten S beträgt damit 1,33. Der Wert für $\log 1,0$ ist: $(\log 5^{-6}) = -4,19$, der Wert für \log_{int} ist bei dem gewählten Verdünnungsfaktor $5 = \log 5 = 0,699$

Somit sind alle Unbekannten der obigen Gleichung bestimmt. Durch Einsetzen in die Formel erhält man:

$$\log \text{TCID}_{50} = -4,19 - 0,699 * (1,33-0,5)$$

$$\log \text{TCID}_{50} = -4,77$$

Die TCID_{50} des Virusüberstandes aus dem obigen Beispiel beträgt somit $1,7 * 10^{-5}$.

2.4.6 Synzytientest

Beim Synzytien-Test nutzt man aus, daß infizierte Zellen, die Virusproteine auf ihrer Oberfläche exprimieren, untereinander fusionieren können. Dadurch entstehen mehrkernige Riesenzellen (Synzytien). Oft korrespondiert diese Eigenschaft mit der Infektiosität des Virus und immer mit der Fähigkeit des gp120, mit CD4 und Korezeptoren zu interagieren. Für den Synzytientest wurden HeLaP4-Zellen eingesetzt und in einer *single round*-Infektion (Kap. 2.4.4 / S. 41) infiziert. Obwohl die Synzytien nach 72 Stunden schon unter dem Lichtmikroskop zu erkennen waren, wurden die Synzytien durch einen Hemacolor® Schnellfärbetest von Merck visualisiert. Durch die Schnellfärbung wurden die Zellkerne blau angefärbt. Dadurch konnten die Synzytien auf einfache Weise visualisiert und fotografiert werden.

Laborprotokoll: Synzytien Schnellfärbung

1. Zellen 2 min mit Methanol fixieren
2. Methanol vorsichtig abnehmen

3. 100 µl Lösung 2 (Farbstoff rot) pro Well hinzugeben
4. 2 min bei RT inkubieren
5. Färbelösung vorsichtig abnehmen
6. 100 µl Lösung 3 (Farbstoff blau) pro Well hinzugeben
7. 2 min bei RT inkubieren
8. Färbelösung vorsichtig abnehmen
9. Zweimal mit sterilfiltriertem PBS waschen

2.4.7 Kompetitionsanalysen, Inhibitionsanalysen

Für Kompetitions- und Inhibitionsanalysen von Viren in Anwesenheit von Chemokinen, Inhibitoren und freiem gp120 wurde eine *single round*-Infektion (Kap. 2.4.4 / S. 41) von TZM-bl- oder Ghost-Zellen durchgeführt. Dabei wurde die zu testende Substanz in den gewünschten Konzentrationen während der Infektion zugesetzt. Je nach Versuch wurden teilweise die Zellen präinkubiert, teilweise die Viren oder die Zellen simultan mit Virus und Inhibitor/Kompetitor infiziert. Sollten Adsorptionsfaktoren ausgeschlossen werden, wurden die Zellen mit 2 µg/ml des Polykations Polybrene (in DMEM, 5% FKS) für eine Stunde präinkubiert und anschließend mit sterilem PBS gewaschen. Nach einem Waschschrift mit sterilem PBS wurde die *single round*-Infektion durchgeführt.

2.4.8 β-Galactosidase-Reporter-gen-Nachweis

Die TZM-bl-Zellen besitzen ein β-Galactosidase-Reporter-Gen unter der Kontrolle des HIV-1-Tat-Promoters. Wird β-Galactosidase in infizierten Zellen exprimiert, sind diese in der Lage, die glycosidische Bindung von X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) zu schneiden, was eine Dimerisierung und Oxydation zur Folge hat, die zur Bildung eines unlöslichen blauen Farbstoffes führt.

Laborprotokoll: Nachweis des β-Galactosidase-Reportergens

1. Zunächst die 100 µl/Well DMEM-Medium vorsichtig abnehmen
2. Zweimal vorsichtig waschen mit 100 µl/Well sterilfiltriertem PBS
3. Fixierung der Zellen mit 100 µl/Well 2%igem Formaldehyd

4. 10 min bei RT inkubieren
5. Fixierlösung vorsichtig abnehmen
6. Zweimal vorsichtig waschen mit 100 µl/Well sterilfiltriertem PBS
7. Färbung mit 100 µl Färbelösung (PBS mit 0,5 mg/ml X-Gal, 3 mM $K_3Fe(CN)_6$, 3 mM $K_4Fe(CN)_6$, 1 mM $MgCl_2$) bei 37°C für 8 h
8. Auszählen der blau gefärbten Zellen unter einem Lichtmikroskop

2.4.9 Der GFP-Reporter-gen-Nachweis

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

2.4.10 Detektion HIV-1 infizierter Zellen durch Immunfärbung

Zur Detektion der infizierten Zellen wurde intrazelluläres p24-Antigen nachgewiesen [123]. Die Zellen wurden mit -20°C kaltem Methanol/Aceton 1:1 fixiert und mit PBS/1% FKS gewaschen. Die Detektion des p24 erfolgte mit einem monoklonalen anti-p24-Antikörper (Aalto; 1:2000 in PBS/1% FKS). Es wurden 200 µl der Antikörperlösung pro Well einer 96er-Mikrotiterplatte eingesetzt. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert und zweimal mit PBS/1% FKS gewaschen. Als Detektionsantikörper wurde ein β -Galaktosidase-konjugierter anti-Maus-Antikörper (Southern Biotech) verwendet. Der Ansatz wurde 1 Stunde inkubiert (37°C) und anschließend zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Substratreaktion erfolgte durch Zugabe einer X-Gal-Färbelösung (Kap. 2.4.8 / S. 44).

3 Material

3.1 Chemikalien und Enzyme

Adenosintriphosphat	Boehringer (Mannheim)
Acrylamid, Gel 30, Gel 40	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Life Technologies (Karlsruhe)
Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Alkaline Phosphatase Substrat Kit	BioRad (München)
Ammoniumpersulfat	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
CEQ2000 DTCS Quickstart Kit	Beckman Coulters
Chloroform	Serva (Heidelberg)
Chondroitinase	Sigma (Deisenhofen)
CIAP	MBI Fermentas
<i>Colloidal-Blue-Staining-Kit</i>	Invitrogen (Darmstadt)
Diethylformamid	Sigma (Deisenhofen)
Desoxyribonucleosidtriphosphate	MBI Fermentas
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
DMEM	Life Technologies (Karlsruhe)
DMEM, Cystein- und Methionin-frei	Life Technologies (Karlsruhe)
Dithiothreitol	Sigma (Deisenhofen)
Empigen BBTM, 30 % (v/v)	Calbiochem (Schwalbach)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol (96%)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Formamid	Sigma (Deisenhofen)
Fötale Kälberserum	Biochrom (Gründau)
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche (Mannheim)
Glukose	Merck (Darmstadt)

Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Sigma (Deisenhofen)
Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
Hemacolor® Schnellfärbetest	Merck (Darmstadt)
Heparinase I und III	Sigma (Deisenhofen)
HEPES	Biomol (Hamburg)
Hygromycin B	Life Technologies (Karlsruhe)
IPTG	Applichem (Darmstadt)
Isopropanol (96 %)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Kalium-3-Ferrocyanat	Merck (Darmstadt)
Kalium-4-Ferrocyanat	Merck (Darmstadt)
Klenow-Fragment (DNA Polymerase I)	MBI Fermentas
LB-Medium	Sigma (Deisenhofen)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Methanol (96%)	Merck (Darmstadt)
Methionin und Cystein, [35S]-markiert	Amersham Pharmacia
100 bp Molekulargewichtstandard GenRuler™	MBI Fermentas
1 kb Molekulargewichtstandard GenRuler™	MBI Fermentas
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
Penicillin	Life Technologies (Karlsruhe)
Pfu DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Phenol/Chloroform	Sigma (Deisenhofen)
Polybrene®	Sigma (Deisenhofen)

Prestained Marker	MBI Fermentas
Puromycin	Sigma (Deisenhofen)
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
Salzsäure, 37% (v/v)	Sigma (Deisenhofen)
Streptomycin	Life Technologies (Karlsruhe)
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
Tetramethylethyldiamin	Sigma (Deisenhofen)
Tetramethylethyldiamin	Sigma (Deisenhofen)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
Trypsin/EDTA	Life Technologies (Karlsruhe)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Trypton	Life Technologies (Karlsruhe)
Tween-20	Serva (Heidelberg)
X-Gal	Applichem (Darmstadt)
Xylencyanol	Serva (Heidelberg)

3.2 Antikörper

Anti-HIV-1 p24 D7320 (Schaf)	Biochrom, Berlin
Anti-gp120-polyklonal (Ziege)	Acris GmbH, Herford
Anti-gp120-D7324 (Schaf), <i>Alkaline Phosphatase</i> konjugiert	Aalto, (Dublin)
Anti-goat-IgG (Kaninchen)	Aalto, (Dublin)
Peroxidase konjugiert	Sigma (Deisenhofen)
Anti-gp120-mAb	Sigma (Deisenhofen)
Anti-CXCR4, anti-CCR5	Aids-Reagent NIBSC, London
	Aids-Reagent NIBSC, London

3.3 Verwendete Puffer und Medien

TEA-Puffer (50x)	2 mM Tris-Base, 0,25 M Essigsäure, 0,05 M EDTA
PBS-Puffer (50x)	120 mM NaCl, 17 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBS-T	PBS, 0,05% Tween 20
PBS-M	PBS, 50 mM MgCl ₂
Blockpuffer	PBS-T, 5% FKS
<i>Coating</i> -Puffer	150 mM Na ₂ HCO ₃ , pH 8,5
TSS/PEG	LB Medium, 10% w/v PEG 3350, 5% v/v DMSO, 50 mM MgCl ₂ , pH 6,5, sterilfiltriert
DNA-Ladepuffer	0,09% Bromphenolblau, 0,09% Xylencyanol, 60% Glycerol, 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 MgCl ₂
BCIP/NBT Substrat	PBS, 0,5 mg/ml X-Gal, 3 mM K ₃ Fe(CN) ₆ , 3 mM K ₄ Fe(CN) ₆ , 1 mM MgCl ₂
Zelllyse-Puffer	50 mM Tris-Cl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5 % SDS
TNA-Puffer	50 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,6 % Triton-X, 1,24 mg/ml BSA
Transferpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 20% v/v Ethanol (oder Methanol)

SDS-Page-Elektrophoresepuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 0,1% SDS
Laemmli-Probenpuffer	5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 200 mM DTT, 5% SDS, 20% Glycerin, 0,03% Pyronin Y
dYT-Medium	16 g/l Bacto-Pepton, 10 g/l Hefe Extrakt, 5 g/l NaCl, pH 7
LB-Medium	10 g/l Bacto-Pepton, 5 g/l Hefe Extrakt, 5g/l NaCl, pH 7 autoklaviert
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/ml Bactoagar, pH 7, autoklaviert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose</i>

3.4 Geräte

Begasungswärmeschrank	Heraeus (Hamburg)
Blot-Anlage, Blot-Mini-V8.10	BioRad (München)
Centromat® BS-T, Orbitalinkubator	Braun (Melsungen)
CEQTM2000 DNA-Analyse-System	Beckman Coulters
Elektrophoreseanlage Mini Protean II	BioRad (München)
Elektrophoreseanlage HORIZON 58	Hoefern Pharmacia (Bethesda, USA)
Elektrophoreseanlage SE660	Hoefern Pharmacia (Bethesda, USA)
Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DMLS)	Leica-Microsystems GmbH (Wetzlar)
Horizontalschüttler KL2	Wilke und Witzler (Hamburg)
KingFisher Thermometer	LabSystems (Egelsbach)
Laborwaage	Satorius (Göttingen)
Lichtmikroskop	Leitz (Wetzlar)
Magnetrührer, heizbar	Ikamag (Staufen)
MAXIsorb-Platte	Nalge Nunc International (USA)

Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	Brand (Wertheim)
pH-Meter	Schott (Mainz)
Pipetten	Gilson
Pipetten	Gilson
Photometer, Lambda E	MWG-Biotech (Ebersberg)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Quarzküvetten	Hellma (Mühlheim)
Rotoren, HFA22.50, HFA14.290	Heraeus (Hamburg)
Rotor, 5094A	Hettich (Tuttlingen)
Rotor, A-4-44	Eppendorf (Hamburg)
Spektrophotometer UV-160A	Shimadzu (Hamburg)
Thermocycler, Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer, compact	Eppendorf (Hamburg)
UV-Geldokumentationsgerät	Kodak Deutschland
Videodokumentation UP-895 CE	Sony Deutschland
Vortex Gene 2	Bender und Hobein (Zürich)
Wärmeschrank, Modell 600	Memmert (Schwabach)
Wasserbad GFL1003	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge, Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge ROTANTA/R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Superfuge 22	Heraeus (Hamburg)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)

3.5 Aminosäuren

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

3.6 Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
APOBEC3	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BamH1	Bacillus amyloliquefaciens H enzyme I
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine Salz/Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
bp	Basenpaar
BstEII	Bacillus stearotherophilus enzyme II
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CD4	Cluster of differentiation 4
cDNA	complementary Desoxyribonucleinsäure
CIAP	Cellular apoptosis inhibiting protein
CXCR4	CXC-Motiv für Chemokinrezeptor 4
CCR5	CC-Motiv für Chemokinrezeptor 5
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent Assay</i>
<i>Env</i>	<i>Env-Gen des HIV</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii – und andere</i>
ffu	focus forming units
FKS	Fötales Kälber Serum

g	Gramm
Gag	Gruppenspezifisches Antigen des HIV
Gp	Glykoprotein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ 1
HR	<i>heptad-repeats</i>
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
IN	Integrase
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
l	Liter
LB-Medium	Lysogeny broth Medium
m	Milli
μ	Mikro
MHC-1	<i>Major Histocompatibility Complex 1</i>
min	Minute
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
mol	Molar
NC	Nucleokapsid Protein
NKT	Natürliche Killer T-Zellen
n	Nano
NSI	Nicht Synzytium induzierend
OD	Optische Dichte
p	Pico
PBMC	Peripheral blood mononuclear Cell
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfu-Polymerase	<i>Pyrococcus furiosus</i> -Polymerase
Pol	Polymerase-Gen des HIV
PRI	Retrovirale Protease
R5-trop	Den Chemokinrezeptor CCR5 nutzend
R5/X4-trop	Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 nutzend
RANTES	Chemokin, <i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>

ReT	Reverse Transkriptase
Rev	<i>Regulator of viral expression</i>
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RRE	<i>Rev response element</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S.	Seite
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel elektrophoresis
SI	Synzytium induzierend
Tab.	Tabelle
Tag-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
TAT	<i>Transaktivator of transkription</i>
TCID ₅₀	<i>Tissue Culture Infection Dose</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIM5 α	<i>Tripartite motif-containing protein 5</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
V1-V5	Variable Regionen 1-5 des gp120
Vif	<i>Viral infectivity factor</i>
Vpr	<i>Viral protein r</i>
Vpu	<i>Viral protein u</i>
X4-trop	Den Chemokinrezeptor CXCR4 nutzend
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-idolyl- β -D-Galaktopyranosid
z. B.	zum Beispiel

3.7 Oligonukleotide

Alle Aminosäureaustausche wurden an den V3-Loop-Positionen 304-306 (9-11) durchgeführt.

5'-TATAAAAAAAAAAGATAACTCTAG-3'	952 Position R304K/R306K
5'-CTAGAGTTATCTTTTTTTTATA-3'	952 Position R304K/R306K reverse
5'-CAACAATATAAAAAACGTATAA-3'	952 Position R304K
5'-TTATACGTTTTTTTATATTGTTG-3'	952 Position R304K reverse
5'-CAATATAAGAAGACGTATAACTC-3'	952 Position K305R
5'-GAGTTATACGTCTTCTTATATTG-3'	952 Position K305R reverse
5'-CAACAACAATACAAGAAAACGTA-3'	952+g15
5'-GTTGTTGTTATGTTCTTTTGCAT-3'	952+g15 reverse
5'-CAACAACAATACAAGAAGACGTA-3'	952+g15 _{RRR}
5'-GTTGTTGTTATGTTCTTCTGCAT-3'	952+g15 _{RRR} reverse
5'-CAATACAAGAAGAAAGATAACTC-3'	952+g15 _{RKK}
5'-GAGTTATCTTTCTTCTTGTATTG-3'	952+g15 _{RKK} reverse
5'-CAACAACAATACAAAAGACGTA-3'	952+g15 _{KRR}
5'-TACGTCTTTTTGTATTGTTGTTG-3'	952+g15 _{KRR} reverse
5'-CAACAACAATACAAGAAAAAGA-3'	952+g15 _{RKK}
5'-GTTGTTGTTATGTTCTTTTTTCT-3'	952+g15 _{RKK} reverse
5'-CAACAACAATACAAAAGAAAGA-3'	952+g15 _{KRK}
5'-GTTGTTGTTATGTTTTTCTTTCT-3'	952+g15 _{KRK} reverse
5'-CAACAACAATACAAAAAACGTA-3'	952+g15 _{KKR}

5'-GTTGTTGTTATGTTTTTTTGCAT-3	952+g15 _{KKR} reverse
5'-CAACAACAATACAAAAAAAAAAGA-3	952+g15 _{KKK}
5'-GTTGTTGTTATGTTTTTTTCT-3	952+g15 _{KKK} reverse
5'-CAACAATACAAGCAGACGTATAA-3	952+g15 _{SRR}
5'-TTATACGTCTGCTTGTATTGTTG-3	952+g15 _{SRR} reverse
5'-CAACAATACAAGTAAACGTATAA-3	952+g15 _{SKR}
5'-TTATACGTTTACTTGTATTGTTG-3	952+g15 _{SKR} reverse
5'-CAACAATACAAGTAAAAAGATAA-3	952+g15 _{SKK}
5'-TTATCTTTTACTTGTATTGTTG-3	952+g15 _{SKK} reverse
5'-CAACAACAATACAAGAAAAAGTA-3	952+g15 _{RKS}
5'-GTTGTTGTTATGTTCTTTTTCAT-3	952+g15 _{RKS} reverse
5'-CAATACAAGAACACGTATAACTC-3	952+g15 _{RTR}
5'-GAGTTATACGTGTTCTTGTATTG-3	952+g15 _{RTR} reverse
5'-CAATACAAAAACAAAGATAACTC-3	952+g15 _{KTK}
5'-GAGTTATCTTTGTTTTTTGTATTG-3	952+g15 _{KTK} reverse
5'-TACAAGAAGACAAATAACTCTAG-3	952+g15 _{RRQ}
5'-CTAGAGTTATTTGTCTTCTTGTA-3	952+g15 _{RRQ} reverse
5'-TACAAAAAACAAATAACTCTAG-3	952+g15 _{KKQ}
5'-CTAGAGTTATTTGTTTTTTTGTA-3	952+g15 _{KKQ} reverse
5'-TACAAAAAAAACATAACTCTAG-3	952+g15 _{KKN}
5'-CTAGAGTTATGTTTTTTTTTGTA-3	952+g15 _{KKN} reverse

5'-CAACAACAATATAAGAAGACGTA-3	952-g15 _{RRR}
5'-GTTGTTGTTATATTCTTCTGCAT-3	952-g15 _{RRR} reverse
5'-CAATATAAGAAGAAAGATAACTC-3	952-g15 _{RKK}
5'-GAGTTATCTTTCTTCTTATATTG-3	952-g15 _{RKK} reverse
5'-CAACAACAATATAAAAAGACGTA-3	952-g15 _{KRR}
5'-TACGTCTTTTTATATTGTTGTTG-3	952-g15 _{KRR} reverse
5'-CAACAACAATATAAGAAAAAAGA-3	952-g15 _{RKK}
5'-GTTGTTGTTATATTCTTTTTTCT-3	952-g15 _{RKK} reverse
5'-CAACAACAATATAAAAAGAAAGA-3	952-g15 _{KRK}
5'-GTTGTTGTTATATTTTTCTTTCT-3	952-g15 _{KRK} reverse
5'-CAACAACAATATAAAAAAACGTA-3	952-g15 _{KKR}
5'-GTTGTTGTTATATTTTTTTGCAT-3	952-g15 _{KKR} reverse
5'-CAACAACAATATAAAAAAAAAGA-3	952-g15 _{KKK}
5'-GTTGTTGTTATATTTTTTTTTCT-3	952-g15 _{KKK} reverse
5'-CAACAATATAAGCAGACGTATAA-3	952-g15 _{SRR}
5'-TTATACGTCTGCTTATATTGTTG-3	952-g15 _{SRR} reverse
5'-CAACAATATAAGTAAACGTATAA-3	952-g15 _{SKR}
5'-TTATACGTTTACTTATATTGTTG-3	952-g15 _{SKR} reverse
5'-CAACAATATAAGTAAAAAGATAA-3	952-g15 _{SKK}
5'-TTATCTTTTTACTTATATTGTTG-3	952-g15 _{SKK} reverse
5'-CAACAACAATATAAGAAAAAGTA-3	952-g15 _{RKS}

5'-G TTGTTGTTATATTCTTTTTTCAT-3	952-g15 _{RKS} reverse
5'-CAATATAAGAACACGTATAACTC-3	952-g15 _{RTR}
5'-GAGTTATACGTGTTCTTATATTG-3	952-g15 _{RTR} reverse
5'-CAATATAAAAACAAAGATAACTC-3	952-g15 _{KTK}
5'-GAGTTATCTTTGTTTTTATATTG-3	952-g15 _{KTK} reverse
5'-TATAAGAAGACAAATAACTCTAG-3	952-g15 _{RRQ}
5'-CTAGAGTATTTGTCTTCTTATA-3	952-g15 _{RRQ} reverse
5'-TATAAAAAAACAAATAACTCTAG-3	952-g15 _{KKQ}
5'-CTAGAGTATTTGTTTTTTTATA-3	952-g15 _{KKQ} reverse
5'-TATAAAAAAAACATAACTCTAG-3	952-g15 _{KKN}
5'-CTAGAGTATGTTTTTTTTTATA-3	952-g15 _{KKN} reverse

Random 952 Primer

5'-AGA TCT GCC AAT TTC TGC GAC AAT GCT AAA ACC ATA ATA GTA CAG
CTG AAC GAA ACT ATA AAA ATT AAT TGT ACA AGA CCC AAC AAC AAT
ACA ATA ACT CTA GGA CCA GGG AGA G-3 Primer 952 random

5'-GCT AGC TAC CTG GTA TAA AGT GTT ATT CCA TTT TTC TCT AGA AAT
GTT ACA ATG TGC TTT CCT TAT ATC TCC TAT TAT TTC TCC TGT TGT ATA
AAG TAC TCT CCC TGG TCC TAG AGT TAT-3 Primer 952 random reverse

4 Ergebnisse

4.1 Verwendete Viren

4.1.1 Beschreibung der HIV-Varianten des NL-952 Virus

In der vorliegenden Arbeit wurden drei NL-952 Virenvarianten verwendet: NL-952.1, NL-952.2 und NL-952.3 (Polzer, 2002) [124]. Diese unterscheiden sich alleine in der Sequenz und N-Glykosylierung des gp120 V3-Loops (Abb. 9 / S. 62).

Das Virus NL-952.1 besitzt den V3-Loop eines Patientenisolates und hat R5/X4-dualtrophe Eigenschaften. In der V3-Loop Region liegen die N-Glykosylierungsstellen für die N-Glykane g13, g15, g16 und g17. An der Position 304-306 besitzt das Virus die Aminosäuresequenz RKR. Trotz dieser drei positiv geladenen Aminosäuren kann daß NL-952.1 Virus neben CXCR4 auch den Korezeptor CCR5 nutzen.

Das Virus NL-952.2 hat im Unterschied zu NL-952.1 eine unterschiedliche N-Glykosylierung (Abb. 9 / S. 62). Die N-Glykosylierungsstelle g14 ist im NL-952.2 vorhanden (DCI > NCT), dafür fehlt die N-Glykosylierungsstelle g15 (NNT > QNT). Wichtig ist, daß das NL-952.2 Virus seine ursprüngliche dualtrophe Eigenschaft verloren hat und nur noch X4-monotrop ist.

Das Virus NL-952.3 besitzt nur noch die N-Glykosylierungsstelle für das N-Glykan g16. Alle anderen N-Glykosylierungsstellen, g13, g14, g15 und g17 sind mutiert und stellen keine N-Glykosylierungsstellen mehr dar (Abb. 9 / S. 62). Das Virus NL-952.3 ist, wie auch NL-952.2, X4-monotrop.

NL-952.1



NL-952.2



NL-952.3



Abb. 9 V3-Loop Glykosylierungsmutanten des NL-952 Virus

Dargestellt sind die Aminosäuren von Position 273 bis 345 des gp120 V3-Loop Bereichs der Viren: NL-952.1 (NL-952-g14), NL-952.2 (NL-952-g15) und NL-952.3 (NL-952-g13-14-15-17). Die einzelnen Aminosäuren, welche für die N-Glykosylierungsstellen g13 bis g17 codieren sind in den Sequenzen hervorgehoben. Besonders gekennzeichnet ist die Glykosylierungsstelle g15 (blau). Die Sequenz RKR an Position 304-306 ist rot und der V-Loop Beginn (C295) sowie das V-Loop Ende (C331) ist grün markiert. Das NL-952.1 ist R5X4 dualtrop und kann somit die beiden Korezeptoren CCR5 und CXCR4 nutzen. NL-952.2 und NL-952.3 sind X4 monotrop und nutzen ausschließlich CXCR4 als Korezeptor.

NL-952.1: NL-952, R5X4 dualtrop (Polzer, 2002).

NL-952.2: NL-952+g14-g15, X4 monotrop (Polzer, 2002).

NL-952.3: NL-952-g13-g14-g15-g17, X4 monotrop (Polzer, 2002).

4.1.2 Herstellung von NL-952-Mutanten mit Arginin und Lysin Austausch an der Positionen 304-306 des gp120-V3-Loop

Jede der drei NL-952 Glykovarianten (NL-952.1, NL-952.2, NL-952.3) wurde im V3-Loop an der Position 304-306 verändert und für jede der drei Glykovarianten wurden alle Aminosäurekombinationen von R und K an den Positionen 304-306 erzeugt:

RRR	KRR	RKK	KKK
	RKR	KRK	
	RRK	KKR	

Zusätzlich zu den RRR > KKK Mutanten wurden weitere Mutanten hergestellt. Die basischen Aminosäuren R304, K305 und R306 wurden jeweils durch eine, an der jeweiligen Position, bei HIV-Patientenisolaten häufig vorkommende, ungeladene Aminosäure ersetzt (Abb. 6 / S. 18). Es wurden die folgende Aminosäurekombinationen erzeugt:

SKR	RRQ	KKQ	KKN
RKS	RTR	KTK	
	SRR	SKK	

Die resultierenden Viren wurden wie folgt bezeichnet:

NL-952.1_{RRR}: NL4-3 basierendes Virus mit dem V3-Loop des Patientenisolates PI-952 mit dem Aminosäureaustausch K305R.

pNL-952.1_{RRR}: Ein Plasmid welches das vollständige Genom des NL-952.1_{RRR} Virus trägt. Eine Transfektion des Plasmids in Zellen führt zur Virusvermehrung.

Alle oben aufgelisteten Aminosäurekombinationen wurden in die drei Glykovarianten des NL-952 eingebaut. Dabei wurden die Methode der zielgerichteten PCR-Mutagenese und ein spezieller pUC-Vektor verwendet in dem sich das BstEII-BamHI env-Genfragment des NL-952 Virus befand (Abb. 10 / S. 64).

Auf diese Weise wurden insgesamt $17 \times 3 = 51$ Virusvarianten des NL-952 hergestellt.

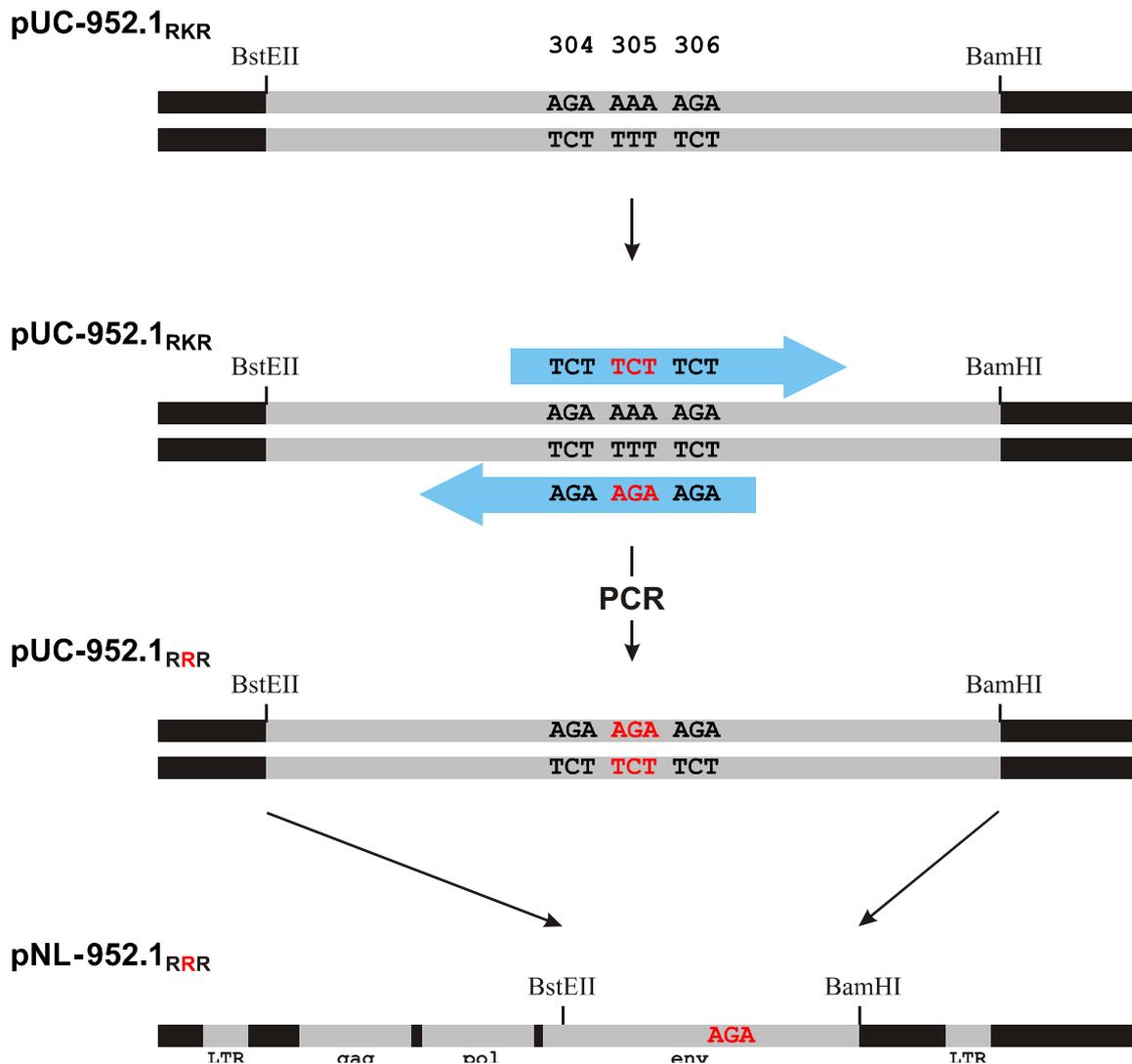


Abb. 10 Herstellung von NL-952 Aminosäuremutanten

Im env-Gen des NL4-3_{Bst} Virus befindet sich sowohl eine *unique* BstEII als auch eine *unique* BamHI Schnittstelle. Dadurch kann das env-Fragment zwischen Plasmiden, die ebenfalls *unique* BstEII und BamHI Schnittstellen besitzen, ausgetauscht werden. Env-Mutanten wurden in einem pUC-Vektor hergestellt der das NL-952 BstEII-BamHI env-Fragment trägt. Zur Mutagenese wurden zwei Oligonukleotide (blau) eingesetzt und das vollständige Plasmid amplifiziert. Nach dem Schneiden mit Dnpi und Transformation in *E. coli* wurden die Klone analysiert und sequenziert.

Env-Fragment: Ein unvollständiger Teil des NL4-3 env Gens mit einer Größe von 2129bp. NL-4-3 Position 6325 (BstEII) bis 8465 (BamHI). **pUC-952.1_{RKR}:** pUC-Vektor mit dem BstEII-BamHI env-Fragment der NL-952 Glykovariante 952.1 und der Sequenz RKR an der V3-Loop Aminosäure-Position 304-306. **pNL-952.1_{RRR}:** Plasmid mit dem Genom (LTR-LTR) des NL-952.1_{RRR} Virus.

4.2 Infektiosität der NL-952.1-, NL-952.2- und NL-952.3-Virusvarianten

4.2.1 Infektion von CD4, CXCR4 und CCR5 exprimierenden TZM-bl-Zellen mit RRR > KKK V3-Loop-Varianten

Die verwendeten TZM-bl Zellen bilden auf ihrer Oberfläche neben dem primären HIV-Rezeptor CD4 auch die Korezeptoren CCR5 und CXCR4 aus (Kap. 2.3.1. / Tab. 1 / S. 34). Dadurch ist diese Zelllinie besonders gut, für Infektionsstudien mit mono- oder dualtropen Viren geeignet. Zur Messung der Infektiosität haben diese Zellen ein von einem HIV-1 TAT-Promoter reguliertes β -Galactosidasegen (*lac-Z*). Nach dem Viruseintritt in die Zelle wird das *lac-Z* Gen durch TAT aktiviert und infizierte Zellen lassen sich mit dem Farbstoff X-Gal anfärben. Angefärbte Zellen (*foci*) wurden ausgezählt und so die Anzahl der *foci forming units* (ffu) für die jeweilige Virusmutante bestimmt. Um die Infektiosität der hergestellten Virusmutanten zu messen, wurde zuerst die p24 Konzentration der Virusüberstände bestimmt und pro Test (96er Mikrotiterplattenformat) wurden 0,5 ng p24 zu ca. 5000 TZM-bl Zellen gegeben.

In der Abbildung 11 (S. 66) sind die Ergebnisse der Untersuchung mit den verschiedenen Virusmutanten dargestellt. Es wurde beobachtet, daß die Infektiosität der Virusmutanten mit der Anzahl der vorhandenen Arginine (R) an den V3-Positionen 304-306 zunimmt. Wenn alle drei Positionen mit Arginin besetzt waren, wurde die höchste Infektiosität beobachtet. Im Umkehrschluss, waren alle drei Positionen von Lysin (K) besetzt, wurde die geringste Infektiosität beobachtet. Dieser Effekt war am stärksten bei den RRR und KKK Mutanten der Viren NL-952.2 und NL-952.3 (Abb. 11 / S. 66).

