

**STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE
CHARAKTERISIERUNG VON HIV-1
HÜLLPROTEINEN**

MASTERARBEIT

im Master-Studiengang Biotechnologie/
Biotechnology
der Beuth Hochschule für Technik
-University of Applied Sciences-

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Master of Science (M.Sc.)

vorgelegt von

Stefan Fiedler

Oktober 2012

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	2
1 EINLEITUNG	4
1.1 GESCHICHTLICHER ABRISS	4
1.2 EPIDEMIOLOGIE	5
1.3 MORPHOLOGIE EINES HIV-PARTIKELS	5
1.4 GENOM DES HIV	5
1.5 REPLIKATIONSZYKLUS	6
1.6 EINTRITT VON HIV IN DIE WIRTSZELLE	7
1.7 STRUKTUR VON GP160, GP120 UND GP41	9
1.8 CCR5 KOREZEPTOR UND EINFLUSS VON MUTATIONEN	11
1.9 ZIELSTELLUNG	11
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 MATERIAL	13
2.1.1 <i>Kompetente Bakterienstämme</i>	13
2.1.2 <i>Eukaryotische Zellen</i>	13
2.1.3 <i>Virusstämme</i>	13
2.1.4 <i>Enzyme</i>	14
2.1.5 <i>Plasmid</i>	14
2.1.6 <i>Oligonukleotide</i>	15
2.1.7 <i>Reagenzien</i>	16
2.1.8 <i>Kits</i>	16
2.1.9 <i>Puffer</i>	16
2.1.10 <i>Medien/Zusätze</i>	17
2.1.11 <i>Plastikmaterialien</i>	17
2.1.12 <i>Geräte</i>	18
2.1.13 <i>Software</i>	18
2.2 METHODEN	19
2.2.1 <i>Extraktion viraler RNA aus Zellkulturüberstand</i>	19
2.2.2 <i>Etablierung einer full-length-envelope PCR</i>	19
2.2.3 <i>Quantitative TaqMan PCR (LTR-RT-PCR)</i>	21
2.2.4 <i>Kultivierung 293T-Zellen/Molt-4/CEM-174</i>	21
2.2.5 <i>Plasmid-DNA-Präparation</i>	22
2.2.6 <i>Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden</i>	23
2.2.7 <i>Aufreinigung von DNA durch präparative Gelelektrophorese</i>	24

2.2.8	<i>Ligation</i>	25
2.2.9	<i>Transformation</i>	25
2.2.10	<i>DNA-Sequenzierung</i>	26
2.2.11	<i>Transiente Transfektion</i>	26
2.2.12	<i>Zell/Zell-Fusionsassay</i>	27
3	ERGEBNISSE	28
3.1	ETABLIERUNG DER <i>FULL-LENGTH</i> -ENVELOPE PCR.....	28
3.2	VIRUSLAST DER PRIMÄRISOLATE AUS ZELLKULTURÜBERSTAND.....	31
3.3	KLONIERUNG DES ENV-PCR PRODUKTES IN DEN EXPRESSIONSVEKTOR.....	31
3.4	SEQUENZAUSWERTUNG DER PLASMID-DNA	33
3.5	VERGLEICHENDE SEQUENZANALYSEN DER HIV ENVELOPEPROTEINE MIT VERSCHIEDENEM KOREZEPTORGEBRAUCH	35
3.5.1	<i>Das Oberflächenprotein gp120</i>	35
3.5.2	<i>Protease Spaltstelle von gp160</i>	44
3.5.3	<i>Das Transmembranprotein gp41</i>	45
3.6	ZELL/ZELLFUSIONSASSAY	49
4	DISKUSSION	51
4.1	PCR-DESIGN UND VERGLEICH VON DNA-POLYMERASEN FÜR <i>FULL-LENGTH</i> ENV-AMPLIFIKATION	51
4.2	ENV-KLONIERUNG IN DEN EUKARYONTEN EXPRESSIONSVEKTOR PCDNA3.1	52
4.3	STRUKTURELLE ANALYSE DES HÜLLPROTEINS	53
4.3.1	<i>Sequenzunterschiede im Oberflächenprotein gp120</i>	53
4.3.2	<i>Sequenzunterschiede im Transmembranprotein gp41</i>	55
4.4	ZELLFUSION ZUR FUNKTIONALEN CHARAKTERISIERUNG DER HÜLLPROTEINE	56
4.5	AUSBlick	57
5	ZUSAMMENFASSUNG	59
6	SUMMARY	61
7	LITERATURVERZEICHNIS	62
8	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	65

1 EINLEITUNG

1.1 Geschichtlicher Abriss

Bereits frühzeitig wurde vermutet, das humane Retroviren mit Tumoren und anderen Krankheiten in Verbindung stehen. Erste wissenschaftliche Erkenntnisse konnten bereits im Jahre 1977 erlangt werden. Auf der Japanischen Hauptinseln Honshū in der Präfektur Kyoto kam es zur einer erhöhten Inzidenz von ansonsten selten Fällen der adulten T-Zell-Leukämie in einer Gruppe von Menschen mit engen sozialen Kontakten (Uchiyama *et al.* 1977). Im Juni 1981 wurden Fallstudien in den Magazinen *Morbidity and Mortality Weekly Report* und dem *New England Journal of Medicine* zu einer gehäuft tödlich verlaufenden Krankheit unter homosexuellen Männern in den USA veröffentlicht, die meist an einem Kaposi-Sarkom oder einer Lungenentzündung erkrankten (Gottlieb *et al.* 1981).

Der Arbeitsgruppe von Luc Montagnier gelang im Jahre 1983 die erste Isolierung eines neuen Retrovirus, das heute als humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (*Human Immunodeficiency Virustype 1*, HIV-1) bezeichnet wird. Dabei ist zu erwähnen dass die Arbeitsgruppe von Robert Gallo wichtige Vorarbeit geleistet hatte (Barré-Sinoussi *et al.* 1983, Gallo *et al.* 1984).

1986 konnte in Portugal ein zweites AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) auslösendes Virus, hauptsächlich in Patienten aus West Afrika und dem Senegal, isoliert werden. Dieses Virus mit einer Divergenz von >55% zu HIV-1 wurde später als humanes Immundefizienzvirus Typ 2 (HIV-2) beschrieben (Clavel *et al.* 1986, Coffin *et al.* 1986).

Gegenstand intensiver Forschung sind die HIV-Hüllglykoproteine. Von ihnen erhofft man sich Erkenntnisse zur Pathogenese von HIV sowie über die humorale und zelluläre Immunantwort gegen diese Proteine, um diagnostische Werkzeuge zu entwickeln und geeignete Vakzinantigene zu identifizieren. Auch für die Entwicklung antiretroviraler Medikamente ist die Untersuchung der Interaktion der viralen Hüllproteine mit der Zielzelle wesentlich.

1.2 Epidemiologie

UNAIDS schätzt, dass Ende 2010 ca. 34 Millionen Menschen mit HIV lebten. Davon entfallen 23 Millionen (2010) Menschen auf die Sub-Sahara-Region (UNAIDS, *AIDS epidemic update*, November 2011). Die Fallzahlen stabilisierten sich langsam auf diesem hohen Niveau. Die Rate der Neuinfektionen ging von 3 Millionen im Jahre 2001 auf 2,7 Millionen in 2010 zurück. Weltweit starben im Jahr 2010 ca. 1,8 Millionen Menschen an den Folgen einer HIV-Infektion. In Deutschland leben derzeit ca. 73000 Menschen mit HIV/AIDS. Die Zahl der HIV Erstdiagnosen in Deutschland lag 2011 bei 2.889. (Epidemiologisches Bulletin, Jul.2012/Nr. 28, Robert Koch-Institut).

1.3 Morphologie eines HIV-Partikels

Ein reifes HIV-Partikel hat einen Durchmesser von 80-120 nm. Es besteht aus einer Lipiddoppelmembran zellulären Ursprungs, in die trimere Glykoprotein-Komplexe aus dem externen Oberflächen-Glykoprotein gp120 (SU) und dem Transmembran-Glykoprotein gp41 (TM) eingebettet sind. Innerhalb der Virushülle befindet sich die Matrix (MA) sowie ein konisches Kapsid (CA). Das Kapsid umschließt das virale Genom, welches aus zwei identischen einzelsträngigen Ribonukleinsäuremolekülen („ribonucleic acid, RNA“) besteht (Gelderblom et al. 1987 und 1991). Die zwei RNA-Moleküle bilden gemeinsam mit Nukleokapsidproteinen (NC) einen Ribonukleoproteinkomplex (RNP). Im RNP befinden sich die Enzyme Reverse Transkriptase (RT/RNaseH), Protease (PR) und Integrase (IN)

1.4 Genom des HIV

Das gesamte ca. 9,5 kB große HIV-1 RNA Genom kodiert neun Proteine in drei offenen Leserahmen (*open reading frames*, ORF), die von regulatorischen repetitiven Sequenzen flankiert sind. Die 5'-LTR-Region (*long terminal repeat*) fungiert als Promoter/Enhancer-Region, welche die Genexpression von HIV-1 steuert. In der 3'-LTR-Region wird die Transkription terminiert. Durch Überlagerung der ORF, ist die kodierende Kapazität des Virus bei gleichbleibender Größe im Vergleich zu anderen Retroviren erhöht. Das HIV-1 Genom beinhaltet die für Retroviren typischen drei offenen Leserahmen *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*), welche die Strukturproteine und Enzyme kodieren, sowie die essentiellen regulatorischen (*Tat*, *Rev*) und akzessorischen regulatorischen Proteine (*Vif*, *Vpr*, *Vpu*, *Nef*; Collins et al. 1998).

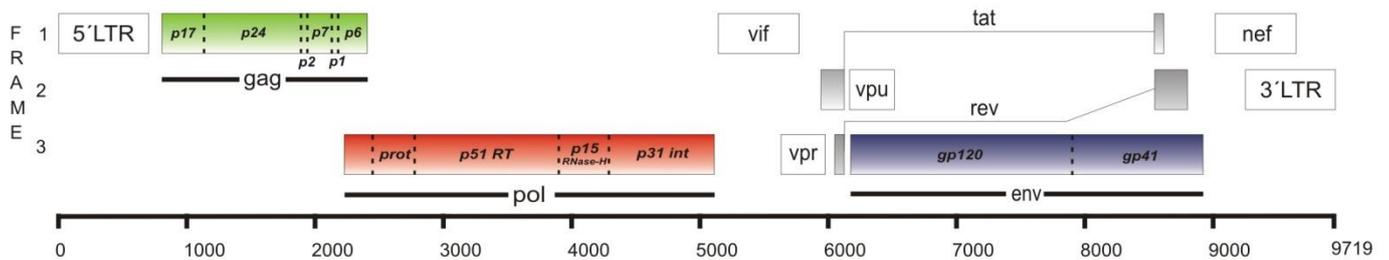


Abb.1. Schematischer Aufbau des HIV-1 Genoms

Zu den Strukturproteinen zählen die externen und transmembranen Glykoproteine (gp120 und gp41), die vom *env*-ORF kodiert werden, sowie die gruppen-spezifischen Antigene (*gag*): das Matrixprotein (p17), das Kapsidprotein (p24), das Nukleokapsidprotein (p7) und Link-Protein (p6). Die Transkription der viralen DNA wird durch das Regulatorprotein Tat (*transactivator of transcription*) aktiviert. Rev (*regulator of expression*) fördert den Export der RNA vom Nukleus in das Zytoplasma und unterstützt die Translation. Die akzessorischen Proteine Nef (*negativ factor*), Vif (*virion infectivity factor*), Vpr (*viral protein R*) und Vpu (*viral protein U*) sind im Gegensatz zu den regulatorischen Proteinen bei der *in vitro* Virusreplikation nicht essentiell, steigern jedoch die Infektiosität des Partikels und die Pathogenität des Virus (Cohen *et al.* 1996). Die Enzyme Protease (p12), Reverse Transkriptase/RNaseH (p51/p66) und Integrase (p32) werden vom *pol*-ORF kodiert und spielen eine entscheidende Rolle im Replikationszyklus.

1.5 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus von HIV-1 beginnt mit der Bindung des viralen Partikels an den CD4-Rezeptor (*Cluster of Differentiation 4*) und einen Korezeptor der Zelle (*attachment*). Dabei interagiert das virale Oberflächenglykoprotein gp120 mit dem monomeren zellulären Glykoprotein CD4 und einem Korezeptor, und löst die Fusion der Wirtszellmembran und der Virushülle aus. Durch die Fusion beider Membranen wird das Kapsid (Virus-Core) in das Zytoplasma entlassen und die virale RNA freigesetzt (*uncoating*). Nachdem die RNA „frei“ im Zytosol vorliegt, wird die eingeschleuste RT aktiv, welche die virale RNA in provirale cDNA umschreibt. Die Reverse Transkriptase besitzt keine Korrekturfunktion (*proof reading*) für den Einbau fehlgepaarter Basen. Bei der Umschreibung der RNA und Synthese der doppelsträngigen DNA ergibt sich daraus eine Mutationsrate von etwa einer Mutation pro Genomkopie (Perelson *et al.* 1996). Dabei führen einige Mutationen zu replikationsdefizienten Viren, andere jedoch bleiben

replikationskompetent. So entsteht in jedem Individuum eine Vielzahl eng verwandter Virusvarianten, welche in ihrer Gesamtheit als virale Quasispezies bezeichnet wird. Bestimmte Virusvarianten sind dabei erfolgreicher die Immunantwort des Wirtes zu umgehen als andere. Das doppelsträngige DNA-Genom (dsDNA) bildet zusammen mit der Integrase einen Präintegrationskomplex. Dieser Komplex dient dem Transport in den Zellkern und der Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom. Wirtszelleigene Reparaturenzyme füllen Lücken, die aufgrund des Einbaumechanismus entstehen. Die integrierte virale DNA liegt nun als sogenanntes Provirus vor (Allan *et al.* 1987). Der Zustand, in dem das provirale Genom in der Zelle integriert oder noch nicht integriert vorliegt, ohne dass virales Protein gebildet wird, kann bei Retroviren lebenslang anhalten, da aufgrund fehlender Virusproteine keine Immunreaktion erfolgt. Nach Stimulation der infizierten Wirtszelle durch Mitogene oder Zytokine wird die Transkription der proviralen DNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II aktiviert (Rosen *et al.* 1985). Die Proteine Tat und Rev werden früh synthetisiert und vom Zytosol in den Nukleus geschleust (frühe Infektionsphase). Sie führen zu einer massiven Transkriptionsaktivierung (Tat) sowie zur Umschaltung (Rev) von mehrfach gespleißter zu ungespleißter und einfach gespleißter mRNA (späte Infektionsphase). Translatierte Vorläuferproteine von Gag und Pol sowie die ungespleißte *full-length* HIV-RNA akkumulieren und bilden das. Dieses im „self-assembly“-Prozess entstandene Kernpartikel sammelt sich zusammen mit Env-Proteinen an der Zellmembran an und ein umhülltes Virus wird durch Knospung von der Zelle abgelöst (Budding). Erst nach dem die virale Protease die proteolytische Spaltung der bis dahin vorhandenen Polyproteine (Gag, Pol) bewirkt, erlangt das Viruspartikel Infektiosität (Kaplan *et al.* 1994).

1.6 Eintritt von HIV in die Wirtszelle

Die Interaktion des Virus mit einem CD4-Rezeptor und einem Chemokinkorezeptor auf der Wirtszelloberfläche ist notwendig, um einen Eintritt des Viruspartikels zu ermöglichen. Die natürliche Funktion des CD4-Rezeptors ist die Präsentation von Antigenen auf der T-Zelloberfläche und die Interaktion mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex II („Major Histocompatibility Complex“, MHC II) auf Immunzellen. CD4-Rezeptoren werden auf den Zelloberflächen von T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert. HIV bindet mit dem immundominanten V3-loop und anderen Epitopen des externen Glykoproteins gp120 an den CD4-Rezeptor, löst mehrere Konformationsänderungen aus, die eine Bindung an einen Korezeptor und die

Membranfusion zur Folge haben (Abb.2). Der Korezeptor ist ein Chemokinrezeptor aus der Familie der T7-Transmembranproteine, welche entsprechend des Aminosäuremotives ihrer natürlichen Liganden klassifiziert werden. Es werden die Korezeptoren mit den Motiven C, CC, CXC oder CX3C unterschieden. Das HIV Hüllprotein beeinflusst den Korezeptorgebrauch des Virus. Zurzeit wird zwischen zwei hauptsächliche Varianten unterschieden. Die T-Zelltropen HIV-Isolate (X4-Virus) verwenden den Chemokinrezeptor CXCR4 als Korezeptor, während die makrophagentrope Isolate (R5-Virus) den Korezeptor CCR5 nutzen (Deng et al. 1996; Feng et al. 1996). Die natürlichen Liganden von CCR5 sind β -Chemokine wie MIP-1 α und MIP-1 β , die von CXCR4 sind α -Chemokine wie SDF-1 (Cairns und D'Souza 1998). Es existieren HIV-Isolate, die sowohl CCR5 als auch CXCR4 Korezeptoren nutzen (dualtrope X4R5-Viren) und die alternative Korezeptoren nutzen (Alkhatib und Berger 2007).

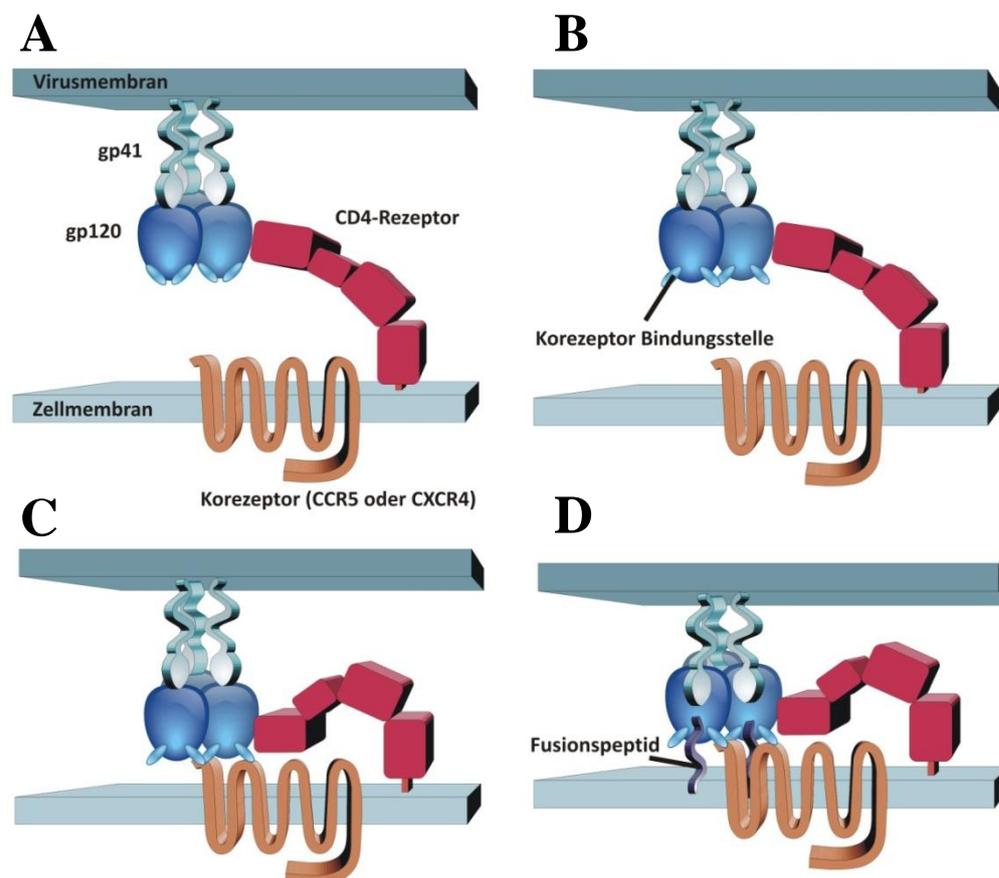


Abb.2. Proteininteraktion bei Eintritt in die Wirtszelle

In Blau: gp120, Türkis: gp41, Rot: CD4-Rezeptor, Orange: Korezeptor CCR5/CXCR4, Violett: gp41 Fusionspeptid. A) Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor der Wirtszelle B) Konformationsänderung von gp120 und Freilegung der Korezeptor-Bindungsstelle C) Bindung an den Korezeptor D) Konformationsänderung im gp41, insertion des Fusionspeptids: Membranfusion wird eingeleitet. Abbildung nach De Clercq (2007)

1.7 Struktur von gp160, gp120 und gp41

Das HIV Glykoprotein besitzt zwei grundlegenden Funktionen, zum einen die bereits genannte Interaktion mit dem CD4-Rezeptor der Zielzelle und zum anderen die Induktion der Fusion von Virusmembran mit Wirtszellmembran. Als Membranprotein besitzt es eine extrazelluläre Einheit (SU, *surface*, gp120) und eine Transmembraneinheit (TM, *transmembran*, gp41). Wie bei den anderen HIV-Strukturproteinen wird auch Env als Vorläuferprotein synthetisiert. Dieses Glykoprotein (gp160) wird in die Untereinheiten gp120 und gp41 gespalten. Für diese Spaltung ist, im Gegensatz zu der Reifung anderer Vorläuferproteine, die zelluläre Protease Furin verantwortlich. Die Glykoproteine liegen in der Membran in trimerer Form vor. Die Hälfte des Molekulargewichts von gp120 und gp41 machen Glykosylierungen aus, die an ca. 30 Glykosylierungsstellen zu finden sind. 80% dieser Glykosylierungen sind im gp120 zu finden.

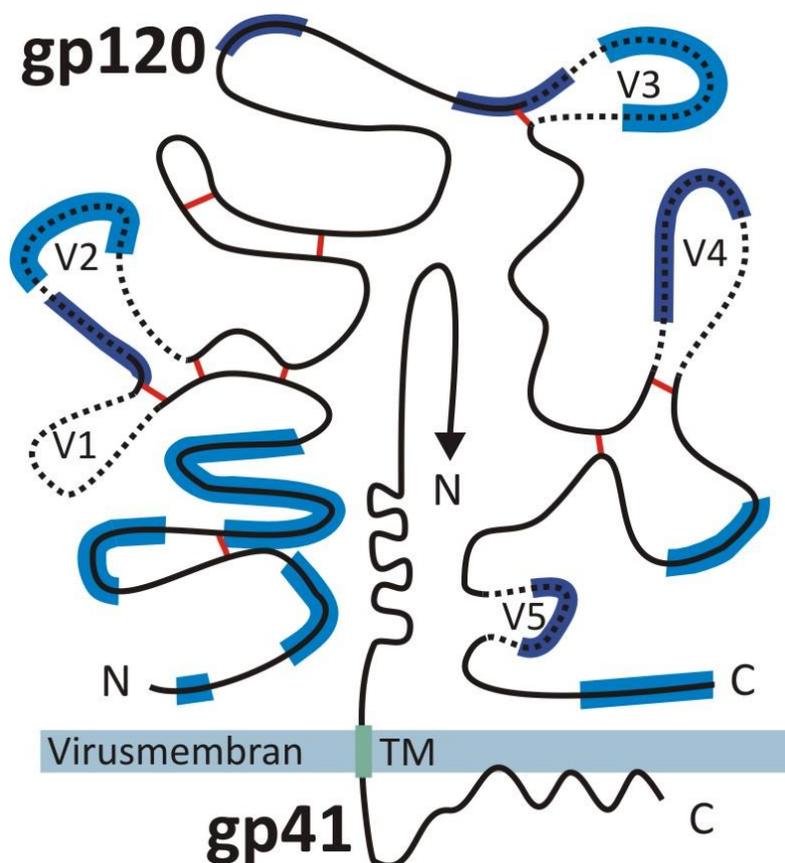


Abb.3. 2D-Modell der Struktur des gp120/gp41 Glykoproteinkomplexes

Das Hüllprotein ist nur als Monomer dargestellt. Hypervariable Bereiche sind mit V1-V5 bezeichnet und gestrichelt dargestellt. In Hellblau: Virusmembran; in Blau: Epitop auf der Oberfläche exponiert, in Dunkelblau: Epitop von Kohlenhydraten umgeben. Die Verbindungslinien in Rot sind Disulfidbrücken. N: aminoterminal Ende, C: carboxy-terminal Ende, TM: Transmembran-Region (nach Leonard *et al.* 1990)

Die gp120 und gp41 bleiben nach der Spaltung über nichtkovalente Bindungen miteinander verbunden. Diese schwache „Bindung“ kann zu einer Dissoziation des SU-Komplexes von der TM-Domäne („Env-shedding“) führen. Im 550 Aminosäuren (AS) großen gp120 befinden sich fünf hypervariable Regionen (V1 bis V5 Schleifen/Loop, Abb.3). Die Basis dieser Loops wird durch Disulfidbrücken ausgebildet. Von besonderer Bedeutung ist der bereits genannte immundominante V3-Loop (AS 301-335), der für die Bindung an den CD4-Rezeptor und den Korezeptor der Zielzelle verantwortlich ist. Dieser hypervariable Loop besitzt an seiner Spitze vier konservierte Aminosäuren (Gly Pro Gly Arg, GPGR-Motiv).

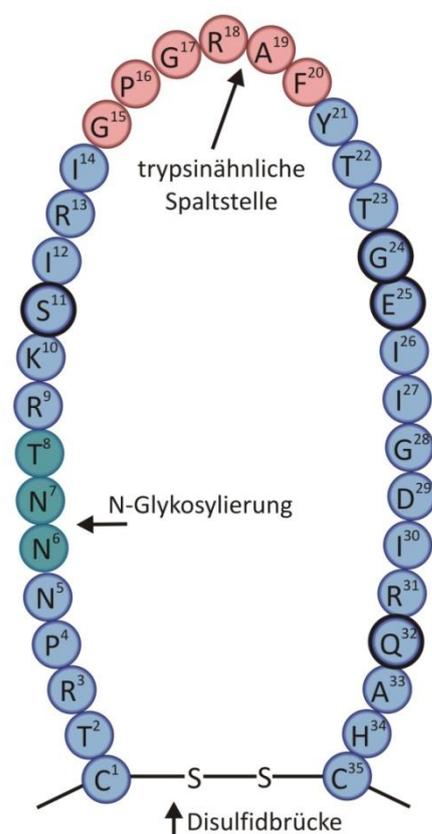


Abb.4. V3-Loop von HIV gp120

Dritte variable Region des gp120. In Rot: Konservierte Spitze mit GPGR-Motiv, Türkis: N-Glykosylierungsstelle, Fett gedruckt: Position von syncytieninduzierenden basischen AS (nach Millich *et al.* 1993)

Deletionen, welche im V3-Loop lokalisiert sind, führten zu einem Ausbleiben der Membranfusion (Travis *et al.* 1992). Während der Krankheitsprogression nimmt die Anzahl der basischen Mutationen im V3-Loop zu, dies führt zu einer verstärkten Syncytienbildung der Isolate in Zellkultur als auch einen Wechsel von makrophagentropen Viren zu T-Zelltropen Viren. Durch diesen typischen Wechsel im Tropismus kommt es im Verlauf der Krankheit zu einem immer stärker werdenden Verlust an CD4⁺ T-Zellen und somit zum Stadium AIDS.