Ausnahmen in der RRR > KKK Reihe bildete z.B. das Virus NL-952.3_{RKK}. So lag die Infektiosität der Virusmutante NL-952.3_{RKK} bei 185 ffu. Sie hatte damit eine höhere Infektiosität als die Virusmutanten NL-952.3_{KRR} (165 ffu) und NL-952.3_{RRK} (180 ffu) (Abb. 11 / S. 66). Auch bei der Virusmutante NL-952.1_{RKK} ist die Infektiosität mit 175 ffu höher als diejenige der Virusmutante NL-952.1_{KRR} (150 ffu).

Ausgehend von der ursprünglichen NL-952 V3-Loop-Kombination RKR wurde jede Position separat betrachtet. Dabei zeigte sich z.B. für NL-952.1, daß sich die Infektiosität beim Austausch R304K (RKR → KKR) von 190 auf 85 ffu reduzierte. Beim Austausch K305R (RKR → RRR) erhöhte sich dagegen die Infektiosität von 190 auf 210 ffu

während der Austausch R306K (RKR→RKK) die NL-952.1 Infektiosität von 190 auf 175 ffu reduzierte (Abb. 11). Die gleichen Ergebnisse zeigten auch die entsprechenden Mutanten von NL-952.2 und NL-952.3. Die Abnahme der Infektiosität von RRR zu den KKK Mutanten wurde damit unabhängig von der Anwesenheit bzw. Elimination der im V3-Bereich vorhandenen Glykane, bei allen drei Virusvarianten beobachtet (Abb. 11).

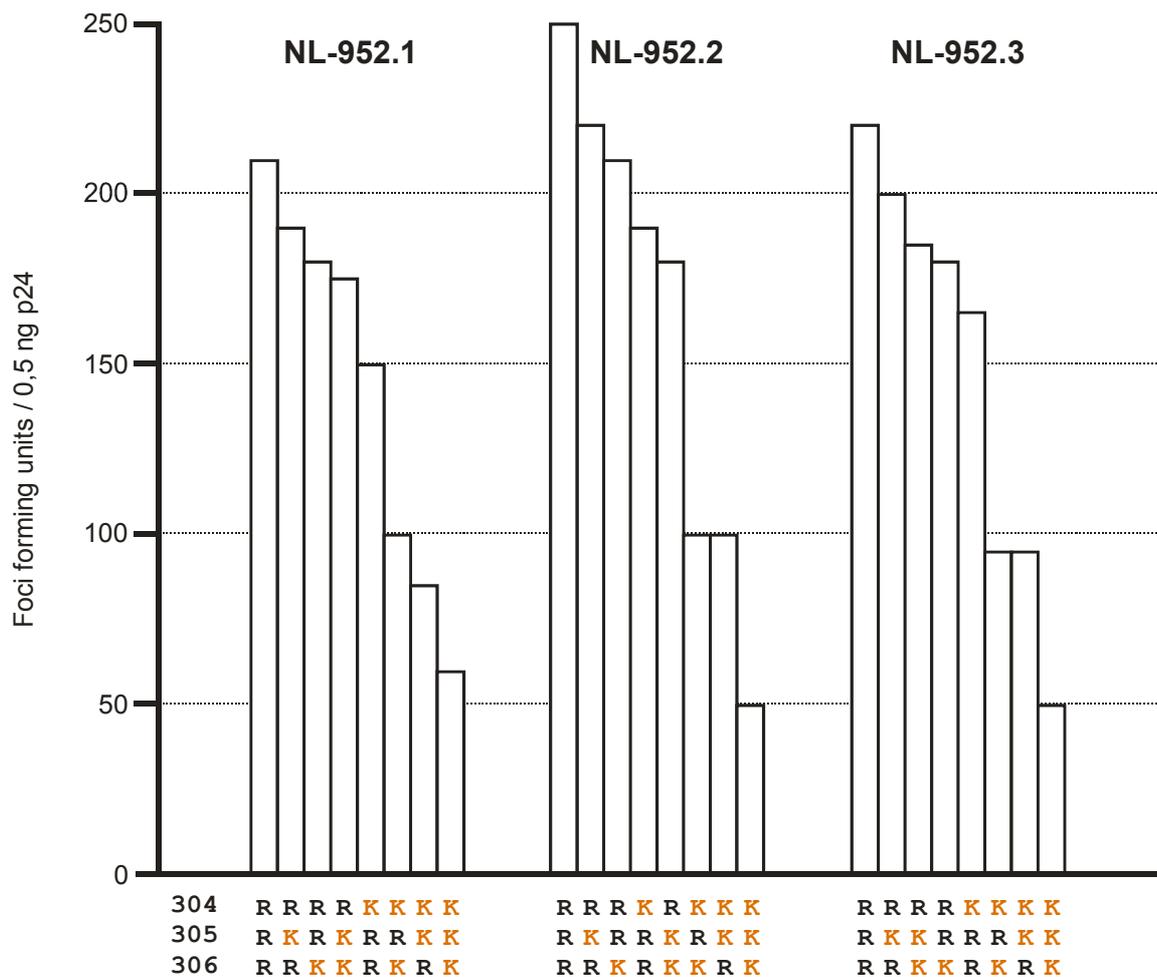


Abb. 11 Infektiosität der RRR > KKK Mutanten

Für die Tests wurden TZM-bl-Zellen infiziert (CD4+, CCR5+, CXCR4+). Die RRR Mutanten zeigten die höchste, die KKK Mutanten die niedrigste Infektiosität. Es wurden Virusüberstände mit einer Konzentration von 5 ng p24/ml eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte aus jeweils 20 Versuchen. 304, 305, 306: sind Aminosäurepositionen im gp120 V3-Loop.

4.2.2 Infektion von CD4, CXCR4 und CCR5 exprimierenden TZM-bl-Zellen mit NL-952-Virusvarianten die die Aminosäuren N, Q, S und T an den Positionen 304-306 des gp120-V3-Loop besitzen

Durch den Austausch der basischen durch eine ungeladene Aminosäure, wurden die Auswirkungen beim Verlust der positive Ladungen R304, K305 und R306 untersucht. Beim Austausch wurde darauf geachtet, daß ausschließlich ungeladene Aminosäuren verwendet wurden, welche an den V3-Loop Positionen 304-306 anderer HIV-1-Typen vorkommen (Abb. 6 / S. 18). Dadurch konnten nicht nur die Auswirkungen, welche der Verlust der positiven Ladung verursacht analysiert werden, sondern auch ob und in wie weit HIV-1-Typen den Verlust der positiven Ladung an sich durch eine ungeladene Aminosäure kompensieren können. Aus diesem Grund wurde auf die normalerweise verwendete *knock out* Mutation zu Alanin verzichtet, da Alanin an den V3-Loop Positionen 304-306 bei HIV-1-Typen nicht vorkommt (Abb. 6 / S. 18).

Es wurden dieselben Testbedingungen wie im vorangegangenen Versuch 4.2.1 verwendet. In der Abbildung 12 (S. 69) sind die Ergebnisse der Untersuchung mit den verschiedenen Virusmutanten dargestellt. Der Versuch zeigte, daß der Verlust der positiven Ladung ausgehend von der Virusmutante mit der höchsten Infektiosität RRR (Abb. 11 / S. 66) an allen Positionen R304, R305 und R306 zu einem Verlust der Infektiosität führte. Dieser Prozess wurde bei allen NL-952-Glykovarianten (Abb. 9 / S. 62) beobachtet (Abb. 11, 12, 13 / S. 66, 69, 70).

Anhand von Abbildung 12 (S. 68) ist ersichtlich, daß vor allem der Verlust der positiven Ladung an der Position R304S und K304S unabhängig von der Glykosylierung der NL-952-Virusmutanten die Infektiosität am stärksten beeinflusst. Ähnliches gilt auch für den Austausch K305T, wenn die begleitenden Aminosäuren an den Positionen 304 und 306 Lysine sind.

Analysierte man die Positionen separat voneinander am Beispiel der Glykomutante NL-952.1, so wurde die stärkste Reduktion der Infektiosität beim Aminosäureaustausch an Position 304 beobachtet. Die Aminosäureaustausche NL-952.1_{RKR} R304S und danach K304S (RKR → KKR → SKR), reduzierte die Infektiosität von 190 ffu für RKR auf 150 ffu für KKR und auf 55 ffu für SKR (Abb. 11, 12 / S. 66, 69).

Dagegen bewirkte der Austausch NL-952.1_{RKR} R306K eine geringe Reduktion der

Infektiosität von 190 ffu für RKR auf 175 für RKK ffu (Abb. 11 / S. 66), die durch den Austausch K306S von 175 ffu (RKK) → 182 ffu (RKS) (Abb. 12 / S. 69) wieder aufgehoben wurde.

Der Effekt, daß der Austausch einer positiv geladenen Aminosäure durch eine ungeladene, an Position 306 zu einer Steigerung der Infektiosität führt, wurde im Zusammenhang mit anderen ungeladenen Aminosäuren wie z.B. Glutamin (Q) oder Asparagin (N) noch deutlicher beobachtet als mit Serin (S).

Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit davon, welche basischen Aminosäuren (Lysin oder Arginin) an den beiden anderen Positionen 304 und 305 exprimiert wurden. So änderte der Austausch K306Q bei R304 und R305 (RRK → RRQ) die Infektiosität von NL-952.1 Glykomutanten von 175 ffu für RRK auf 190 ffu für RRQ kaum. Der gleiche Austausch K306Q zeigte jedoch bei K304 und K305 (KKK → KKQ) eine deutliche Steigerung der Infektiosität von 60 ffu für KKK auf 170 ffu für KKQ (Abb. 12 / S. 69). Wurde gleichzeitig das Glykan g15 eliminiert, zeigte die Virusmutante NL-952.2_{RRQ} mit 225 ffu eine annähernd gleiche Infektiosität wie die NL-952 Ursprungssequenz NL-952.2_{RKR} mit 220 ffu (Abb. 11, 12 / S. 66, 69).

Der Effekt der begleitenden Aminosäuren wurde auch gut an Position 305 beobachtet. Die Mutation K305T (Lysin zu Threonin), NL-952.1_{KKK} mit 60 ffu zu NL-952.1_{KTK} mit 50 ffu wirkte sich kaum auf die Infektiosität aus, wohingegen die Mutation R305T (Arginin zu Threonin), NL-952.1_{RRR} mit 210 ffu zu NL-952.1_{RTR} mit 172 ffu die Infektiosität reduzierte (Abb. 11, 12 / S. 66, 69). Damit steigert der Austausch einer positiven durch eine ungeladene Aminosäuren die Infektiosität stärker, wenn Lysine an den anderen beiden Positionen ausgebildet werden.

Für die analysierten V3-Loop Positionen 304-306 ergab sich insgesamt, daß für die Infektiosität des Virus vor allem die basische Aminosäure an der Position 304 entscheidend war. Ersetzte man diese durch eine ungeladene Aminosäure, dann resultierte das in einer drastischen Reduktion der Infektiosität von 190 ffu für RKR auf 55 ffu für SKR. Die Position 305 spielte im Bezug auf die Infektiosität die geringste Rolle. Aminosäureaustausche führten hier nur zu sehr geringen Veränderungen der Infektiosität. An Position 306 konnten unter bestimmten Bedingungen, ungeladene Aminosäuren, den Effekt der positiven Ladung, bei gleichzeitiger Eliminierung des Glykans g15

kompensieren. So wirkte sich der Aminosäureaustausch NL-952.2_{RKR} R306S mit 220 ffu zu NL-952.2_{RKS} mit 215 ffu kaum aus (Abb. 11, 12 / S. 66, 69). Sobald jedoch weitere Glykane eliminiert wurden (NL-952.3) reduzierte sich dieser Effekt wieder (Abb. 11, 12 / S. 66, 69).

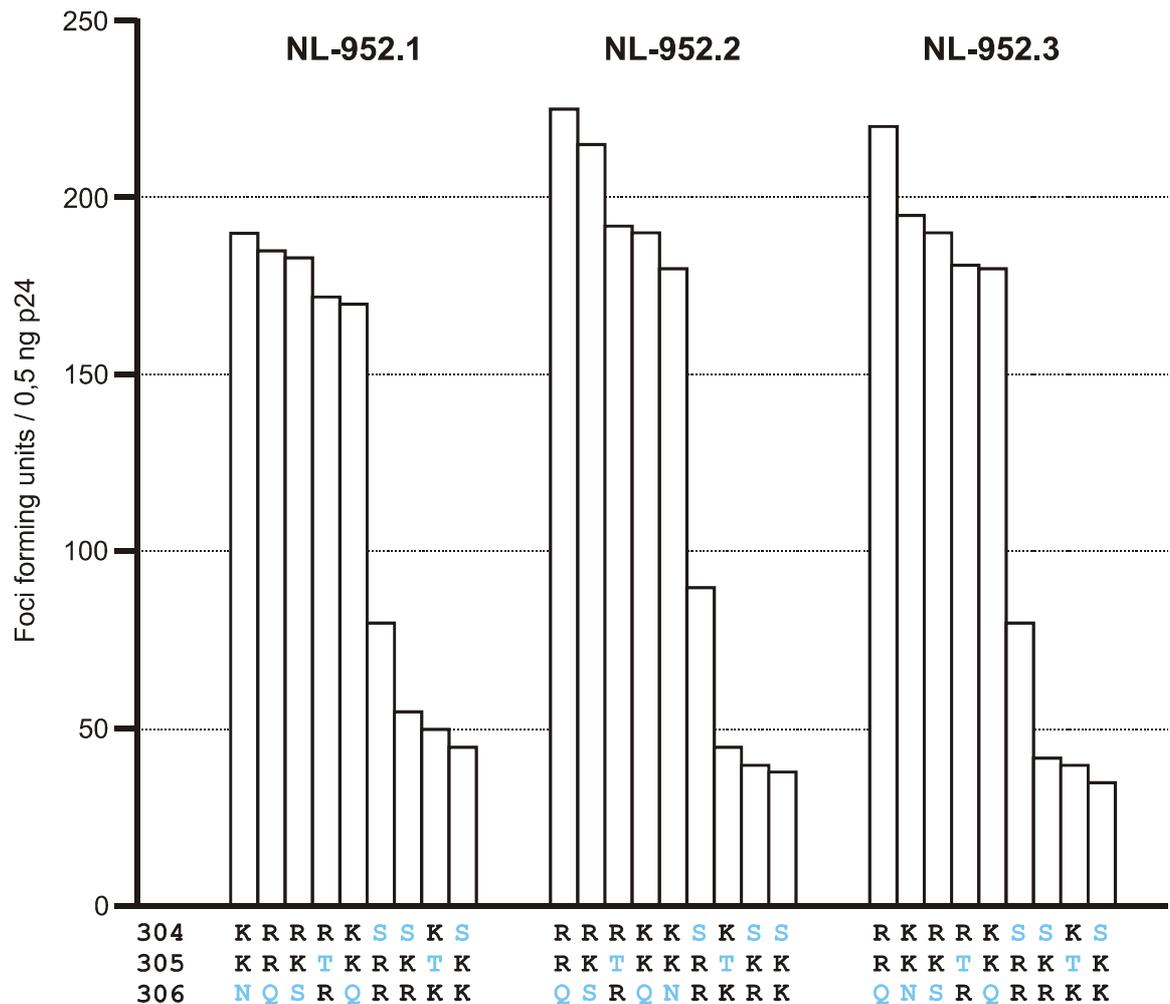


Abb. 12 Infektion von TZM-bl-Zellen mit NL-952-Virusmutanten mit N, Q, S und T Aminosäureaustauschen

Für die Tests wurden TZM-bl-Zellen infiziert (CD4+, CCR5+, CXCR4+). Wird die positive Ladung an der Position 304 durch eine neutrale ersetzt resultiert das in einer starken Reduktion der Infektiosität. Es wurden Virusüberstände mit einer Konzentration von 5 ng p24/ml eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte aus jeweils 20 Versuchen. 304, 305, 306: sind Aminosäurepositionen im gp120 V3-Loop.

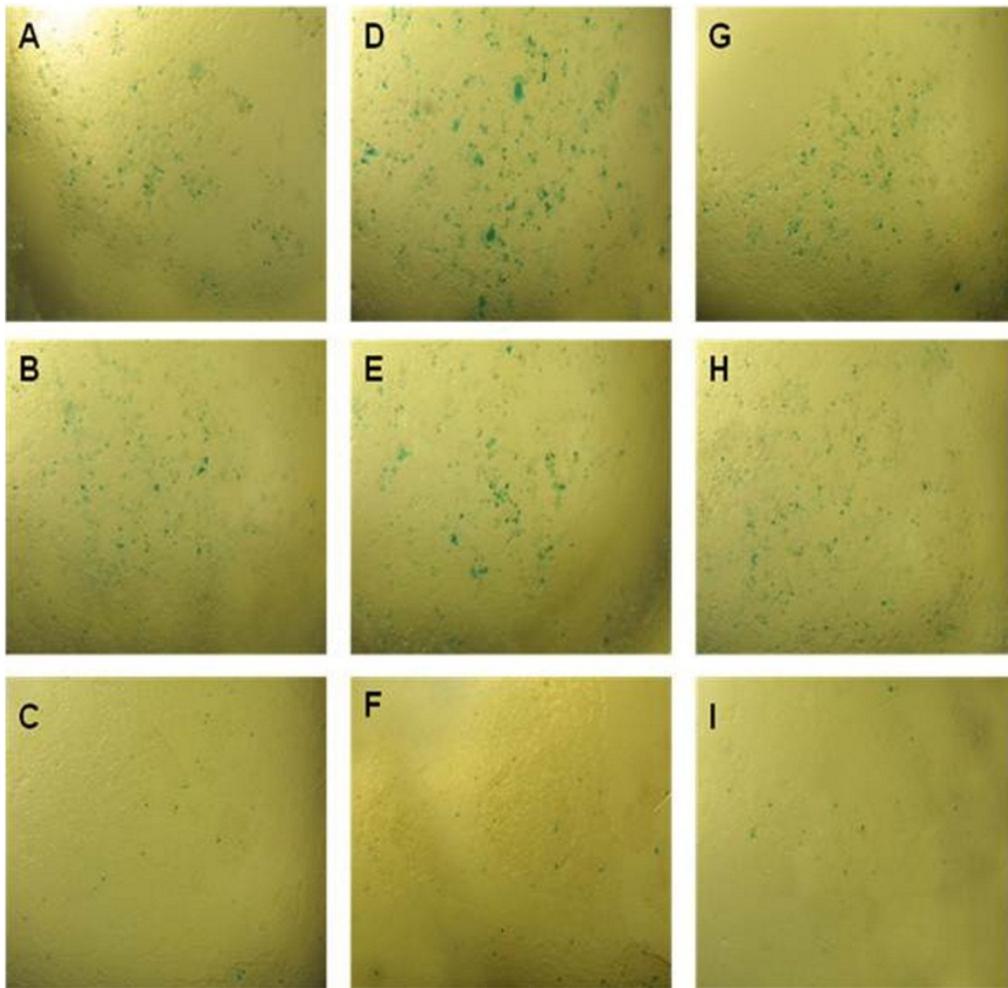


Abb. 13 Wachstum von NL-952-Virusmutanten mit R und K Aminosäureaustauschen auf TzM-bl-Zellen

Die Bilder (A-I) zeigen infizierte TzM-bl-Zellen (blau), auf einem TzM-bl-Zellrasen 72 h nach Infektion. Jede Abbildung wurde aus einem Well einer 48er Mikrotiterplatte aufgenommen. Die TzM-bl-Zellen wurden mit X-Gal blau angefärbt und anschließend ausgezählt. Für die Infektion wurden 2×10^4 TzM-bl-Zellen mit 5 ng/ml Virusüberstand infiziert. Die Buchstaben stehen für die unterschiedlichen Glykosylierungs- und Aminosäuremutanten.

A: NL-952.1_{RRR}

D: NL-952.2_{RRR}

G: NL-952.3_{RRR}

B: NL-952.1_{RKR}

E: NL-952.2_{RKR}

H: NL-952.3_{RKR}

C: NL-952.1_{KKK}

F: NL-952.2_{KKK}

I: NL-952.3_{KKK}

4.2.3 Infektion von Ghost-X4- und Ghost-R5-Zellen mit NL-952-Virusmutanten

Die Nutzung der Korezeptoren CCR5 oder CXCR4 ist neben der Aminosäuresequenz des V3-Loops auch von dessen positiver Nettoladung abhängig. Um heraus zu finden, ob die eingefügten Aminosäureaustausche Auswirkungen auf die spezielle Nutzung eines Korezeptors haben, wurden Korezeptor spezifische Infektionsanalysen durchgeführt. Hierzu eignen sich besonders gut Ghost-Indikatorzellen, welche neben dem primären HIV-1-Rezeptor CD4 auch CCR5 oder CXCR4 auf ihrer Zelloberfläche ausbilden. Zusätzlich besitzen sie ein, von einem Tat-Promotor reguliertes *Green Fluorescence Protein* (GFP) Gen. Durch die Anreicherung von GFP in infizierten Zellen, leuchten diese unter UV-Licht grün und können so ausgezählt werden.

Ghost-Indikatorzellen wurden auf 96er-Mikrotiterplatten ausgesät und bei 37°C inkubiert. 24 h später wurden rekombinante Virusmutanten in einer Konzentration von 5 ng p24/ml (Kap. 2.4.1 / S. 39) hinzugegeben. Über 6 Tage wurde nun alle 48 h der Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren. Nach 6 Tagen wurde die p24-Konzentration im Überstand mit Hilfe eines ELISA (Kap. 2.4.3 / S. 40) bestimmt. Alle NL-952-Virusmutanten wurden nacheinander auf Ghost-R5- und Ghost-X4-Zellen getestet.

Die Virusmutanten, die an den Positionen 304-306 innerhalb der V3-Sequenz ausschließlich positive Ladung aufwiesen, wuchsen auf Ghost-X4-Zellen (Abb. 14 / S. 72). Alle Virusmutanten, welche mindestens eine ungeladene Aminosäure an diesen Positionen aufwiesen waren letal. Sie zeigten auch nach 6 Tagen keinerlei Wachstum und es konnte kein p24 nachgewiesen werden. Alle übrigen Virusmutanten zeigten nach 6 Tagen, unabhängig von ihrer Glykosylierung, ein ähnliches Wachstum auf Ghost-X4-Zellen. (Abb. 14 / S. 72).

Nach Ihrer Infektiosität aufgeschlüsselt, replizieren auf Ghost-X4-Zellen die Virusmutanten NL-952.1_{RRR} (OD 1,73), NL-952.2_{RRR} (OD 1,85), NL-952.3_{RRR} (OD 1,75) am besten und die Virusmutanten NL952.1_{KKK} (OD 0,81), NL-952.2_{KKK} (OD 0,75), NL-952.3_{RRR} (OD 0,72) am schlechtesten. Dieser Effekt war von der N-Glykosylierung des V3-Loop unabhängig.

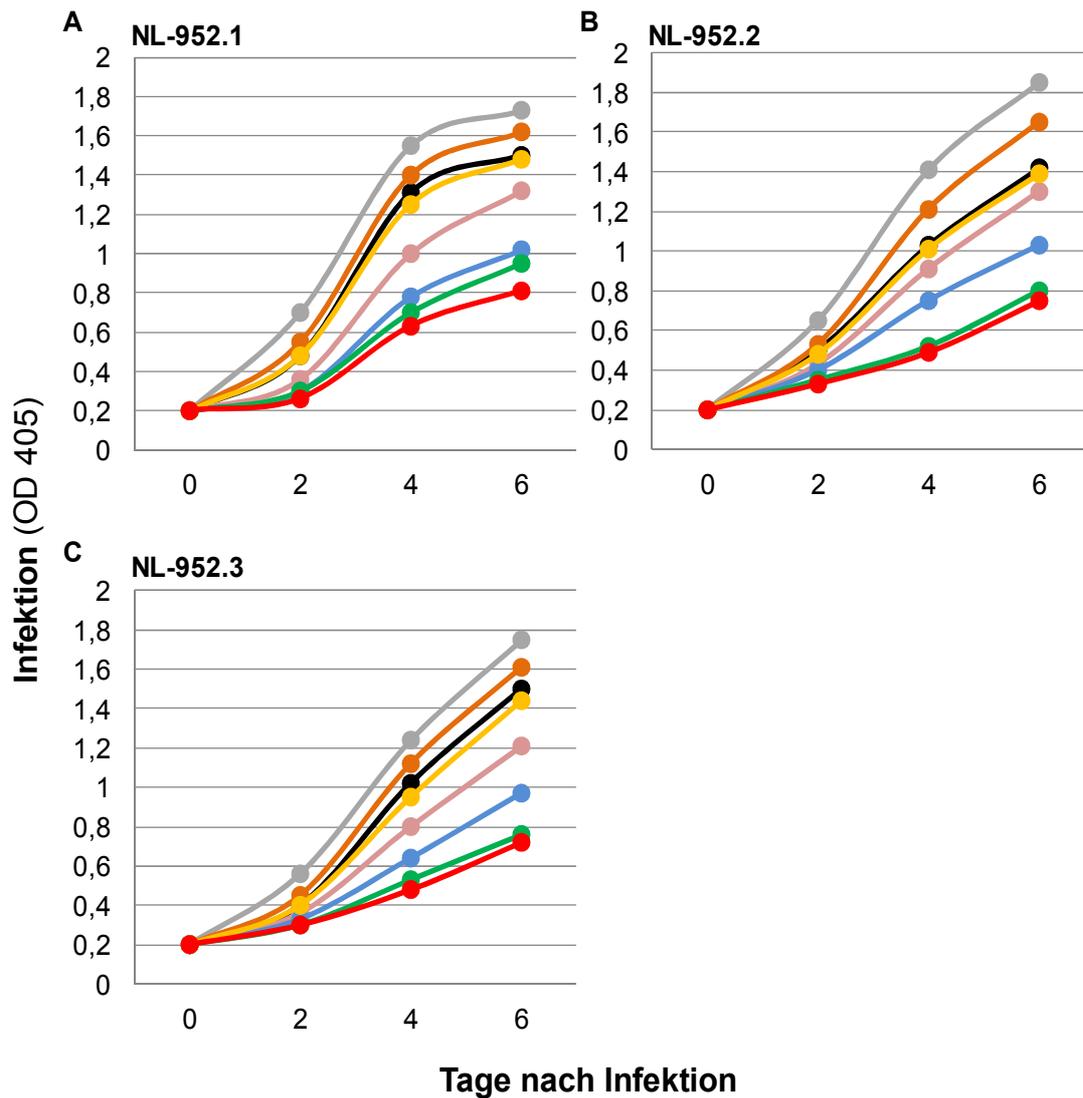


Abb. 14 Wachstum von NL-952-Virusmutanten mit R und K Aminosäureaustauschen auf Ghost-X4-Zellen

Darstellung der Infektion von NL-952-Virusmutanten mit 3 positiven Aminosäuren, an den Positionen 304-306, im V3-Loop, auf Ghost-X4-Zellen. Jede Linie steht für eine R/K-Aminosäure-Austausch-Mutante. Dazu wurden Ghost-X4-Zellen mit 5 ng/ml rekombinanten Virus infiziert und alle 48 h der Überstand abgenommen und der p24-Gehalt (ng/ml) mittels ELISA bestimmt. Die Buchstaben A-C stehen für die NL-952-Glykomutanten (Abb. 9 / S. 62). A: NL-952.1; B: NL-952.2 und C: NL-952.3. Alle Virusmutanten zeigten nach 6 Tagen ein Wachstum. Die Standardabweichung vom Mittelwert war <09%.

(●) RRR (●) RKR (●) RRK (●) KRR
 (●) RKK (●) KRK (●) KKR (●) KKK

In Abbildung 15 ist die Replikation von NL-952-Virusmutanten auf Ghost-R5-Zellen dargestellt. Es wurde beobachtet, daß in Anwesenheit des N-Glykans g15, fast alle untersuchten Virusmutanten in der Lage waren, auf Ghost-R5-Zellen zu replizieren. Einzige Ausnahme hiervon bildete die RRR-Virusmutante des NL-952.1. Sie replizierte trotz Anwesenheit des N-Glykans g15 nicht auf Ghost-R5-Zellen (Abb. 15A / S. 74).

Wurde die g15-Glykosylierungsstelle eliminiert (NL-952.2 und NL-952.3), waren die Virusmutanten, welche an allen drei Positionen 304-306 eine positive Ladung aufwiesen, letal und konnten nicht mehr auf Ghost-R5-Zellen replizieren. Wurde jedoch eine basische Aminosäure durch eine ungeladene, Aminosäure ersetzt, so wurde wieder eine Replikation auf Ghost-R5-Zellen beobachtet (Abb. 14 B-D / S. 72). Die höchste Replikationsrate (OD 1,68) auf Ghost-R5-Zellen, wurde in Anwesenheit des N-Glykans g15 bei NL-952.1_{RRR} beobachtet (Abb. 15A / S. 74). Nach Elimination des Glykans g15, replizierten die Virusmutanten NL-952.2_{RRQ} (OD 1,85) und NL-952.3_{RRQ} (OD 1,85) am effizientesten (Abb. 14, C-D / S. 72). Unabhängig von Ausbildung oder Elimination des Glykans g15 zeigten Virusmutanten mit dem Aminosäuremotiv SKK (bsp. NL-952.1_{SKK} OD 1,07) die geringsten Replikationsraten auf Ghost-R5-Zellen (Abb. 15, B-D / S. 74).

Aus den Daten kann man erkennen, daß die Virusmutanten mit 3 basischen Aminosäuren an den Positionen 304-306 bevorzugt den Korezeptor CXCR4 nutzen (Abb. 14 A-C / S. 72). Diese Tendenz verstärkte sich, wenn das Glykan g15 eliminiert wurde (Abb. 15B, C / S. 74). Dabei verloren die Virusmutanten jedoch die Fähigkeit auf Ghost-R5-Zellen zu wachsen (Abb. 15 / S. 74). Einzige Ausnahme bildete die Virusmutante NL-952.1_{RRR}. Sie konnte auch bei Anwesenheit des Glykans g15 nicht auf Ghost-R5-Zellen replizieren. Ersetzte man allerdings eine basische Aminosäure durch eine ungeladene, dann verloren alle untersuchten Virusmutanten unabhängig von der Ausbildung des Glykans g15 die Fähigkeit auf Ghost-X4-Zellen zu replizieren (Abb. 14, 15 / S. 72, 74). Auch in diesem Versuch wurde beobachtet, daß Arginin an der Position 304 für die Infektiosität des Virus deutlich günstiger war als Lysin oder eine andere ungeladene Aminosäure.

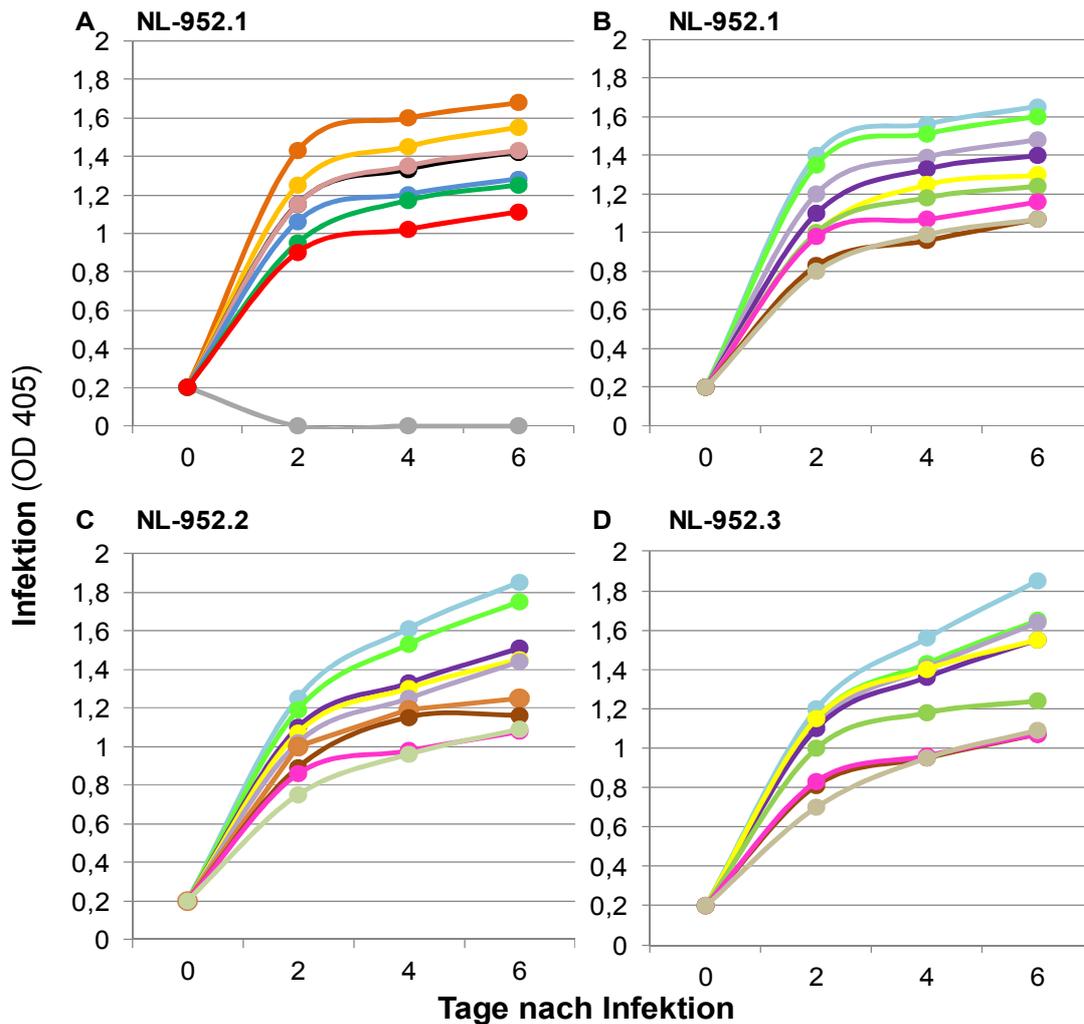


Abb. 15 Wachstum von NL-952-Virusmutanten mit N, Q, S und T Aminosäureaustauschen auf Ghost-R5-Zellen

Darstellung der Infektion von NL-952-Virusmutanten, auf Ghost-R5-Zellen. Jede Linie steht für eine R/K- (A) oder eine basische/ungeladene (C-D) Aminosäureaustausch-Mutante an den untersuchten V3-Loop-Positionen 304-306. Die Buchstaben A-D stehen für die NL-952-Glykomutanten (Abb. 9 / S. 62). A: NL-952.1; B: NL-952.1; C: NL-952.2 und D: NL-952.3. Ghost-R5-Zellen wurden mit 5 ng/ml rekombinanten Virus infiziert und alle 48 h der Überstand abgenommen und der p24-Gehalt (ng/ml) mittels ELISA bestimmt. Fast alle Virusmutanten zeigten nach 6 Tagen ein Wachstum. Einzig die Virusmutante NL-952.1_{RRR} (A) zeigt kein Wachstum. Die Standardabweichung vom Mittelwert war <7%.