1.8 CCR5 Korezeptor und Einfluss von Mutationen

1996 untersuchte die amerikanische Arbeitsgruppe von Nathaniel Landau Patienten mit multipler HIV-Exposition, die jedoch nicht infiziert werden. Dabei entdeckten sie in diesen Individuen eine 32 Bp große Deletion auf dem CCR5-Korezeptor-Gen. Diese Deletion führt zu einem nicht funktionellen Korezeptor. Untersuchungen zeigten, dass in 1% der kaukasischen Bevölkerung eine homozygote Deletion (CCR5 Δ 32/ Δ 32) und in 5-14% eine heterozygote Deletion (CCR5 Δ 32/wt) auftritt (Libert *et al.* 1998). Eine homozygote Deletion führt hierbei zu einem fast vollständigen Schutz gegenüber einer HIV-1 Infektion. Eine heterozygote Deletion führt zu einer verlangsamten Krankheitsprogression.

Insgesamt sind sehr wenige Patienten publiziert, bei denen eine CCR5 Δ 32/ Δ 32 vorliegt und die dennoch eine HIV-1 Infektion besitzen. Weitere Mutationen des CCR5 Chemokinrezeptors sind bekannt, weisen jedoch im Vergleich zu der 32Bp Deletion keine auffälligen Effekte auf. In der HIV-1 Serokonverterstudie des Robert Koch-Institutes zeigten Untersuchungen den verzögernden Effekt einer heterozygoten CCR5 Deletion (Oh *et al.* 2008). Ebenfalls konnte ein HIV-1 positiver Patient mit einer CCR5 Δ 32/ Δ 32 für die Studie und weitere Untersuchungen rekrutiert werden (Oh *et al.* 2008).

1.9 Zielstellung

Die Bindung und die Fusion eines HIV-Partikels an und in die Zielzelle ist ein essentielles Ereignis im Replikationszyklus von HIV. Dieser, noch nicht vollständig geklärte, Vorgang benötigt initial die Interaktion mit dem CD4-Rezeptor sowie einem Chemokinrezeptor. Die am häufigsten verwendeten und am besten charakterisiertesten Korezeptoren sind die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4. In der Serokonverterstudie des Robert Koch-Institutes wurde 2002 ein HIV-1 positiver Patient eingeschlossen, bei welchem 2007 die 32 Bp homozygote Deletion im CCR5-Gen (CCR5 Δ 32/ Δ 32) diagnostiziert wurde. Von der Erstprobe und einer Verlaufsprobe wurde der Korezeptorgebrauch phänotypisch untersucht, und dabei festgestellt, dass das Erstisolat sowohl den CXCR4- als auch den CCR5-Korezeptor verwendet, wohingegen das Folgeisolat nur den CXCR4-Korezeptor nutzt. Es zeigte sich auch, dass das Folgeisolat alternative Korezeptoren wie CX3CR1 und möglicherweise auch CCR3, CCR8, STRL33 (BONZO) und GPR15 (BOB) für den Eintritt in die Zielzelle gebraucht (Diplomarbeit Demiroglu 2008, Diplomarbeit Brett 2010, Masterarbeit Friedel 2011, Masterarbeit Flamme 2012).

Inhibitionsversuche mit dem CXCR4-spezifischen Inhibitor (AMD3100) bestätigten zunächst den Gebrauch alternativer Korezeptoren in einer IsnoR5 Zelllinie und PBMCs (Kücherer et al. 2009). In Inhibitionsversuchen mit AMD3100 und Fraktalkin, dem natürlichen CX3CR1-Liganden, war jedoch aufgrund der basalen CXCR4-Expression in dem verwendeten GHOST-Zellpanel, eine eindeutige Unterscheidung zwischen CXCR4 und CX3CR1 Gebrauch nicht möglich (Friedel, 2009). In einer anderen CX3CR1-Zelllinie ohne CXCR4 Hintergrundexpression konnte der CX3CR1-Gebrauch nachfolgend klar ausgeschlossen werden (Flamme 2012).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine strukturelle und funktionale Charakterisierung des vollständigen Hüllproteins von HIV aus dem CCR5-defizienten Patienten durchzuführen. In den vorangegangenen Arbeiten war in den HIV-Isolaten jeweils nur der V3-Loop sequenziert worden. Insbesondere sollte daher untersucht werden, ob Domänen im Hüllprotein außerhalb des V3-Loops einen Einfluss auf den Korezeptorgebrauch haben. Hierzu musste zum einen ein PCR-System etabliert werden, um *full-length-envelope* DNA-Fragmente mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen für *sticky-end* Klonierung zu amplifizieren. Es musste ein geeignetes Vektorsystem ausgewählt werden, in dem die *full-length-envelope* Sequenzen zunächst in Bakterien vermehrt, und anschließend in humanen Zelllinien exprimiert und untersucht werden können. Die Sequenzen von Viren mit bekannten Corezeptorgebrauch und den Patientenisolaten sollten verglichen werden, um Hinweise auf Domänen/Aminosäuren zu erhalten, die für den Entry-Prozess und die Evolution des Corezeptorgebrauchs von HIV relevant sein können. Die Funktionalität der Hüllproteine und seiner Mutanten sollten im Zell/Zell-Fusionsassay analysiert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Kompetente Bakterienstämme

NEB 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency) New England Biolabs GmbH,
Frankfurt a.M., Deutschland

2.1.2 Eukaryotische Zellen

Humane embryonale Nierenzellen HEK 293T NRZ für Retroviren, Erlangen
Deutschland

Molt-4/8 Zellen, humane T-Zelllinie Robert Koch-Institut, Berlin
Deutschland

CEM x 174, humane T-Zelllinie NRZ für Retroviren, Erlangen
Deutschland

2.1.3 Virusstämme

Alle Virusstämme wurden in vorrangegangenen Arbeiten in PBMCs vermehrt (siehe Tab.1). Die Abnahmen erfolgten an unterschiedlichen Tagen. Für die Klonierung wurden von den Isolaten Überstände der Tage 10 post Infektion (p.i.) beziehungsweise 12 Tage p.i. verwendet. Die Viruslast des Materials wurde mit der LTR-RT-PCR überprüft (siehe 2.2.3).

Tab.1. Liste der Referenzmaterialien sowie Patientenisolat

Name	Virus	Korezeptor- gebrauch	Virusabnahme dpi
HTLVIIIB	Referenzlaborstamm	CXCR4	d10
BAL	Referenzlaborstamm	CCR5	d10
02-0165	Primärisolat* (Erstisolat)	CCR5/CXCR4	d14 #849,#850**
08-0755	Primärisolat* (Verlaufsisolat)	CXCR4	d10, d14, Autolog A/B, Kokultur A/B #850

* Isolat aus CCR5 Δ 32/ Δ 32 Patienten

** PBMC-Spendernummer

2.1.4 Enzyme

Tab.2. Verwendete Enzyme

Enzyme	Firma
EcoRI	Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland
NcoI	
PstI	
SacI	
XhoI	
NheI	Promega,
T4 DNA Ligase	Madison, USA
Superscript II™ Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Plasmid

pcDNA™ 3.1 (+) (siehe Abb.5)

Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
Deutschland

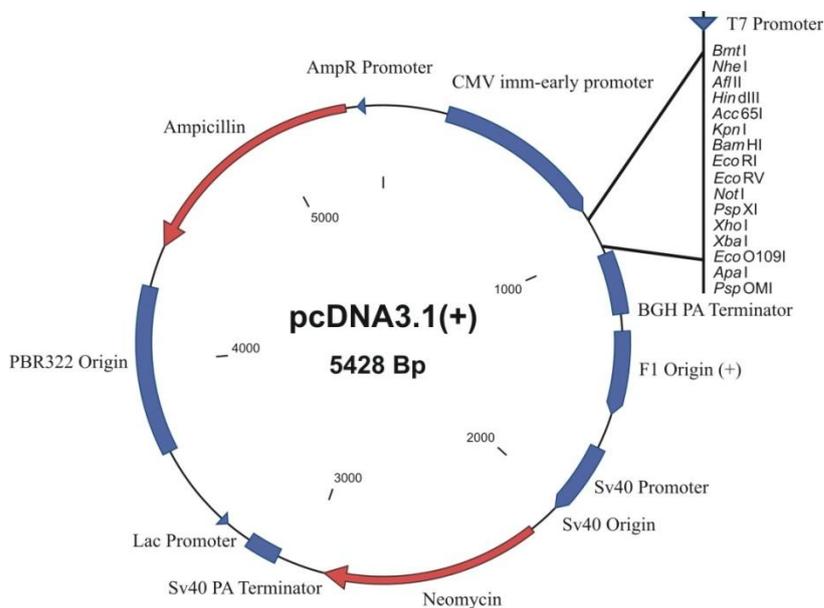


Abb.5. Expressionsvektorkarte pcDNA3.1

Karte des Expressionsvektors pcDNA3.1 mit Restriktionsenzymstimmstellen (multiple cloning site), erstellt mit Clone Manager, Rot: Selektionsmarker, Blau: Promotor/Terminatorregion.

2.1.6 Oligonukleotide

Die folgenden Primer wurden von der Firma Metabion, Martinsried, Deutschland synthetisiert (Tab.3). Das Primerdesign erfolgte mit der Clone Manager 9 Software. Bei dem Design der PCR-Primer wurde auf folgende Parameter geachtet: einen Gehalt von Guanin und Cytosin von 50 % bis 60 %, eine Schmelztemperatur zwischen 55°C und 70°C, möglichst keine Wiederholung von mehr als drei aufeinander folgenden identischen Nukleotiden, keine Dimerbildung von Primern mit sich selbst oder mit einem anderen Primer über einer Länge von sechs Nukleotiden (maximal drei am 3' Ende), ein Guanin oder Cytosin am 3' Ende. Für zwei Primer wurde eine zusätzliche Restriktionsenzymstrecke eingebaut, um eine spätere Klonierung zu erleichtern.

Tab.3. Primerliste PCR, Sequenzierung, Viruslast

Primer	Verwendung	Sequenz	Koord.*
<i>env5950_SF1s</i>	PCR-Primer	5'-CGAATTCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGC-3'	5950-5984
<i>env8904_SF2as</i>	PCR-Primer	5'-GTCTCGAGATGCTGCTCCCACCCTATCTG-3'	8904-8876
<i>env5853_SF3s</i>	PCR-Primer	5'-TAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAG-3'	5853-5877
<i>env8936_SF4as</i>	PCR-Primer	5'-TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT-3'	8913-8936
<i>T7s_SF5</i>	Seq.-Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	pcDNA3.1
<i>BGHas_SF6</i>	Seq.-Primer	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	pcDNA3.1
<i>E180s_SF7</i>	Seq.-Primer	5'-GTCTGGTATAGTGCAACAGCA-3'	7859-7879
<i>E250s_SF8</i>	Seq.-Primer	5'-GGAGGCTTGATAGGTTTAAGAATA-3'	8292-8315
<i>E175as_SF9</i>	Seq.-Primer	5'-TTTAGCATCTGATGCACAAAATAG-3'	6401-6378
<i>E00as_SF10</i>	Seq.-Primer	5'-TCATTGCCACTGTCTTCTGCTCTTTCTA-3'	6228-6201
<i>E40s_SF11</i>	Seq.-Primer	5'-CATGTGGAAAAATGACATGGTGGATCA-3'	6506-6532
<i>2s</i>	Seq.-Primer	5'-TTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCT-3'	7351-7374
<i>2as</i>	Seq.-Primer	5'-AGAAAAATCCCCCTCCACAATTAA-3'	7374-7351
<i>5asc</i>	Seq.-Primer	5'-TCCTTSGATGGGAGGGGCATACAT TGC-3'	7547-7521
<i>env7407asc</i>	Seq.-Primer	5'-CATAGTGCTTCTCTGCTGCTCCYAAGAACC-3'	7814-7786
<i>env7254asc</i>	Seq.-Primer	5'-TCATATCTCCTCCTCCAGGTCTGAA-3'	7650-7626
<i>gp46 F2</i>	Seq.-Primer	5'-ACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAACAGCA-3'	7850-7879
<i>gp48 R2</i>	Seq.-Primer	5'-TCCTACTATCATTATGAATATTTTTATATA-3'	8294-8265
<i>E00</i>	Seq.-Primer	5'-TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA-3'	6201-6228
<i>LTR_524_s</i>	Viruslast	5'- CTCAATAAAGCTTGCCTTG -3'	524-542
<i>LTR_625_as</i>	Viruslast	5'- GCGCCACTGCTAGAGAT -3'	625-641
<i>TM-LTR_3</i>	Viruslast	5'- Fam -TCTGAGGGATCTCTAGYTACCAGA -BHQ-1 -3'	578-601

* Koordinaten entsprechen der Lokalisation in der Referenzsequenz HXB2 (AccNo.: K03455)

2.1.7 Reagenzien

Adenosintriphosphat (ATP)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Agarose	peqlab, Erlangen, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol $\geq 99,8 \%$	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
GeneRuler™ 1kB Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler™ 100Bp Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
pmax GFP®	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz
Low DNA Mass™ Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HIV-negatives humanes Plasma	Paul-Ehrlich-Institut, Frankfurt/Main, Deutschland
2-Propanol $\geq 99,8 \%$	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
RNAsin	Promega, Madison, USA
SuperFect® Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.8 Kits

BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit	ABI, Weiterstadt, Germany
EndoFree® Plasmid Maxi Kit (10)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
GeneJet™ Gel Extraction Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (250)	Invitek GmbH, Berlin, Deutschland
MSB® Spin PCRapace	Invitek GmbH, Berlin, Deutschland
NucliSENS® miniMAG®	bioMérieux, Nürtingen, Deutschland

2.1.9 Puffer

Tab.4. Pufferzusammensetzung

Puffer	Bestandteil	Verwendung
6 x Ficoll-Ladepuffer	Ficoll 400, 25 % Bromphenolblau 0,25 % TAE Puffer 10x	Gelelektrophorese
PBS (pH 7,2)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄	Medium (Zellkultur)
10x TAE-Puffer	Tris 400 mM EDTA 10 nM Natriumacetat 500 mM	Gelelektrophorese

2.1.10 Medien/Zusätze

Luria Broth–Medium (LB)	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,17 M NaCl, 1,5 % Agar
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Fötiales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
SOB	2% pflanzliches Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
SOC	SOB + 20 mM Glucose
Trypsin 250	Difco, USA
Versen	0,2 % EDTA in PBS, Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland

2.1.11 Plastikmaterialien

CentriSpin™-10 Columns	GENAXXON bioscience, Ulm, Deutschland
------------------------	--

Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Mikropipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Rapidozym, Luckenwalde, Deutschland
Polystyrol-Rundbodenröhrchen (5 ml)	Becton Dickinson Labware, NJ, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche (75 cm ²)	Thermo Scientific (nunc), Roskilde, Dänemark
Zellkulturtestplatte 6/24	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
2.1.12 Geräte	
Avanti® J-E Zentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Zellkulturinkubator	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Geldokumentationssystem E.A.S.Y. RH-3	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Gelelektrophorese-Kammer Horizon®58	Gibco BRL, Eggstein, Deutschland
Hereaus Multifuge X3FR Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Jena , Deutschland
Mastercycler® pro S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Karl Bleymehl Reinraumtechnik, Inden/Pier, Deutschland
	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Mikrozentrifuge	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NanoDrop™ND1000	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
TaqMan MXpro-3000	ABI , (Stratagene) , Californien USA
2.1.13 Software	
BioEdit 7.0.9	Ibis Biosciences, CA, USA
Clone Manager Professional 9	Scientific & Educational Software, NC, USA
CorelDRAW Home & Student Suite X5	Corel Corporation, USA

E.A.S.Y Win 32	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Lasergene 10, Softwarepaket	DNASTAR Inc., WI, USA
NCBI Primer-Blast Tool	NCBI, MD, USA
TreeView 1.6.6	Roderik D.M. Page, UK

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion viraler RNA aus Zellkulturüberstand

Die Extraktion der viralen RNA erfolgte mit dem bioMérieux Extraktionssystem NucliSENS[®] miniMAG[®]. Dieses System beruht auf der Bindung von RNA an magnetische Silikapartikel und der Aufreinigung der RNA im Batch-Verfahren. Es wurden 0,5 ml bis 1,0 ml Zellkulturüberstand eingesetzt. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerprotokoll. Eluiert wurde mit 60 µl Elutionspuffer. Die RNA wurde in 10 µl Portionen aliquotiert und abschließend bei -70°C gelagert.

2.2.2 Etablierung einer *full-length-envelope* PCR

Ein Arbeitsziel war das Design einer PCR, um von verschiedenen HIV-Isolaten den vollständigen Rev/Env-ORF mit einer Länge von 2954 Nukleotiden zu amplifizieren. Da es sich bei allen verwendeten Stämmen um Subtyp B Viren handelte, wurde die Referenzsequenz von HXB2 aus der HIV-Datenbank stellvertretend verwendet. Sie diente als Grundlage für das Primerdesign und für das Klonierungsschema. An einem Referenzalignment mit Subtyp B Viren wurde die Konserviertheit der Primerbindungsstellen überprüft. Für die PCR-Etablierung wurde das Virusisolat HTLVIII B verwendet, welches in Zellkultur angezogen wurde. Für die Versuche wurde eine serielle Verdünnungsreihe (1:10) des Zellkulturüberstandes in HIV-negativem humanem Plasma hergestellt, um auch Aussagen zur Sensitivität der etablierten PCR treffen zu können.

Die extrahierte RNA aus den Zellkulturüberständen wurde zunächst in einem reversen Transkriptionsschritt mit Superscript II in cDNA umgeschrieben (siehe Tab.5 und Tab.6). 10 µl Template wurden vor der Transkription für 10 min bei 96°C denaturiert. Das RNA-Template wurde anschließend mit 10 µl RT-Mix versetzt und das folgende Zyklusprogramm (Tab.6) verwendet.

Tab.5. RT-Mix Zusammensetzung für die Reverse Transkription

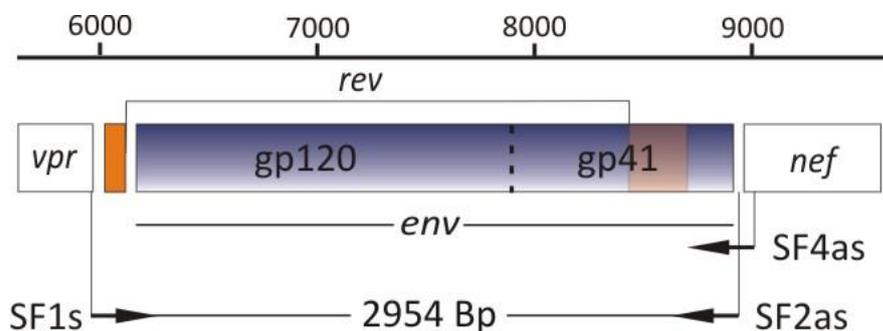
Reagenz	Konz. Stocklösung	Konz. final
5xRT-Puffer (15 mM MgCl ₂)	5 x	1 x
DTT	100 mM	5 mM
dNTP	2,5 mM	0,5 mM
as-Primer env8936_SF4as	25 µM	0,6 µM
RNasin	40 U/µl	40U
Superscript II	200U/µl	100U

Tab.6. Amplifikationsparameter der Reversen Transkription

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen [n]
Transkription*	42	1 h	1
Inaktivierung	93	7 min	1
Hold	4	∞	

* Vor der Zugabe des RT-Mixes erfolgte ein Denaturierungsschritt

Es wurden drei Polymerasen getestet, um ein PCR Produkt zu generieren (Tab.7). Zusätzlich wurden Amplifikationsparameter der PCR variiert. Dies waren zum einen die Dauer der Elongation (2 min bis 7 min) und zum anderen unterschiedliche Annealingtemperaturen (57°C bis 67°C). Die Amplifikation wurde in einem Mastercycler® pro S (Eppendorf) durchgeführt. Dieser war in der Lage eine Gradienten-PCR durchzuführen. Geprüft wurde auf die erfolgreiche Amplifikation eines 3000 Bp großen Produktes (Abb.6).

**Abb.6. PCR-Schema *full-length-envelope* PCR**

Ausschnitt Genkarte mit Position des RT-Primers (SF4as) sowie der PCR-Primer (SF1s, SF2as).

Tab.7. Verwendete Polymerasen für die PCR-Etablierung

Polymerase	max. Produktlänge [kB]	Fehlerrate (10^{-6})	<i>proof reading</i>
Expand High Fidelity, Roche	5	9	ja
Long PCR Enzyme Mix, Fermentas	47	9	ja
PfuUltra HotStart, Agilent	14	2	ja

Nachdem die PCR anhand des Isolats HTLVIII B auf RNA-Ebene etabliert worden war, folgte deren Anwendung auf die HIV-Patientenisolate. Hierbei musste das PCR-Protokoll teilweise modifiziert werden, insbesondere beim Versuch der zusätzlichen Amplifikation von HIV-RNA.

2.2.3 Quantitative TaqMan PCR (LTR-RT-PCR)

Je 10 μ l RNA wurden entsprechend des inhouse-Protokolls in die Viruslastbestimmung eingesetzt (Dreifachwerte). In dieser RT-PCR wurde ein 105 Bp langes Fragment im HIV-*LTR*-Bereich amplifiziert. Die PCR wurde mit dem TaqMan Gerät MXpro-3000 (Fa. ABI) durchgeführt. Als Konzentrationsstandard wurde eine serielle Verdünnungsreihe (1:10) des HTLVIII B Stocks in HIV negativem humanem Plasma verwendet. Der lineare quantifizierbare Messbereich der Eichkurve des inhouse-Testes für Plasma (450 μ l Testvolumen) liegt zwischen $6,5 \times 10^2$ geq/ml (Genomäquivalente pro Milliliter) und 10^7 geq/ml. Viruslasten unter $6,5 \times 10^2$ geq/ml konnten nicht zuverlässig quantifiziert werden. Die Auswertung erfolgte mit der Gerätesoftware.

2.2.4 Kultivierung 293T-Zellen/Molt-4/CEM-174

Die HEK 293T Zelllinie aus humanen, embryonalen Nierenzellen, ist mit der temperatursensitiven Mutante des SV-40 T-Antigen stabil transfiziert. Sie weisen ein fibroblastoides adhärenthes Zellwachstum auf und besitzen eine Generationszeit von ca. 24-30 h.

Die HEK 293T Zellen wurden in einem Vollmedium bestehend aus D-MEM, 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 200 mM L-Glutamin kultiviert. Das Wachstum erfolgte in einer befeuchteten Atmosphäre bei 37°C und einem Zusatz von 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂). Zwei Mal wöchentlich wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 in 75 cm² Flaschen passagiert. Für das Ablösen wurde eine 0,2 % Trypsin/Versenlösung verwendet.

Die Molt-4 Zellen sowie die CEM-174 Zellen sind T-Zellen aus Leukämiepatienten. Sie sind CD4⁺ und exprimieren mehrere Korezeptoren. Diese Suspensionszellen wurden in RPMI-1640 Medium kultiviert mit den Zusätzen 10% FKS und 200 mM L-Glutamin. Das Wachstum erfolgte in einer befeuchteten Atmosphäre bei 37°C und einem Zusatz von 5 % CO₂. Zwei Mal wöchentlich wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 in 50 ml Flaschen passagiert.

2.2.5 Plasmid-DNA-Präparation

Minipräparation mit dem Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kit

Plasmid-Minipräparationen aus bis zu 2 ml Bakterienkultur wurden mit dem Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kit von der Firma Invitex GmbH durchgeführt. Die Plasmide trugen Ampicillin als Selektionsmarker in den NEB 5 α -Bakterien.

Für die Minikultur wurden 2 ml LB-Medium mit einem Ampicillin-Zusatz von 100 μ g/ml (LB-AMP) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht schüttelnd (225 rpm) inkubiert. Nach 12-16 h Inkubation wurden die Bakterien aus 2 ml Minikultur durch Zentrifugation mit 13.000 x rpm für 2 min geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 250 μ l Lösung A des Invisorb® Spin Kits resuspendiert, in 250 μ l Lösung B alkalisch lysiert und durch 250 μ l Lösung C neutralisiert (Endvolumen 750 μ l). Bei Zugabe der neutralisierenden Lösung fallen die Proteine und weitestgehend quantitativ lineare DNA aus, während ringförmige Plasmid-DNA-Moleküle in Lösung bleiben. Anschließend wurde die Plasmid-DNA über Mikrospinsäulenteknik konzentriert und weiter gereinigt. Der Überstand des geklärten Lysates wurde auf die Säule nach Angaben des Herstellers aufgetragen, zentrifugiert und anschließend mit 750 μ l Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurde die gebundene Plasmid-DNA in 100 μ l Elutionspuffer eluiert, die Konzentration mit Hilfe des NanoDrop™ ND1000 bestimmt und die superhelikale Konformation der Plasmid-DNA im Agarosegel mit EtBr kontrolliert. In der Regel wurde eine Konzentration von ca. 150-250 ng/ μ l erhalten.

Maxipräparation mit dem EndoFree® Plasmid Maxi Kit

Für die Maxipräparation aus 250 ml Bakterienkultur wurde das EndoFree® Plasmid Maxi Kit von der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Dieses diente zur Isolierung einer größeren Menge an endonukleasefreiem Plasmid, die anschließend für die Transfektion eukaryonter Zellen verwendet werden konnte.

Zu Beginn wurde eine Vorkultur in 2 ml LB-AMP-Medium aus einer Kolonie für 1,5 h bei 37°C mit 200 rpm inkubiert. Von dieser Kultur wurden anschließend 250 µl in 250 ml LB-AMP-Medium überimpft (1:1000 Verdünnung).

Aus der Maxikultur wurden nach 12-16 h die Bakterien geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Puffer 1 resuspendiert, in 10 ml Puffer 2 lysiert und in 10 ml Puffer 3 neutralisiert. Proteine und lineare DNA lagen dabei wiederum ausgefällt vor und wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf die QIAfilter Cartridge-Säule überführt und mit Hilfe eines Stempels durch den Filter gedrückt. Durch die Zugabe von 2,5 ml ER-Puffer zu dem Lysat entstand eine leichte Trübung, die jedoch nach der Inkubation von 30 min auf Eis wieder verschwand. In der Zwischenzeit wurde die QIAGEN-Tip 500 Säule mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert. Danach wurde das geklärte Lysat auf die Säule aufgetragen, sodass es zur Bindung der Plasmid-DNA kam. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 30 ml QC-Puffer. Die DNA wurde mit 15 ml QN-Puffer eluiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol ausgefällt und das DNA-Pellet abzentrifugiert. Mit 5 ml 70% Ethanol wurde das DNA-Pellet gewaschen und im Anschluss in 500 µl TE-Puffert gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am NanoDrop™ ND1000.

2.2.6 Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden

Endonukleasen, sogenannte Restriktionsenzyme, schneiden DNA-Moleküle an Sequenzspezifischen Schnittstellen. Dabei entstehen DNA-Fragmente mit in der Regel unterschiedlicher Größe. Anhand des Bandenmusters von DNA-Restriktionsfragmenten können die DNA-Moleküle identifiziert werden. Restriktionsenzyme erzeugen durch das Schneiden stumpfe Enden (*blunt ends*) oder klebrige Enden (*sticky end*) mit 5'- oder 3'-Überhängen.