(●) RRR (●) RKR (●) RRK (●) KRR (●) RKK (●) KRK
 (●) KKR (●) KKK (●) RRQ (●) RKS (●) KKQ (●) RTR
 (●) KKN (●) SRR (●) KTK (●) SKR (●) SKK

4.2.4 Infektion von X4- und R5-U87-Zellen mit Mutanten des NL-952 Virus

Um die Unterschiede der einzelnen Virusmutanten im Hinblick auf eine unterschiedliche Glykosylierung des V3-Loop beurteilen zu können, wurden Infektionsanalysen über einen Zeitraum von 14 Tagen durchgeführt. Hierfür eignen sich besonders gut U87-Indikatorzellen, eine Glioblastom-Zelllinie, die den humanen CD4-Rezeptor und einen der beiden Korezeptoren CCR5 oder CXCR4 auf ihrer Zelloberfläche tragen (Tab. 1 / S. 34). Die U87-Indikatorzellen vermehren sich langsamer als Hela-, Ghost- oder TZM-bl-Zellen und waren deshalb besonders gut für einen Test über einen 14-tägigen Zeitraum geeignet. Die U87-X4/R5-Indikatorzellen-Zellen wurden auf 96er-Mikrotiterplatten ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurden rekombinante Virusmutanten in einer Konzentration von 5 ng p24/ml hinzu gegeben (Kap. 2.4.1 & 2.4.2 / S. 39). Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde alle 2 Tage der Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren. Nach 14 Tagen wurde mittels ELISA die p24 Antigenmenge gemessen (Kap. 2.4.3 / S. 40).

Die 14-Tage Kultur der Virusmutanten von NL-952.1 zeigte, daß alle Virusmutanten, welche drei positive Ladungen an den V3-Positionen 304-306 aufwiesen, in der Lage waren sich auf U87-X4-Zellen zu vermehren (Abb. 16A / S. 77). Die Virusmutante NL-952.1_{RRR} replizierte dabei besser (OD 1,82), als die Virusmutante NL-952.1_{KKK} (OD 1,01). Alle NL-952.1 Virusmutanten, bei denen mindestens eine basische Aminosäure durch eine neutrale ersetzt wurde, waren nicht mehr in der Lage CXCR4 zu nutzen. Im Zellkulturüberstand konnte auch nach 14 Tagen kein p24 Antigen detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Virusmutanten NL-952.2 und NL-952.3 zeigten ähnliche Tendenzen wie NL-952.1 (Abb. 16 B-C / S. 77). Auf U87-X4-Zellen replizierten nur Mutanten, welche an allen drei Positionen (304-306) eine basische Aminosäure aufwiesen. Wurde diese durch eine ungeladene ersetzt, zeigten die Virusmutanten kein Wachstum auf U87-X4-Zellen. Auch in diesem Versuch zeigten die NL-952.2_{RRR} (OD 2,34) und NL-952.3_{RRR} (OD 2,21) Mutanten ein besseres Wachstum im Vergleich mit den Lysin-Mutanten NL-952.2_{KKK} (OD 1,16) und NL-952.3_{KKK} (OD 1,14) (Abb. 16 B-C / S. 77).

Beim Wachstum auf U87-R5-Zellen wurde beobachtet, daß nicht alle NL-952.1 Virusmutanten in der Lage waren sich auf diesen Zellen zu vermehren (Abb. 17 A-B / S. 78). Die Virusmutante NL-952.1_{RRR} konnte sich nicht vermehren und zeigte auch nach 14 Tagen kein Wachstum (Abb. 17 A / S. 78). Mit einer OD von 1,75 hatte die Virusmutante NL-952.1_{RKR} die höchste Wachstumsrate, wohingegen die Virusmutante NL-952.1_{SKK} am schlechtesten replizierte (OD 1,18) (Abb. 16 A-B / S. 77).

Bei den Virusmutanten der Glykovarianten NL-952.2 und NL-952.3 zeigte sich bei der Replikation auf U87-R5-Zellen ein gegenüber der Replikation auf U87-X4-Zellen umgekehrter Effekt (Abb. 16 C-D / S. 77). Nur Virusmutanten die an den V3- Positionen 304-306 mindestens eine ungeladene Aminosäure besaßen, konnten auf U87-R5-Zellen replizieren. Die höchste Wachstumsrate wurde bei den Virusmutanten NL-952.2_{RTR} und NL-952.3_{RTR}. (OD 2,01/2,0) beobachtet. Die schlechteste dagegen bei den Virusmutanten NL-952.2_{SKK} (OD 1,23) und NL-952.3_{KTK} (OD 1,15) (Abb. 17 C-D / S. 78).

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, nach 14 Tagen ähnliche Replikationsraten für die Virusmutanten der -g15 Glykovarianten NL-952.2 und NL-952.3. Beide -g15 Glykovarianten zeigten gleichzeitig gegenüber der +g15 Glykovariante NL-952.1, eine gesteigerte Replikationsfähigkeit (Abb. 16, 17 / S. 77, 78). Damit deckten sich die Ergebnisse der Infektionsanalysen auf U87-Indikatorzellen mit den Infektionsanalysen auf Ghost-Indikatorzellen (Kap. 4.2.2 / S. 67).

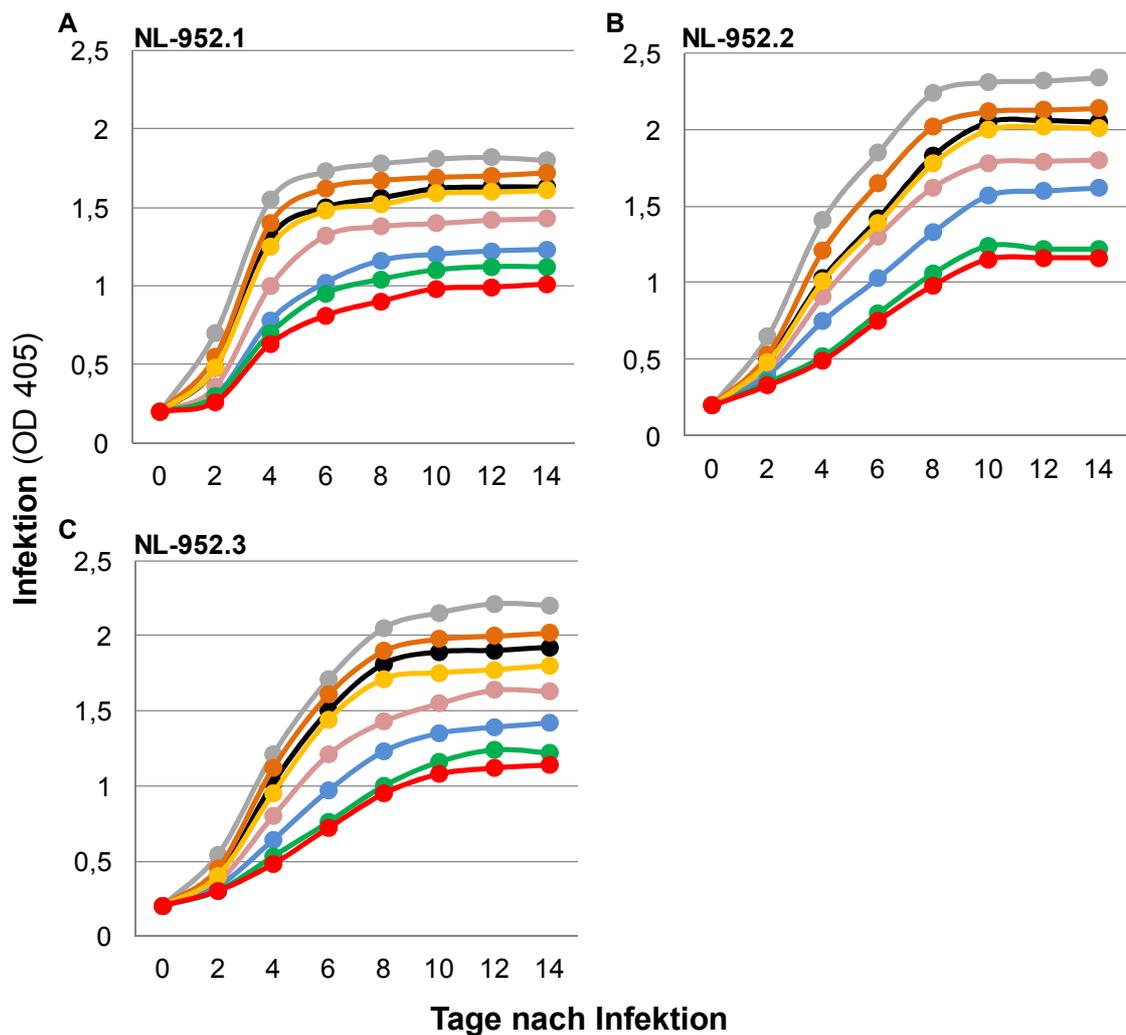


Abb. 16 Wachstum von NL-952-Virusmutanten mit R und K Aminosäureaustauschen auf U87-X4-Zellen

Darstellung der Infektion von NL-952-Virusmutanten mit 3 basischen Aminosäuren, an den Positionen 304-306, im V3-Loop, auf Ghost-X4-Zellen. Jede Linie steht für eine R/K-Aminosäure-Austausch-Mutante. Dazu wurden U87-X4-Zellen mit 5 ng/ml rekombinanten Virus infiziert und alle 48 h der Überstand abgenommen und der p24-Gehalt (ng/ml) mittels ELISA bestimmt. Die Buchstaben A-C stehen für die NL-952-Glykomutanten (Abb. 9 / S. 62). A: NL-952.1; B: NL-952.2 und C: NL-952.3. Alle Virusmutanten zeigten ein Wachstum und gingen nach spätestens 10 Tagen in eine Plateauphase über. Die Standardabweichung vom Mittelwert war <12%.

(●) RRR (●) RKR (●) RRK (●) KRR
 (●) RKK (●) KRK (●) KKR (●) KKK

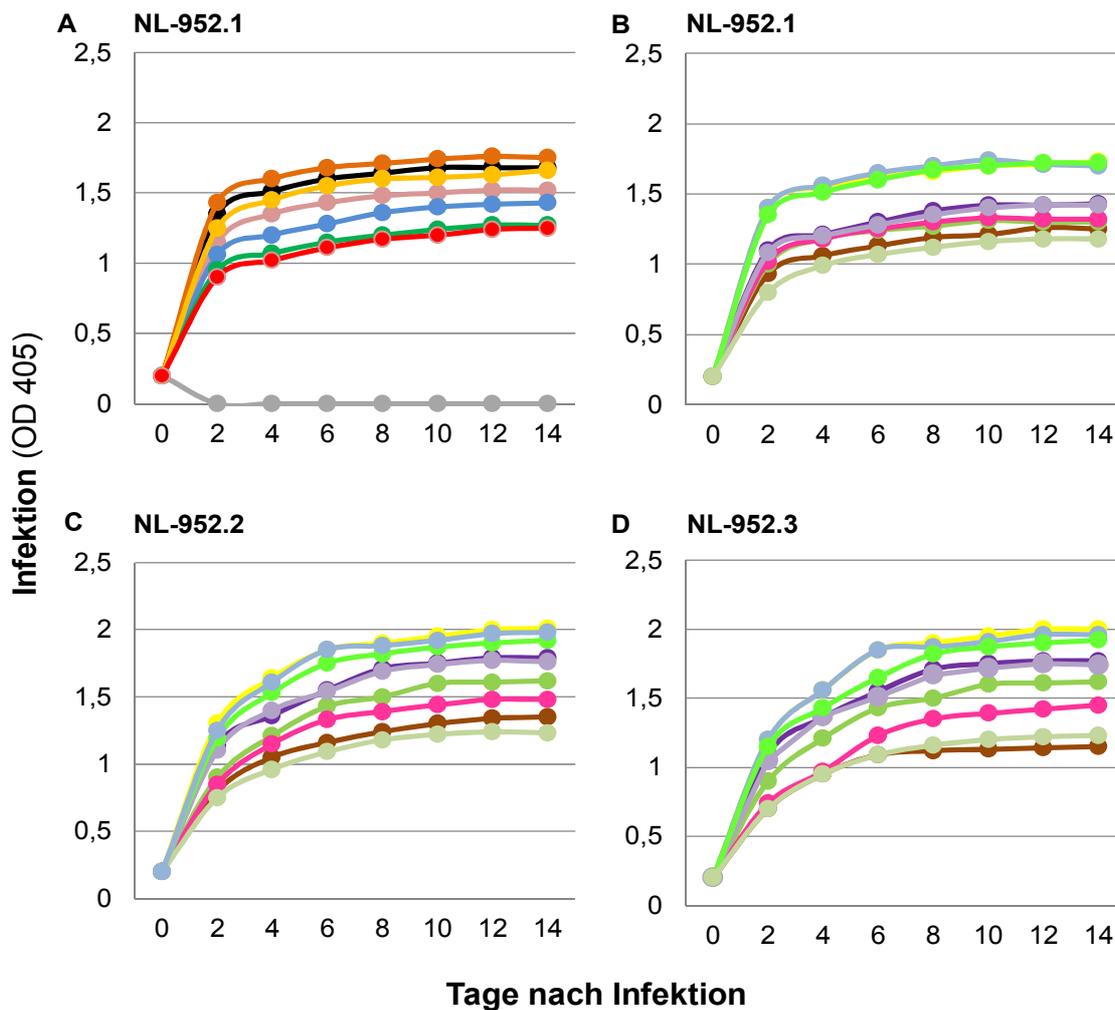


Abb. 17 Wachstum der NL-952-Virusmutanten auf U87-CCR5-Zellen.

Darstellung der Infektion von NL-952-Virusmutanten, auf U87-R5-Zellen. Jede Linie steht für eine R/K- (A) oder eine basische/ungeladene (C-D) Aminosäure-Austausch-Mutante an den untersuchten V3-Loop-Positionen 304-306. Die Buchstaben A-D stehen für die NL-952-Glykomutanten (Abb. 9 / S. 61). A: NL-952.1; B: NL-952.1; C: NL-952.2 und D: NL-952.3. Ghost-R5-Zellen wurden mit 5 ng/ml rekombinanten Virus infiziert und alle 48 h der Überstand abgenommen und der p24-Gehalt (ng/ml) mittels ELISA bestimmt. Fast alle Virusmutanten gehen nach 10 Tagen Wachstum in eine Plateauphase über. Einzig die Virusmutante NL-952.1_{RRR} (A) zeigte kein Wachstum. Die Standardabweichung vom Mittelwert war <8%.

- | | | | | | |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| (●) RRR | (●) RKR | (●) RRK | (●) KRR | (●) RKK | (●) KRK |
| (●) KKR | (●) KKK | (●) RRQ | (●) RKS | (●) KKQ | (●) RTR |
| (●) KKN | (●) SRR | (●) KTK | (●) SKR | (●) SKK | |

4.3 Bestimmung der Infektiosität der NL-952-Virusmutanten.

Die Bestimmung der Infektiosität der einzelnen NL-952-Virusmutanten erfolgte durch die Berechnung der TCID₅₀ nach der Methode von Reed und Muench [122] (Kap. 2.4.5 / S. 41). Alle Virusmutanten wurden nach ihrem TCID₅₀ Wert in die Tabelle eingefügt (Tab. 2 / S. 42) um die Unterschiede in der Infektiosität der einzelnen Virusmutanten darzustellen.

Für die Bestimmung der Infektiosität wurden TZM-bl-Zellen auf 96er-Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden rekombinante Virusüberstände hinzu gegeben. Die Ausgangskonzentration an zugefügtem Virus betrug 5 ng p24/ml (Kap. 2.4.2 / S. 39). Von dieser Konzentration wurden Verdünnungsreihen erstellt. Die Zellkulturplatten wurden weitere 48 h bei 37°C inkubiert. Die Detektion infizierter Zellen erfolgte durch Färbung mit X-Gal. (Kap. 2.4.8 / S. 44). Die infizierten Zellen wurden ausgezählt und anschließend die TCID₅₀ bestimmt. (Kap. 2.4.5 / S. 41).

Tabelle 3 (S. 80) zeigt, abhängig von der Glykosylierungs- und Aminosäure-Kombination, Differenzen in der Infektiosität von mehr als 1 log Stufe. Beispielsweise ist die Infektiosität, angegeben als TCID₅₀, für die Virusmutante NL-952.2_{RRR} $6,6 \times 10^4$ für NL-952.2_{KKK} dagegen nur noch $6,6 \times 10^3$ und für NL-952.2_{SKK} gar $6,1 \times 10^3$.

Ähnlich verhält es sich bei den anderen beiden NL-952 Glykovarianten NL-952.1 und NL-952.3. Hier zeigte sich z.B. für die Virusmutante NL-952.1_{RRR} eine TCID₅₀ von $4,6 \times 10^4$ dahingegen betrug die TCID₅₀ für NL-952.2_{KKK} nur noch $7,0 \times 10^3$. Bei NL-952.3 waren die Unterschiede noch größer, so betrug die TCID₅₀ von NL-952.3_{RRR} $5,2 \times 10^4$ gegenüber $6,6 \times 10^3$ bei NL-952.3_{KKK}.

Tab. 3 Infektiosität der NL-952-Virusmutanten

Virusmutanten	NL-952.1*	NL-952.2	NL-952.3
RRR	4,6x10 ⁴	6,6x10 ⁴	5,1x10 ⁴
RKR	3,9x10 ⁴	5,0x10 ⁴	4,1x10 ⁴
RRK	3,4x10 ⁴	4,6x10 ⁴	3,3x10 ⁴
KRR	2,6x10 ⁴	3,5x10 ⁴	3,0x10 ⁴
RKK	3,2x10 ⁴	3,3x10 ⁴	3,4x10 ⁴
KRK	9,1x10 ³	9,1x10 ³	8,8x10 ³
KKR	8,4x10 ³	9,1x10 ³	8,8x10 ³
KKK	7,0x10 ³	6,6x10 ³	6,6x10 ³
RRQ	3,6x10 ⁴	5,3x10 ⁴	5,2x10 ⁴
KKQ	2,6x10 ⁴	3,5x10 ⁴	3,8x10 ⁴
KKN	3,0x10 ⁴	3,1x10 ⁴	4,0x10 ⁴
SKR	6,5x10 ³	6,6x10 ³	6,1x10 ³
RKS	3,5x10 ⁴	4,9x10 ⁴	4,0x10 ⁴
SRR	8,0x10 ³	8,7x10 ³	8,1x10 ³
SKK	6,0x10 ³	6,1x10 ³	5,9x10 ³
KTK	6,3x10 ³	6,5x10 ³	6,1x10 ³
RTR	2,5x10 ⁴	3,4x10 ⁴	3,2x10 ⁴

* Sequenzen der V3-loop Region inklusive der N-Glykosylierungsstellen g13-g17 sowie der V3-loop positive Ladungen:

NL-952.1 LNETIKINCTRPNNNTRKRITLGPGRVLYTTGEEIIGDIRKAHCNISREKWNNTN (+5)
 NL-952.2 -----Q----- (+5)
 NL-952.3 -K-----D-I-----I-----A- (+5)

*Angaben in TCID₅₀; Die drei Buchstaben beziehen sich auf die drei Aminosäuren 304-306 in der V3-Loop Sequenz des NL-952

R= Arginin, K = Lysin, Q = Glutamin, N = Asparagin, T = Threonin, S = Serin.

4.4 Virus Neutralisationsexperimente

4.4.1 Neutralisation von NL-952-Virusvarianten durch den CXCR4-Liganden SDF-1 α

Es wurde untersucht ob die eingefügten Aminosäureaustausche im NL-952 sich nicht nur auf die Infektiosität und die Korezeptornutzung des Virus, sondern auch auf seine Neutralisierbarkeit auswirken. Dazu wurde die EC₅₀ (mittlere effektive Konzentration) der einzelnen Virusmutanten bestimmt. Der EC₅₀ Wert gibt diejenige Konzentration eines Stoffes, bei der 50% der Virusmutanten neutralisiert werden. Ghost-X4-Indikatorzellen werden mit unterschiedlichen Konzentrationen von SDF-1 α (0-1000 ng/ml), einem natürlichen Liganden des Korezeptors CXCR4, vorinkubiert. Anschließend wurden die so behandelten Zellen mit den NL-952-Virusmutanten infiziert. Um die Infektionsereignisse der verschiedenen Virusmutanten, auf ihre Neutralisierbarkeit hin, miteinander vergleichen zu können, wurden von den einzelnen Virusmutanten jeweils diejenigen Mengen an rekombinantem Virusüberstand eingesetzt, bei denen ohne SDF-1 α ungefähr 100 Infektionsereignisse auftraten. Dann wurden diese als 100% definiert. Detektiert wurden die infizierten Zellen mittels Immunfärbung (Kap. 2.4.10 / S. 45).

Abbildung 18 zeigt die Infektionsereignisse der verschiedenen NL-952-Virusmutanten in Abhängigkeit zur SDF-1 α Konzentration. Wie bereits in früheren Ergebnissen aufgezeigt, verliert das ursprünglich dualtrophe NL-952 Virus seine Fähigkeit auf Ghost-X4-Zellen zu wachsen (Abb. 17 / S. 78), sobald eine positive Ladung entfernt wird (Kap. 4.2.2 / S: 67). Dabei ist es unwichtig an welcher untersuchten V3-Loop-Position, 304, 305 oder 306, der Austausch stattfindet (Abb. 18 / S. 83).

Bei den NL-952.1 Virusmutanten, die das N-Glykan g15 ausbilden (+g15), ist ersichtlich, daß die meisten Virusmutanten bei einer SDF-1 α Konzentration von 250 ng/ml vollständig neutralisiert wurden (Abb. 18 / S. 83). Diese Untersuchungen ergaben einen EC₅₀ Wert von 125 ng/ml. Einzig für die dreifache Lysin Virusmutante NL-952.1_{KKK} liegt der EC₅₀ Wert zwischen 125 ng/ml und 250 ng/ml. Vollständig neutralisiert wird diese Virusmutante erst bei einer Konzentration von 500 ng/ml SDF-1 α (Abb. 18 / S. 83).

Die Virusmutanten der NL-952 Glykovarianten NL-952.2 sowie NL-952.3 zeigen eine Steigerung der Resistenz gegen SDF-1 α , sobald das N-Glykan g15 fehlt (-g15) (Abb. 18 / S. 83). Die Virusmutanten wurden jetzt erst bei SDF-1 α Konzentrationen von mindestens

500 ng/ml vollständig neutralisiert. Der EC_{50} Wert stieg von 125 ng/ml bei den +g15-Glykovarianten von NL-952.1 auf ca. 250 ng/ml bei den -g15-Glykovarianten NL-952.2 und NL-952.3 an. Hierbei verhalten sich die Virusmutanten NL-952.2 und NL-952.3 von den Ergebnissen her sehr ähnlich. Eine Ausnahme bilden die dreifach Arginin Mutanten NL-952.2_{RRR} und NL-952.3_{RRR}. Bei beiden Mutanten konnte keine Steigerung der Resistenz beobachtet werden (Abb. 18 / S. 83).

Unter den Virusvarianten NL-952.2 und NL-952.3 finden sich Virusmutanten, die selbst bei SDF-1 α Konzentrationen von 1000 ng/ml nicht vollständig neutralisiert wurden. Alle diese Virusmutanten wiesen mehrheitlich Lysin (K) anstelle von Arginin (R) an den V3-Loop-Positionen 304-306 auf. Von besonderem Interesse war, daß die Virusmutanten NL-952.2_{RKK} und NL-952.3_{RKK} nicht so leicht neutralisiert wurden, wie die KKK-Virusvarianten, die an allen drei Positionen Lysin (K) besitzen (Abb. 18 / S. 83).

Anhand der Untersuchungen zeigten sich Unterschiede zwischen der Glykovarianten NL-952.1, welche das N-Glykan g15 ausbilden und den Glykovarianten, bei denen das N-Glykan g15 fehlte. Die Ausbildung einer höheren Resistenz gegenüber einer Neutralisation durch den natürlichen CXCR4 Liganden SDF-1 α wird demnach vorwiegend durch das N-Glykan g15 bestimmt (Abb. 18 / S. 83), aber auch hier spielt die Art der basischen Aminosäure an der V3-Loop-Position 304-306 eine wichtige Rolle. Allerdings sind bei der Ausbildung einer SDF-1 α -Resistenz Lysine effektiver sind als Arginine (Abb. 18 / S. 83).

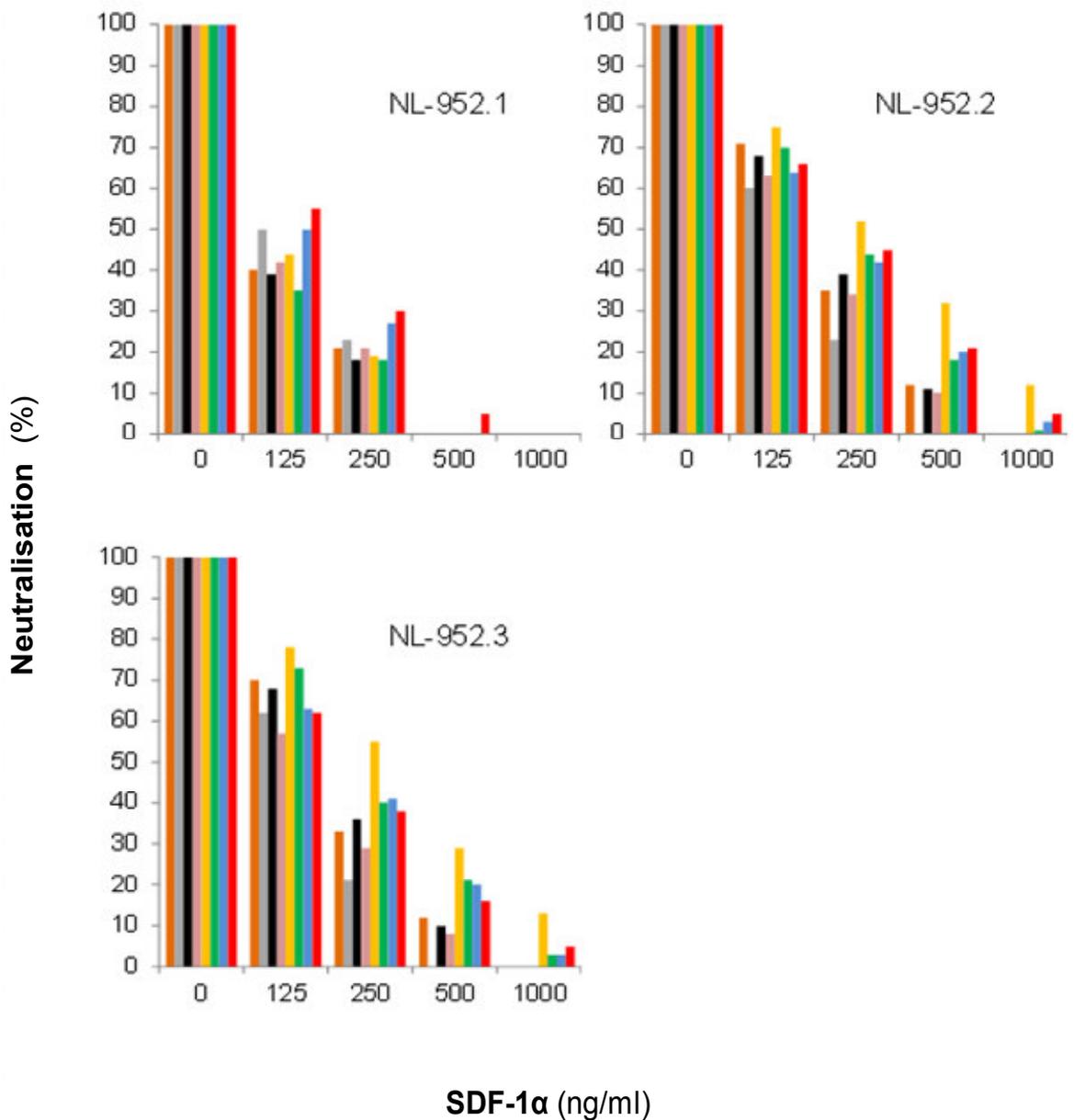


Abb. 18 Neutralisation von NL-952.1;-2;-3 Virusmutanten durch SDF-1α

Verschiedene Virusmutanten der NL-952-Glykovarianten wurden, nach Infektion von Ghost-X4-Zellen, durch SDF-1α neutralisiert. Anschließend wurde der EC₅₀-Wert berechnet. Dabei zeigten Virusmutanten die das N-Glykan g15 ausbilden (NL-952.1) eine geringere Resistenz gegenüber SDF-1α (mittlerer EC₅₀ von 125 µg/ml), als Virusmutanten denen das N-Glykan g15 fehlt [(NL-952.2; -3) mittlerer EC₅₀ von 250 µg/ml]. Die Standardabweichung vom Mittelwert war <10%.



4.4.2 Neutralisation von NL-952-Virusvarianten durch den CCR5-Liganden RANTES

Nachdem untersucht wurde, in wie weit sich die NL-952-Virusmutanten durch den CXCR4-Liganden SDF-1 α neutralisieren lassen, wurde der Versuch für R5-trope NL-952-Virusvarianten auf Ghost-R5-Indikatorzellen durchgeführt. Einer der natürlichen Liganden des CCR5 ist RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*). Die übrigen Versuchsbedingungen wurden genauso wie beim SDF-1 α Versuch gewählt (Kap. 4.4.1 / S. 81).

Abbildung 19 zeigte zunächst den Verlust der Fähigkeit CCR5 als Korezeptor zu nutzen, bei allen Virusmutanten derjenigen NL-952-Glykovarianten, bei denen das N-Glykan g15 fehlte. Sobald allerdings eine der drei untersuchten positiven Ladungen an den Positionen 304-306 innerhalb der V3-Loop-Sequenz durch einen Aminosäure Austausch neutralisiert wurde, hebt sich dieser Verlust wieder auf. Einzige Ausnahme stellt die Virusmutante NL-952.1_{RRR} dar. Sie war trotz Ausbildung des N-Glykans g15 nicht in der Lage, Ghost-R5-Zellen zu infizieren (Abb. 19 / S. 86).

Abbildung 19 zeigte weiter, daß die meisten Virusmutanten bei RANTES Konzentrationen von 500-1000 ng/ml vollständig neutralisiert wurden. NL-952.1 Virusmutanten mit drei positiven Ladungen haben dabei einen EC₅₀ Wert von durchschnittlich 125 ng/ml. Sie wurden besser neutralisiert, als NL-952.1 Virusmutanten mit nur zwei positiven Ladungen an den V3-Loop-Positionen 304-306. Diese Mutanten haben einen durchschnittlichen EC₅₀ von 250 ng/ml (Abb. 19 / S. 86).

Virusmutanten, die bei 1000 ng/ml RANTES nicht vollständig neutralisiert wurden, enthalten an den V3-Loop-Positionen 304-306 mindestens zwei Lysine (K). Die einzige Ausnahme hiervon bildet die Virusvarianten NL-952.1-3_{SRR} (Abb. 19 / S. 86).

Bei der Neutralisierbarkeit von Virusmutanten der NL-952.2 und NL-952.3 Glykovarianten, zeigten die Ergebnisse ein umgekehrtes Bild zum vorherigen SDF-1 α -Versuch (vergleiche Abb. 18 / S. 83 mit Abb. 19 / S. 86). Die Resistenz nimmt durch die Entfernung des Glykans g15 ab.

Wurde die g15 Glykosylierungsstelle mutiert, wurden die meisten Virusmutanten durch RANTES Konzentrationen von 1000 ng/ml vollständig neutralisiert. Besonders resistent

zeigten sich die Virusmutanten SRR der Glykovarianten NL-952.2_{SRR} und NL-952.3_{SRR}. Sie wurden auch bei dieser hohen Konzentration von 1000 ng/ml nicht vollständig neutralisiert. Dahingegen wurden die Virusmutanten NL-952.2_{RTR/KTK} sowie NL-952.3_{RTR/KTK} bereits bei RANTES Konzentrationen von 500 ng/ml vollständig neutralisiert (Abb. 19 / S. 86).

Die Ergebnisse zeigen, ähnlich zur SDF-1 α -Neutralisation, daß das Fehlen des N-Glykans g15 eine entscheidende Rolle bei der Veränderung der Resistenz gegenüber RANTES spielt. Wird das Glykan g15 nicht ausgebildet führt es zu einer deutlichen Reduktion der Resistenz. Diese Versuche unterstützen ebenfalls die Ergebnisse aus Versuch 4.4.1 (Abb. 18 / S. 83) im Bezug darauf, daß Lysin-Virusmutanten schwerer neutralisiert wurden als Arginin-Mutanten.