Zur Produktion von *sticky ends* für die gerichtete Klonierung wurde im PCR-Produkt sowie im Vektor ein Doppelverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *XhoI* durchgeführt. In einem 20 µl Reaktionsansatz wurden 2 µg Vektor-DNA sowie jeweils 1 µg PCR-Produkt geschnitten. Im Ansatz befanden sich je 15 U *EcoRI* und *XhoI* in einem 2x Tango Puffer sowie H₂O. Aufgrund der unterschiedlichen DNA-Konzentration der PCR-Produkte wurde für jeden Restriktionsverdau ein individuelles Protokoll nach Herstellerangaben erstellt. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C erfolgte die Enzyminaktivierung bei 65°C für 15 min. Die geschnittenen PCR-Produkte wurden anschließend in der präparativen Gelelektrophorese gereinigt.

Für die Kontrolle der Plasmids pcDNA3.1 wurden *NheI*, *PstI* und *SacI* eingesetzt. Im 20 µl Ansatz waren 500 ng Plasmid-DNA, jeweils 10 U der Restriktionsenzyme, entsprechend Puffer (*NheI*: 1x Tango Puffer, *PstI*: 1x Puffer-O, *SacI*: 1x *SacI*-Puffer) und H₂O enthalten. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C folgte die Inaktivierung bei 65°C für 15 min (*NheI*, *SacI*) oder mit 1 µl 0,5M EDTA (*PstI*). Die Restriktionsverdau-Ansätze wurden daraufhin in einem 1 % Agarosegel analysiert, und die Länge der Restriktionsfragmente anhand eines Größenstandards bestimmt.

Die Kontrolle der rekombinaten env⁺-Plasmide erfolgte mit dem Restriktionsenzym *NcoI*. Im standardisierten Restriktionsverdau (20 µl Ansatz) befanden sich 4 µl DNA aus der Minipräparation (20 ng bis 1000 ng), jeweils 1 µl des Restriktionsenzymes (1 U), 2 ml 10x Puffer-3 sowie 13 µl H₂O.

2.2.7 Aufreinigung von DNA durch präparative Gelelektrophorese

Die RE-geschnittenen PCR-Produkte wurden über ein 1% Agarosegel gereinigt, um die abgeschnittenen Enden, Nebenbanden und Primerdimere vollständig zu entfernen. Sowohl das Gel als auch der 1x TAE-Puffer enthielt kein Ethidiumbromid. Erst nach der Elektrophorese wurde ein schmaler Kontrollstreifen des präparativen Gels, der den Größenstandard und einen Anteil des Produktes enthielt, in einem Ethidiumbromidbad (1xTAE mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) angefärbt. Dadurch wird gewährleistet, dass in dem zu klonierenden Fragment keine Dimere durch UV-Bestrahlung entstehen, da dimerhaltige-DNA von DNA-Polymerasen nicht mehr repliziert werden kann.

Der gesamte Restriktionsansatz (20 µl) wurde auf das Gel aufgetragen. Der gefärbte Kontrollstreifen diente zur Lokalisation des PCR Produktes. Die Bande wurde entsprechend ihrer Position im Kontrollstreifen komplett aus dem Gel ausgeschnitten und unter Anwendung des GenJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas) aufgereinigt. Hierfür wurde die Masse des isolierten Gels bestimmt und in einem Verhältnis von 1:1 (Masse:Volumen) mit dem Bindungspuffer vermengt. Durch Erwärmen (60°C) verflüssigte sich das Gel und es entstand eine homogene Lösung. Diese wurde auf die GeneJet™ Purification Säule überführt und das PCR-Produkt an die Membran gebunden. Es folgte ein Waschschrift. Am Ende wurde das gereinigte PCR-Produkt in 25 µl Elutionspuffer eluiert und die Konzentration mit dem NanoDrop® ND1000 bestimmt. Die Ausbeute betrug in der Regel 40 % des Ausgangsmaterials.

2.2.8 Ligation

Die Ligation zweier Fragmente erfolgte über die kovalente Verknüpfung einer Phosphodiester-Bindung, die sich zwischen der freien 5'-Phosphat-Gruppe und der freien 3'-Hydroxy-Gruppe der Desoxyribose in den geschnittenen PCR-Produkten sowie dem Vektor bildet. Katalysiert wurde diese Reaktion durch die T4 DNA-Ligase.

Für die Ligation wurde 4fach mehr Insert als Vektor eingesetzt (molares Verhältnis 1:4 Vektor:Insert). 20 ng des Vektors pcDNA3.1 (5400) Bp wurden mit 80 ng des kleinen Inserts (3000 Bp) ligiert. Jeder 20 µl Ansatz enthielt Vektor und das PCR-Produkt in dem genannten molaren Verhältnis sowie 1x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 U T4 DNA Ligase. Die Ligation erfolgte für 3 h bei 22°C.

2.2.9 Transformation

Durch Transformation wird exogene DNA in eine Bakterienzelle eingeschleust. Um die DNA-Aufnahme zu ermöglichen, wird *Escherichia coli* (*E.coli*), welches keine natürliche Kompetenz aufweist, mit Calciumchlorid kompetent gemacht. Die Zellmembran wird durch CaCl₂ durchlässig gemacht und durch einen anschließenden Hitzeschock die DNA in die Zelle aufgenommen.

Es wurden chemokompetente *E.coli* (NEB5alpha), die eine Transformationseffizienz von 1-3 x 10⁹ cfu/µg pUC19 DNA (colony forming units pro Mikrogramm) aufwiesen, verwendet. Als Transformationskontrolle wurden 100 pg pUC19 DNA eingesetzt. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 50 µl mit 5 µl Ligationsansatz versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (30 sec, 42°C). Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Zellen in 950 µl SOC-Medium aufgenommen. Anschließend wurden diese zur phänotypischen Expression für 1 h bei 37°C unter Schütteln (225 rpm) ausgeführt (Expression der Antibiotikumresistenz). Von jedem Transformationsansatz wurden sowohl 100 µl unverdünnt als auch 100 µl einer 1:10 und 1:100 Verdünnung auf LB-AMP-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht in einem 37°C Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kolonien auf den Platten ausgezählt. Anhand der koloniebildenden Einheiten der Transformationskontrolle konnte die Transformationseffizienz der gelagerten Bakterien überprüft werden (>1 x 10⁷ cfu/µg pUC19 DNA erforderlich). Die richtigen rekombinanten Klone wurden nach der Minipräparation durch Restriktionsanalyse identifiziert (siehe 2.2.6).

2.2.10 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung des Inserts in den rekombinanten Plasmiden wurden 12 Sequenzierungsprimer eingesetzt, die Vektor- und Insertsequenzen enthielten (siehe Tab.3). Der Sequenzierungsansatz (10 µl) enthielt 150-300 ng Plasmid-DNA, 0,5 µl Puffer, 2 µl BigDye Mix 3.1, 10 µM der Primer und Wasser (ultrapur, fluorophorfrees Wasser). Für die Cycle-Sequenzierung wurde das folgende PCR-Programm gewählt (siehe Tab.8).

Tab.8. PCR-Programm für Plasmid-DNA-Sequenzierung

	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Vordenaturierung	96	2 min	1
Denaturierung	96	10 sec	
Annealing	50/55	5 sec	25
Elongation	60	4 min	
Hold	4	∞	

2.2.11 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion wird ein Fremdgen (Transgen) in einem Expressionsvektor (Plasmid) in die Zielzellen eingeschleust. Das Plasmid liegt dabei extrachromosomal im Zytoplasma der transfizierten Zelle vor und trägt alle regulatorischen Elemente, die zur Transkription und Translation des Fremdgens benötigt werden. So können Proteine transient in den transfizierten Zellen intra- oder membranständig exprimiert werden.

Es wurde das Transfektionsreagenz SuperFect® Transfection Reagent der Firma Qiagen verwendet, das ein aktiviertes Dendrimer enthält, welches die DNA in eine kompakte Struktur versetzt, um dadurch eine bessere Aufnahme in die Zelle zu gewährleisten. Die Zellen wurden 12-16 h vor der Transfektion in eine 48-Lochplatte ausgesät (1×10^4 Zellen/Kavität) und über Nacht bei 37°C mit 5 % CO₂ kultiviert.

Die 293T-Zellen hatten eine 50-80 %ige Konfluenz direkt vor der Transfektion. Die Env-Plasmide (pcDNA3.1 env⁺) wurden jeweils mit 1 µg in 60 µl D-MEM-Medium eingesetzt. Zu den Ansätzen wurden 5 µl des Transfektionsreagenz gegeben und 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurde 1 ml Vollmedium mit 10 % FKS, 1 %

L-Glutamin zugegeben. Der komplette Ansatz wurde anschließend auf die zuvor mit PBS „ohne“ gewaschenen 293T-Zellen gegeben und für 2,5 h unter den oben angegebenen Wachstumsbedingungen inkubiert. Danach folgte ein weiterer Waschschrift mit 500 µl PBS „ohne“. Nach der Aufnahme in neuem Vollmedium wurden die Zellen für weitere 24 h bis 48 h kultiviert. Anschließend wurden die Kokultivierungsexperimente begonnen.

2.2.12 Zell/Zell-Fusionsassay

Das Phänomen der Membranfusion zwischen einem HIV-1-Partikel und einer CD4-positiven Zielzelle wurde im Abschnitt 1.6 beschrieben. Für diese Experimente wurden 100 µl transfizierte env⁺ 293T-Zellen in einer 24-Lochplatte mit einer Zellzahl von 1×10^4 bis 1×10^5 Zelle/ml ausgesät und zeitgleich mit 100 µl 1×10^4 bis 1×10^5 Zellen/ml CD4⁺ Molt-4/CEM kokultiviert. Dabei erfolgte die Mischung aus den Zellkulturmedien D-MEM und RPMI-1640. Die Auswertung erfolgte nach 16 Stunden Inkubation bei 27°C und 5 % CO₂ qualitativ mittels Lichtmikroskopie (Peters *et al.* 2004). Eine genaue Auszählung der Zellfusionen erfolgte nicht, da dies für die Aussagekraft der Experimente nicht erforderlich war.

3 ERGEBNISSE

Die Evolution der Struktur und Funktion des HIV-Hüllproteins aus einem Patienten mit homozygoter CCR5 Δ 32/ Δ 32 Defizienz sollte im Hinblick auf die Interaktion mit HIV-Rezeptor und Korezeptor charakterisiert werden.

Dazu sollte das funktionale, vollständige Hüllprotein aus zwei Verlaufsisolaten des Patienten kloniert und sequenziert werden. Zur Klonierung des Env-ORF wurde ein weitgehend Subtyp B generisches PCR-Design entworfen. Zur Sequenzierung des ca. 3 kB langen Leserahmens wurde ein Sequenzierungskonzept benötigt, das die Ermittlung eines vollständigen Env-Contigs aufgrund doppelsträngiger Sequenzinformation ermöglichte.

Die detaillierte Analyse funktionaler Sequenzen der Verlaufsisolat im Vergleich zu Referenzviren mit unterschiedlichem Korezeptorgebrauch sollte Hinweise auf mögliche Änderungen in den hypervariablen Regionen des Hüllproteins ergeben, die für die Interaktion mit den Rezeptoren wesentlich sind. Funktionale Env-Varianten sollten anschließend in humanen Zellen exprimiert werden, um in Fusionsexperimenten mit humanen T-Zelllinien, die als Modell für HIV-Wirtszellen dienen, Domänen auf dem Hüllprotein zu identifizieren, die für die Interaktion mit Rezeptor/Korezeptor verantwortlich sind. Anhand der publizierten Daten war zu vermuten, dass nicht nur der hypervariable V3-Loop für die Interaktion mit Rezeptor/Korezeptor eine Rolle spielt.

3.1 Etablierung der *full-length-envelope* PCR

Zur Durchführung der Funktionsanalyse wird ein Expressionsvektorsystem benötigt, mit dem das komplette Hüllprotein in humanen Zelllinien exprimiert werden konnte. Die Klonierung von Env-PCR-Amplifikaten wurde daher so geplant, dass die Primersequenzen Schnittstellen für Restriktionsenzyme trugen, die im HIV-Env Leserahmen in der Regel nicht vorkommen. Das PCR-Design erfolgte anhand von Referenzsequenzen aus der HIV-Sequenzdatenbank. Die PCR-Bedingungen wurden mit HTLVIIIB Referenzvirus etabliert (Subtyp B, X4-Virus). Dieser Virusstock wurde in HIV-1 negativem Plasma auf eine Viruslast von $9,3 \times 10^5$ geq/ml und $9,3 \times 10^3$ geq/ml eingestellt und die virale RNA extrahiert. Als negative Kontrolle diente HIV-negatives humanes Plasma. Um möglichst effizient den vollständigen Env-ORF zu amplifizieren, wurden drei unterschiedliche Polymerasen mit *proof-reading* Funktion getestet (Tab.7). Die Enzyme wurden nach Angaben der Hersteller eingesetzt und unterschieden sich in Pufferzusammensetzung und PCR-

Zyklerprogramm. In Tab.10 und Tab.11 ist das finale Protokoll der *full-length-envelope* PCR für das am besten geeignete Enzym angegeben. Nach der Extraktion viraler RNA und dem Umschreiben in cDNA, erwiesen sich nach Optimierung 10 µl cDNA-Template und 40 µl PCR-Mix als optimal. In Tab.9 sind die Ergebnisse der untersuchten Polymerasen zusammengefasst.