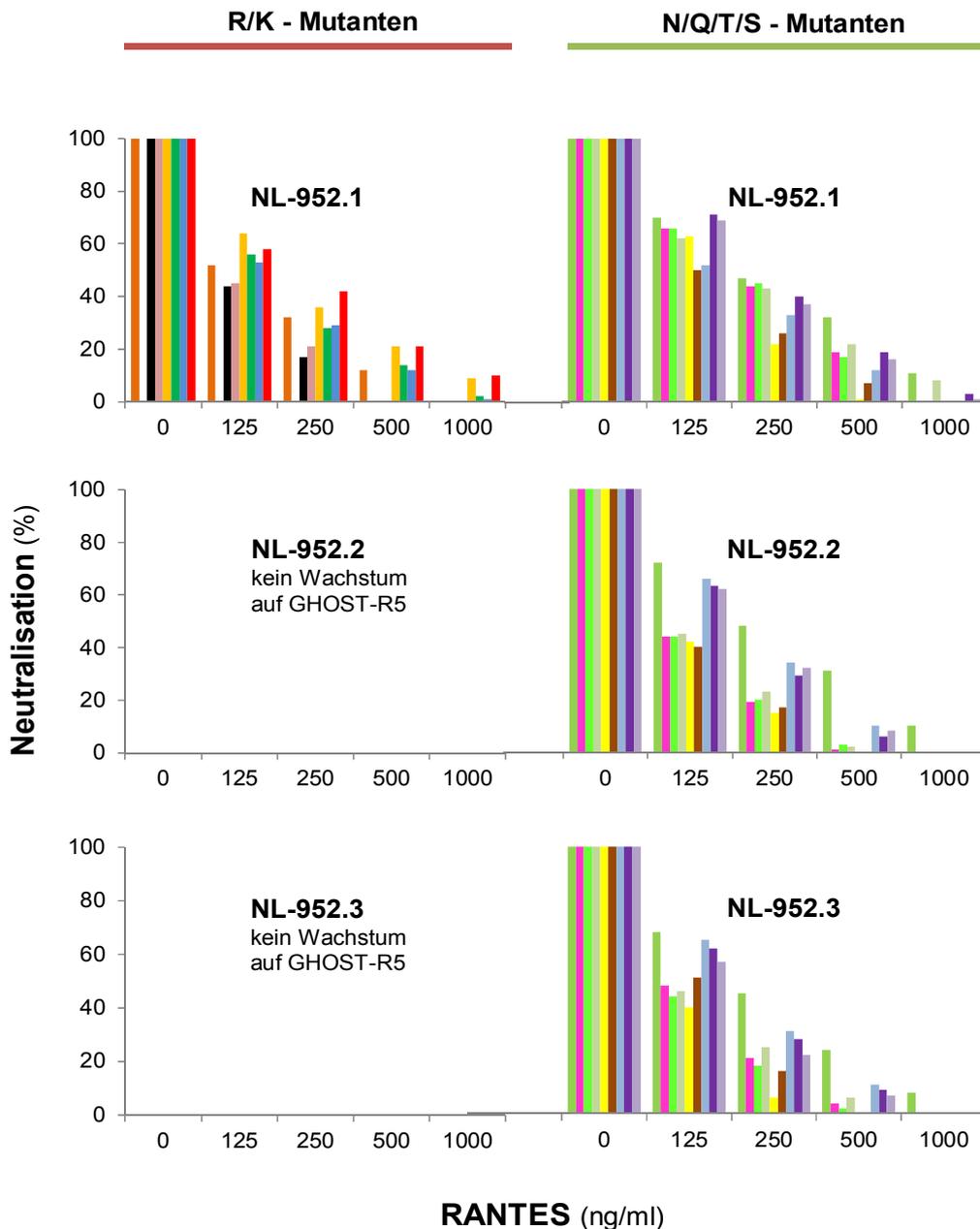


Abb. 19 Neutralisation von NL-952.1; -2; -3 Virusmutanten durch RANTES

Virusmutanten mit dem N-Glykan g15 (NL-952.1) zeigten eine geringere Resistenz gegenüber RANTES (mittlerer EC_{50} von 125 $\mu\text{g/ml}$), als Virusmutanten denen das N-Glykan g15 fehlt [(NL-952.2; -3) mittlerer EC_{50} von 250 $\mu\text{g/ml}$]. Viren mit zwei basischen Aminosäuren zeigten eine höhere RANTES-Resistenz (mittlerer EC_{50} von 250 $\mu\text{g/ml}$), als Viren mit drei basischen Aminosäuren. Letztere wachsen dabei nur auf Ghost-R5-Zellen, wenn das N-Glykan g15 ausgebildet wird (NL-952.1). Die Standardabweichung vom Mittelwert war $<8\%$.



4.4.3 Neutralisation von NL-952 Virusvarianten mit HOCl-modifiziertem humanem Serumalbumin

Zusätzlich zu den SDF-1 α - und RANTES-Neutralisationsexperimenten wurden Untersuchungen mit einem X4/R5-unabhängigem Inhibitor durchgeführt. Eine chemisch, durch HOCl modifizierte Form des Humanen-Serumalbumins (mHSA) bindet an das HIV-1-gp120 und ist in der Lage HIV-1-Typen vollständig zu neutralisieren [124-127]. Für die Untersuchungen wurden TZM-bl-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors mHSA (0-248 μ g/ml) vorinkubiert und anschließend mit den verschiedenen Mutanten der NL-952.1 und NL-952.2 Virusvarianten infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und die infizierten TZM-bl-Zellen durch X-Gal.-Färbung dargestellt. Für die Auswertung wurden die Anzahl der in Abwesenheit von mHSA infizierten Zellen als 100% definiert. Die weiteren Werte wurden gemäß dieser Definition auf diese 100% bezogen. Anschließend wurde der EC₅₀ bestimmt.

Abbildung 20 zeigt, daß NL-952.1-Virusmutanten (+g15) eine höhere Resistenz gegenüber mHSA besitzen als NL952.2-Virusmutanten (-g15). Für NL-952.1-Virusmutanten wurde bei einer Neutralisation durch mHSA eine EC₅₀ von durchschnittlich 8 μ g/ml errechnet. Die EC₅₀ von NL-952.2-Virusmutanten liegt hingegen bei durchschnittlich 4 μ g/ml. Die Werte der NL-952.3-Virusmutanten (nicht gezeigt) gleichen denen von NL-952.2. Die Neutralisation durch das inhibitorische Protein mHSA wirkt also besonders gut gegen genau diejenigen NL-952-Glykovarianten, die sich in den vorherigen Versuchen als besonders resistent gegen eine Neutralisation durch SDF-1 α und RANTES gezeigt haben (vergleiche Abb. 18, 19 / S. 83, 86 mit Abb. 20 / S. 89).

Bei der Neutralisation von Virusmutanten der Glykovariante NL-952.1 durch mHSA, wird die Virusmutante NL-952.1_{RRR} am besten neutralisiert. Bereits mHSA Konzentrationen von 16 μ g/ml reichen zur vollständigen Neutralisation. Im Gegensatz dazu wird die Virusmutante NL-952.1_{KKK} erst bei mHSA Konzentrationen von 128 μ g/ml vollständig neutralisiert. Die übrigen Virusmutanten zeigen eine vollständige Neutralisation bei mHSA Konzentrationen von ca. 64 μ g/ml (Abb. 20 / S. 89).

Auch bei der Glykovariante NL-952.2 wird die Virusmutante NL-952.2_{RRR} durch mHSA am besten neutralisiert. Sie ist bereits bei mHSA Konzentrationen 16 μ g/ml nicht mehr in Zellkulturen nachweisbar. Die Virusmutante NL-952.2_{KKK} zeigt auch bei Fehlen des

N-Glykans g15, die höchste Resistenz gegenüber mHSA. Sie wird erst bei mHSA Konzentrationen von 64 µg/ml vollständig neutralisiert. Die übrigen untersuchten Virusmutanten der NL-952.2-Glykovariante werden bei mHSA Konzentrationen von ca. 32 µg/ml vollständig neutralisiert (Abb. 20 / S. 89).

Die Ergebnisse zeigen ein umgekehrtes Bild gegenüber der Neutralisation durch Rezeptor spezifische Liganden. Hier wirkt sich das in den vorherigen Versuchen als resistenzsteigernd wirkende N-Glykan g15, resistenzvermindernd aus. Übereinstimmungen mit den beiden vorherigen Versuchen 4.4.1 und 4.4.2 (Abb. 18, 19 / S. 83, 86) werden in der resistenzsteigernden Wirkung von Lysinen erzielt (Abb. 20 / S. 89).

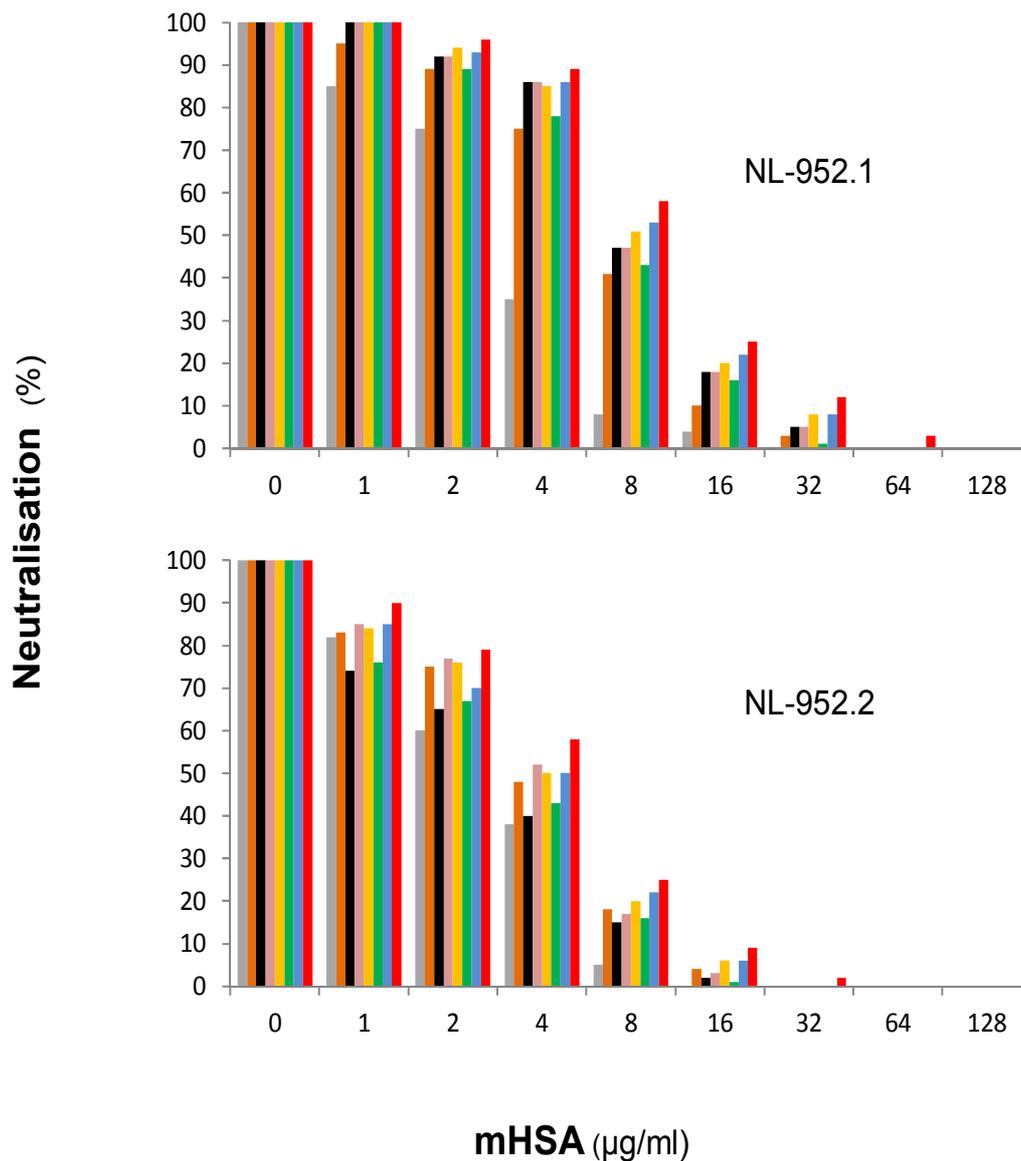


Abb. 20 Neutralisation von NL-952-Virusmutanten durch mHSA

Verschiedene Virusmutanten der Glykovarianten NL-952.1 und -.2 wurden nach der Infektion von TZM-bl-Zellen mit mHSA inkubiert. Dabei zeigten Virusmutanten die das N-Glykan g15 haben (NL-952.1) eine höhere Resistenz gegenüber mHSA (mittlerer EC_{50} von 8 µg/ml), als Virusmutanten denen das N-Glykan g15 fehlt [(NL-952.2) mittlerer EC_{50} von 4 µg/ml]. Zur Vergleichbarkeit der Infektionsereignisse wurde jeweils ca. 100 ffu eingesetzt. Die Ausgangszahl an infizierten Zellen wurde als 100% definiert und die Neutralisation in Prozent (%) angegeben. Die Standardabweichung vom Mittelwert war <10%.



4.5 Infektionsexperimente mit NL-952-Virusmutanten in Anwesenheit von autologen oder heterologen rekombinantem gp120

4.5.1 Freies rekombinantes gp120_{KKK} hat keinen Einfluss auf die Infektiosität von NL-952_{RRR}

Freies rekombinantes gp120 ist in der Lage die Infektion von HIV-1-Typ zu fördern oder aber zu inhibieren [101]. In dieser Arbeit wurde das Spektrum auf dualtrophe HIV-1B-Varianten erweitert. In wie weit kann ein Virus welches beide HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4 nutzen kann, wie z.B. NL-952.1_{RRR} durch heterologes rekombinantes gp120 z.B. gp120-952.1_{KKK} beeinflussen werden.

Freies gp120 wurde durch Transfektion von Hela-P4-Zellen mit verschiedenen NL-952-Virusmutanten hergestellt (Kap. 2.3.6 / S. 36). Das auf der Zelloberfläche exprimierte gp120 dissoziiert in den Zellkulturüberstand. Mit Hilfe eines Dot-Blot (Kap. 2.3.9 / S. 38) zur Quantifizierung von gp120 wurde die durchschnittliche Konzentration von 25 – 50 ng/ml gp120 in den Zellkulturüberständen gemessen. Für die Versuche wurde eine Konzentration von 7,5 ng/ml eingesetzt. Hierzu wurden die gp120 enthaltenen Zellkulturüberstände 1:1 mit DMEM 5% FKS Medium verdünnt. Als nächstes wurden TZM-bl-Zellen auf 96er-Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden in Anwesenheit von 7,5 ng/ml freiem gp120 952.1_{KKK} rekombinante Virusüberstände der gleichen Virusmutanten NL-952.1_{RRR} infiziert. Weitere Kombinationen erfolgten für NL-952.2 und NL-952.3 (siehe Liste heterologer Kombinationen). Die Ausgangskonzentration an zugefügtem Virus betrug 5 ng p24/ml pro Well. Von dieser Konzentration wurden Verdünnungsreihen erstellt. Die Zellkulturplatten wurden weitere 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung der TZM-bl-Zellen wie unter (Kap. 2.4.7 / S. 44) beschrieben. Es wurden jeweils 20 Wells ausgezählt und daraus ein Mittelwert ($\sum x$) gebildet.

Liste der heterologen Virus/gp120-Kombinationen:

RRR-Virus	freies KKK-gp120
NL-952.1 _{RRR}	gp120 952.1 _{KKK}
NL-952.2 _{RRR}	gp120 952.2 _{KKK}
NL-952.3 _{RRR}	gp120 952.3 _{KKK}

Abbildung 21 zeigt, daß freies gp120 NL-952.1_{KKK};-2_{KKK};-3_{KKK} keinen steigernden oder inhibierenden Effekt auf die Infektiosität von NL-952.1_{RRR};-2_{RRR};-3_{RRR} Virusmutanten hat.

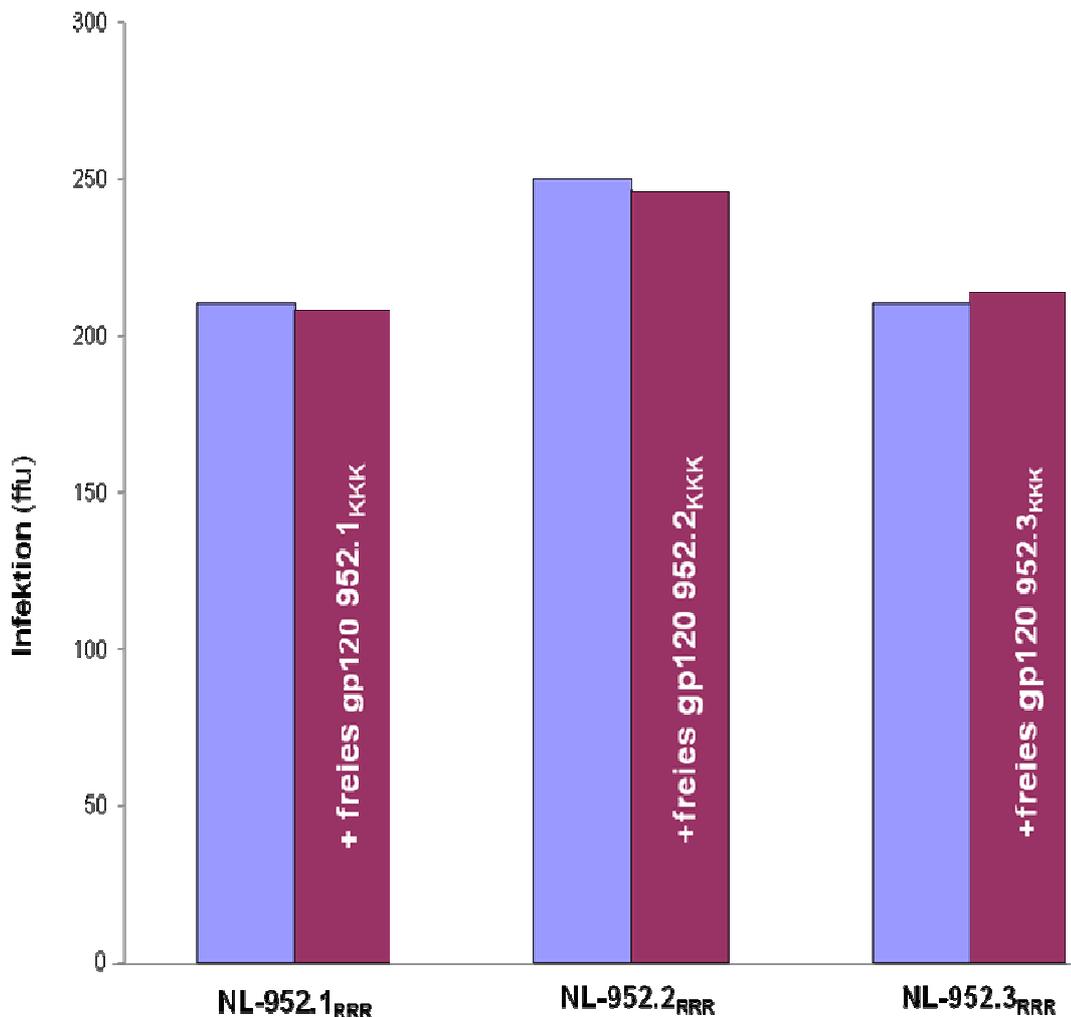


Abb. 21 Infektiosität der RRR-Viren in Anwesenheit von KKK-gp120

Rekombinanten Glykovarianten von NL-952.1_{RRR};-2_{RRR};-3_{RRR} wurden jeweils einmal unabhängig vom heterologen freien gp120-952.1_{KKK}, -2_{KKK}, -3_{KKK}, und einmal in dessen Anwesenheit infiziert. Es wurden einmal die Infektionsereignisse normal (●) und dann in Anwesenheit von freiem gp120 (●) angezeigt (siehe Liste in 4.5.1 / S. 90). Es zeigte sich kein die Infektion steigernder oder inhibierender Effekt. Die Standardabweichung vom Mittelwert war <8%.

4.5.2 Steigerung der Infektiosität von NL-952-Viren mit K-Austauschen durch freies gp120 mit R-Austauschen

In Versuch 4.5.1 konnte gezeigt werden, daß X4-tropes gp120, von NL-952-Virusvarianten mit einer niedrigen Replikationsrate, nicht in der Lage ist X4-trope NL-952-Virusvarianten mit hohen Replikationsraten zu beeinflussen.

In diesem Versuch wird nun der umgekehrte Weg untersucht: Wie beeinflusst freies gp120 von NL-952-Virusvarianten mit hohen Replikationsraten, NL-952-Virusvarianten mit niedrigen Replikationsraten? Dafür wurden in Anwesenheit von 7,5 ng/ml freiem gp120 952.1_{RRR}, TZM-bl-Zellen mit rekombinantem Virusüberstand der Virusvariante NL-952.1_{KKK} infiziert. Weitere heterologe Kombinationen erfolgten für NL-952.2 und NL-952.3 (siehe Liste heterologer Kombinationen).

Liste der Virus/gp120 Kombinationen:

KKK-Virus	freies RRR-gp120
NL-952.1 _{KKK}	gp120 952.1 _{RRR}
NL-952.2 _{KKK}	gp120 952.2 _{RRR}
NL-952.3 _{KKK}	gp120 952.3 _{RRR}

Es wurde der gleiche Versuchsaufbau wie im vorherigen Versuch, jedoch mit NL-952.1_{KKK}, -2_{KKK}, -3_{KKK}-Virusmutanten und freiem gp120-1_{RRR}, -2_{RRR}, -3_{RRR} genutzt. Wie im allen vorherigen Versuchen wurden die Ergebnisse als Mittelwerte ($\sum x$) aus jeweils 20 ausgezählten Wells einer 96er-Mikrotiterplatte gebildet.

Abbildung 22 (S. 93) zeigt, daß X4-tropes freies gp120 952-1_{RRR}, -2_{RRR}, -3_{RRR} in der Lage ist, die Infektiosität von NL-952.1_{KKK}, -2_{KKK}, -3_{KKK}-Virusmutanten zu steigern. Hierbei fällt auf, daß die Virusmutante NL-952.1 mit ca. 40% die stärkste Steigerung erfährt. Bei den Virusmutanten NL-952.2 und NL-952.3 fällt die Steigerung mit 32% bzw. 27% entsprechend geringer aus (Abb. 22 / S. 93). Somit kann X4-tropes freies gp120 von NL-952 Viren mit hohen Replikationsraten (gp120-952.1_{RRR}, -2_{RRR}, -3_{RRR}), X4-trope Viren mit niedrigeren Replikationsraten (NL-952.1_{KKK}, -2_{KKK}, -3_{KKK}) in ihrer Infektiosität steigern.

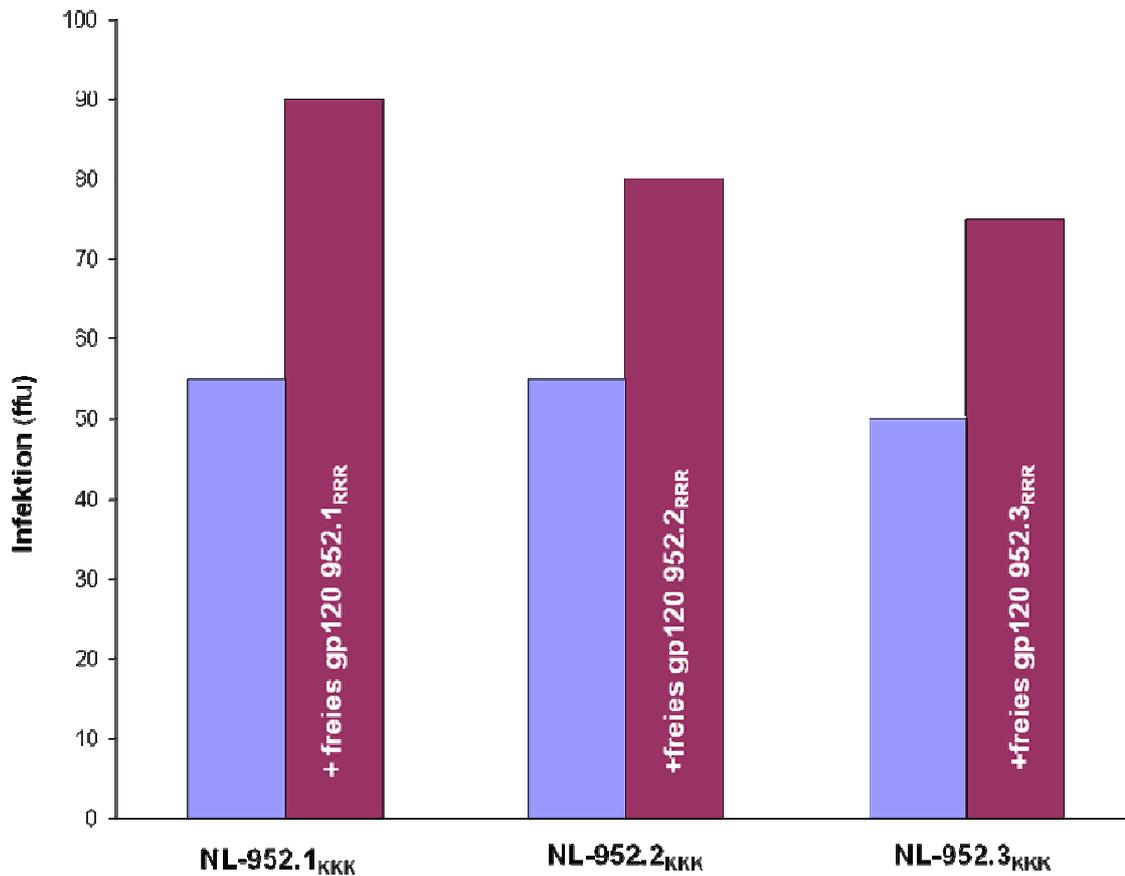


Abb. 22 Infektiosität der KKK-Viren in Anwesenheit von RRR-gp120

In diesem Folgeexperiment zu Versuch 4.5.1 (Abb. 21 / S. 91), wurden rekombinante Glykovarianten von NL-952.1_{KKK}; -2_{KKK}; -3_{KKK} jeweils einmal unabhängig vom heterologen freien gp120-952.1_{RRR}, -2_{RRR}, -3_{RRR}, und einmal in dessen Anwesenheit infiziert. Es wurden die Infektionsereignisse normal (●) und in Anwesenheit von freiem gp120 (●) angezeigt (für Kombination siehe Liste in 4.5.2 / S. 92). Dabei zeigte sich ein die Infektion steigernder Effekt bei KKK-haltigen NL-952-Glykovarianten durch RRR-haltiges freies gp120 derselben Glykovariante. Die Standardabweichung vom Mittelwert war <7%.

4.5.3 Neutralisation von X4-tropen NL-952.2_{KKK};-3_{KKK} Virusmutanten durch X4-tropes freies gp120 952.2_{RRR};-3_{RRR} auf Polybrene vorbehandelten TZM-bl-Zellen

Es ist möglich, daß die Steigerung der Infektiosität im Versuch 4.5.2 durch Adsorptionseffekte wie z.B. Bindung an Heparan-Sulfat-Proteoglykane (HSPG) vermittelt worden ist. Versuche in unserer Arbeitsgruppe zeigten, daß sich der infektionssteigernde Effekt aufhebt, sobald die Zellen vorher mit Heparinase 1, welches HSPG von der Zelloberfläche abschneidet, vorbehandelt wurden [101]. Um diese Adsorptionseffekte zu untersuchen wurde HSPG im folgenden Versuch nicht entfernt, sondern seine negative Ladung neutralisiert. Dazu wurde der Versuch auf vorher mit Polybrene behandelten TZM-bl-Zellen durchgeführt. Polybrene ist ein Polykation, welches durch Bindung an HSPG dessen negative Ladungen überlagert [128]. Da die HSPG-abhängige Abstoßung der Virus- von der Zellmembran dadurch minimiert wird, spielen Adsorptionseffekte in mit Polybrene vorbehandelten TZM-bl-Zellen keine Rolle mehr. TZM-bl-Zellen wurden zunächst 1 h mit 2 µg/ml Polybrene bei 37° präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen in Anwesenheit von 7,5 ng/ml freiem gp120 952.1_{KKK};-2_{KKK};-3_{KKK}, mit rekombinanten Virusüberständen der Virusmutanten NL-952.1_{RRR};-2_{RRR};-3_{RRR} infiziert. Für jedes Einzelexperiment wurden die gleichen Glykovarianten verwendet (z.B. freies gp120 952.2_{KKK} zu NL-952.2_{RRR}), Das Experiment wurde dann umgekehrt (freies gp120 952.1_{RRR};- 2_{RRR};- 3_{RRR} und NL-952.1_{KKK};- 2_{KKK};- 3_{KKK}-Virusmutanten) wiederholt. Die Ausgangskonzentration an zugefügtem Virus betrug 5 ng p24/ml. Von dieser Konzentration wurden Verdünnungsreihen erstellt. Die Zellkulturplatten wurden weitere 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung der TZM-bl-Zellen wie unter (Kap. 2.4.7 / S. 44) beschrieben. Es wurden jeweils 20 Wells ausgezählt und daraus ein Mittelwert ($\sum x$) gebildet.

Abbildung 23 (S. 96) zeigt, daß abhängig von der verwendeten Virusmutante, es auf Polybrene vorbehandelten TZM-bl-Zellen zur Verdrängung der Virusmutante durch freies gp120 kommt. Detailliert ist zu sehen, daß NL-952.1;-2;-3_{KKK} Virusmutanten durch freies gp120 aus der Bindung verdrängt werden, wenn die Zellen mit Polybrene vorbehandelt sind. So wird die Infektiosität der Virusmutanten NL-952.2_{KKK} und NL-952.3_{KKK} durch die jeweiligen freien gp120 952.2_{RRR} und gp120 952.3_{RRR} um 62%

beziehungsweise 64% reduziert. Allerdings kommt es zu keiner Reduktion der Infektiosität der Virusmutante NL-952.1_{KKK} auf Polybrene durch freies gp120 952.1_{RRR} (Abb. 23 / S. 96). Das ist nicht verwunderlich, da NL-952.1_{KKK} ein dualtropes Virus ist, während freies gp120 952.1_{RRR} X4-monotrop ist. Da TZM-bl-Zellen beide Korezeptoren CCR5 und CXCR4 auf ihrer Oberfläche exprimieren, kann NL-952.1_{KKK} bei blockiertem Korezeptor CXCR4 die Zelle weiterhin über den Korezeptor CCR5 infizieren

Weiter ist aus Abbildung 23 ersichtlich, daß umgekehrt die Virusmutanten NL-952.1_{RRR},- 2_{RRR},- 3_{RRR} auf Polybrene vorbehandelten TZM-bl-Zellen keiner Veränderung der Infektiosität durch freies gp120.1_{KKK},- 2_{KKK},- 3_{KKK}. unterliegen.

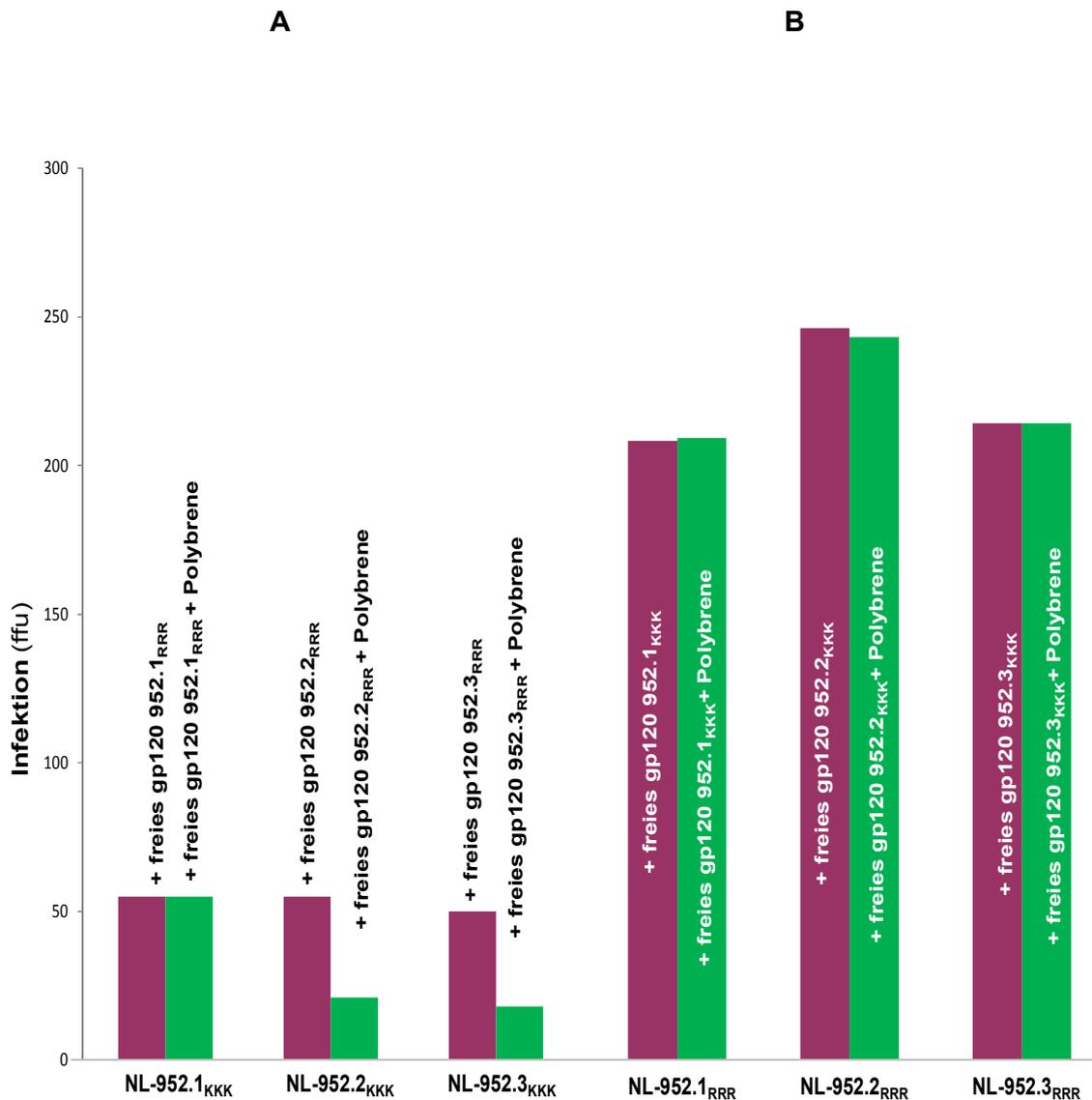


Abb. 23 Wachstum von NL-952-Virusmutanten in Anwesenheit von freiem gp120 derselben Glykovariante auf Polybrene vorbehandelten TBM-bi-Zellen

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte aus jeweils 20 separaten Versuchen gebildet. Es werden einmal die Infektionsereignisse von HIV-1-Typ + freies gp120 auf Polybrene vorbehandelten TBM-bi-Zellen und auf nicht vorbehandelten Zellen gemessen. (●) Infektion auf unbehandelten TBM-bi-Zellen, (●) Infektion auf Polybrene vorbehandelten Zellen (2 µg/ml). A: NL-952.1_{KKK}; -.2_{KKK}, -.3_{KKK} mit freiem heterologem gp120.1_{RRR}; -.2_{RRR}, -.3_{RRR}. B: NL-952.1_{RRR}; -.2_{RRR}, -.3_{RRR} mit freiem heterologem gp120.1_{KKK}; -.2_{KKK}, -.3_{KKK}. Die Standardabweichung vom Mittelwert war <8%.