Tab.9. Vergleich der drei PCR-DNA-Polymerasen

Polymerase (Firma)	Annealing Temp. [C°]	PCR-Ergebnis 3000 Bp
Expand High Fidelity (Roche)	60-65	ja *
Long PCR Enzyme Mix (Fermentas)	57-67	ja
PfuUltra HotStart (Agilent)	57-67	nein

* Hauptprodukt bei 3000 Bp

Das Ergebnis der PCR mit der PfuUltra HotStart Polymerase von Agilent war bei allen getesteten Annealing-Temperaturen negativ (57°C bis 67°C), es entstanden nur Primerdimere. Die Expand High Fidelity Polymerase von Roche amplifizierte bei einer Annealing-Temperatur von 65°C nur bei der hohen Viruslast ($9,3 \times 10^5$ geq/ml) ein schwaches PCR-Produkt von 3000 Bp Größe. Ein zweites PCR-Nebenprodukt mit einer Größe von 800 Bp und deutlich höherer DNA Konzentration wurde amplifiziert (Daten nicht gezeigt).

Der Long PCR Enzyme Mix von Fermentas, bestehend aus einer Taq DNA Polymerase und einer thermostabilen DNA Polymerase mit *proof reading* Aktivität, amplifizierte das gewünschte PCR Produkt von 3000 Bp in ausreichend hoher Menge bei allen getesteten Annealing-Temperaturen (siehe Abb.7). Es zeigte sich lediglich ein schwaches Nebenprodukt bei 800 Bp Größe. Dieses Enzym wurde im weiteren Verlauf verwendet.

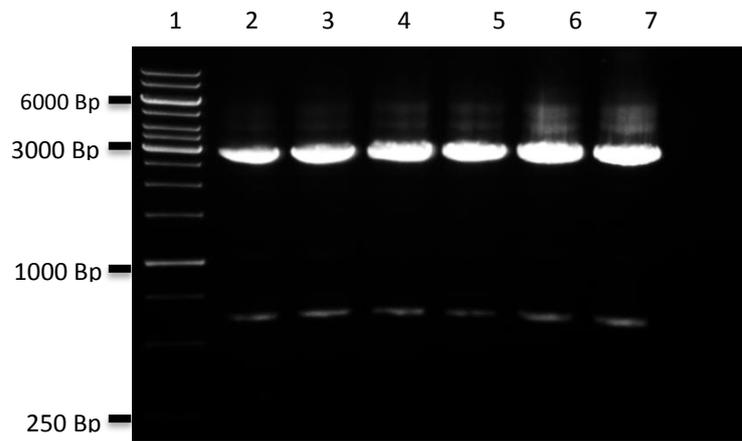


Abb.7. Qualitative Gelelektrophorese Polymerasen PCR-Produkte mit dem Fermentas Long PCR Enzyme Mix

1 % Agarosegel, mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) Spur 1: 300 ng 1 kB DNA-Ladder, Spur 2-7: HTLVIIIB (9,3x10³ geq/ml), Annealing-Temperatur Spur 2: 57°C, Spur 3: 59°C, Spur 4: 61°C, Spur 5: 63°C, Spur 6: 65°C, Spur 7: 67°C, Spur 8: NK

Tab.10. PCR-Mix für das Long PCR Enzym Mix (Fermentas)

Reagenz	Konz. Stocklösung	Konz. final*
PCR-Puffer mit MgCl ₂	10x	1 x
dNTP	2.5mM	0,2mM
as-Primer env5950_SF1s	25µM	0,5µM
s-Primer env8904_SF2as	25µM	0,5µM
DMSO	100%	2%
Polymerase (Fermentas)	2,5U/µl	1,25U

* Mit H₂O auf 40 µl aufgefüllt

Tab.11. Amplifikationsparameter der PCR

PCR-Schritt	Temp. [°C]	Dauer	Zyklen [n]
Denaturierung	96	5 min	1
Denaturierung	96	20 sec	
Annealing	65	30 sec	10
Elongation	68	3 min	
Denaturierung	96	20 sec	
Annealing	65	30 sec	25
Elongation	68	3 min (+10 sec/Zyklus)	
Finale Elongation	68	10 min	1
Hold	4	∞	

3.2 Viruslast der Primärisolate aus Zellkulturüberstand

Um erfolgreich das 3000 Bp PCR-Produkt zu amplifizieren, wurde eine ausreichende Viruslast von mindestens $9,3 \times 10^3$ geq/ml im Zellkulturüberstand benötigt. Die Virusanzucht (Demiroglu 2008) erfolgte durch Kultivierung autologer PBMC (08-0755) oder aus Plasma in Kokultur mit Spender-PBMC (02-0165). Die geernteten Virusstocks der Zellkulturanzucht wurden bei -70°C bis zur RNA-Extraktion gelagert. Die Viruslast der extrahierten RNA wurde mit einer quantitativen *real time* RT-PCR bestimmt (2.2.3). Es zeigte sich, dass nicht alle Zellkulturüberstände eine ausreichende Viruslast hatten, um eine erfolgreiche PCR zu gewährleisten (Tab.12). Für die *full-length-envelope* PCR wurde das Erstisolat (02-0165, Kokultur A d14 und Kokultur B d14), das Verlaufsisolat (08-0755 Kokultur B d10), das R5-Referenzvirus (BAL d10) sowie das X4-Referenzvirus (HTLVIIIB d10) verwendet. Von diesen Proben konnte erfolgreich ein PCR-Produkt mit der *full-length-envelope* PCR amplifiziert werden.

Tab.12. Viruslast der einzelnen Isolate und Erntetage

Isolat	Kultur/ Tag der Ernte	Viruslast [geq/ml]
02-0165	Kokultur A / d14	$7,9 \times 10^9$
	Kokultur B / d14	$6,1 \times 10^9$
08-0755	Autolog A/ d10	u.N.
	Autolog B/ d10	u.N.
	Kokultur A/ d10	u.N.
	Kokultur B/ d10	$1,2 \times 10^9$
	Autolog A/ d14	u.N.
	Autolog B/ d14	u.N.
	Kokultur A/ d14	u.N.
HTLVIIIB	Kokultur/ d10	$9,3 \times 10^5$
BAL	Kokultur/ d10	n,d,

u.N. unter der Nachweisgrenze, n,d, nicht durchgeführt

3.3 Klonierung des Env-PCR Produktes in den Expressionsvektor

Der Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen) wurde durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen *NheI*, *PstI* und *SacI* auf ein korrektes Bandenmuster überprüft (Abb.9). Der Expressionsvektor pcDNA3.1 sowie das amplifizierte Envelope PCR-Produkt mussten vor der Ligation mithilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* geschnitten werden. Die geschnittenen DNAs (Überprüfung im Gel) wurden anschließend über präparative

Agarosegele gereinigt. Nach Ligation erfolgte die Transformation in chemokompetente NEB5α E.coli (2.2.9, Abb.8).

Aufgrund der Quasispeziesnatur von HIV war mit unterschiedlichen Virusvarianten und auch Defektgenomen zu rechnen. Daher mussten mehrere Klone von jedem Virusisolat und Referenzstamm analysiert werden. Von den über Nacht gewachsenen Kolonien, wurden jeweils ca. 15 Minikulturen angesetzt, und die Plasmid-DNA für weitere Untersuchungen extrahiert. Die Kontrolle der rekombinanten Klone erfolgte über Restriktionsfragmentanalyse. Dazu wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym *NcoI* geschnitten. Für eine korrekte Insertion wurde ein Bandenmuster von 4300 Bp, 3300 Bp sowie 800 Bp erwartet. Religierter Vektor wies ein Bandenmuster von 3300 Bp, 1300 Bp und 800 Bp auf (Abb.9). Von den 15 untersuchten Klonen des Erstisolats (02-0165) besaßen 12 ein korrektes Restriktionsmuster, 14 vom Folgeisolat (08-0755), 11 vom X4-Virus (HTLVIIIB) und von den 16 untersuchten Klonen des R5-Virus (BAL) waren fünf korrekt. Die Ergebnisse der Restriktionsanalyse wurden in Tab.13 zusammengefasst.

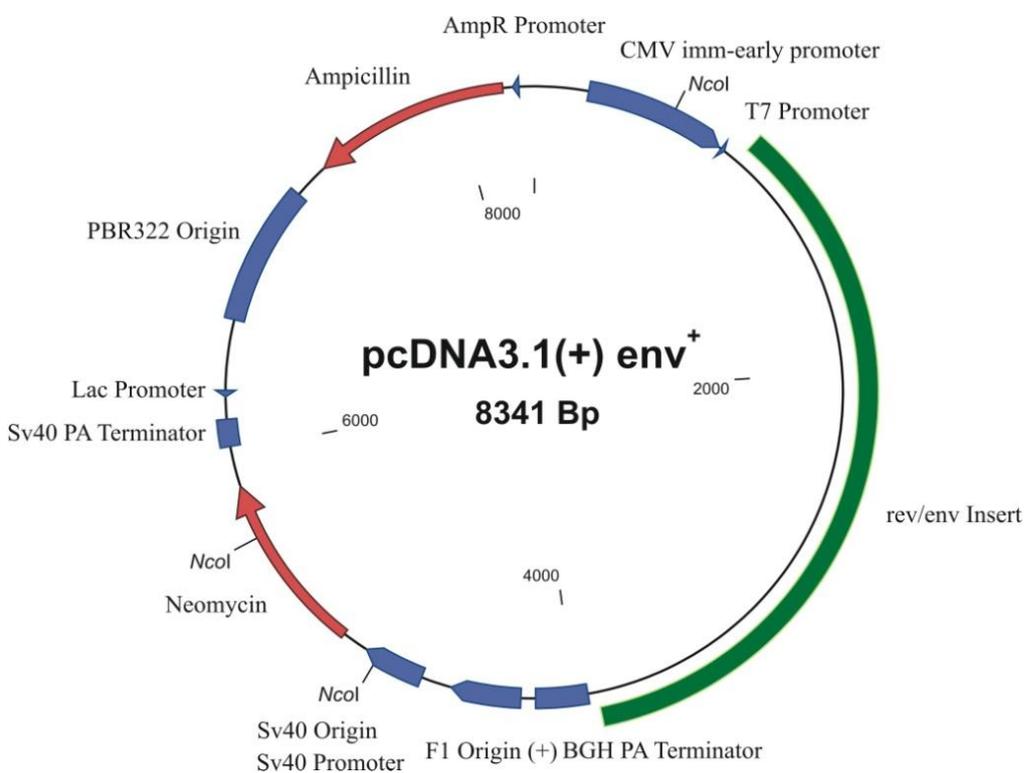


Abb.8. Expressionsvektorkarte pcDNA3.1 mit Env-Insert

Karte des Expressionsvektors mit *NcoI* Restriktionsenzymstimmstellen, erstellt mit CloneManager, in Rot: Selektionsmarker, Blau: Promotor-/Terminatorregion, Grün: 2913 Bp rev/env-Insert.

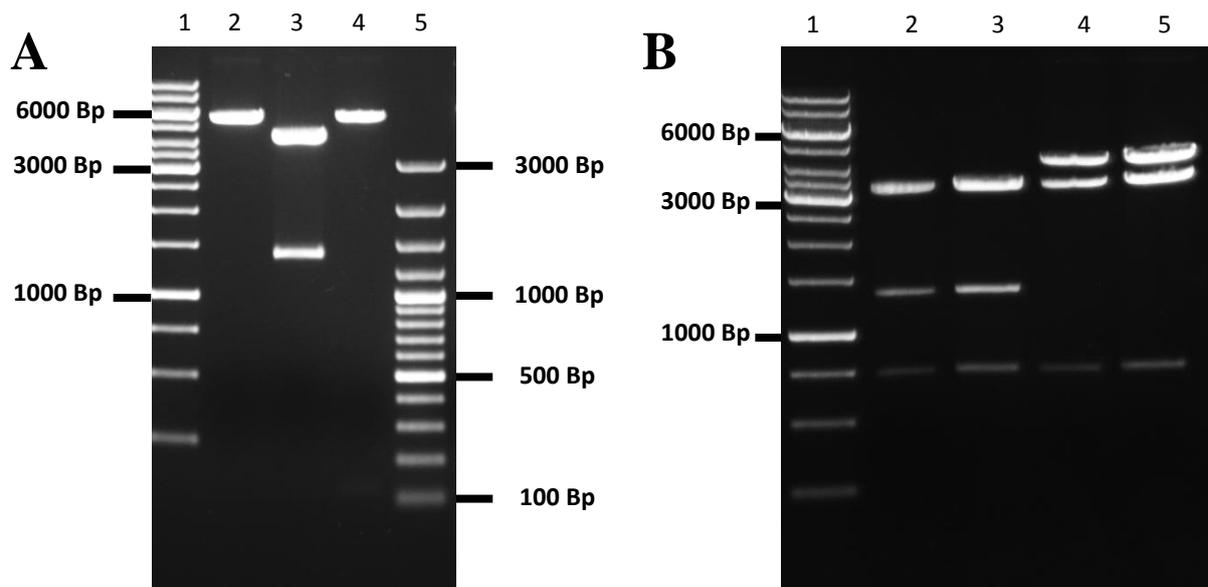


Abb.9. Restriktionsfragmentanalyse der rekombinanten Klone und des Vektors

1 % Agarosegel, mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) **A)** Spur 1: 300 ng 1 kB DNA-Ladder, Spur 2: 100 ng pcDNA3.1 *NheI*, Spur 3: 100 ng pcDNA3.1 *PstI*, Spur 4: 100 ng pcDNA3.1 *SacI*, Spur 5: 100 Bp DNA-Ladder. **B)** Spur 1: 300 ng 1 kB DNA-Ladder, Spur 2: 150 ng pcDNA3.1 *NcoI*, Spur 3: 300 ng pcDNA3.1 *NcoI*, Spur 4: 150 ng pcDNA3.1-02-0165 1.1, Spur 5: 300 ng pcDNA3.1-02-0165 1.1

Tab.13. Zusammenfassung Klon Restriktionskontrolle und Sequenzierung

Virusedisolat	Klone getestet [n]	RE [*] -Muster korrekt [n]	Durchgehendes ORF [n]
Erstisolat (02-0165)	15	12	7
Verlaufisolat (08-0755)	15	14	7
HTLVIII B (X4)	15	11	3
BAL (R5)	16	5	0

* RM Restriktionsmuster

3.4 Sequenzbewertung der Plasmid-DNA

Alle Plasmide mit korrektem Restriktionsmuster wurden sequenziert (Abb.14). Ziel war es doppelsträngig (5'-3' und 3'-5' Orientierung) zu sequenzieren. Insgesamt wurden je sechs sense- und antisense-Primer verwendet, mit denen eine gute Sequenzabdeckung erreicht und ein durchgängiges Sequenzcontig erhalten wurde. Die äußeren Sequenzierungsprimer hybridisierten an die T7 Promotor-Sequenz und an die BGH-Terminator-Region. Die anderen Primer waren innerhalb des Env-Inserts lokalisiert (Rev und Env-ORF).

Die rekombinanten Plasmide wurden nach zwei Kriterien bewertet: zum einen wurde geprüft, ob das vollständige Insert ohne Deletion integriert war. Zum anderen wurde überprüft, ob Insertionen oder Deletionen einzelner Basen vorlagen, die zu einem *frame shift* und vorzeitigem Stoppcodon führten. Zur Auswertung wurde das Assembly-Modul des Programmes DNA-STAR Lasergene 10 verwendet. Die erzeugten Contigs wurden im FASTA-Format abgespeichert.

Von den beiden Isolaten des CCR5 Δ 32/ Δ 32 Patienten waren jeweils sieben Plasmide mit funktionalen Env-Sequenzen identifiziert. Von HTLVIIIB wurden nur drei funktionale Klone erhalten (Tab.13). Keine der rekombinanten Klone des BAL-Isolates trug eine funktionale Env-Sequenz (n=5). Die sequenzierten Plasmide wiesen einheitlich ein um 400 Bp verkürztes gp160 auf. Eine weitere Sequenzanalyse der BAL Referenzsequenz (AccNo. AY713409) zeigte eine zweite *XhoI* Schnittstelle im gp160 an Position 8398 (Koord. HXB2), die zu einem 400 Bp verkürztem Env-Fragment bei der Restriktion mit *XhoI* führte. Für Sequenzvergleiche wurde daher statt der klonalen Sequenz die Referenzsequenz von BAL genutzt.

3.5 Vergleichende Sequenzanalysen der HIV Envelopeproteine mit verschiedenem Korezeptorgebrauch

Die HIV-1 Sequenzen der Env-Klone der Patientenisolatate wurden mit HTLVIII B-Sequenzen (X4), sowie einer HXB2 Sequenz (X4), der BAL-Sequenz (R5) und dem dualtropen Isolat 89.6 (R5/X4) verglichen. Hierzu wurde ein komplettes gp160 Nukleotidalignment aller benötigten Sequenzen mit dem Rechenalgorithmus „ClustalW Multiple Alignment“ erstellt (Thompson *et al.* 2002). Das Alignment wurde manuell in BioEdit so editiert, dass die kodierenden Triplets nicht durch Lücken (*gaps*) getrennt wurden. Ziel war es, potentielle Unterschiede in hypervariablen Domänen des Envelope-Proteins zu identifizieren, um deren Rolle in biologischen Funktionsassays (z.B. Fusionsassay) zu analysieren.

3.5.1 Das Oberflächenprotein gp120

Das Glykoprotein 120 auf der Oberfläche des HIV-1 Partikels besitzt Eigenschaften, die teilweise auf Grundlage der Aminosäuresequenz vorhergesagt werden können. So befinden sich 24 potentielle Glykosylierungsmotive (N-X-S/T) im gp120, die für die Evolution der Immunantwort und das Immunescape wichtig sind (Abb.10). 17 der potentiellen Glykosylierungsstellen sind auch *in vivo* glykosyliert beobachtet worden (Mizuochi *et al.* 1990). Aufgrund der großen Menge an Glykosylierungen im Hüllprotein wird vermutet, dass nur ein geringer Anteil der Aminosäurekette aus den Zuckermodifikationen herausragt. Sowohl die Referenzisolate als auch die sequenzierten env-Plasmide zeigten 18 Cysteine im Sequenzalignment. Diese Cysteinreste sind hoch konserviert und bilden Disulfidbrücken untereinander aus, die essentiell für die Konformation und Faltung des Proteins sind (Abb.10). Die Disulfidbrücken bilden Anker für die hypervariablen Schleifendomänen V1 bis V5 aus. Zwischen diesen hypervariablen Regionen befinden sich die konservierten Bereiche C1 bis C4 (Modrow *et al.* 1987, Knarr *et al.* 1999).

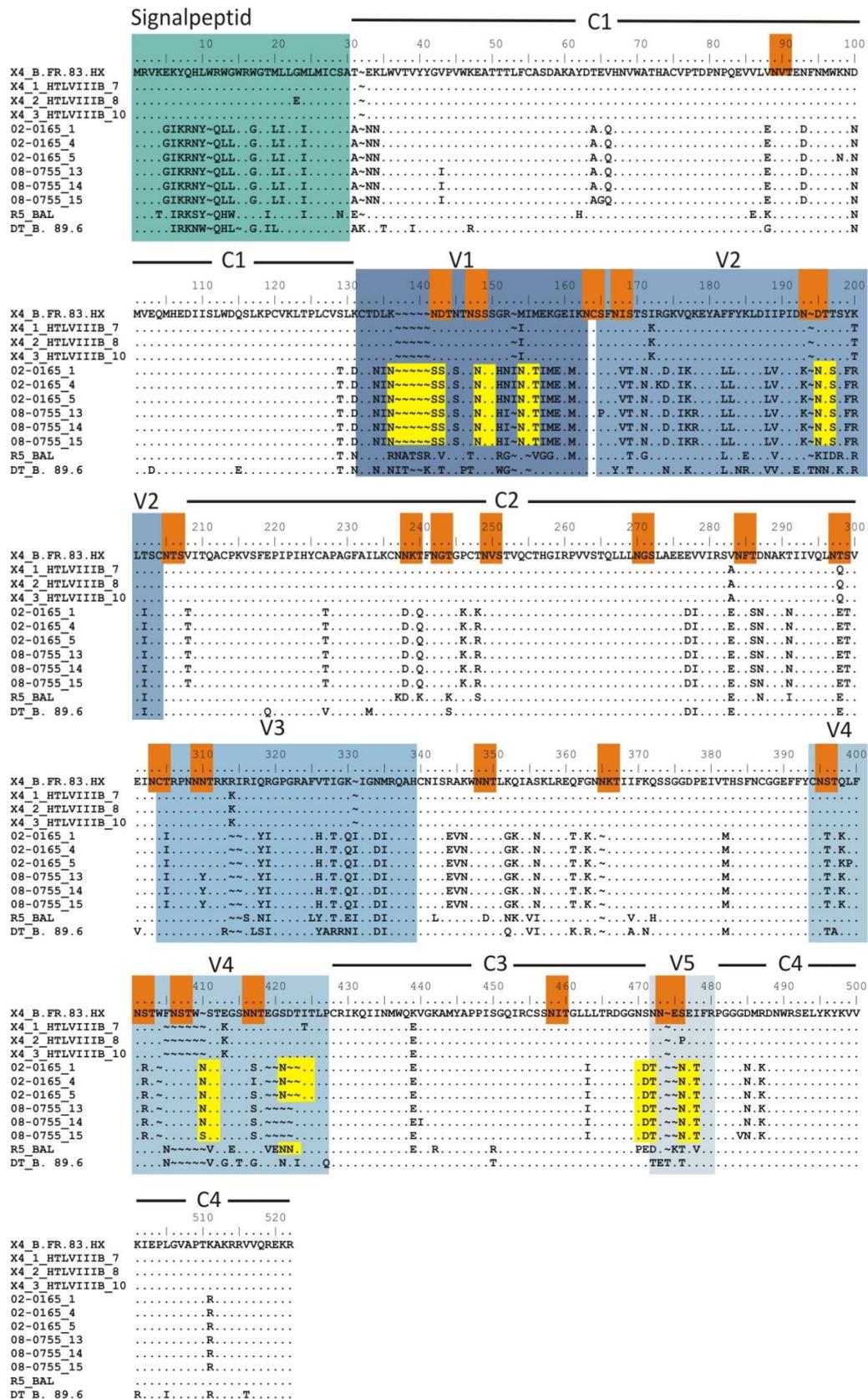


Abb.10. Aminosäurealignment des gp120 (SU)

Alignment von 3 Referenzsequenzen und 9 Plasmidsequenzen, Grün: Signalpeptid, in Blau: V1-V5 loop, Orange: Glykosylierungsmotive, Gelb: alternative Glykosylierungsmotive von 02-0165 und 08-0755, schwarze Balken: Konservierte Domänen C1-C4, DT: Dualtropes Virus R5/X4.

V1-/V2-Loop

Die ersten beiden hypervariablen Domänen des gp120 sind die direkt benachbarten V1- und V2-Loops. Diese an AS-Position 130 bis 205 befindlichen Strukturen sind bisher wenig charakterisiert und ihre Funktion ist nicht endgültig geklärt. Deletionsmutanten zeigten eine stark verringerte Replikationseffizienz (Bontjer *et al.* 2009). Wichtig sind die potentiellen Glykosylierungspositionen in diesen Loops. Sie dienen zum einen als Adhäsionsmoleküle zur Zielzellfindung und zum anderen verbergen sie potentielle Antikörperepitope (Wyatt *et al.* 2009).

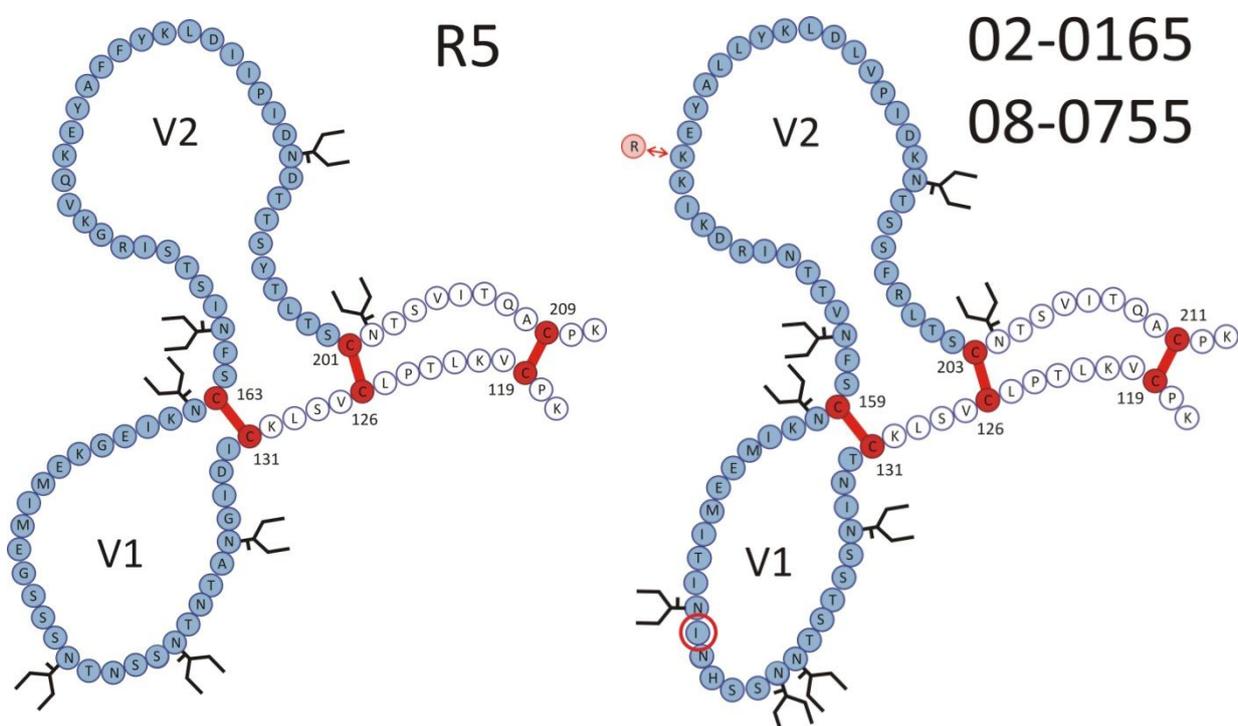


Abb.11. Schematische Darstellung des V1-/V2-Loops

Modell der AS-Loopstruktur eines BAL-Isolates (R5) und der Env-Klone 02-0165 und 08-0755. Blau: AS der Loopstruktur, Rot: Cystein und Disulfidbrücken. Symbol I: Glykosylierungsstellen, roter Kreis: AS-Deletion bei 08-0755, roter Pfeil: AS Austausch Lysin (K) zu Arginin (R).

Wie in Abb.11 zu erkennen ist, befanden sich einige deutliche Veränderungen in der V1/V2-Loop-Region des gp120 im Vergleich zum Wildtyp. Der V1-Loop weist gegenüber dem BAL-R5 eine um vier AS verkürzte Kette auf. Andere X4-Referenzsequenzen wiesen diese Deletion ebenfalls auf. Weiterhin konnte an AS-Position 142 in den Isolaten des CCR5Δ32/Δ32 Patienten, im Vergleich zu den R5 und X4 Referenzen, eine zusätzliche Glykosylierungsstelle identifiziert werden. Auf dem V2-Loop sind ebenfalls einige Modifikationen gegenüber den Wildtypisolaten auffällig. So sind im Isolat 02-0165 und 08-0755 mehrere aufeinanderfolgende AS-Austausche vorhanden, sowie eine um eine AS-Position verschobene Glykosylierungsstelle.