4.5.4 Verdrängung von NL-952.1_{KKK} durch freies gp120 952.1_{RRR} auf Ghost-X4-Indikatorzellen

Im vorherigen Versuch zeigte freies gp120 952.1_{RRR} keine Auswirkungen auf NL-952.1_{KKK}, da bei blockiertem Korezeptoren CXCR4, die NL-952.1_{KKK} Infektion über den Korezeptor CCR5 läuft. Um den Effekt von freiem gp120 952.1_{RRR} auf NL-952.1_{KKK} zu analysieren, wurden Ghost-X4-Indikatorzellen verwendet, denen der Korezeptor CCR5 fehlt (Tab. 1 / S. 34). Diese Zellen wurden auf 96er Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Präinkubation mit 2 µg/ml Polybrene bei 37° für 1 h. Die gp120 enthaltenen Zellkulturüberstände wurde wie in den vorangegangenen Versuchen 1:1 mit DMEM 5% FKS Medium verdünnt. Danach wurden die Zellen in Anwesenheit von 50% freiem gp120-952.1_{RRR} Virusüberstand (ca. 7,5-15 ng/ml) mit NL-952.1_{KKK} infiziert. Hierbei wurde zur besseren Visualisierung der Ergebnisse 4x mehr Virusüberstand eingesetzt als normal (20 ng/ml). Die 48-well-Zellkulturplatten wurden anschließend 48 h bei 37°C inkubiert. Die infizierten Zellen wurden danach mit Hilfe eine *Green fluorescence Protein* (GFP) visualisiert.

Abbildung 24 (S. 98) zeigt eine Reduktion der Infektion von NL-952.1_{KKK} durch freies gp120-952.1_{RRR}. Auf Polybrene vorbehandelten X4-monotropen Zellen verdrängt freies gp120 952.1_{RRR} das NL-952.1_{KKK} Virus aus der Bindung an CXCR4. Da die Aminosäureaustausche RRR→KKK die einzigen Unterschiede in den beiden gp120-Molekülen sind, ist zu vermuten, daß dieser Effekt durch die Aminosäuren bedingt wird. Wenn das so ist hätte Arginin bei ansonsten gleichen Testbedingungen eine höhere Affinität zum Korezeptor CXCR4 als Lysin.

Ghost-X4-Indikatorzellen +2 μ g/ml
Polybrene + 20ng/ml NL 952.1_{KKK}

Ghost-X4-Indikatorzellen 2 μ g/ml
Polybrene + 20ng/ml NL 952.1_{KKK} +
50% Überstand freies gp120 952.1_{RRR}

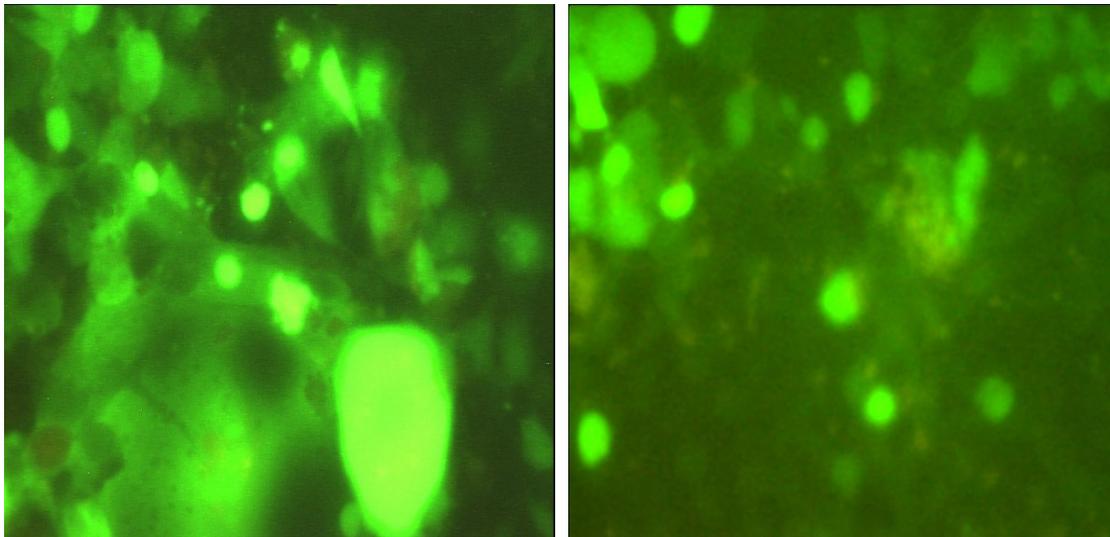


Abb. 24 Neutralisation von NL-952.1_{KKK} durch freies gp120-952.1_{RRR}

Die Testbedingungen sind ansonsten dieselben wie unter 4.5.3. (S. 94) nur das anstelle von TZM-bl-Zellen Ghost-X4-Indikatorzellen verwendet wurden. Auf der linken Abbildung ist die Infektion von Polybrene vorbehandelten Ghost-X4-Indikatorzellen durch NL-952-1_{KKK} gezeigt, auf der rechten Abbildung wurde freies gp120-952.1_{RRR} hinzu gegeben. Es zeigt sich, daß auf X4-monotropen Zellen freies gp120-952.1_{RRR} in der Lage ist NL-952-1_{KKK} zu neutralisieren.

4.6 Auswirkungen der Glykosylierungsstelle g15 auf den Tropismus der X4-tropen Glykovariante NL-930

In den vorherigen Versuchen konnten wir aufzeigen, daß beim Verlust des Glykans g15 das dualtrophe NL-952 nach X4-monotroph driftet. Dabei stellt sich die Frage ob das Glykan g15 generell einen starken Einfluss auf den Korezeptordrift von HIV ausübt. Um dieses zu untersuchen wurde das X4-monotrophe HIV-1B NL-930 verwendet. Beim diesem Virus handelt es sich um eine NL4-3-Chimäre, welche die V3-Sequenz des Primärisolates PI-930 besitzt [124]. Im ursprünglichen Patientenisolat PI-930 fehlt das N-Glykan g15 und anstelle des Glykosylierungsmotivs NNNT wird das davon weit entfernte Motiv YRNA verwendet. Aufgrund dieses Motivs kann das Glykan g15 auch nicht durch eine einfache Punktmutation reaktiviert werden. Somit ist davon auszugehen, daß das NL-930 Motiv YRNA durch mehrere Mutationen entstanden ist. Dieses zeigt, daß Varianten von HIV-1B auch ohne das Glykan g15 erfolgreich replizieren können. Alle weiteren untersuchten Glykosylierungsstellen für die N-Glykane g13, g14, g16 und g17 sind unverändert vorhanden.

Wenn also ein dualtrophes Virus wie NL-952 beim Verlust des Glykans g15 nach X4 driftet, dann sollte das X4-trophe Virus NL-930 beim Austausch des Motivs YRNA durch das Glykosylierungsmotiv NNNT und die damit verbundene Ausbildung des Glykans g15 wieder nach dualtrop oder R5-monotrop driften, vorausgesetzt die Ausbildung des Glykans g15 ist isoliert dafür verantwortlichen. Damit ließe sich der Einfluss des Glykans g15 auf den Tropismus deutlich machen.

Durch S. Polzer wurde das Motiv YRNA bereits durch das Glykosylierungsmotiv NQNT ersetzt. Durch das Einfügen von Punktmutationen wurden die Glykosylierungsmotive der Glykane g13-g17 weiter verändert und die von S. Polzer [124] geschaffene Palette von NL-930 Glykovarianten um die für unsere Fragestellung wichtigen Glykovarianten erweitert (Polzer 2002). Dafür wurde zunächst das von S. Polzer an der Glykosylierungsstelle g15 eingebrachte Aminosäuremotiv QNT, durch das N-Glykosylierungsmotiv NNT ersetzt (Abb. 25 / S. 100). Danach wurde auf Basis der NL-930+g15 Glykovariante, weitere NL-930 Glykovarianten bei denen die Glykane g13, 14, 15, 16 und 17 in unterschiedlichen Kombinationen fehlten, erstellt. Alle durchgeführten Punktmutationen wurden durch DNA-Sequenzierung (CEQ 2000) bestätigt.

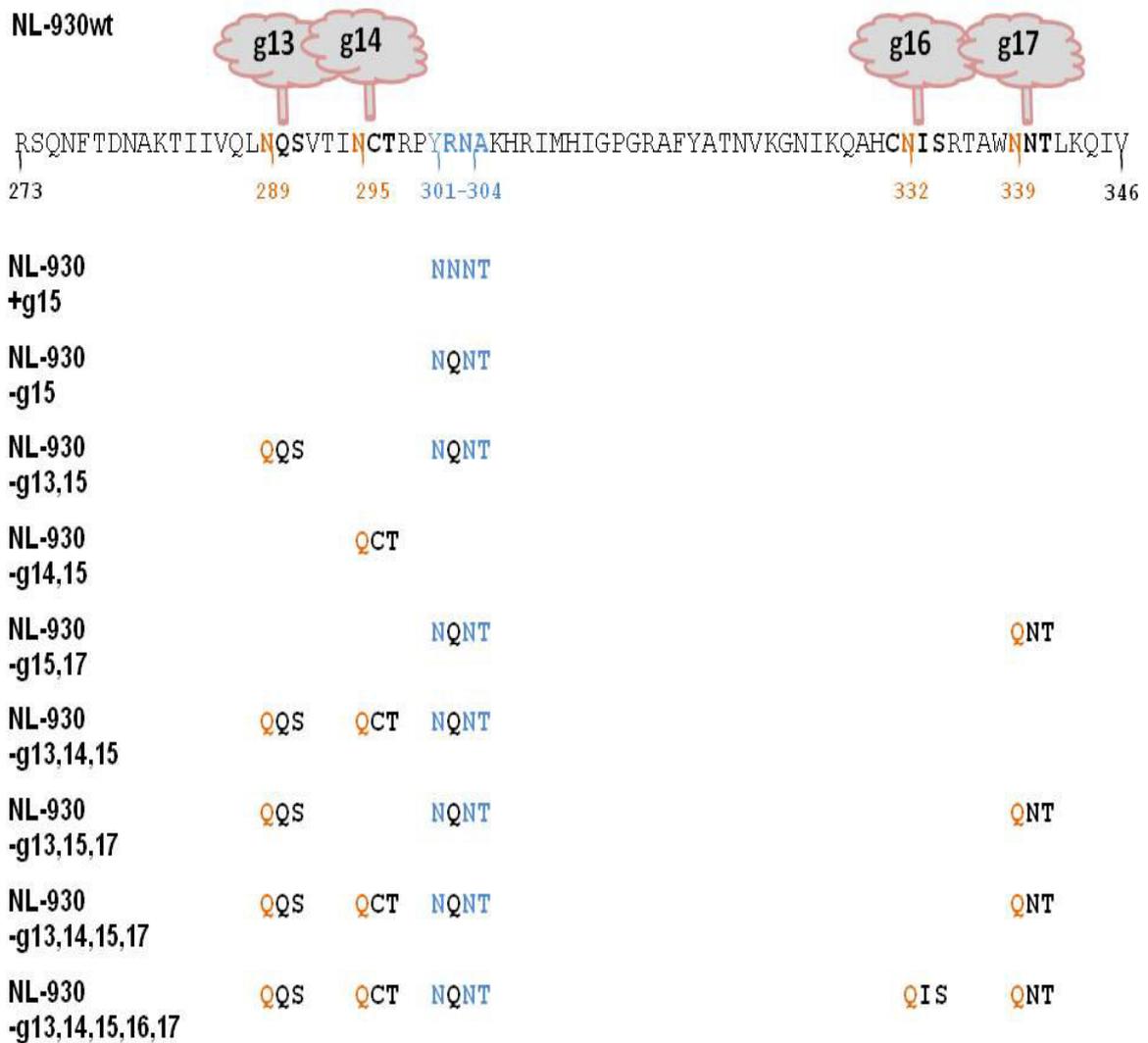


Abb. 25 Liste der NL-930 Glykovarianten

Die Abbildung zeigt die Liste von NL-930 Glykovarianten ausgehend von dem NL-930wt Motiv YRNA. Dieses wurde durch das g15 Glykosylierungsmotiv NNNT ausgetauscht. Ausgehend von der NL-930+g15_{NNT} Glykovariante wurden dann die verschiedenen NL-930-Glykovarianten erstellt.

4.6.1 Auswirkungen der N-Glykane g13-g17 auf die Infektiosität von NL-930-Glykovarianten

Um den Einfluss des N-Glykans g15 auf die Infektiosität der X4-tropen Glykovarianten von NL-930 zu überprüfen, wurden TZM-bl-Zellen mit Virusüberständen der unterschiedlichen NL-930-Glykovarianten infiziert. Die gewählten Glykovarianten unterschieden sich insbesondere durch die Anwesenheit oder das Fehlen des N-Glykans g15. TZM-bl-Zellen wurden in 96er Mikrotiterplatten ausgesät und nach 24 h entweder mit 2,5 ng/ml p24 oder mit 5 ng/ml p24 einer rekombinanten Glykovariante von NL-930 infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und die infizierten TZM-bl-Zellen durch X-Gal-Färbung dargestellt. Die blau gefärbten Zellen wurden dann unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Aus jeweils 20 ausgezählten Wells pro Virusmutante wurde dann ein Mittelwert ($\sum x$) gebildet.

Abbildung 26 (S. 102) zeigt, daß nur Glykovarianten bei denen das N-Glykan g15 fehlt, in der Lage sind auf TZM-bl-Zellen zu infizieren. Diejenigen Glykovarianten NL-930+g15_{NNNT} bei denen das Glycosylierungsmotiv g15 vorhanden ist (NNNT) und das N-Glykan g15 ausgebildet wird, sind bei den eingesetzten Virusmengen nicht in der Lage TZM-bl-Zellen zu infizieren (Abb. 26 / S. 102). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von S. Polzer 2002 [124] auf Ghost-X4-Zellen gefunden. Da TZM-bl-Zellen auch den Korezeptor CCR5 enthalten wurden diese Zellen gewählt. Damit sollte untersucht werden ob diejenigen Glykovarianten, welche nicht mehr X4 als Korezeptor nutzen können, eventuell auf R5 ausweichen. Das Phänomen des Tropismuswechsels ist bereits für andere HIV-1- Glykovarianten im Zusammenhang mit dem N-Glykan g15 beschrieben worden [92, 124]. Aus Abb. 26 (S. 102) ist jedoch ersichtlich, daß NL-930+g15 Glykovarianten auch nicht in der Lage sind den Korezeptor CCR5 zur Infektion zu nutzen. Sie sind letal.

Die NL-930-Virusvarianten bei denen das N-Glykan g15 fehlt, zeigen eine hohe Infektiosität auf TZM-bl-Zellen (Abb. 26 / S. 102). Somit ist festzuhalten, daß das Fehlen des N-Glykans g15 eine entscheidende Rolle für die Infektion von Wirtszellen durch NL-930 Glykovarianten spielt. Für die übrigen N-Glykane g13, g14, g16 und g17 zeigte sich, daß die Anzahl der fehlenden N-Glykane entscheidender für die Infektiosität ist, als das Fehlen eines bestimmten N-Glykans. So nimmt die Infektiosität mit abnehmender Anzahl von N-Glycosylierungsstellen ab (Abb. 26 / S. 102) Die Glykovarianten

NL-930_{YRNA} (wt) und NL-930-g15_{QNT} zeigen ähnliche Infektionswerte. Beiden fehlt nur das N-Glykan g15. Genauso verhalten sich die Glykovarianten zueinander, welchen die gleiche Anzahl (zwei, drei oder gar vier) an N-Glykane fehlt. Das N-Glykan g15 scheint als einziges aus diesem Schemata heraus zu fallen. Sobald g15 ausgebildet wird, ist auch keine Infektion möglich, wenn alle anderen Glykane g13-g17 fehlen (Abb. 26). Damit scheint das N-Glykan g15 die entscheidende Rolle für die Infektiosität von X4-monotropen HIV-1-Glykovarianten zu spielen.

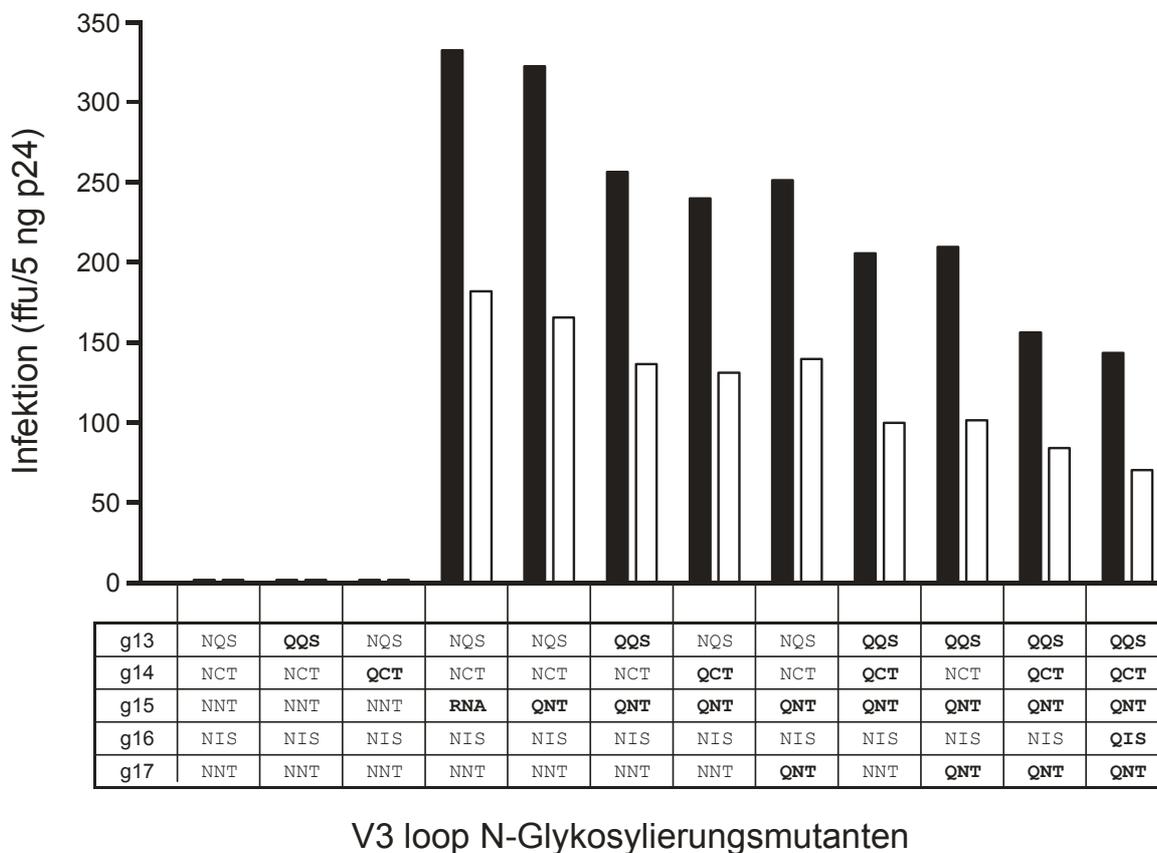


Abb. 26 Infektiosität der NL-930-Glykovarianten

TZM-bl-Zellen wurden mit NL-930 Virusüberständen mit einer Konzentration von 2,5 ng p24/ml (○) oder 5 ng p24/ml (●) infiziert. Unter der Graphik befinden sich die Glykosylierungsmotive der Glykane g13-g17. Ausgeschaltete Glykosylierungsstellen sind dabei hervorgehoben. Virusmutanten, die das N-Glykan g15 ausbilden zeigten dabei kein Wachstum. Die Infektiosität nimmt mit der Anzahl der fehlenden N-Glykane ab. Die Standardabweichung vom Mittelwert war <10%.

4.6.2 Spezifische Infektiosität der HIV NL-930-Glykovarianten

Die Bestimmung der Infektiosität der einzelnen NL-930-Glykovarianten erfolgte nach der Methode von Reed & Muench (Kap. 2.4.5 / S. 41). Hierzu wurden TZM-bl-Zellen auf einer 96er-Mikrotiterplatte ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden rekombinante Virusvarianten hinzu gegeben. Die Ausgangskonzentration an zugefügtem Virus betrug 5 ng/ml p24. Von dieser Konzentration wurden Verdünnungsreihen erstellt. Die Zellkulturplatten wurden weitere 48 h bei 37°C inkubiert. Die Detektion infizierter Zellen erfolgte durch Färbung mit X-Gal. Die infizierten Zellen wurden ausgezählt und dann die Infektiosität mithilfe der unter Methode beschriebenen Formeln (Kap. 2.4.5 / S. 41) berechnet.

Tabelle 4 (S. 104) zeigt die Infektiosität der verschiedenen NL-930-Glykovarianten. Zunächst sieht man keine Infektiosität bei allen NL-930-Glykovarianten, welche das N-Glykan g15 ausbilden (NL-930-g13, NL930+g15_{NNT}). Alle übrigen Glykovarianten, denen das N-Glykan g15 fehlt, erreichten sehr hohe TCID₅₀ Werte. Hierbei ist weiter auffällig, daß im Bezug auf die übrigen untersuchten Glykane g13, g14, 16 und g17 vor allem die Anzahl und weniger die Position der fehlenden Glykane eine Auswirkung auf die Infektiosität hat (Tab. 4 / S. 104). Damit steht fest, daß das Fehlen des N-Glykans des g15, entscheidend für die Infektiosität von NL-930-Glykovarianten ist. Bei allen anderen untersuchten Glykanen ist das Fehlen nicht so entscheidend und für die Infektiosität des Virus eher nachteilhaft.

Tab. 4: Infektiosität der NL-930-Glykovarianten

NL-930 Glykovarianten	g13	g14	g15	g16	g17	TCID ₅₀
	NET	NCT	NNT	NIS	NNT	
NL-930	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	0×10 ⁴
NL-930 -g13	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	0×10 ⁴
NL-930 -g14	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	0×10 ⁴
NL-930 (wt) -g15 _{YRNA}	(+)	(+)	(-) YRNA	(+)	(+)	1,5×10 ⁵
NL-930 -g15 _{QNT}	(+)	(+)	(-) QNT	(+)	(+)	1,2×10 ⁵
NL-930 -g13, g15	(-)	(+)	(-) QNT	(+)	(+)	6,8×10 ⁴
NL-930 -g14, 15	(+)	(-)	(-) QNT	(+)	(+)	6,1×10 ⁴
NL-930 -g15, 17	(+)	(+)	(-) QNT	(+)	(-)	6,1×10 ⁴
NL-930 -g13, 14, 15	(-)	(-)	(-) QNT	(+)	(+)	4,1×10 ⁴
NL-930 -g13, 15, 17	(-)	(+)	(-) QNT	(+)	(-)	4,2×10 ⁴
NL-930 -g13, 14, 15, 17	(-)	(-)	(-) QNT	(+)	(-)	1,9×10 ⁴
NL-930 -g13, 14, 15, 16, 17	(-)	(-)	(-) QNT	(-)	(-)	1,6×10 ⁴

*Angaben in TCID₅₀;. Die Buchstaben beziehen sich auf die Aminosäuren, welche zum Ausbildung bzw. Deletion von Glykostrukturen verwendet worden sind.

A = Alanin, N= Asparagin, Q = Glutamin, R= Arginin, T = Threonin, Y = Thyrosin,

4.6.3 Die Neutralisation von NL-930-Glykovarianten durch mHSA ist abhängig von der N-Glykosylierung des V3-Loop

Um zu prüfen, in wie weit sich das Vorhandensein des N-Glykan g15 innerhalb der V3-Loop-Sequenz allgemein auswirkt, wurde ein weiterer Inhibitionstest mit einem vom den Korezeptoren CCR5 oder CXCR4 unabhängigen Inhibitor durchgeführt. Hierfür eignete sich besonders mHSA (Virus envelopebinding Protein) [124-127]. TZM-bl-Zellen wurden in 96er Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die TZM-bl-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen mHSA (0-64 µg/ml) 1 h vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ng/ml p24 rekombinanten NL-930-Glykovarianten infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und die infizierten TZM-bl-Zellen durch X-Gal-Färbung dargestellt (Kap. 2.4.8 / S. 44). Für die Auswertung wurden die Anzahl der in Abwesenheit von mHSA infizierten Zellen als 100% definiert. Die weiteren Werte wurden gemäß dieser Definition auf diese 100% bezogen.

Abbildung 27 (S. 106) lässt deutlich erkennen, daß mHSA in der Lage ist NL-930-Glykovarianten zu neutralisieren. Der Neutralisationseffekt ist hierbei abhängig von der Anzahl der V3-Loop N-Glykane. Die NL-930-Glykovarianten, welchen ausschließlich das N-Glykan g15 fehlte, erwiesen sich resistenter gegenüber der Neutralisation durch mHSA als NL-930-Glykovarianten denen mehrere Glykane fehlten. Die Glykovarianten NL-930-g13/14/15Q, NL-930-g13/15/17 und NL-930-g13/14/15/16/17 z.B, denen drei oder mehr N-Glykane fehlen, werden bereits bei mHSA Konzentrationen von 32 µg/ml vollständig neutralisiert. Dagegen wurden diejenigen Glykovarianten welche nur eine oder zwei fehlende N-Glykane aufwiesen, erst bei mHSA Konzentrationen von 64 µg/ml vollständig neutralisiert. NL-930-Glykovarianten, bei denen das N-Glykan g15 ausgebildet wird, sind nicht in der Lage auf TZM-bl-Zellen zu wachsen (Tab. 4 / S. 104). Sie sind deshalb nicht in Abbildung 27 aufgeführt. Es zeigt sich, daß die Neutralisierbarkeit durch mHSA von der Anzahl der fehlenden N-Glykane abhängig ist. Je mehr N-Glykosylierungsstellen fehlen, desto wirkungsvoller die Inhibition durch mHSA (Abb. 27 / S. 106). Gleichzeitig zeigt sich auch in diesem Experiment, die entscheidende Rolle des N-Glykans g15 für das Wachstum von NL-930-Glykovarianten. Aus Abbildung 27 ist weiter ersichtlich, daß die EC_{50} Werte für alle verwendeten NL-930-Glykovarianten bei ungefähr 4 µg/ml liegen.

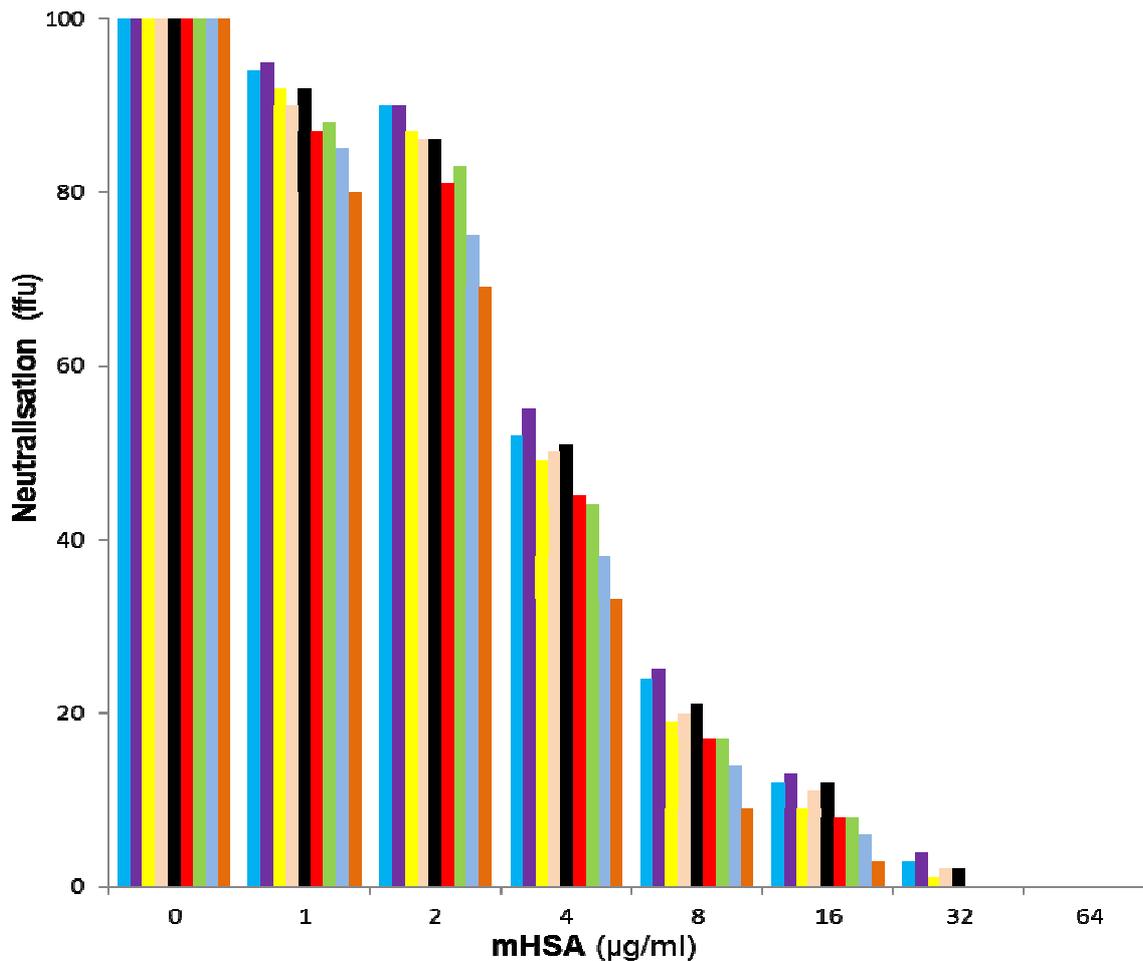


Abb. 27 Neutralisation von NL-930-Glykovarianten durch mHSA

Die Abbildung zeigt die konzentrationsabhängige Neutralisation von NL-930-Glykovarianten durch mHSA auf TZM-bl-Zellen. Zur Vergleichbarkeit wurde von jeder Virusmutante diejenige Menge Virusüberstand eingesetzt, bei der ohne Zusatz von mHSA ca.100 Infektionsereignisse zu erwarten waren. Jede farbige Säule steht für eine NL-930-Glykovariante. A: Glykovarianten denen nur das Glykan g15 fehlt, B: Fehlt das Glykan g15 und ein weiteres Glykan (g13-g17), C: Fehlt das Glykan g15 und mehrere oder alle Glykane (g13-g17). Es zeigt sich, daß Glykovarianten denen nur das N-Glykan g15 fehlt, resistenter gegen die Neutralisation durch mHSA sind, als NL-930 Glykovarianten, denen zusätzlich zum N-Glykan g15 weitere N-Glykane (g13-g17) fehlen. Die Standardabweichung vom Mittelwert war <9%.

A

(●) NL-930-g15_{YRNA}
 (●) NL-930-g15_{QNT}

B

(●) NL-930-g13,15
 (●) NL-930-g14,15
 (●) NL-930-g15,17

C

(●) NL-930-g13,14,15
 (●) NL-930-g13,15,17
 (●) NL-930-g13,14,15,17
 (●) NL-930-g13,14,15,16,17

5 Diskussion

5.1 Aminosäure Austausch an den Positionen 304-306 innerhalb des V3-Loop und ihre Auswirkungen auf Infektiosität, Tropismus und Neutralisierbarkeit des NL-952 Virus

Die Charakterisierung des HIV-Tropismus ist ein wichtiges diagnostisches Kriterium zur Therapieplanung. Zur schnellen Abschätzung werden verschiedene Programme wie z.B. Geno2pheno oder webPSSM verwendet (Tab. 5 / S. 120). Als Kriterium zur Berechnung dient hierfür die 11/24/25-Regel [85, 86, 90]. Sie bewertet die Ladungsverhältnisse innerhalb des HIV-V3-Loop. Dabei werden allerdings nur die Ladungsverhältnisse an sich und nicht die Unterschiede zwischen den einzelnen basischen Aminosäuren berücksichtigt, da nach der bisher gängige Meinung, die Unterschiede zwischen den einzelnen basischen Aminosäuren zu vernachlässigen sind und nur die positive Ladung an sich eine Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin an den untersuchten Positionen 304-306 innerhalb des V3-Loop von HIV-1 nicht generell als gleichwertig anzusehen sind. Das widerlegt die bisher gängige Meinung und mit den hier erlangten Ergebnissen ist es möglich die 11/24/25-Regel [85, 86, 90] weiter zu verfeinern. Hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die untersuchten Parameter Infektiosität, Virus-Neutralisation und Tropismus zeigten sich bedeutende Unterschiede. Im Wesentlichen zeigen die Ergebnisse:

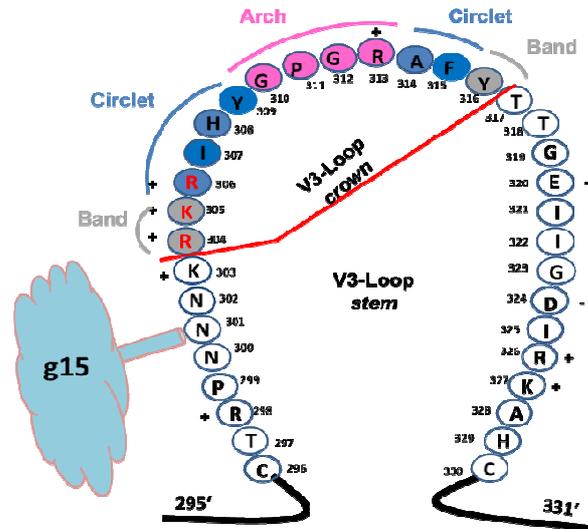
1. Arginin an den von uns untersuchten Positionen hat einen positiveren Effekt auf die Infektiosität und den Tropismus des HIV-1 als Lysin. Je höher der Anteil an Arginin im Bezug zu anderen Aminosäuren, desto höher die Infektiosität $6,6 \times 10^4$ (NL-952.2_{RRR}) versus $6,8 \times 10^3$ (NL-952.2_{KKK}) (Tab. 3, S. 79).
2. Lysin steigert die Resistenz gegenüber der Neutralisation durch mHSA und natürliche Korezeptorliganden wie z.B. RANTES und SDF-1 α (Abb. 18-20, S. 82; 85, 88).

In den letzten Jahren wurde der V3-Loop mit seiner Bedeutung für den Korezeptor intensiv studiert. Insbesondere die Arbeitsgruppe von Suzan Zolla-Pazner leistete hierzu einen entscheidenden Beitrag. Nach neuesten Erkenntnissen wird der V3-Loop nach Huang *et al.* (2005 & 2007) [76, 77] in 3 Abschnitte gegliedert V3-Loop-*base*; *stem* und *crown* (Abb. 6 / S. 18). Die V3-Loop-*crown* wurde anschließend weiter differenziert. Sie wird in der zweidimensionalen Betrachtung nach Jiang *et al.* (2010) [129] in die drei

Bereiche *arch*, *circlet* und *base*, gegliedert (Abb. 28A / S. 109). In der dreidimensionalen Betrachtung wurde die *V3-crown* aufgrund der Ausrichtung der Aminosäureseitenketten nach Almond *et al.* (2010) [130, 131] in vier Bereiche gegliedert (Abb. 28B / S. 109), wobei die Übergänge zwischen *V3-Loop-crown* und *V3-Loop-stem* gegenüber der Einteilung nach Huang *et al.* abweichen. Almond untergliederte die *V3-Loop-crown* Region in eine *base*, ein *hydrophilic* und ein *hydrophobic face* des amphipatischen β -Hairpins, sowie den konservierten β -turn [130, 131] mit dem GPG-Motiv. Die Seitenketten aller variablen Aminosäuren (306, 308, 314 und 317) bilden dabei das *hydrophilic face*. Die übrigen Bereiche sind hoch konserviert (Abb. 28B, 29 / S. 109, 110).

Innerhalb des so aufgegliederten *V3-Loop* spielen elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen eine entscheidende Rolle. Sie stabilisieren die *V3-Loop crown* des HIV-1 Subtyps B in einem β -Hairpin welcher entweder besser mit dem Korezeptor CCR5 oder CXCR4 interagiert [132]. Interessanterweise wird die für HIV-1B so wichtige Konformation der *V3-Loop crown* bei HIV-1-Subtyp C nicht ausgebildet [133]. Das der Arginin-Anteil entscheidend für die Infektiosität ist liegt wahrscheinlich an den unterschiedlichen Bindungseigenschaften der beiden basischen Aminosäuren. Dieses deckt sich mit neueren Ergebnissen aus anderen molekularen Bereichen, die aufzeigen, daß zwischen beiden Aminosäuren deutliche Unterschiede im Bindungsverhalten bestehen [134-136]. So konnte z.B. Schwieger *et al.* (2008) [137] aufzeigen, daß Arginin in seiner Bindung an biologische Membranen deutlich weniger von elektrostatischen Wechselwirkungen abhängig ist als Lysin. Die Bindung von Arginin hängt viel mehr von hydrophoben Wechselwirkungen und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ab. Neuere Erkenntnisse postulieren, daß gp120 den Korezeptor zunächst über das generelle elektrostatische Potential der beiden Proteine findet. Hierbei besitzt CCR5 aufgrund seiner höheren negativen Nettoladung, ein größeres elektrostatisches Potential als CXCR4. Erst wenn beide Proteine sich aneinander anzulagern beginnen, spielen die positiven Ladungen direkt eine Rolle [138]. Somit können diesbezügliche Unterschiede der beiden basischen Aminosäuren das Bindungsverhalten von HIV-1 bereits den initialen Schritt beeinflussen. Dieses würde die bessere Infektiosität von Virusmutanten mit höherem Arginin-Anteil in dieser Studie erklären (Tab. 3 / S. 80).

A



B

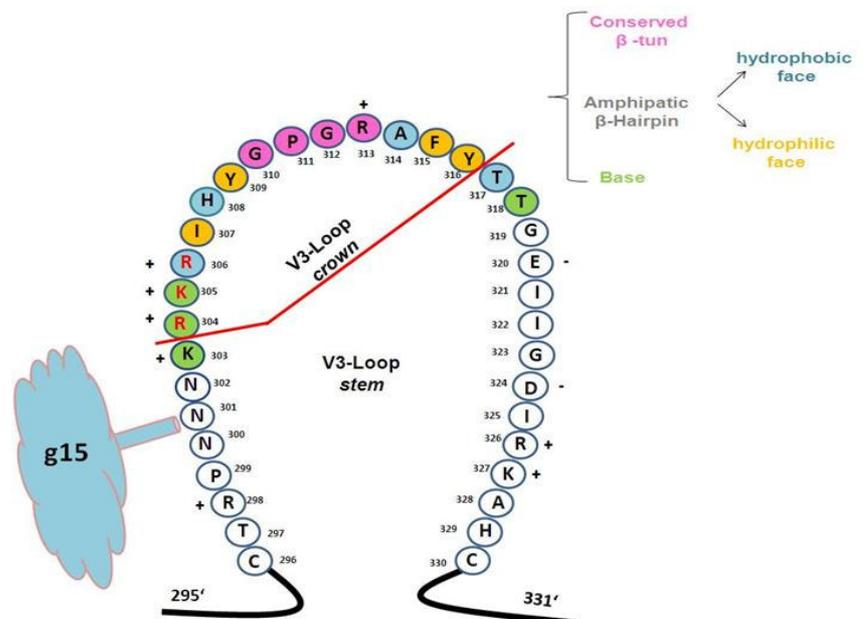
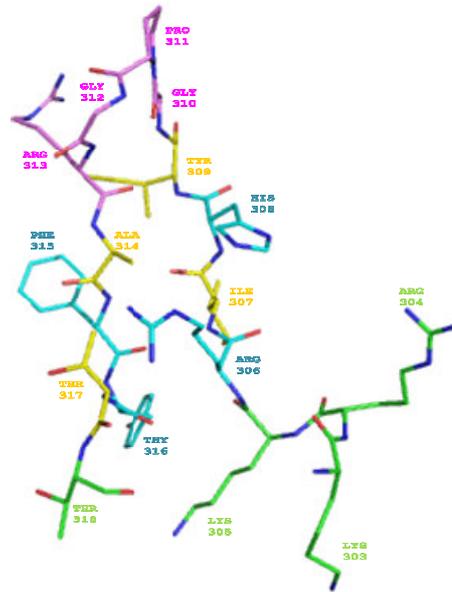


Abb. 28 Darstellungen der V3-Loop crown

Die V3-crown (Spitze des V3-Loop) wird nach Jiang (2010) in 3 Bereiche unterteilt A: *Band* (grau) (AS 304; 305; 316), *Circlet* (blau) (AS 306-309; 314; 315) und *Arch* (pink) (AS 310-314). Nach detaillierter Analyse wird sie bei dreidimensionaler Betrachtung nach Almond (2010) anhand der Ausrichtung der Aminosäureseitenketten in 4 Bereiche B: *Base* (grün) (AS 303-305; 318), *amphipatic beta-Hairpin* mit *hydrophobic face* (hellblau) (AS 306; 308; 314; 317) und *hydrophilic face* (gelb) (AS 307; 309; 315; 316) sowie den *conserved beta-turn* (pink) (AS 310-314) gegliedert, welche teilweise in den V3-stem hineinreichen. Abbildung modifiziert nach [129-131]

A



B

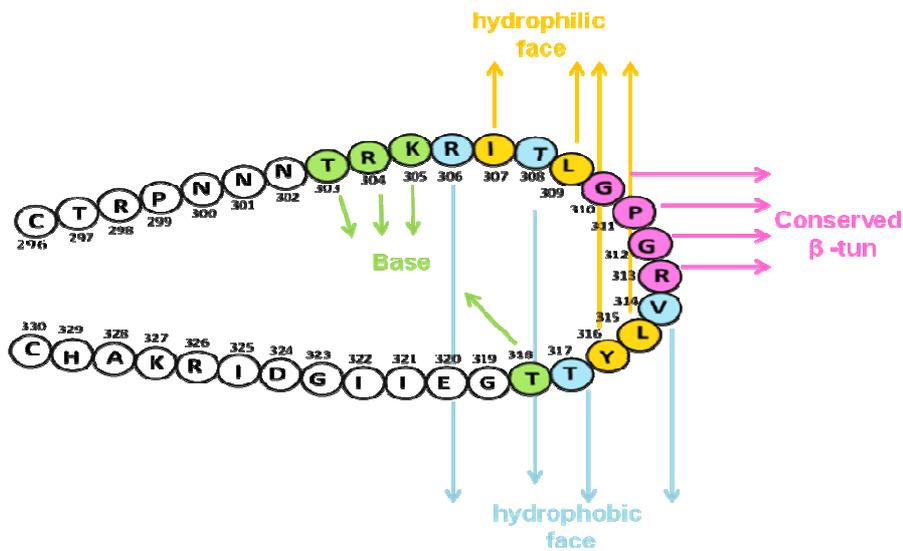


Abb. 29 3D-Interpretation der V3-Loop *crown* nach Almond

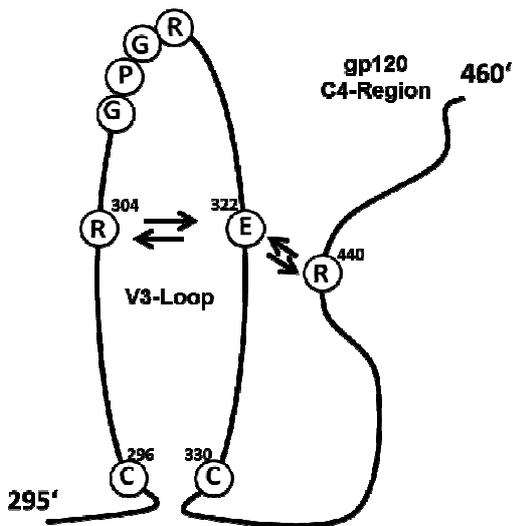
Die V3-*crown* wird in der dreidimensionalen Betrachtung anhand der Ausrichtung der Aminosäureseitenketten in 4 Bereiche. A: zeigt die dreidimensionale farbige Struktur, inklusive der Amino- (blau) und Carboxylgruppen (rot) B: zeigt die farbige Aufteilung innerhalb des V3-Loop (vergleiche Abbildung 28, Graphik B / S. 109) in *Base* (grün) (AS 303-305; 318), *amphipatic β -Hairpin* mit *hydrophobic face* (hellblau) (AS 306; 308; 314; 317) und *hydrophilic face* (gelb) (AS 307; 309; 315; 316) sowie den *conserved β -turn* (pink) (AS 310-314) gegliedert, welche teilweise in den V3-*stem* (AS 296-304 und 318-330) hineinreichen. Die Abbildung wurde modifiziert nach [129-131]

In diesem Zusammenhang scheint die Guanidinogruppe des Arginins ein Vorteil gegenüber der ϵ -Aminogruppe des Lysins zu haben. Vor diesem Hintergrund erklärt sich auch, daß in der V3-Loop-Bindungsregion des Korezeptors ein stark negatives elektrostatisches Potential besteht, wohingegen in den von der Bindungsregion abgewandten Bereichen vornehmlich ein positives elektrostatisches Potential existiert [139].

Die Bindung von Korezeptor und V3-Loop wurde anhand des Korezeptors CCR5 genauer untersucht. Dabei bindet der V3-Loop, wie bereits besprochen, in zwei Schritten an den Korezeptor. Zuerst bindet die V3-Loop *base* zusammen mit Anteilen des *bridging-sheets* an den Thyrosin-reichen N-terminus des Korezeptors. Anschließend bindet die V3-Loop *crow*n und Teilen des V3-Loop *stem* an die *extracellular loops* (ECL) 1 & 2 im Korezeptor-Körper [76-79, 139]. Eine Reihe von Aminosäuren wurde bereits identifiziert, die während dieses Bindungsvorgangs besondere Rollen spielen. Das im V3-Loop hoch konservierte Arginin 298 zum Beispiel interagiert während der Bindung des Korezeptors nicht nur sehr spezifisch an *6-O-sulfated Syndecane* sondern ebenso spezifisch an den N-Terminus des CCR5 [140, 141].

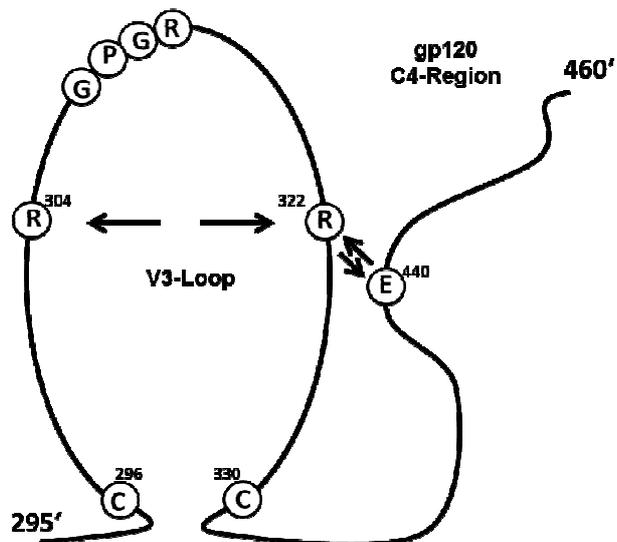
Die Aminosäuren 306 und 322 (11/25) spielen zusammen mit der Aminosäure an Position 440 in der C4-Region, eine wichtige Rolle bei der Auswahl des Korezeptors [90, 142-145]. Wenn an Position 322 eine saure Aminosäure ausgebildet wird, befindet sich häufig an Position 440 ein konserviertes Arginin, welches über elektrostatische Wechselwirkungen mit Position 322 interagiert. Diese Interaktion schränkt die Flexibilität des V3-Loop C-terminus ein, so daß sich der V3-Loop N-Terminus daran anpasst. Dieses begünstigt die Ausbildung eines V3-Loop β -*Hairpin*, welcher dem β -*Hairpin* des Korezeptors CCR5 nachempfunden ist und das Virus nach R5 stabilisiert (Abb. 30A / S. 112) [143, 146]. Befindet sich hingegen an Position 440 eine saure Aminosäure und an Position 322 eine basische, wird ein V3-Loop β -*Hairpin* ausgebildet, dem β -*Hairpin* des Korezeptors CXCR4 nachempfunden ist (Abb. 30B / S. 112). Das Virus ist dann X4-trop [146-148]. In diesem Zusammenhang spielt das an Position 304 hoch konservierte Arginin eine wichtige Rolle. Über alle HIV-Subtypen gesehen kommt es an dieser Position zu >95% vor. Einzige Ausnahme hiervon bildet HIV-1D mit 91% [91, 149-151]. Es ist Bestandteil der V3-Loop *crow*n und bildet zusammen mit den Aminosäuren an den Positionen 305 (K) und 318 (T) dessen *base* [108, 141]. Es stellt die Bindestelle für anti-V3-Loop monoklonale Antikörper wie z.B. mab2219 oder mab2558 dar [152].

A



R5-trop

B



X4-trop

Abb. 30 Stabilisierung des HIV-1B V3-Loop β -Hairpin in R5- oder X4-Konformation zur Korezeptornutzung

Gezeigt ist die V3-Loop-crown von R304E/R322 sowie die AS R/E in der C4-Region des gp120. Die Aminosäuren an den Positionen 304 und 322 liegen in der 3D Struktur des V3-Loop in direkter Nachbarschaft. A: Die Glutaminsäure an Position 322 interagiert über elektrostatische Wechselwirkungen mit den Argininen R440 und R304. Dieses stabilisiert den V3-Loop β -Hairpin in einer geschlossenen R5-Konformation. B: Interaktion der Aminosäuren Arginin an Position 322 und Glutaminsäure an Position 440, bei gleichzeitiger Abstoßungsreaktion zwischen R304 und R322. Dadurch ist der V3-Loop β -Hairpin stärker geöffnet und wird in X4-Konformation stabilisiert. Abbildung modifiziert nach [143-148, 153]

Arginin-304 liegt im β -Hairpin der Position 322 direkt gegenüber. In R5-Konformation, wenn sich an der Position 322 eine saure Aminosäure befindet, kommt es zur elektrostatischen Interaktion und somit zur Annäherung der β -Hairpin Enden [153]. Dieses stabilisiert die R5-Konformation weiter, da die saure Aminosäure an Position 322 wie bereits oben erwähnt auch mit dem Arginin an Position 440 interagiert (Abb. 30A / S. 112). Befindet sich allerdings an Position 322 eine basische Aminosäure führen die positiven Ladungen zur Abstoßung zwischen Arginin 304 und der basischen Aminosäure an Position 322. Der β -Hairpin ist weiter offen und Position 322 wird dann nur durch die jetzt negative Ladung an Position 440 stabilisiert. Es resultiert eine X4-Konformation (Abb. 30B / S. 112) [143, 154].

5.1.1 Untersuchung des Aminosäure Austausches an der V3-Loop Position 304

Unsere Ergebnisse zeigen daß der Austausch R304K die Infektiosität um $\frac{1}{2}$ log Stufe reduziert. Ersetzt man die basische durch eine ungeladene Aminosäure (R304S) reduziert sich die Infektiosität um fast 1 log Stufe. Gleichzeitig verlieren NL-952 Viren, welche an Position 304 keine basische Aminosäure besitzen ihre Fähigkeit den Korezeptor X4 zu nutzen. Vor dem Hintergrund daß der β -Hairpin in R5-Konformation mehr geschlossen ist, müsste das Serin anstelle der elektrostatischen Interaktion zwischen R304 und E322 eine eigene Bindung ausbilden. Dieses könnte durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen S304 und T320 geschehen. Ein solcher Effekt kann auch an der Position 306 beobachtet werden (siehe übernächsten Abschnitt). In Experimenten mit RANTES und SDF-1 α sowie mHSA zeigte sich das K304 Viren gegenüber R304 Viren schlechter neutralisiert wurden. So wird NL-952.1_{KKK} erst bei 1000ng/ml vollständig neutralisiert, NL-952.1_{RKR} bereits bei 500ng/ml (Abb. 18 / S. 83). Ähnlich verhält es sich bei RANTES und mHSA (Abb. 19, 20 / S. 86, 89) wobei die Viren insgesamt durch SDF-1 α am besten und durch mHSA am schlechtesten neutralisiert wurden.

Damit bestätigen unsere Daten zu Position 304 die von Suphapaiphat (2007) [155], welche auf die Wichtigkeit des konservierten Arginin an dieser Position für die Infektiosität und Membranfusion des HIV-1 hindeuten. Unsere Daten ergänzen die von Suphapaiphat (2007) gefundenen dahingehend, daß durch einen Austausch einer basischen Aminosäure gegen eine andere an dieser Stelle, bereits eine nennenswerte

Reduktion der Infektiosität erreicht wird wohingegen Suphapaiphat (2007) durch den Austausch R304A eine Reduktion der Infektiosität um 50% erreichte. Dieses stellt ein erstes Indiz dafür da, das Arginin und Lysin nicht generell als gleichwertig behandelt werden dürfen. Interessanterweise beeinflusst der Austausch R304K nicht die Bindung von mAbs, was dafür spricht, daß diesbezüglich eine R/K-Variabilität toleriert wird [152].

5.1.2 Untersuchung des Aminosäure Astausches an der V3-Loop Position 305

Im Einklang mit der oben formulierten Aussage, daß Arginine die Infektiosität steigern, steht auch der beobachtete Effekt an der Position 305. Auch hier ist die positive Ladung mit >97% (K:81%, R:16%) aller untersuchten HIV-1-Typen hoch konserviert [91]. Der Austausch K305R im NL-952.1_{RKR} hat eine Steigerung der Infektiosität gemessen als TCID₅₀ von $3,9 \times 10^4$ (NL-952.1_{RKR}) auf $4,6 \times 10^4$ (NL-952.1_{RRR}) zur Folge. Fehlt zusätzlich das N-Glykan g15 steigert sich die TCID₅₀ weiter bis auf $6,6 \times 10^4$ (NL-952.2_{RRR}) (Tab. 3 / S. 79). Gleichzeitig kommt es beim Fehlen des N-Glykans zum Tropismuswechsel von R5/X4- dualtrop zu X4-monotrop. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich darauf, daß die positiven Ladungen nun nicht mehr durch das N-Glykan g15 maskiert werden, sondern frei zugänglich sind [92]. Die Entfernung der positiven Ladung K305T reduziert die Infektiosität (TCID₅₀) noch weiter von $3,9 \times 10^4$ / $7,0 \times 10^3$ (NL-952.1_{RKR}/NL-952.1_{KKK}) auf $2,5 \times 10^4$ / $6,3 \times 10^3$ (NL-952.1_{RTR}/ NL-952.1_{KTK}). In diesem Zusammenhang postulierte Scherres *et al.* (2009) [156] für die Bindung an den Korezeptor CCR5, daß die Aminosäuren R298, R304 und K305 ein positives Dreieck bilden, welches die sulfatierten Aminosäuren Y3, Y10 und Y14 im CCR5 bindet und so den Ankerpunkt zur Bindung des Korezeptor durch den V3-Loop bilden. Er postulierte, daß durch den Verlust der positiven Ladung CCR5 nicht optimal gebunden werden kann, was in einer geringeren Infektiosität resultiert. Für den Korezeptor CXCR4 existieren diesbezüglich noch keine Daten.

Weiter konnten wir die besondere Bedeutung von K305 für die Neutralisation durch die Korezeptorliganden RANTES und SDF-1 α sowie den Inhibitor mHSA zeigen. Hierbei zeigt sich ein deutliches Ergebnis für die RRR und KKK Virusmutanten. Der Austausch einzelner Positionen ist jedoch nicht eindeutig. Sicher zeigt sich nur, daß Lysine insbesondere an der Position 305 die Neutralisation erschweren. Lysin-K305 spielt auch

eine wichtige Rolle bei der Bindung des V3-Loop durch mAbs wie z.B. mab2219 oder mab2257 [129, 151, 156].

5.1.3 Untersuchung des Aminosäure Austausches an der V3-Loop Position 306

Der basische Aminosäureaustausch an Position 306 im NL-952.1 zeigte den geringsten Effekt auf die Infektiosität. Die $TCID_{50}$ reduzierte sich beim Wechsel R306K und schließlich R306S unwesentlich. Auch bei den -g15 Mutanten NL-952.2 zeigte sich kein nennenswerter Effekt (Tab. 3 / S. 79). Der Austausch K306Q steigerte die $TCID_{50}$ ausgehend von NL-952.1_{KKK} sogar ($TCID_{50}$ NL-952.1_{KKK} $7,0 \times 10^3$ zu NL-952.1_{KKQ} $2,6 \times 10^4$). Gleiches trat bei Verlust des N-Glykans g15 (NL-952.2) auf. Dieses ist nicht unbedingt verwunderlich, da die Aminosäure an Position 306 zu den hoch variablen Aminosäuren innerhalb des V3-Loop gehört (Abb. 6, / S. 18 sowie Abb. 28, 29, / S. 108, 109) [119, 120]. Nur in ca. 6% wird hier eine basische Aminosäure ausgebildet (S: 72,2%, G: 19,6%, R:6,3%) [91]. Da Position 306 aber in die 11/24/25-Regel einfließt, bestätigen unsere Ergebnisse, daß weniger die Art der basischen Aminosäure, als vielmehr die positive Ladung an sich in Bezug auf die 11/24/25-Regel an Position 306, eine Rolle spielt [85, 86, 90].

Diese Tatsache beeinflusst den Tropismus entscheidend. Die Anwesenheit von S306 stabilisiert über die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Seitenketten von T/I 319/320 vornämlich die R5 Konformation. Beim Aminosäureaustausch S306R wird durch den Wechsel zu Arginin diese Bindung gekappt. R306 interagiert mit dem aromatischen Rest von F317 durch Interaktion der kationischen Ammoniumgruppe $-NH_4^+$ des Arginins mit dem π -Elektronen im aromatischen Rest (Kationen- π Interaktion). In X4-tropen Viren befindet sich sehr häufig an den Positionen 304-306 am N-terminus das Aminosäuremotiv RKR mit drei basischen Aminosäuren wohingegen am C-terminus keine sauren Aminosäuren ausgebildet werden. In diesem Motiv wird zwischen den Aminosäuren K305 und Y318 eine weitere Kationen- π -Interaktion ausgebildet. Diese Bindungen begünstigen den X4- β -Hairpin. In R5-tropen Viren hingegen kommt in der Regel nur eine Kationen- π -Interaktion zwischen R306 und Y318 vor, wenn an Position 306 Arginin ausgebildet wird [154, 157].

Insgesamt sind elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen wichtig für die Struktur der V-Loop *crowns*, da sie den β -Hairpin entweder in einer R5- oder X4-gefällige Konformation stabilisieren. Dieses zeigt sich auch darin, daß der Wechsel K305R in NL-952.1 (NL-952.1_{RKR} zu NL-952.1_{RRR}) nicht nur die Infektiosität steigert, sondern auch einen Tropismuswechsel von R5/X4-dualtrop zu X4-monotrop vollzieht (Abb. 14, 15 / S. 72, 74). Da dieses in Anwesenheit des N-Glykans g15 und bei gleichbleibender Nettoladung erfolgt, scheinen diese Effekte eine größere Rolle im V3-Loop zu spielen als bisher vermutet.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die von Suphapaiphat *et al.* (2007) [155] gefundenen Daten zu Aminosäureaustauschen innerhalb des V3-Loop. Diese zeigen auf das für die Bindung des Korezeptors durch den V3-Loop vor allem Aminosäuren aus dem V3-Loop *stem* sowie aus der *base* der V3-Loop *crowns* (Abb. 6 / S. 18 sowie Abb. 28, 29 / S. 109, 110) zu denen die von uns untersuchten Aminosäuren 304-306 gehören, eine entscheidende Bedeutung haben.

In unseren Neutralisationsexperimenten zeigt sich nicht nur die Bedeutung von Lysin an den untersuchten Positionen, auch kann die Bedeutung des N-Glykans g15 gezeigt werden. Wird das N-Glykan g15 entfernt, steigert sich die Resistenz gegen SDF1- α (EC₅₀ NL-952.1_{RKR} 125ng/ml gegen NL-952.2_{RKR} 250ng/ml) (Abb. 18 / S. 83), wohingegen die Resistenz gegen mHSA und RANTES sinkt (mHSA EC₅₀ NL-952.1_{RKR} 8 μ g/ml gegen NL-952.2_{RKR} 4 μ g/ml) (Abb. 18 / S. 83). Bei NL-952 Virusmutanten bewirkt der g15-Verlust einen Tropismuswechsel von dualtrop zu X4-monotrop. Deshalb zeigt sich die resistenzvermindernde Wirkung des N-Glykans g15 nur an NL-952 Virusmutanten mit nur zwei basischen Aminosäuren an den untersuchten Positionen (EC₅₀ NL-952.1_{RKS} 250ng/ml gegen NL-952.2_{RKS} 125 μ g/ml) (Abb. 19 / S. 86). Tsuchiya *et al* (2013)[158] postulierten in diesem Zusammenhang, das vor allem eine Kombination aus drei Faktoren den Tropismuswechsel nach CXCR4 unterstützt. Zuerst das Arginin an Position 304, dann eine V3-Loop Elongation an Position 305 und zuletzt der Verlust der N-Glykosylierungsstelle g15. Erst das Auftreten mehrerer dieser Faktoren zusammen lässt das Virus einen Tropismuswechsel durchführen, wohingegen das Auftreten eines Faktors keine Veränderung auslöst. Der NL-952 V3-Loop ist 35 Aminosäuren lang, enthält also keine Elongation, jedoch besitzt NL-952 ein Arginin an Position 304. Der Verlust der Glykosylierungsstelle g15 in NL-952.2 lässt das Virus von X4R5-dualtrop zu X4-monotrop wechseln, was sich mit der Aussage von Tsuchiya deckt. Um zu bestätigen,

das die Glykosylierungsselle g15 Auswirkungen auf Tropismus und Infektiosität von HIV hat, wurde in weiterführenden Experimenten die Glykosylierungsstelle g15 in den X4-monotropen Laborstamms NL-930 eingefügt, der ursprünglich dieses Glykosylierungsmotiv nicht aufweist. Darüber werden wir später berichten.

Den von HIV-1B genutzten Korezeptor möglichst präzise vorhersagen zu können spielt in der heutigen Zeit auch klinisch eine immer größere Rolle. So können HIV-1B Stämme welche den Korezeptor CCR5 nutzen, wirkungsvoll durch den CCR5-spezifischen Antagonisten *Maraviroc* inhibiert werden [159, 160]. Weitere Korezeptor spezifische Antagonisten befinden sich in der Entwicklung. Zur genauen Vorhersage werden entweder genotypische oder phänotypische Merkmale heran gezogen [161]. Genotypisch spielt diesbezüglich bisher die Anzahl der positiven Nettoladung insgesamt, aber auch die Position einzelner basischer Aminosäuren innerhalb des V3-Loop von HIV-1B bei der Auswahl des Korezeptors eine entscheidende Rolle [85]. So kann anhand einer Analyse des V3-Loops der Tropismus bestimmt und das Ansprechen auf einen Korezeptorantagonisten vor Therapieeinleitung abgeschätzt, werden [162, 163]. Hierfür existieren mittlerweile eine Reihe von Programmen, welche anhand der Analyse des V3-Loop unter Einbeziehung der 11/24/25-Regel versuchen den Korezeptor möglichst genau zu bestimmen. Jedoch ist ihre Vorhersage in <50% der Subtypen korrekt [164], da die Regel alleine eine 30% Sensitivität (falsch negative) und 93% Spezifität (falsch positive) besitzt [165]. Um die Vorhersagbarkeit durch die 11/24/25-Regel zu verbessern, wurde unterstützend eine Reihe von Computermodellen entwickelt [91, 165-167], welche jedoch keine entscheidende Verbesserung brachten. Mit der kristallographischen Aufschlüsselung der Bindung des V3-Loops an den Korezeptor CCR5 durch Huang *et al.* (2005) [76] entstand die Möglichkeit, neue Faktoren zusätzlich zur genotypischen Analyse des V3-Loop, zur besseren Vorhersagbarkeit heranzuziehen. So erweiterte Sander *et al.* (2007) [168] das Modell um einen geometrische Ansatz, indem er die Entfernungen einzelner Aminosäuren zueinander berücksichtigte. Dybowski *et al.* (2010) [169] machten sich in einem Zwei-Stufen-Modell das elektrostatische Potential einzelner Atome bestimmter Aminosäuren sowie ihre Hydrophobizität zunutze. Beide Ansätze benötigen jedoch erhebliche computergestützte Zusatzberechnungen was Ihre Anwendbarkeit limitiert.

Vielversprechende neue Ansätze kommen zum Beispiel einen von Bozek *et al.* (2013) [170]. Dieser nutzt physikalische und chemische Eigenschaften des V3-Loop ergänzend

zur 11/24/25-Regel. Er erhöht damit Sensitivität und Spezifität der Regel um jeweils 7%. Somit besteht in diesem Ansatz vor allem hinsichtlich der Sensitivität weiterhin deutlicher Verbesserungsbedarf. Ein weiterer Ansatz kommt von Pfeiffer *et al* (2013) [171]. Er verändert die Berechnung der von Swenson *et al* (2011) [172] mittels *deep sequencing* erhobenen Daten zur Korezeptorvorhersage. In einem weiteren Schritt werden für den Tropismus wichtige Aminosäurepositionen, innerhalb des V3-Loops, in der Berechnung berücksichtigt. Hiervon sind auch die von uns untersuchten V3-Loop Positionen 304 und 306 betroffen.

Wir haben unsere Daten mit mehreren gängigen und frei verfügbaren Computerprogrammen zur Bestimmung des Korezeptortropismus verglichen. Dabei zeigte sich, übereinstimmend mit Mefford *et al.* (2008) [164], daß das Geno2pheno und webPSSM den Korezeptor nur in <50% richtig Voraussagen konnte (Tab. 5 / S. 120). Insbesondere dualtrope Stämme konnten beide getesteten Programme nicht richtig vorhersagen. Dieses liegt sicher an den für das Programm eingestellten Regeln die nur R5 oder X4 berücksichtigen. Allerdings lagen beide Programme auch hier nur in ca. 50% der Fälle richtig (Tab. 5 / S. 120). Dabei kam es insbesondere bei R5-tropen NL-952.1 Mutanten zu inkongruenten Aussagen zwischen den Analyseprogrammen, so konnte nur NL-952.1_{RKS} von beiden Programmen richtig als R5-trop erkannt werden, was zeigt, daß beide mit unterschiedlichen Parametern arbeiten. Unsere Daten stehen in diesem Punkt im Widerspruch zu Low *et al.* (2007) [165] die heraus fanden, daß vor allem X4-trope Stämme falsch vorher gesagt werden. In dieser Studie wurden jedoch alle X4-tropen Stämme richtig bestimmt. Die 11/24/25-Regel stützt sich genau wie die sie verwendenden Programme vor allem auf die Ladungen von 3 Aminosäuren und nehmen die Aminosäuresequenz des V3-Loop nur nebenbei war. Dabei fand Delobel *et al.* (2007) [173] heraus, daß sich die Aussage hinsichtlich des Korezeptors verbessern lässt, wenn man die 11/24/25-Regel mit der Anzahl der positiven Nettoladungen innerhalb des V3-Loop kombiniert [173, 174]. Auch können ergänzende klinische Daten wie z.B. die Anzahl der T-Zellen helfen, die Vorhersage zu verbessern [175, 176]. Auch wäre eine Einbeziehung der von Sander, Dybowski, Swenson, Bozek und Pfeifer [168-172] zur Vorhersage des Tropismus, genutzten Eigenschaften in ein umfangreiches Vorhersageprogramm möglich. Da diese Programme wie bereits oben erwähnt zur Bestimmung des Tropismus und damit zur Therapieabschätzung auf das Ansprechen auf einen Korezeptorantagonisten vor Therapieeinleitung genutzt werden, ist es sehr wichtig

möglichst genaue Regeln zu definieren um die Chance für eine Fehleinschätzung zu minimieren. Dieses kann durch die Zusammenführung möglichst vieler Analyseeigenschaften erreicht werden. Jedoch wächst mit steigender Komplexität auch die benötigte Rechnerleistung und das Handling der Programme sinkt. Vor diesem Hintergrund könnte ein Programm das zur Analyse wenige ausgereifte Eigenschaften nutzt vorteilhaft gegenüber einem umfangreichen Programm sein. Augenblicklich können Geno2pheno oder webPSSM aufgrund ihrer hohen Fehlerquote, nach Aussagen von Saracino *et al.* (2007) [177] und Low *et al.* (2007) [165], nur ergänzend eingesetzt werden, jedoch liegt ihr bedeutender Vorteil in der nur wenige Sekunden dauernden, kostengünstigen Analyse. Je feiner die definierten Regeln ausgearbeitet sind, desto korrekter wird das Ergebnis sein und desto schneller und unkomplizierter kann eine Therapie dann umgestellt werden. Unsere Erkenntnisse können in diesem Fall helfen diese Regeln zu verbessern. Denn vor dem Hintergrund der enormen Wichtigkeit einer möglichst genauen Einschätzung des V3-Loop-Tropismus, kann unsere Entdeckung, daß die basische Aminosäuren Arginin und Lysin nicht generell als gleichwertig angesehen werden können, sondern Arginin eine infektiösitätssteigernde- und Lysin eine resistenzsteigernde Wirkung hat, helfen die wichtige 11/24/25-Regel weiter zu verbessern.

Tab. 5

Bioinformatische Vorhersage der Korezeptornutzung basierend auf den V3-Loop Sequenzen des NL-952.1 und NL-952.2 Virus.

Virus	NL-952.1						NL-952.2					
	ZK	G2P	PSSM			HcP	ZC	G2P	PSSM			HcP
			SINSI	X4R5	X4				SINSI	X4R5	X4	
RRR*	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4
RRK	X4R5	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4
RKR	X4R5	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4
RKK	X4R5	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4
KRR	X4R5	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4
KRK	X4R5	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4
KKR	X4R5	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4
KKK	X4R5	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4	X4
RRQ	R5	X4	R5	R5	X4	X4	R5	X4	X4	X4	X4	X4
RKS	R5	R5	R5	R5	R5	R5	R5	X4	X4	X4	X4	X4
RTR	R5	X4	X4	X4	X4	X4	R5	X4	X4	X4	X4	X4
KKN	R5	R5	R5	X4	X4	X4	R5	X4	X4	X4	X4	X4
KKQ	R5	R5	R5	X4	X4	X4	R5	X4	X4	X4	X4	X4
KTK	R5	X4	X4	X4	X4	X4	R5	X4	X4	X4	X4	X4
SRR	R5	X4	X4	X4	X4	X4	R5	X4	X4	X4	X4	X4
SKR	R5	X4	X4	X4	X4	X4	R5	X4	X4	X4	X4	X4
SKK	R5	X4	X4	X4	X4	X4	R5	X4	X4	X4	X4	X4
		4/17	5/17	3/17	2/17			8/17	8/17	8/17	8/17	8/17

* Aminosäuresequenz an der Position 304-306 im V3 Loop des gp120.

ZK = Tropismus der Virusmutanten in der Zellkultur unter Benutzung von GHOST-Indikatorzellen zur Bestimmung der Korezeptornutzung.

G2p = Phenotyp-Vorhersageprogramm Geno2pheno (<http://www.geno2pheno.org/>)

PSSM = Phenotyp-Vorhersageprogramm WebPSSM (<http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>)

HcP = Phenotyp-Vorhersageprogramm (www.imtech.res.in/raghava/hivcopred)

5.2 Auswirkungen der V3-Loop-Glykosylierung des HIV-1 auf die Infektiosität und Neutralisierbarkeit am Beispiel des X4-monotropen HIV NL-930

Im ersten Teil dieser Studie wurde der Einfluss des N-Glykans g15 auf Tropismus, Infektiosität und Neutralisation deutlich. Allerdings bestehen auch Anzeichen dafür, daß z.B. ein Tropismuswechsel auch g15 unabhängig vollzogen werden kann. So zeigte die Virusmutante NL-952-1_{RRR} auch unter Ausprägung des N-Glykans g15 einen Tropismuswechsel von R5/X4-dualtrop zu X4-monotrop (Abb. 19 / S. 86). Das ist ein Indiz dafür, daß ein Tropismuswechsel auch unter Ausbildung des g15 N-Glykans und gleichbleibender Nettoladung möglich ist und stützt die postulierte Notwendigkeit einer Anpassung des β -Hairpin in eine R5 oder X4 gefällige Konformation aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen [130-133, 154]. NL-930 besitzt nach unseren Studien neben Lysin an Position 304 und 322 eine Glutaminsäure an Position 440 was nach Rosen *et al.* (2008) [143] einen X4-typischen β -Hairpin begünstigt.

Da aber die Bedeutung von N-Glykanen für die Bindung von HIV-1 an die Wirtszelle mehrfach in verschiedenem Zusammenhang postuliert worden ist [92, 178-181], wurde die Auswirkung des N-Glykans g15 und der den V3-Loop umgebenden N-Glykane g13-g17 auf die Infektiosität des X4-tropen NL-930 untersucht welches anstelle des g15-Motivs NNT das Motiv YRNA enthält. Dabei zeigen die Ergebnisse im Wesentlichen drei Dinge:

1. Bei Ausbildung des N-Glykans g15 ist die NL-930 Virusmutante nicht infektiös.
2. Je mehr der untersuchten N-Glykane g13-17 zusätzlich zum N-Glykan g15 fehlen, desto stärker reduziert sich die Infektiosität
3. Je mehr der untersuchten N-Glykane g13-17 zusätzlich zum N-Glykan g15 fehlen, desto besser wird die NL-930 Mutante durch mHSA neutralisiert.

Das bei Ausbildung des N-Glykans g15 NL-930 letal ist (Tab. 4 / S. 104), zeigt die Bedeutung des N-Glykans für die Virusevolution. Gleichzeitig kann damit postuliert werden, daß g15 eine untergeordnete Rolle im *Glycan shield* spielt, welches das Virus vor dem Immunsystem schützt [24, 25, 181-183]. Dafür spricht, daß NL-930 Mutanten, welchen mehrere N-Glykane zusätzlich zum N-Glykan g15 fehlten besser von mHSA

neutralisiert wurden (Abb. 27 / S. 106). Insgesamt werden NL-930 Virusmutanten besser neutralisiert, je mehr N-Glykane zusätzlich zum N-Glykan g15 fehlen. Hierbei werden alle NL-930 Glykovarianten denen 3 oder mehr N-Glykane fehlen bereits bei einer durchschnittlichen mHSA-Konzentration von 32µg/ml vollständig neutralisiert. Glykovarianten die <3 N-Glykane fehlten dagegen erst bei mHSA-Konzentrationen von 64µg/ml. Weiter auffällig ist, daß die Infektiosität ebenfalls mit der Anzahl der fehlenden N-Glykane abnimmt. Dabei hat vor allem die Anzahl der fehlenden untersuchten N-Glykane g13, g14, 16 und g17 und weniger ihre Position eine Auswirkung auf die Infektiosität. Dacheux *et al.* 2004 [184] konnten aufzeigen, daß während der Virusevolution die Anzahl der Glykane hin zu den späten Virusformen eher zu- als abnimmt. Dieses passt zu unserer Beobachtung, daß je mehr N-Glykane fehlen, desto stärker reduziert sich die TCID₅₀ der NL-930 Virusmutanten (Abb. 26 / S. 102). Wilhelm (2012) [181] konnte in diesem Zusammenhang zeigen, daß N-Glykane die Bindung an CD4 beeinflussen und postulierte in diesem Zusammenhang das N-Glykane wichtig für den Bindungsmechanismus sind. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine Schwächung des *Glycan shields* und die damit verbundene Exposition von antigenen Epitopen innerhalb von gp120 [72, 185]. Diese Epitope können anschließend von Antikörper des Immunsystems wirkungsvoll erkannt und gebunden werden [186-188]. Allerdings richten sich Antikörper auch gegen die Glykane selber [185]. So konnten Pejchal *et al.* (2011) [190] aufzeigen, daß Antikörper direkt die Glykane des *Glycan shields* binden und Mouquet *et al.* (2012) [191] fanden heraus, daß die Antikörper des Immunsystems beide in HIV vorkommenden Typen von Glykanen High-Mannose-Typ und Komplex-Typ binden können. Somit fungieren die Glykane selbst als antigene Epitope. Ebenfalls möglich wäre, daß durch die Entfernung der N-Glykane g13-g17 Strukturen innerhalb des gp120 exponiert werden, welche dann mit benachbarten Regionen des Proteins interagieren. So konnten Li *et al.* (2008) [192] aufzeigen, daß der Verlust des N-Glykans 448 in der C4-Region von gp120 strukturelle Veränderungen in dieser Region auslöst, welche diese unempfindlicher gegen Proteolyse macht. Andere Regionen werden dabei allerdings nicht beeinflusst, so daß eine lokale Reaktion postuliert werden kann. Ein ähnlicher Effekt könnte auch im V3-Bereich vorliegen.

Abschließend kann über die Glykovarianten von NL-930 allgemein gesagt werden, daß das Fehlen des N-Glykans g15 essentiell für dessen Replikationsfähigkeit ist. Des Weiteren spielen die den V3-Loop einrahmenden N-Glykane g13-g17 eine modellierende Rolle bei

der Reduktion der Infektiosität und der Neutralisation von NL-930 Glykovarianten. Für die Klärung, welche strukturellen Änderungen NL-930 nach Ausbildung des N-Glykans g15 letal werden lassen sind weitere Studien nötig. Deren Ergebnisse könnten dann helfen, die Selektionsprozesse welche die Quasispezies in unterschiedliche Korezeptor-affine Gruppen einteilen besser zu verstehen und das Modell des Virusdrifts weiter zu verbessern.

5.3 Freies gp120 und seine Wirkung auf die Infektiosität des NL-952

Im dritten Teil dieser Studie untersuchten wir die Auswirkungen von freiem gp120 auf die Infektiosität von HIV. Bekannt ist, das freies gp120 sowohl im Blut von AIDS-Patienten mit bis zu 96 ng/ml [106, 107] als auch in Zellkulturüberständen bis zu 28 ng/ml [105] nachweisbar ist. Weitere Spekulationen gehen davon aus, das freies gp120 in Lymphknoten, wo sich das Virus hauptsächlich vermehrt, in noch höheren Konzentrationen vorkommt [193]. Dieses freie gp120 ist funktional und kann Bindungen mit Rezeptoren wie CD4 oder den Korezeptoren CCR5 und CXCR4 eingehen. Da bekannt ist, daß der im gp120 liegende V3-Loop die Infektiosität genetisch ähnlicher Viren fördert [194] und ebenfalls bekannt ist, daß sich die unterschiedlichen Viren der HIV-Quasispezies gegenseitig fördern oder neutralisieren, was die evolutionäre Entwicklung der Quasispezies vorantreibt, ist davon auszugehen, daß funktionales freies gp120 ebenfalls einen Beitrag hierzu leistet. Zwar kann sich freies gp120 nicht weiter replizieren, jedoch kann es z.B. durch Bindung an CD4 und den jeweiligen Korezeptor diesen blockieren und somit das Andocken eines HIV verhindern. Oder aber es bindet an HSPG und schirmt die Ladungen ab so daß weitere Viren der Quasispezies dann an der Wirtszelle andocken können. Bekannt ist, daß im Menschen primär die Viren der Quasispezies vorkommen, welche den Korezeptor CCR5 nutzen. Im Verlauf entwickeln sich dann R5/X4 dualtrope Viren und schließlich diejenigen welche exklusiv CXCR4 verwenden. Nach unserer Hypothese ist freies gp120 in der Lage die Evolution der HIV-1 Quasispezies zu beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen im Wesentlichen:

1. Freies gp120 von Virusmutanten mit niedriger Infektiosität haben keinen Einfluss auf Virusmutanten mit hoher Infektiosität
2. Freies gp120 von Virusmutanten mit hoher Infektiosität steigert die Infektiosität von Virusmutanten mit niedriger Infektiosität.

3. Freies gp120 von Virusmutanten mit hoher Infektiosität inhibieren auf mit Polybrene vorbehandelten Zellen die Infektiosität von Virusmutanten mit niedriger Infektiosität.

Wir konnten beobachten, daß freies gp120 der NL-952.1; -2; -3_{KKK} Virusmutanten keinen nennenswerten Einfluss auf die Infektiosität der NL-952.1; -2; -3_{RRR} Virusmutanten hat (Abb. 31 / S. 126). Die Virusmutanten NL-952.1; -2; -3_{RRR} scheinen aufgrund ihrer höheren Infektiosität im Konkurrenzkampf um den Korezeptor im Vorteil zu sein. So das freie gp120.1; -2; -3_{KKK} aufgrund der schlechteren Infektiosität nicht in der Lage ist die Bindung von NL-952.1; -2; -3_{RRR} nennenswert zu beeinflussen. Dieses liegt wohl daran, daß entweder freies gp120 952.1; -2; -3_{KKK} aufgrund seiner schlechteren Korezeptor Bindungseigenschaften nicht gut an den Korezeptor bindet oder durch NL-952.1; -2; -3_{RRR} verdrängt wird (Abb. 31A / S. 126).

Im Gegensatz hierzu beeinflusst freies gp120 952.1; -2; -3_{RRR} die Infektiosität von NL-952.1; -2; -3_{KKK} Virusmutanten erheblich. So lässt sich in Anwesenheit von freiem gp120 952.1; -2; -3_{RRR} eine deutliche Steigerung der NL-952.1; -2; -3_{KKK} Infektiosität um bis zu 40% beobachten (Abb. 31A / S. 126). Da wir eine Steigerung und keine Verminderung der Infektiosität beobachten konnten, scheint freies gp120 952.1; -2; -3_{RRR} nicht nur direkt an den Korezeptor zu binden, sondern scheint zusätzlich auch auf eine andere Art und Weise unterstützend in die Infektion einzugreifen.

Eine mögliche Erklärung wäre, daß sich auf Wirtszellen neben den von HIV-1 genutzten Rezeptoren noch andere biologische Strukturen befinden. Zu diesen gehören unter anderem die Heperansulfat-Proteoglykane (HSPG). Diese haben eine negative Nettoladung, welche die Bindung von HIV-1 Varianten mit geringer positiver Ladung im V3-Loop an den Korezeptor erschweren kann. Es ist bekannt, daß verschiedene HIV-1-Typen mit hoher positiver Nettoladung in der Lage sind an HSPG zu binden [141, 195-197]. Daher ist es möglich, daß freies gp120 952.1; -2; -3_{RRR} nicht direkt an den Korezeptor bindet, sondern an HSPG und damit die davon ausgehenden negativen Ladungen abfängt. Da es eine höhere Infektiosität hat als NL-952.1; -2; -3_{KKK}, läuft dieser Prozess wahrscheinlich schneller ab als die eigentliche Infektion durch das NL-952.1; -2; -3_{KKK} Virus. Somit könnten im Anschluss an die Abschirmung der negativen Ladungen von HSPG durch NL-952.1; -2; -3_{RRR}, NL-952.1; -2; -3_{KKK} Virusmutanten leichter an den jeweiligen Korezeptor binden. Für die Infektion durch NL-952.1; -2; -3_{RRR} Virusmutanten bedeutet diese Hypothese, daß aufgrund dessen das

freies gp120 952.1; -.2; -.3_{KKK} langsamer bindet als das eigentliche NL-952.1; -.2; -.3_{RRR} Virus, negative Ladungen des HSPG entweder nicht vorher von freiem gp120 abgeschirmt werden können oder aber bereits von anderen NL-952.1; -.2; -.3_{RRR} Viren abgeschirmt werden. Damit kommt es in diesem Versuch zu keiner Veränderung der Infektiosität von NL-952.1; -.2; -.3_{RRR} Virusmutanten durch freies gp120.1; -.2; -.3_{KKK}.

Um diese Hypothese zu prüfen wurden die Infektionsversuche zusätzlich in Anwesenheit des Polykations Polybrene durchgeführt. Hierbei zeigt sich, daß freies gp120 952.1; -.2; -.3_{RRR} die Infektiosität von NL-952.1; -.2; -.3_{KKK} Viren um bis zu 28% inhibiert (Abb. 31B / S. 126). Das liegt vermutlich daran, daß freies gp120 952.1; -.2; -.3_{RRR} jetzt direkt mit dem Virus um die Bindungsstelle konkurriert, da Polybrene die negativen Ladungen von HSPG auf der Membran der Zellen abschirmt. Im Unterschied dazu kommt auch auf Polybrene vorbehandelten TZM-bl-Zellen zu keiner Beeinflussung der Infektiosität der NL-952.1; -.2; -.3_{RRR} Viren durch freies gp120 952.1; -.2; -.3_{KKK}. Wahrscheinlich liegt dieser Effekt daran, daß die dreifach Arginin (RRR)-Viren eine höhere Infektiosität aufweisen und somit schneller an den Rezeptor binden als die dreifach-Lysin Virusvarianten.

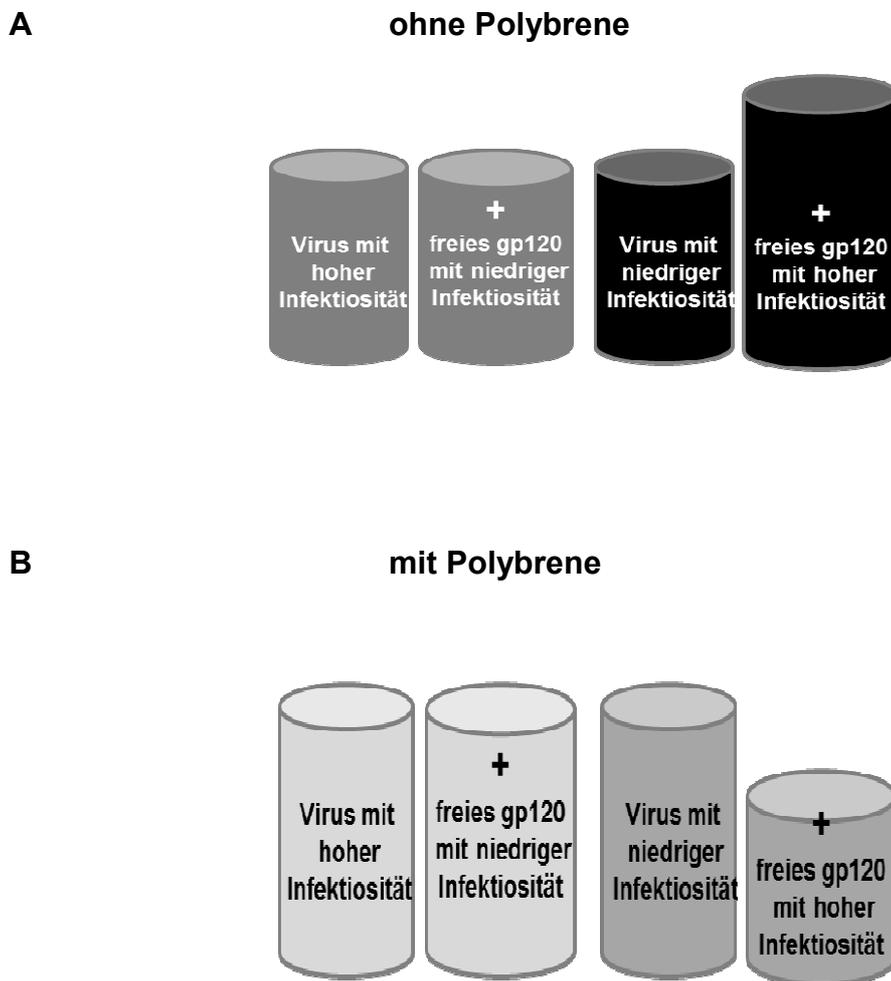


Abb. 31 **Auswirkung von freiem gp120 auf die Infektiosität**

A: Die grauen Zylinder zeigen das freie gp120 von Virusmutanten mit niedriger Infektiosität, keinen Einfluss auf Virusmutanten mit hoher Infektiosität hat. Die schwarzen Zylinder zeigen das freie gp120 von Virusmutanten mit hoher Infektiosität, einen steigernden Einfluss auf Virusmutanten mit niedriger Infektiosität hat.

B: Die linken hellgrauen Zylinder zeigen daß auf mit Polybrene vorbehandelten Zellen freies gp120 von Virusmutanten mit niedriger Infektiosität, keinen Einfluss auf Virusmutanten mit hoher Infektiosität hat. Die rechten dunkelgrauen Zylinder zeigen, daß auf mit Polybrene vorbehandelten Zellen freies gp120 von Virusmutanten mit hoher Infektiosität, einen steigernden Einfluss auf Virusmutanten mit niedriger Infektiosität hat.

Hat das Virus (RRR) in diesem Falle erst einmal an die Zellmembran gebunden, lässt es sich nicht mehr durch daß weniger aktive (KKK) freie gp120 952.1; -.2; -.3_{KKK} verdrängen. Aus demselben Grund kommt es zu einer Inhibition der NL- 952.1; -.2; -.3_{KKK} Infektion durch freies gp120 952.1; -.2; -.3_{RRR}. Das freie RRR-gp120 besetzt schneller die Rezeptoren als das KKK-Virus. Da freies gp120 952.1_{RRR} ausschließlich X4-trop ist, kommt es auf TZM-bl-Zellen zu keiner Reduktion der NL-952.1_{KKK} Virusmutante. Diese ist aufgrund ihrer dualtropen Ausrichtung in der Lage die TZM-bl-Zellen über den ebenfalls auf deren Zelloberfläche exprimierten Korezeptor R5 zu infizieren. Auf Ghost-X4-Indikatorzellen hingegen kommt es zu einer Reduktion der Infektiosität der NL-952.1_{KKK} Virusmutante durch freies gp120 952.1_{RRR}. Damit zeigt sich, daß freies gp120 von stärker infektiösen Virusmutanten in der Lage ist die Infektiosität weniger infektiöser Virusvarianten zu beeinflussen. Dabei spielen in unserer Studie Heperan-Sulfat-Proteoglykane eine entscheidende Rolle. In Anwesenheit von HSPG steigern höher infektiöse HIV-1-Typen die Infektiosität von weniger infektiösen HIV-1-Typen. Präinkubiert man hingegen HSPG haltige Zellen mit Polykationen wie z.B. Polybrene und maskiert somit dessen negative Ladungen, konkurriert freies gp120 von höher infektiösen HIV-1-Virusmutanten direkt mit den weniger infektiösen HIV-1-Typen um die Bindungsstellen auf den Rezeptoren. In diesem Fall kommt es zur Neutralisation der weniger infektiösen HIV-1-Typen durch das freie gp120. Abschließend kann man feststellen, daß freies gp120 einen weiteren modellierenden Faktor im Modell der HIV-1-Infektion darstellt und das dessen Einbeziehung zur Messung der Infektiosität eine neue Methode darstellt, welche bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben wurde.

Da freies gp120 möglicherweise *in vivo* Auswirkungen auf die Evolution der viralen Quasispezies hat, sind weitere Studien notwendig um die genaue Bedeutung von freiem gp120 im Rahmen der Virusevolution zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

HIV-1 benutzt die beiden Chemokinerezeptoren CXCR4 und CCR5 als zusätzliche Rezeptoren. Für die Therapie existieren Medikamente die den Weg über den CCR5 Chemokinrezeptors blockieren. Um diese Medikamente effektiv einsetzen zu können wird der Koerezeptor Typ des HIV-1 durch eine Sequenzierung des gp120 V3-Loops bestimmt. Zur Analyse der Sequenzen gibt es verschiedene Verfahren, ein Bestandteil jedes dieser Verfahren ist die 11/24/25-Regel. Diese Regel berücksichtigt die gesamte positive Ladung des V3-Loops welche sich aus der Summe der Ladungen der vier Aminosäuren Arg, Lys, Glu, und Asp ableitet. Dabei werden die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der beiden Aminosäuren Arg und Lys nicht berücksichtigt.

Eine Frage war, inwieweit sich bei einem Wechsel von Arg nach Lys die Infektiosität oder der Tropismus des HIV-1 ändert. Es wurden daher basierend auf dem retroviralen Vektor NL4-3_{BSt} 24 Virusvarianten hergestellt die an der V3-Loop Position 304-306 alle Kombinationen von Arg und Lys zeigen und sich außerdem in der Anzahl von N-Glycosylierungsstellen unterscheiden. Die acht möglichen KKK>RRR Kombinationen wurden in drei verschiedene Viren NL-952.1, NL-952.2 (-g15), NL-952.3 (-g13/14/15/17) kloniert. Zusätzlich zu den acht KKK>RRR Varianten wurden weitere neun Virusvarianten zu Vergleichszwecken hergestellt die Aminosäuren trugen die an der V3 Loop Position 304-306 bei dem Subtyp B des HIV-1 am häufigsten vorkommen.

In Infektionsstudien mit definierten CD4 und Korezeptor positiven Zelllinien (Ghost, U87 und TZM-bl) wurden alle Virusmutanten auf ihre Infektionseffizienz untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die RRR-Mutanten deutlich effizienter infizierten als die KKK-Mutanten. Das infektiöseste Virus hatte die 304-306 Sequenz RRR und die schwächsten Infektionsraten hatten die Viren mit der KKK- SKK- und KTK-Sequenz.

Weitere Unterschiede bezüglich der Infektiosität wurden in Neutralisationstests durch Zugabe der Korezeptor-Liganden SDF-1 α und RANTES beobachtet. Dabei zeigte sich, dass RRR-Mutanten besser neutralisiert wurden, als KKK-Mutanten. Zusätzliche Neutralisationsstudien mit einem gp120 bindenden Hemmstoff (mHSA) zeigte die gleichen Ergebnisse. Auch hier wurden die KKK-Mutanten verglichen mit den RRR-Mutanten schwerer neutralisiert. Für das N-Glycans g15 wurde gezeigt, dass es den Korezeptorwechsel von R5X4 dualtrop nach X4 monotrop bewirkt. Insgesamt wurde die

unterschiedliche Wirkung der Aminosäuren Arg und Lys an den Positionen 304-306 auf die Infektiosität des HIV-1 gezeigt. Damit ist es möglich die bestehenden Regeln und Computer-Algorithmen zur Korezeptorvorhersage zu verbessern.

Eine weitere Methode zur vergleichenden Analyse der Infektionseffizienz wurde mit Hilfe von löslichem gp120 entwickelt. Damit konnte ein Einfluss des gp120 sowohl auf die CXCR4-spezifische als auch die CCR5-spezifische Infektion gezeigt werden. So steigert lösliches gp120, einer effizient replizierenden RRR-Mutante, die Infektion einer schwächer replizierenden KKK-Mutante solange sich auf den Wirtszellen Heparansulfat-Proteoglycane befinden. In Abwesenheit von HSPG kehrt sich dieser Effekt in eine wirkungsvolle Neutralisation des KKK-Virus um. Keinen Einfluss auf die Infektiosität des RRR Virus hatte das KKK gp120. Ein neuer, bisher unbeobachteter Aspekt war, dass gp120 einer X4-tropen Virusmutante die Infektiosität eines R5-tropen Virus steigert. Dieses Ergebnis hilft die Wechselwirkung von unterschiedlichen Viren der HIV-1 Quasispezies hinsichtlich der Selektion und gegenseitigen Beeinflussung bei der Wechselwirkung mit den Rezeptoren auf Zelloberflächen besser zu verstehen

7 Literatur

1. Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS*. 1991 5:617-37. PMID: 1652977
2. Earl PL, Moss B, Doms RW. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol*. 1991 65:2047-55. PMID: 1900540
3. Gelderblohm H, Reupke H, Winkel T, Kunze R, Pauli G. MHC-antigens: constituents of the envelopes of human and simian immunodeficiency viruses. *Z Naturforsch* 1987 42:1328-34. PMID: 2452527
4. Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 1994. 76:853-64. PMID: 8124721
5. Collins KL, Chen BK, Kalmas SA, Walker BD, Baltimore D. Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T Lymphocytes. *HIV-1 Nature* 1998 391:397-401. PMID: 9450757
6. Kirchhoff, F. "Optimale" Anpassung pandemischer HIV-1-Stämme an den Menschen. *BIOspektrum*. 2010:144–48.
7. Tokarev, A. et al.: Antiviral activity of the interferon-induced cellular protein BST-2/tetherin. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009 25:1197–210. PMID: 19929170.
8. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. Human Immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* 1992. 66:226-34. PMID: 1727486
9. Terwilliger EF, Cohen EA, Lu YC, Sodroski JG, Haseltine WA. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989 86:5163-67. PMID: 2472639
10. Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol*. 1990 64:621-29. PMID: 2404139
11. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 2008 451:425–30. PMID: 18200009.
12. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-

- 1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe*. 2008 4:245-252. PMID: 18342597.
13. Mangeat B, Gers-Huber G, Lehmann M, Zufferey M, Luban J, Piguet V. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. *PLoS Pathog*. 2009 5: e1000574. PMID: 19730691.
 14. Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Münch J, Kim KA, Votteler J, Schubert U, Bibollet-Ruche F, Keele BF, Takehisa J, Ogando Y, Ochsenbauer C, Kappes JC, Ayoub A, Peeters M, Learn GH, Shaw G, Sharp PM, Bieniasz P, Hahn BH, Hatziioannou T, Kirchhoff F Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe*. 2009 6:409-21. PMID: 19917496.
 15. Saphire AC, Bobardt MD, Zhang Z, David G, Gallay PA. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol*. 2001 75:9187-200. PMID:11533182
 16. Bobardt MD, Saphire AC, Hung HC, Yu X, Van der Schueren B, Zhang Z, David G, Gallay PA. Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity*. 2003 18:27-39. PMID:12530973
 17. Zhang YJ, Hatziioannou T, Zang T, Braaten D, Luban J, Goff SP, Bieniasz PD. Envelope-dependent, cyclophilin-independent effects of glycosaminoglycans on human immunodeficiency virus type 1 attachment and infection. *J Virol*. 2002 76:6332-43. PMID:12021366
 18. Moulard M, Lortat-Jacob H, Mondor I, Roca G, Wyatt R, Sodroski J, Zhao L, Olson W, Kwong PD, Sattentau QJ. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol*. 2000 74:1948-60. PMID:10644368
 19. Argyris EG, Acheampong E, Nunnari G, Mukhtar M, Williams KJ, Pomerantz RJ. Human immunodeficiency virus type 1 enters primary human brain microvascular endothelial cells by a mechanism involving cell surface proteoglycans independent of lipid rafts. *J Virol*. 2003 77:12140-51. PMID:14581551
 20. Bobardt MD, Salmon P, Wang L, Esko JD, Gabuzda D, Fiala M, Trono D, Van der Schueren B, David G, Gallay PA. Contribution of proteoglycans to

- human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. *J Virol.* 2004 78:6567-84. PMID:15163749
21. Bourgeois R, Mercier J, Paquette-Brooks I, Cohen EA. Association between disruption of CD4 receptor dimerization and increased human immunodeficiency virus type 1 entry. *Retrovirology.* 2006 8:3:31. PMID:16762062
 22. Sweet RW, Truneh A, Hendrickson WA. CD4: its structure, role in immune function and AIDS pathogenesis, and potential as a pharmacological target *Curr Opin Biotechnol.* 1991 2:622-33. PMID:1367682
 23. Perutz M. *Protein structure: New approaches to disease and therapy.* W.H. Feedmann and Company, New York 1992
 24. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 1998 393:648-59. PMID:9641677
 25. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science.* 1998 280:1884–88. PMID:9632381
 26. Healey D, Dianda L, Moore JP, McDougal JS, Moore MJ, Estess P, Buck D, Kwong PD, Beverley PC, Sattentau QJ. Novel anti-CD4 monoclonal antibodies separate human immunodeficiency virus infection and fusion of CD4+ cells from virus binding. *J. Exp. Med.* 1990 172:1233–42. PMID:1698911
 27. Ashish, Juncadella IJ, Garg R, Boone CD, Anguita J, Krueger JK. Conformational rearrangement within the soluble domains of the CD4 receptor is ligandspecific. *J. Biol. Chem.* 2008 283:2761–72. PMID:18045872
 28. Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature.* 2008 455:109-13. PMID:18668044
 29. Rizzuto CD, Wyatt R, Hernández-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, Sodroski J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science.* 1998 280:1949-53. PMID:9632396
 30. Reeves JD, Hibbitts S, Simmons G, McKnight A, Azevedo-Pereira JM, Moniz-Pereira J, Clapham PR. Primary human immunodeficiency virus type

- 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo. *J Virol.* 1999 73:7795-804. PMID:10438870
31. Earl PL, Doms RW, Moss B. Multimeric CD4 binding exhibited by human and simian immunodeficiency virus envelope protein dimers. *J Virol.* 1992 66:5610-14. PMID:1501294
 32. Kim M, Chen B, Hussey RE, Chishti Y, Montefiori D, Hoxie JA, Byron O, Campbell G, Harrison SC, Reinherz EL. The stoichiometry of trimeric SIV glycoprotein interaction with CD4 differs from that of anti-envelope. *J Biol Chem.* 2001 276:42667-76. PMID:11544255
 33. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 1999 17:657-700. PMID:10358771
 34. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2000 52:145-76. PMID:10699158
 35. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science.* 1991 253:71-4. PMID:1905842
 36. Cann AJ, Churcher MJ, Boyd M, O'Brien W, Zhao JQ, Zack J, Chen IS. The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism. *J Virol.* 1992 66:305-9. PMID:1727490
 37. Willey RL, Theodore TS, Martin MA. Amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop that change viral tropism also alter physical and functional properties of the virion envelope *J Virol.* 1994 68:4409-19. PMID:7515973
 38. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science.* 1996 272:1955-8. PMID:8658171
 39. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The beta-

- chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. 1996 85:1135-48. PMID:8674119
40. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996 381:661-6. PMID:8649511
 41. Scarlatti G, Tresoldi E, Björndal A, Fredriksson R, Colognesi C, Deng HK, Malnati MS, Plebani A, Siccardi AG, Littman DR, Fenyö EM, Lusso P. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med*. 1997 1259-65. PMID:9359702
 42. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996 272:872-7. PMID:8629022
 43. Berson JF, Long D, Doranz BJ, Rucker J, Jirik FR, Doms RW. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol*. 1996 70:6288-95. PMID:8709256
 44. Björndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, Albert J, Scarlatti G, Littman DR, Fenyö EM. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol*. 1997 71:7478-87. PMID:9311827
 45. Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*. 2001 70:777-810. PMID:11395423
 46. Miller MD, Geleziunas R, Bianchi E, Lennard S, Hrin R, Zhang H, Lu M, An Z, Ingallinella P, Finotto M, Mattu M, Finnefrock AC, Bramhill D, Cook J, Eckert DM, Hampton R, Patel M, Jarantow S, Joyce J, Ciliberto G, Cortese R, Lu P, Strohl W, Schleif W, McElhaugh M, Lane S, Lloyd C, Lowe D, Osbourn J, Vaughan T, Emini E, Barbato G, Kim PS, Hazuda DJ, Shiver JW, Pessi A. A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 102:14759-64. PMID:16203977
 47. Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes *Cell*. 2009 137: 433–444. PMID:19410541

48. Miyauchi K, Kozlov MM, Melikyan GB Early Steps of HIV-1 Fusion Define the Sensitivity to Inhibitory Peptides That Block 6-Helix Bundle Formation *PLoS Pathog.* 2009 5:e1000585. PMID:19763181
49. Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, Delmedico MK, Lambert DM, Cohen FS. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol.* 2000 151:413-23. PMID:11038187
50. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* 1997 89:263-73. PMID:9108481
51. Chernomordik L, Kozlov MM, Zimmerberg J. Lipids in biological membrane fusion. *J. Membr Biol* 1995, 146:1-14. PMID:7563032
52. Melikyan GB. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm *Retrovirology.* 2008 5:111 PMID:19077194
53. Hallenberger S, Moulard M, Sordel M, Klenk HD, Garten W. The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J Virol.* 1997 71:1036-45. PMID:8995623
54. Freed EO, Myers DJ, Risser R. Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J Virol.* 1989 63:4670-5. PMID:2677400
55. Freed EO, Martin MA. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem.* 1995 270 23883-6 PMID:7592573
56. McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR, Weissman IL. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell.* 1988 53:55-67. PMID:2450679
57. Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk HD, Garten W. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. Institut für Virologie, Philips-Universität Marburg, Germany. *Nature.* 1992 360:358-61. PMID:1360148
58. Moore PL, Crooks ET, Porter L, Zhu P, Cayanan CS, Grise H, Corcoran P, Zwick MB, Franti M, Morris L, Roux KH, Burton DR, Binley JM. Nature of

- nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2006 80:2515-28. PMID:16474158
59. Hunter E. Viral Entry and Receptors. *Retroviruses.* 1997 71–119. PMID:21433347
 60. Wu SR, Löving R, Lindqvist B, Hebert H, Koeck PJ, Sjöberg M, Garoff H. Single-particle cryoelectron microscopy analysis reveals the HIV-1 spike as a tripod structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 107:18844-9. PMID:20956336
 61. Zhu P, Chertova E, Bess J Jr, Lifson JD, Arthur LO, Liu J, Taylor KA, Roux KH. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 100:15812-7. PMID:14668432
 62. Chertova E, Bess Jr JW Jr, Crise BJ, Sowder II RC, Schaden TM, Hilburn JM, Hoxie JA, Benveniste RE, Lifson JD, Henderson LE, Arthur LO. Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol.* 2002 76:5315-25. PMID:11991960
 63. Zhu P, Chertova E, Bess J Jr, Lifson JD, Arthur LO, Liu J, Taylor KA, Roux KH. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 100:15812-7. PMID: 14668432
 64. Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, MCNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC, Wong-Staal F. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell.* 1986 45:637-648 PMID:2423250
 65. Willey RL, Rutledge RA, Dias S, Folks T, Theodore T, Buckler CE, Martin MA. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986 83:5038-42 PMID:3014529
 66. Lee CN, Robinson J, Mazzara G, Cheng YL, Essex M, Lee TH. Contribution of hypervariable domains to the conformation of a broadly neutralizing glycoprotein gp120 epitope. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1995 11:777-781

PMID:7546903

67. Pedroza Martins L, Chenciner N, Wain-Hobson S. Complex intrapatient sequence variation in the V1 and V2 hypervariable regions of the HIV-1 gp120 envelope sequence. *Virology*. 1992 191:837-845 PMID:1448927
68. Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. 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*. 1990 265:10373-82 PMID:2355006
69. Modrow S, Hahn BH, Shaw GM, Gallo RC, Wong-Staal F, Wolf H. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol*. 1987 61:570-8. PMID:2433466
70. Lasky LA, Nakamura G, Smith DH, Fennie C, Shimasaki C, Patzer E, Berman P, Gregory T, Capon DJ. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell*. 1987 50:975-85. PMID:2441877
71. Javaherian K, Langlois AJ, McDanal C, Ross KL, Eckler LI, Jellis CL, Profy AT, Rusche JR, Bolognesi DP, Putney SD, et al. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 86:6768-72. PMID:2771954
72. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*. 1998 393:705-11. PMID:9641684
73. Kuiken CL, de Jong JJ, Baan E, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Evolution of the V3 envelope domain in proviral sequences and isolates of human immunodeficiency virus type 1 during transition of the viral biological phenotype. *J Virol*. 1992 66:5704. PMID: 1501303
74. Catasti P, Fontenot JD, Bradbury EM, Gupta G. Local and global structural properties of the HIV-MN V3 loop. *J Biol Chem*. 1995 270:2224-32. PMID:7836454
75. Tugarinov V, Zvi A, Levy R, Hayek Y, Matsushita S, Anglister J. NMR structure of an anti-gp120 antibody complex with a V3 peptide reveals a surface important for co-receptor binding. *Structure*. 2000 8:385-95.

PMID:10801487

76. Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, Dimitrov DS, Korber B, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Kwong PD. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science*. 2005 310:1025-8. PMID:16284180
77. Huang CC, Lam SN, Acharya P, Tang M, Xiang SH, Hussan SS, Stanfield RL, Robinson J, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Bewley CA, Kwong PD. Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science*. 2007 317:1930-4. PMID:17901336
78. Cormier E, Persuh GM, Thompson DA, Lin SW, Sakmar TP, Olson WC, Dragic T. Specific interaction of CCR5 amino-terminal domain peptides containing sulfotyrosines with HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000 97:5762-67. PMID:10823934
79. Cormier EG, Dragic T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J. Virol.* 2002 76:8953-57. PMID:12163614
80. Farzan, MH, Choe L, Vaca K, Martin YS, Desjardins E, Ruffing N, Wu L, Wyatt R, Gerard N, Gerard C, and Sodroski J. A tyrosinerich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5 *J. Virol.* 1998 72:1160–64. PMID:9445013
81. Farzan, M., T. Mirzabekov, P. Kolchinsky, R. Wyatt, M. Cayabyab, N. P. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski, and H. Choe. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell*. 1999 96:667–76. PMID:10089882
82. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med*. 1996 2:1244-7. PMID:8898753
83. Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, Perryman S. Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J Virol*. 1992 66:6547-54. PMID:1404602
84. Kwong PD, Wyatt R, Majeed S, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J,

- Hendrickson WA. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure*. 2000 8:1329-39. PMID:11188697
85. De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Minimal Requirements for the Human Immunodeficiency Virus Type 1 V3 Domain to Support the Sycytium-Inducing Phenotype: Analysis by Single Amino Acid Substitution. *J Virol*. 1992 66:6777-80. PMID:1404617
 86. Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H. Phenotype-Associated Sequence Variation in the Third Variable Domain of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Molecule *J Virol*. 1992 66:3183-7. PMID:1560543
 87. Milich L, Margolin B, Swanstrom R. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J Virol*. 1993 67:5623-34. PMID:8350415
 88. Briggs DR, Tuttle DL, Sleasman JW, Goodenow MM. Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS*. 2000 14:2937-9. PMID:11153675
 89. Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. 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*. 1992 89:9434-8. PMID:1409653
 90. Cardozo T, Kimura T, Philpott S, Weiser B, Burger H, Zolla-Pazner S. Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 23:415-26. PMID:17411375
 91. Resch W, Hoffman N, Swanstrom R. Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks. *Virology*. 2001 288:51-62. PMID:11543657
 92. Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Schreiber M. The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology*. 2002 304:70-80. PMID:12490404
 93. Gavel Y, von Heijne G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein

- engineering. *Protein Eng.* 1990 3:433-42. PMID: 2349213
94. Mizuochi T, Spellman MW, Larkin M, Solomon J, Basa LJ, Feizi T. Carbohydrate structures of the human-immunodeficiency-virus (HIV) recombinant envelope glycoprotein gp120 produced in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem J.* 1988 254:599-603. PMID:2845957
 95. Zhu X, Borchers C, Bienstock RJ, Tomer KB. Mass spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells. *Biochemistry.* 2000 39:11194-204. PMID:10985765
 96. Li Y, Luo L, Rasool N, Kang CY. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J Virol.* 1993 67:584-8. PMID:8416385
 97. Reynard F, Fatmi A, Verrier B, Bedin F. HIV-1 acute infection env glycomutants designed from 3D model: effects on processing, antigenicity, and neutralization sensitivity. *Virology.* 2004 324:90-102. PMID:15183057
 98. McCaffrey RA, Saunders C, Hensel M, Stamatatos L. N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *J Virol.* 2004 78:3279-95. PMID:15016849
 99. Balzarini J. Targeting the glycans of glycoproteins: a novel paradigm for antiviral therapy. *Nat Rev Microbiol.* 2007 5:583-97. PMID:17632570
 100. Malenbaum SE, Yang D, Cavacini L, Posner M, Robinson J, Cheng-Mayer C. The N-terminal V3 loop glycan modulates the interaction of clade A and B human immunodeficiency virus type 1 envelopes with CD4 and chemokine receptors. *J Virol.* 2000 74:11008-16. PMID:11069996
 101. Hauser H. Die Bedeutung der N-Glykane im V3-Bereich des gp120 für die Infektiosität der HIV-1-Subtypen A und C. Dissertation Hamburg 2005
 102. Nabatov AA, Pollakis G, Linnemann T, Kliphuis A, Chalaby MI, Paxton WA. Inpatient alterations in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V1V2 and V3 regions differentially modulate coreceptor usage, virus inhibition by CC/CXC chemokines, soluble CD4, and the b12 and 2G12 monoclonal antibodies. *J Virol.* 2004 78:524-30. PMID:14671134
 103. Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem.*

- 2001 276:13433-41. PMID:11278567
104. Mascola JR, Montefiori DC. HIV-1: nature's master of disguise. *Nat Med.* 2003 9:393-4. PMID:12669056
 105. Pyle SW, Bess JW Jr, Robey WG, Fischinger PJ, Gilden RV, Arthur LO. Purification of 120,000 dalton envelope glycoprotein from culture fluids of human immunodeficiency virus (HIV)-infected H9 cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1987 3:387-400. PMID: 2833915
 106. Gilbert PB, Chiu YL, Allen M, Lawrence DN, Chapdu C, Israel H, Holman D, Keefer MC, Wolff M, Frey SE. Long-term safety analysis of preventive HIV-1 vaccines evaluated in AIDS vaccine evaluation group NIAID-sponsored Phase I and II clinical trials. NIAID HIV Vaccine Trials Network. *Vaccine.* 2003 21:2933-47. PMID:12798637
 107. Oh SK, Cruikshank WW, Raina J, Blanchard GC, Adler WH, Walker J, Kornfeld H. Identification of HIV-1 envelope glycoprotein in the serum of AIDS and ARC patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1992 5:251-6. PMID:1740750
 108. Schneider J, Kaaden O, Copeland TD, Oroszlan S, Hunsmann G. Shedding and interspecies type sero-reactivity of the envelope glycopolyptide gp120 of the human immunodeficiency virus. *J Gen Virol.* 1986 67:2533-8. PMID:2431105
 109. Hart TK, Klinkner AM, Ventre J, Bugelski PJ. Morphometric analysis of envelope glycoprotein gp120 distribution on HIV-1 virions. *J Histochem Cytochem.* 1993 41:265-71. PMID:7678271
 110. Sambrook, J., T. Maniatis, and E. F. Fritsch. *Molecular cloninga laboratory manual.* 1989. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 111. Mandel, G. and W. Wickner. Translational and post-translational cleavage of M13 procoat protein: extracts of both the cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* contain leader peptidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979 76:236-240. PMID:370824
 112. Birnboim, H. C. and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979. 7:1513-23 PMID:388356
 113. Chaconas, G. and J. H. van de Sande. 5'-32P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods Enzymol.* 1980. 65:75-85. PMID:6154877

114. Bolivar, F., R. L. Rodriguez, M. C. Betlach, and H. W. Boyer. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene*. 1977 2:75-93. PMID:344136
115. Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, and H. W. Boyer. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 1977 2:95-113. PMID:1422009
116. Saiki, R. K., T. L. Bugawan, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1986. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 324:163-166. PMID:3785382
117. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. 1992 24:104-8. PMID:1422003
118. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 227:680-5. PMID:5432063
119. Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988 9:255-262. PMID:2466658
120. Neurath, A. R., N. Strick, P. Sproul, L. Baker, P. Rubinstein, C. E. Stevens, P. Taylor, R. C. Gallo, J. W. Gold, Y. S. Lee. Radioimmunoassay and enzyme-linked immunoassay of antibodies to the core protein (P24) of human T-lymphotropic virus (HTLV III). *J. Virol. Methods*. 1985 11:75-86 PMID:2989312
121. Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani, J. M. Kilby, M. S. Saag, X. Wu, G. M. Shaw, and J. C. Kappes. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2002 46:1896-1905 PMID:12019106
122. Reed, L.J.; Muench, H. "A simple method of estimating fifty percent endpoints". *The American Journal of Hygiene*. 1938 27:493–497.
123. Sonza S, Burgess SH, Crowe SM. Direct quantification of HIV-1 infectivity for monocyte--macrophages using an infectious focus assay. *AIDS*. 1991 5:571-4 PMID:1907461
124. Polzer S. Bedeutung von N-Glycanen im V3-Bereich des HIV-1 Hüllproteins

- gp120 für die Korezeptornutzung und Neutralisierbarkeit von HIV-1.
Dissertation Hamburg 2002
125. Vossman M. Neutralisation von Varianten des Humanen Immundefizienz Virus Typ I (HIV-1), West-Nil Virus und Hantaan Virus mit modifiziertem humanem Serumalbumin (HSA). Dissertation Hamburg 2004
 126. Kirst M. Herstellung und Charakterisierung eines anti-HIV-Inhibitors basierend auf modifiziertem Serum Albumin. Dissertation Hamburg 2004
 127. Polzer S, van Yperen M, Kirst M, Schwalbe B, Schaal H, Schreiber M. Neutralization of X4- and R5-tropic HIV-1 NL4-3 variants by HOCl-modified serum albumins BMC Res Notes. 2010 3:155. PMID:20525179
 128. Bertolatus JA, Hunsicker LG. Polycation binding to glomerular basement membrane. Effect of biochemical modification. Lab Invest. 1987 56:170-9 PMID:3807316
 129. Jiang X, Burke V, Totrov M, Williams C, Cardozo T, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Kong XP. Conserved structural elements in the V3 crown of HIV-1 gp120. Nat Struct Mol Biol. 2010 17:955-61 PMID:20622876
 130. Almond D, Kimura T, Kong X, Swetnam J, Zolla-Pazner S, Cardozo T. Structural conservation predominates over sequence variability in the crown of HIV type 1's V3 loop. AIDS Res Hum Retroviruses. 2010 26:717-23 PMID:20560796
 131. Almond D, Cardozo T. Assessment of immunologically relevant dynamic tertiary structural features of the HIV-1 V3 loop crown R2 sequence by ab initio folding. J Vis Exp. 2010. PMID:20864931
 132. Verma A, Wenzel W. Conformational landscape of the HIV-V3 hairpin loop from all-atom free-energy simulations. J Chem Phys. 2008 128:105103 PMID:18345927
 133. Almond D, Krachmarov C, Swetnam J, Zolla-Pazner S, Cardozo T. Resistance of Subtype C HIV-1 Strains to Anti-V3 Loop Antibodies. Adv Virol. 2012 2012:803535. PMID:22548061
 134. Thompson PD, Freisheim JH. Conversion of arginine to lysine at position 70 of human dihydrofolate reductase: generation of a methotrexate-insensitive mutant enzyme. Biochemistry. 1991 30:8124-30. PMID:1907850
 135. Ashur-Fabian O, Avivi A, Trakhtenbrot L, Adamsky K, Cohen M, Kajakaro G, Joel A, Amariglio N, Nevo E, Rechavi G. Evolution of p53 in hypoxia-

- stressed Spalax mimics human tumor mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 101:12236-41. PMID:15302922
136. Siddiqui KS, Poljak A, Guilhaus M, De Francisci D, Curmi PM, Feller G, D'Amico S, Gerday C, Uversky VN, Cavicchioli R. Role of lysine versus arginine in enzyme cold-adaptation: modifying lysine to homo-arginine stabilizes the cold-adapted alpha-amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Proteins*. 2006 64:486-501. PMID:16705665
137. Schwieger C. Electrostatic and Non-Electrostatic Interactions of Positively Charged Polypeptides with Negatively Charged Lipid Membranes
Dissertation Halle 2008
138. López de Victoria A, Kieslich CA, Rizos AK, Krambovitis E, Morikis D. Clustering of HIV-1 Subtypes Based on gp120 V3 Loop electrostatic properties. *BMC Biophys*. 2012 5:3. PMID: 22313935
139. Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*. 2010 330:1066-71. PMID:20929726
140. Wang WK, Dudek T, Zhao YJ, Brumblay HG, Essex M, Lee TH. CCR5 coreceptor utilization involves a highly conserved arginine residue of HIV type 1 gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 95:5740-5. PMID:9576954
141. de Parseval A, Bobardt MD, Chatterji A, Chatterji U, Elder JH, David G, Zolla-Pazner S, Farzan M, Lee TH, Gallay PA. A highly conserved arginine in gp120 governs HIV-1 binding to both syndecans and CCR5 via sulfated motifs. *J Biol Chem*. 2005 280:39493-504. PMID:16157597
142. Basmaciogullari S, Babcock GJ, Van Ryk D, Wojtowicz W, Sodroski
Identification of conserved and variable structures in the human immunodeficiency virus gp120 glycoprotein of importance for CXCR4 binding. *J Virol*. 2002 76:10791-800. PMID:12368322
143. Rosen O, Samson AO, Anglister J. Correlated mutations at gp120 positions 322 and 440: implications for gp120 structure. *Proteins*. 2008 71:1066-70
PMID:18275085
144. BreLOT A, Heveker N, Montes M, Alizon M. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J Biol Chem*. 2000 275:23736-44.

PMID:10825158

145. Hoffman NG, Seillier-Moiseiwitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol.* 2002 76:3852-64. PMID:11907225
146. Sharon M, Kessler N, Levy R, Zolla-Pazner S, Görlach M, Anglister J. Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic beta hairpins in chemokines, suggesting a mechanism for coreceptor selectivity. *Structure.* 2003 11:225-36. PMID:12575942
147. Yamaguchi-Kabata Y, Yamashita M, Ohkura S, Hayami M, Miura T. Linkage of amino acid variation and evolution of human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein (subtype B) with usage of the second receptor. *J Mol Evol.* 2004 58:333-40. PMID:15045488
148. Hoffman NG, Seillier-Moiseiwitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol.* 2002 76:3852-64. PMID:11907225
149. Kuiken, C. L., B. Foley, B. Hahn, P. A. Marx, F. McCutchan, J. W. Mellors, J. I. Mullins, S. Wolinsky, and B. Korber (ed.). 1999. Human retroviruses and AIDS 1999: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N.Mex.
150. Stanfield RL, Wilson IA. Structural studies of human HIV-1 V3 antibodies. *Hum Antibodies.* 2005 14:73-80. PMID:16720977
151. Stanfield RL, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Wilson IA. Crystal structures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) neutralizing antibody 2219 in complex with three different V3 peptides reveal a new binding mode for HIV-1 cross-reactivity. *J Virol.* 2006 80:6093-105. PMID:16731948
152. Gorny MK, Sampson J, Li H, Jiang X, Totrov M, Wang XH, Williams C, O'Neal T, Volsky B, Li L, Cardozo T, Nyambi P, Zolla-Pazner S, Kong XP. Human anti-V3 HIV-1 monoclonal antibodies encoded by the VH5-51/VL lambda genes define a conserved antigenic structure. *PLoS One.* 2011 6:e27780. PMID:22164215
153. Mor A, Segal E, Mester B, Arshava B, Rosen O, Ding FX, Russo J, Dafni A,

- Schvartzman F, Scherf T, Naider F, Anglister J. Mimicking the structure of the V3 epitope bound to HIV-1 neutralizing antibodies. *Biochemistry*. 2009 48:3288-303. PMID:19281264
154. Rosen O, Sharon M, Quadt-Akabayov SR, Anglister J. Molecular switch for alternative conformations of the HIV-1 V3 region: implications for phenotype conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 103:13950-5. PMID:1696660
 155. Suphaphiphat P, Essex M, Lee TH. Mutations in the V3 stem versus the V3 crown and C4 region have different effects on the binding and fusion steps of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with the CCR5 coreceptor. *Virology*. 2007 360:182-90. PMID:17101166
 156. Scherres, WJ, Modellierung der Interaktion des humanen Korezeptor CCR5 mit der V3-Loop des Glycoproteins gp120 aus dem HIV-1. Dissertation Hamburg 2010
 157. Ma JC, Dougherty DA. The Cation- π Interaction. *Chem Rev*. 1997 97:1303-24. PMID:11851453
 158. Fätkenheuer G, Pozniak AL, Johnson MA, Plettenberg A, Staszewski S, Hoepelman AI, Saag MS, Goebel FD, Rockstroh JK, Dezube BJ, Jenkins TM, Medhurst C, Sullivan JF, Ridgway C, Abel S, James IT, Youle M, van der Ryst E. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nat Med*. 2005 11:1170-2. PMID:16205738
 159. Tsuchiya K, Ode H, Hayashida T, Kakizawa J, Sato H, Oka S, Gatanaga H. Arginine insertion and loss of N-linked glycosylation site in HIV-1 envelope V3 region confer CXCR4-tropism *Sci Rep*. 2013 3:2389. PMID:23925152
 160. Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, et al. (2005) Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiencyvirus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4721–32. PMID:16251317
 161. Sánchez V, Masiá M, Robledano C, Padilla S, Ramos JM, Gutiérrez F. Performance of genotFypic algorithms for predicting HIV-1 tropism measured against the enhanced-sensitivity Trofile coreceptor tropism assay. *J Clin Microbiol*. 2010 48:4135-9. PMID:20861336
 162. Obermeier M. Tropismustest bei nicht nachweisbarer Viruslast. HIV&more

- 2008 3: 16-17.
163. McGovern RA, Thielen A, Portsmouth S, Mo T, Dong W, Woods CK, Zhong X, Brumme CJ, Chapman D, Lewis M, James I, Heera J, Valdez H, Harrigan PR. Population-based sequencing of the V3-loop can predict the virological response to maraviroc in treatment-naïve patients of the MERIT trial. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012 61:279-86. PMID:23095934
 164. Mefford ME, Gorry PR, Kunstman K, Wolinsky SM, Gabuzda D. Bioinformatic prediction programs underestimate the frequency of CXCR4 usage by R5X4 HIV type 1 in brain and other tissues. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 24:1215-20. PMID:18788913
 165. Low AJ, Dong W, Chan D, Sing T, Swanstrom R, Jensen M, Pillai S, Good B, Harrigan PR. Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *AIDS*. 2007 21:F17-24. PMID:17721088
 166. Pillai S, Good B, Richman D, Corbeil J. A new perspective on V3 phenotype prediction. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003 19:145-9. PMID:12643277
 167. Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, McLaughlin S, Shankarappa R, Margolick JB, Mullins JI. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol*. 2003 77:13376-88. PMID:14645592
 168. Sander O, Sing T, Sommer I, Low AJ, Cheung PK, Harrigan PR, Lengauer T, Domingues FS. Structural descriptors of gp120 V3 loop for the prediction of HIV-1 coreceptor usage. *PLoS Comput Biol*. 2007 3:e58. PMID:17397254
 169. Dybowski JN, Heider D, Hoffmann D. Prediction of co-receptor usage of HIV-1 from genotype. *PLoS Comput Biol*. 2010 6:e1000743. PMID:20419152
 170. Bozek K, Lengauer T, Sierra S, Kaiser R, Domingues FS. Analysis of physicochemical and structural properties determining HIV-1 coreceptor usage. *PLoS Comput Biol*. 2013 9:e1002977. PMID:23555214
 171. Pfeifer N, Lengauer T. Improving HIV coreceptor usage prediction in the clinic using hints from next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. 2012 28:i589-95. PMID:22962486
 172. Swenson LC, Mo T, Dong WW, Zhong X, Woods CK, Thielen A, Jensen

- MA, Knapp DJ, Chapman D, Portsmouth S, Lewis M, James I, Heera J, Valdez H, Harrigan PR. Deep V3 sequencing for HIV type 1 tropism in treatment-naive patients: a reanalysis of the MERIT trial of maraviroc. *Clin Infect Dis*. 2011 53:732-42. PMID:21890778
173. Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, Barre-Sinoussi F, Israël N, Izopet J. Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies. *J Clin Microbiol*. 2007 45:1572-80. PMID:17329448
174. Frange P, Chaix ML, Raymond S, Galimand J, Deveau C, Meyer L, Goujard C, Rouzioux C, Izopet J; French ANRS CO 06 PRIMO Cohort Study Group. Low frequency of CXCR4-using viruses in patients at the time of primary non-subtype-B HIV-1 infection. *J Clin Microbiol*. 2010 48:3487-91. PMID:20686090
175. Sierra S, Kaiser R, Thielen A, Lengauer T. Genotypic coreceptor analysis. *Eur J Med Res*. 2007 12:453-62. PMID:17933727
176. Sing T, Low AJ, Beerenwinkel N, Sander O, Cheung PK, Domingues FS, Büch J, Däumer M, Kaiser R, Lengauer T, Harrigan PR. Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antivir Ther*. 2007 12:1097-106. PMID:1801876
177. Saracino A, Monno L, Punzi G, Cibelli DC, Tartaglia A, Scudeller L, Brindicci G, Lagioia A, Scotto G, Angarano G. HIV-1 biological phenotype and predicted coreceptor usage based on V3 loop sequence in paired PBMC and plasma samples. *Virus Res*. 2007 130:34-42. PMID:17582634
178. Kolchinsky P, Kiprilov E, Bartley P, Rubinstein R, Sodroski J. Loss of a single N-linked glycan allows CD4-independent human immunodeficiency virus type 1 infection by altering the position of the gp120 V1/V2 variable loops. *J Virol*. 2001 75:3435-43. PMID:11238869
179. Wolk T, Schreiber M. N-Glycans in the gp120 V1/V2 domain of the HIV-1 strain NL4-3 are indispensable for viral infectivity and resistance against antibody neutralization. *Med Microbiol Immunol*. 2006 195:165-72. PMID:16547752
180. Utachee P, Nakamura S, Isarangkura-Na-Ayuthaya P, Tokunaga K, Sawanpanyalert P, Ikuta K, Auwanit W, Kameoka M. Two N-linked

- glycosylation sites in the V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE envelope glycoprotein gp120 regulate viral neutralization susceptibility to the human monoclonal antibody specific for the CD4 binding domain. *J Virol.* 2010 84:4311-20. PMID:20164234
181. Wilhelm D, Behnken HN, Meyer B. Glycosylation assists binding of HIV protein gp120 to human CD4 receptor. *Chembiochem.* 2012 13:524-7. PMID:22266649
182. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature.* 2003 422:307-12. PMID:12646921
183. Binley JM, Ban YE, Crooks ET, Eggink D, Osawa K, Schief WR, Sanders RW. Role of complex carbohydrates in human immunodeficiency virus type 1 infection and resistance to antibody neutralization. *J Virol.* 2010 84:5637-55. PMID:20335257
184. Dacheux L, Moreau A, Ataman-Onal Y, Biron F, Verrier B, Barin F. Evolutionary dynamics of the glycan shield of the human immunodeficiency virus envelope during natural infection and implications for exposure of the 2G12 epitope. *J Virol.* 2004 78:12625-37. PMID:15507649
185. Zhou T, Xu L, Dey B, Hessel AJ, Van Ryk D, Xiang SH, Yang X, Zhang MY, Zwick MB, Arthos J, Burton DR, Dimitrov DS, Sodroski J, Wyatt R, Nabel GJ, Kwong PD. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature.* 2007 445:732-737. PMID:17301785
186. Moore PL, Gray ES, Choge IA, Ranchobe N, Mlisana K, Abdool Karim SS, Williamson C, Morris L; CAPRISA 002 Study Team. The c3-v4 region is a major target of autologous neutralizing antibodies in human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol.* 2008 82:1860-9. PMID:18057243
187. Zolla-Pazner S, Cardozo T. Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 2010 10:527-35. PMID:20577269
188. Chaillon A, Braibant M, Moreau T, Thenin S, Moreau A, Autran B, Barin F. The V1V2 domain and an N-linked glycosylation site in the V3 loop of the HIV-1 envelope glycoprotein modulate neutralization sensitivity to the human

- broadly neutralizing antibody 2G12. *J Virol.* 2011 85:3642-8.
PMID:21248038
189. Sanders RW, Venturi M, Schiffner L, Kalyanaraman R, Katinger H, Lloyd KO, Kwong PD, Moore JP. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol.* 2002 76:7293-305. PMID:12072528
 190. Pejchal R, Doores KJ, Walker LM, Khayat R, Huang PS, Wang SK, Stanfield RL, Julien JP, Ramos A, Crispin M, Depetris R, Katpally U, Marozsan A, Cupo A, Maloveste S, Liu Y, McBride R, Ito Y, Sanders RW, Ogohara C, Paulson JC, Feizi T, Scanlan CN, Wong CH, Moore JP, Olson WC, Ward AB, Poignard P, Schief WR, Burton DR, Wilson IA. A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. *Science.* 2011 334:1097-103. PMID:21998254
 191. Mouquet H, Scharf L, Euler Z, Liu Y, Eden C, Scheid JF, Halper-Stromberg A, Gnanapragasam PN, Spencer DI, Seaman MS, Schuitemaker H, Feizi T, Nussenzweig MC, Bjorkman PJ. Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 109:E3268-77. PMID:23115339
 192. Li H, Chien PC Jr, Tuen M, Visciano ML, Cohen S, Blais S, Xu CF, Zhang HT, Hioe CE. Identification of an N-linked glycosylation in the C4 region of HIV-1 envelope gp120 that is critical for recognition of neighboring CD4 T cell epitopes. *J Immunol.* 2008 180:4011-21. PMID:18322210
 193. Pantaleo, G., C. Graziosi, J. F. Demarest, L. Butini, M. Montroni, C. H. Fox, J. M. Orenstein, D. P. Kotler, and A. S. Fauci. 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 362:355-358. PMID:8455722
 194. Sirois S, Sing T, Chou KC. HIV-1 gp120 V3 loop for structure-based drug design. *Curr Protein Pept Sci.* 2005 6:413-22. PMID:16248793
 195. Gallay, P. 2004. Syndecans and HIV-1 pathogenesis. *Microbes Infect.* 6:617–622. PMID:15158197
 196. De Witte, L., M. Bobardt, U. Chatterji, G. Degeest, G. David, T. B. Geijtenbeek, and P. Gallay. 2007. Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:19464–19469. PMID:18040049

197. Bobardt MD, Chatterji U, Schaffer L, de Witte L, Gallay PA. Syndecan-Fc hybrid molecule as a potent in vitro microbicidal anti-HIV-1 agent. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 54:2753-66. PMID:20439611

8 **Veröffentlichungen**

Schwalbe B, Schreiber M (2015)

Effect of lysine to arginine mutagenesis in the V3 loop of HIV-1 gp120 on viral entry efficiency and neutralization. PLoS One 10(3): e0119879.

Schwalbe B, Hauser H, Schreiber M. (2014)

A virus-envelope paired competitive assay to study entry efficiency of human immunodeficiency virus type 1 in vitro. J Virol Methods. 22:91-98.

Schwalbe B, Hauser H, Schreiber M (2014)

Progress in HIV-Carbohydrate Interactions: Infectivity of CCR5-Tropic HIV-1 is Enhanced by GP120 from CXCR4-Tropic Virus. J Glycobiol 3:110.

Polzer S, van Yperen M, Kirst M, **Schwalbe B**, Schaal H, Schreiber M. (2010)

Neutralization of X4- and R5-tropic HIV-1 NL4-3 variants by HOCl-modified serum albumins. BMC Res Notes. 3:155.

Submitted:

Schwalbe B, Müller H, Polzer S, Schreiber M

Escape of a HIV-1 Patient Isolate from Neutralization Based on Mutations Affecting the Site for N-glycosylation within the gp120 V3 Loop.

9 Danksagung

Herrn Dr. Michael Schreiber danke ich für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit, dieses selbständig zu bearbeiten sowie die abschließende Begutachtung der Arbeit. Außerdem danke ich ihm für seine wertvollen Ratschläge während dieser Zeit.

Für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit danke ich ebenfalls Herrn Professor Dr. Hans-Peter Mühlbach.

Herrn Professor Dr. Herbert Schmitz möchte ich für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft im Rahmen dieser Arbeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der LG Schreiber Marcus Voßmann, Martin Kirst, Heiko Hauser, Melanie van Yperen und Petra Plähn für ihre Tipps und Unterstützung.

Weiter bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Abteilung für Virologie. Die stete Hilfsbereitschaft aller Mitarbeiter und die gute Arbeitsatmosphäre habe ich sehr schätzen gelernt.

Abschließend danke ich meinen Eltern, insbesondere meiner Mutter sowie meinen Freunden, besonders Lina Dromina und Christin Fandl, für deren ständigen mentalen Beistand und ihre Motivation in den schwierigen Phasen zweier paralleler Studiengänge. Durch sie habe ich immer wieder den Anstoß bekommen um letztendlich auch diese Arbeit abschließen zu können.

Vielen Dank Euch allen !!!

10 Anhang

Gefahrstoffverzeichnis nach dem *Globally Harmonized System* (GHS)

Gefahrstoffe	Piktogramme	Gefahrensätze	Vorsorgesätze
Acrylamid	 	H301 H312 + H332 H315 H317 H319 H340 H350 H361f H372	P201 P280 P301 + P310 P305 + P351 + P338 P308 + P313
Ampicillin	 	H315 H317 H319 H334 H335	P261 P280 P305 + P351 + P338
Ammoniumpersulfat	  	H272 H302 H315 H317 H319 H334 H335	P280 P305 + P351 + 338 P302 + P352 P304 + P341 P342 + P311
Calciumchlorid		H319	P305 + P351 + P338
Chloroform	 	H302 + H332 H315 H319 H336 H351 H361d H373	P261 P281 P305 + P351 + P338
Diethylformamid	  	H360D H226 H332 H312 H319	P201 P302 + P352 P305 + P351 + P338 P308 + P313
Dithiothreitol (DTT)		H302 H315 H319	P302 + P352 P305 + P351 + P338
Essigsäure	 	H226 H314	P280 P305 + P351 + P338 P310

Ethanol	 	H225	P210
Ethidiumbromid	 	H302 H330 H341	P260 P281 P284 P310
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)		H319	P280 P305 + P351 + P338 P310
Formamid		H360D	P201 P308 + P313
Hygromycin B	  	H318 H332 H334	P261 P280 P305 + P351 + P338
Isopropanol	 	H225 H319 H336	P210 P233 P305 + P351 + P338
Kaliumhydroxid	 	H302 H314	P280 P301 + P330 + P331 P305 + P351 + P338 P305 + P351 + P338 P309 + P310
Kalium-3-Ferrocyanat		H412	P273
Kalium-4-Ferrocyanat		H412	P273
Methanol	  	H225 H301 H311 H331 H370	P210 P260 P301 + P310 P311 P342 + P311
Natriumdodecylsulfat (SDS)	  	H228 H302 H315 H318 H332 H335 H413	P210 P261 P280 P305 + P351 + P338 P373
Natriumhydroxid		H290 H314	P280 P305 + P351 + P338 BEI P310
Penicillin		H317	P280

Phenol		H301 H311 H314 H331 H341 H373	P280 P302 + P352 P301 + P330 + P331 P305 + P351 + P338 P305 + P351 + P338
Puromycin		H302	
Salzsäure		H290 H314 H335	P234 P260 P303 + P361 + P353 P304 + P340 P305 + P351 + P338 P309 + P311 P501
Streptomycin		H302	
Tetramethylethylendiamin (TEMED)		H225 H302 H314 H332	P210 P233 P280 P301 + P330 + P331 P305 + P351 + P338 P309 + P310
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (TRIS)		H315 H319 H335	H261 P305 + P351 + P338
Trypsin		H315 H319 H334 H335	P261 P280 P302 + P352 P305 + P351 + P338 P337 + P313 P342 + P311
Trypanblau		H350	P201 P308 + P313
Xylencyanol		H319	P262

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den genutzten Werken inhaltlich oder wörtlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Diese Arbeit wurde von mir noch keiner anderen Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegt, weder an der Universität Hamburg noch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades.

Hamburg, den 4. August 2015