V3-Loop

Der V3-Loop spielt eine zentrale Rolle in der Rezeptor/Korezeptor Interaktion von Virus und Wirtszelle. Er beeinflusst die Bindung an den CD4-Rezeptor sowie den Korezeptor (CCR5/CXCR4). Ein HIV mit einem gp120, das einen deletierten V3-Loop trägt, zeigte keine infektiösen Eigenschaften. Eine Deletion der vier hochkonservierten AS GPGR an der Spitze des Loops führte ebenfalls zur Replikationsdefizienz (Travis *et al.* 1992).

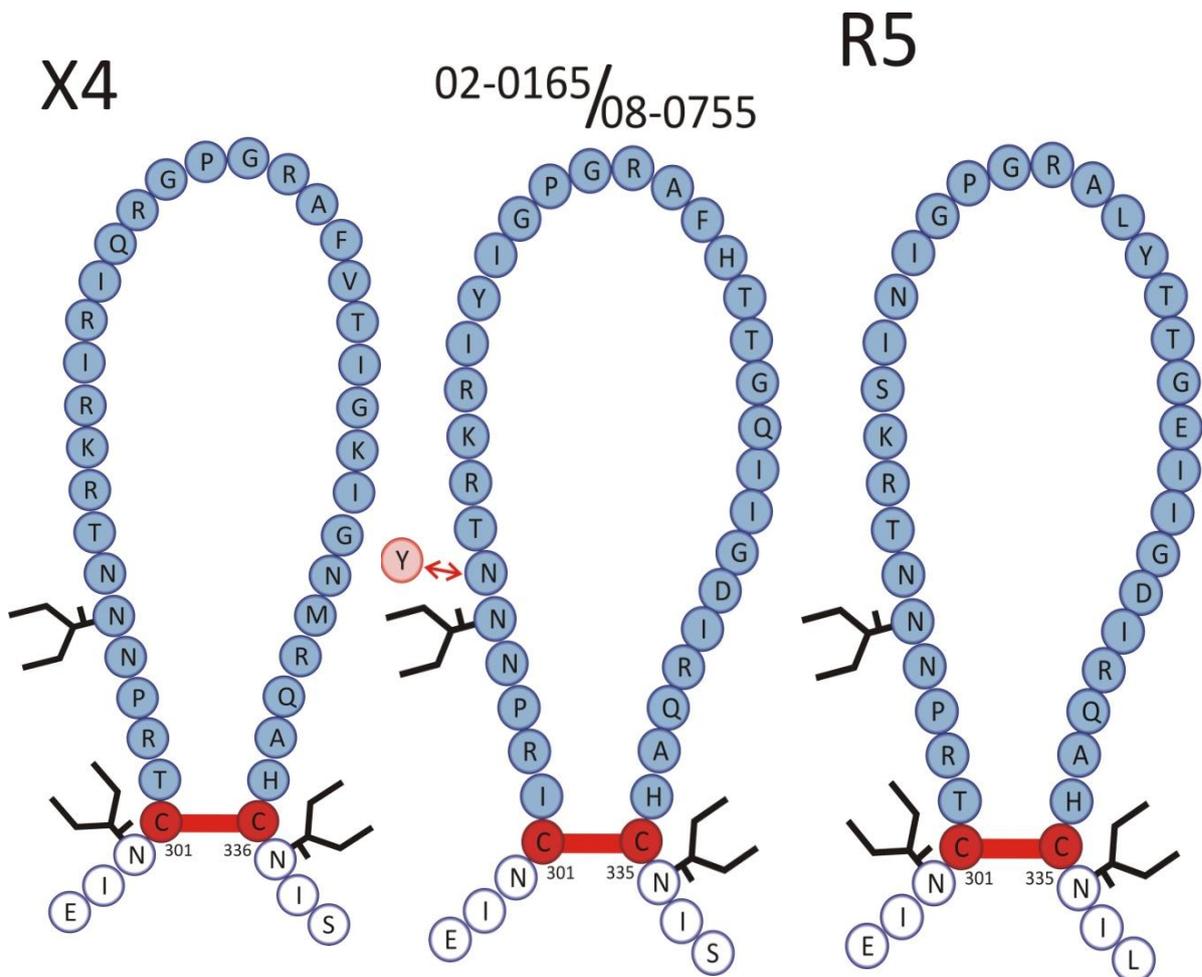


Abb.12. Schematische Darstellung des V3-Loops von Viren mit unterschiedlichem Korezeptorgebrauch

Blau: AS der Loopstruktur, Spitze (GPGR), Rot: Cysteine durch Disulfidbrücken verbunden. Symbol □: Glykosylierungsstellen. Links: X4 Virus. Mitte: Patientenisolat 02-0165, roter Pfeil: AS-Austausch Asparagin (N) zu Tyrosin (Y) im Isolat 08-0755. Rechts: R5 Virus.

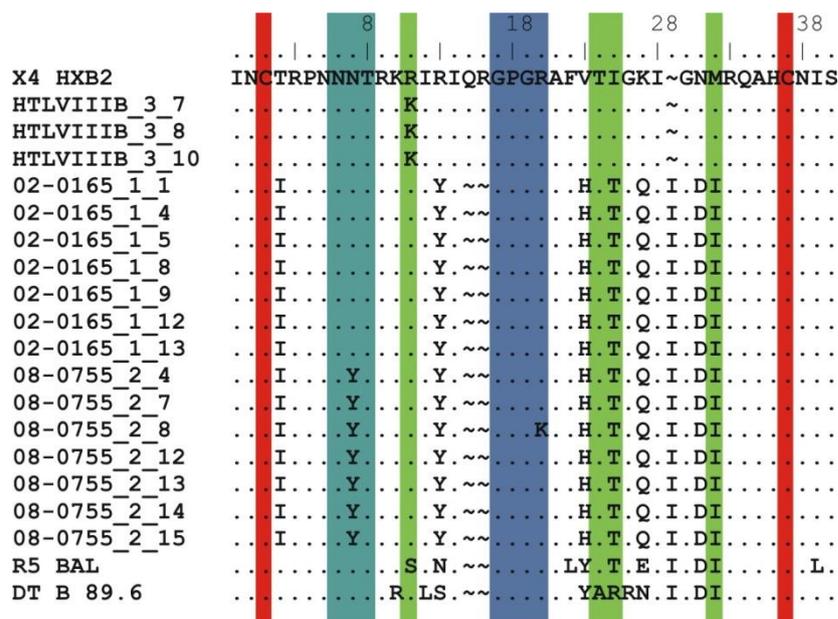


Abb.13. Aminosäuresequenzalignment des gp120 V3-Loops

Alignment von 3 Referenzsequenzen und allen erhalten Plasmidsequenzen (17), Blau: GPGR-Motiv, Türkis: NNT-Glykosylierungsmotiv, Rot: flankierende Cysteine, Grün: Positionen, an denen sich bei X4-Viren i.d.R. eine oder zwei basische Aminosäuren befinden.

Es zeigte sich, dass alle klonalen Sequenzen im V3-Loop identisch waren, mit Ausnahme des Klons 2.8 des Folgeisolates (08-0755). Dieser wies im hoch konservierten GPGR-Motiv den Aminosäureaustausch R20K auf. Die Glykosylierungsstelle an AS 6-8 (Abb.13) ist ebenfalls in allen untersuchten Klonen vorhanden. Das Envelope des Folgeisolates zeigte an dieser Stelle die Substitution N7Y in allen analysierten Klonen. Die Referenzsequenzen sowie die Envelopes aus den Patientenisolaten zeigten die bekannte zwei AS-Deletion an Position 14 und 15 im Vergleich zu HXB2 (HTLVIIIIB), allerdings auch eine Insertion von Isoleucin an Position 29. Alle klonalen Env-Sequenzen der Patientenisolat besaßen keine Glykosylierungsstelle am N-terminalen Anfang des V3-Loops (NCI-Motiv statt NCT-Motiv).

V4-/V5-Loop

Die V4- und V5-Loops sind bei räumlicher Betrachtung des gp120 Proteins zugänglich an der Außenseite lokalisiert. Die Funktionen des V4- sowie des V5-Loops sind noch nicht abschließend geklärt. Aufgrund des sehr hohen und dichten Anteils an Glykosylierungspositionen und der räumlichen Lage wird vermutet, dass diese Region lediglich vor Antikörperbindung schützen soll und mögliche Epitope verbirgt (Wyatt *et al.* 1998).

In Abb.14 sind die Veränderungen des V4- und V5-Loops von einem X4-Virus zur AS-Sequenz der beiden Patientenisolate dargestellt. Vor allem die zusätzlichen Glykosylierungsstellen an den Positionen 405, 414 und 461 sind auffällig. Aufgrund der Deletion von drei AS und der daraus resultierenden Verkürzung des V4-Loops kommt es zu einer potentiell deutlich dichteren Besetzung mit glykosylierten Aminosäuren. Der V5-Loop ist im Vergleich zum X4-Virus um eine AS verkürzt und weist am N-Terminus eine zusätzliche Glykosylierungsstelle auf. Im Vergleich des Erstisolates 02-0165 mit dem Verlaufsisolat 08-0755 ist der Verlust einer Glykosylierungsstelle an Position 414 zu erkennen.

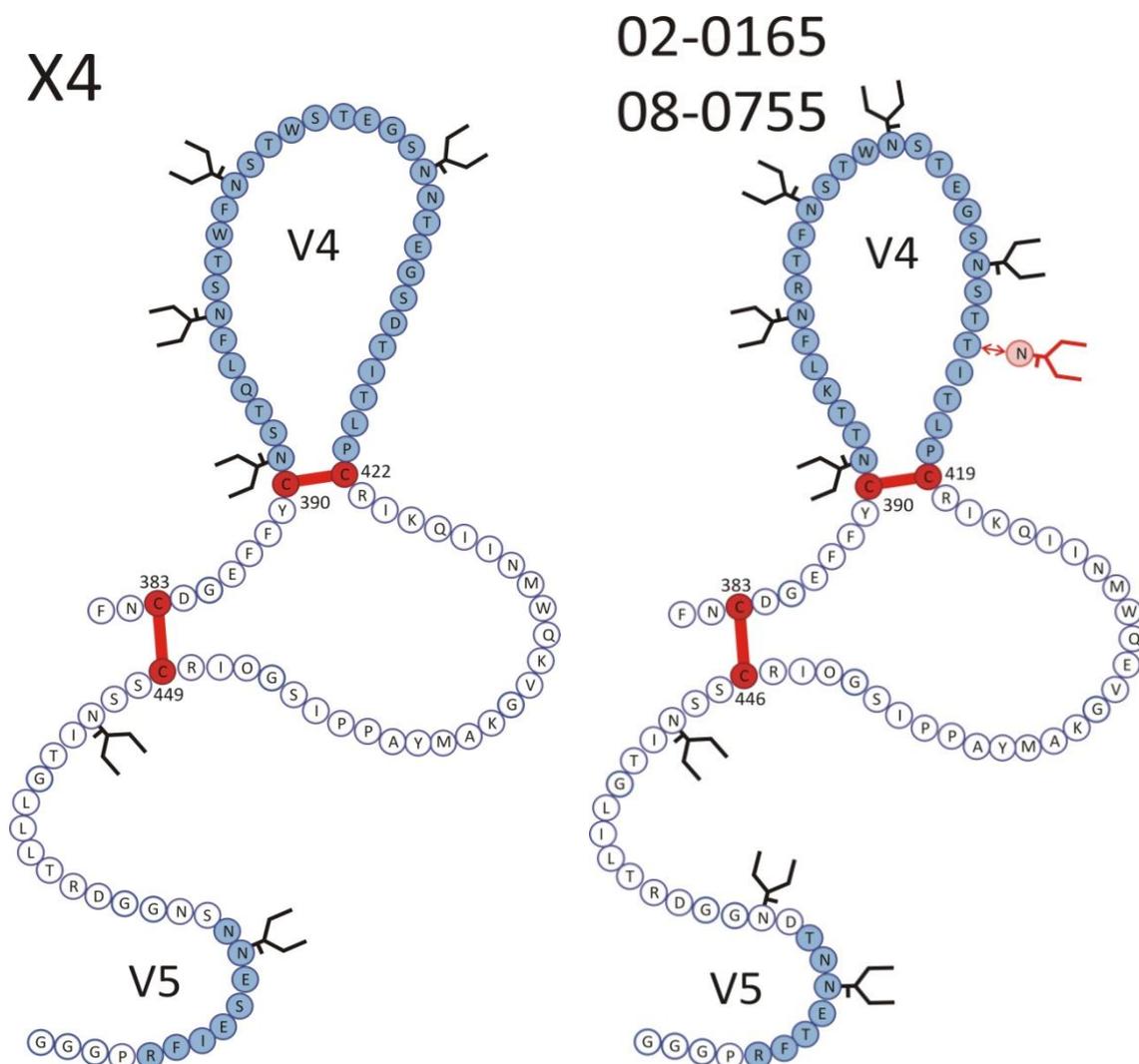


Abb.14. Schematische Darstellung des V4/5-Loops

Modell der AS-Loopstruktur eines X4-HIV und der Env-Klone 02-0165 und 08-0755. Blau: AS der Loopstruktur, Rot: Cystein und Disulfidbrücken. Symbol II: Glykosylierungsstellen, roter Pfeil: AS Austausch T414N mit zusätzlichen Glykosylierungsposition.

Die konservierten Regionen C1-C4 im gp120

Die hochkonservierten Regionen C1 bis C4 sind zum einen notwendig, um eine funktionale Faltung des gesamten Glykoproteins zu gewährleisten, zum anderen sind auf diesen Epitope lokalisiert, die für die CD4 Bindung verantwortlich sind. Die vier konservierten Domänen liegen verteilt im gp120 (Modrow *et al.* 1987, Leonard *et al.* 1990).

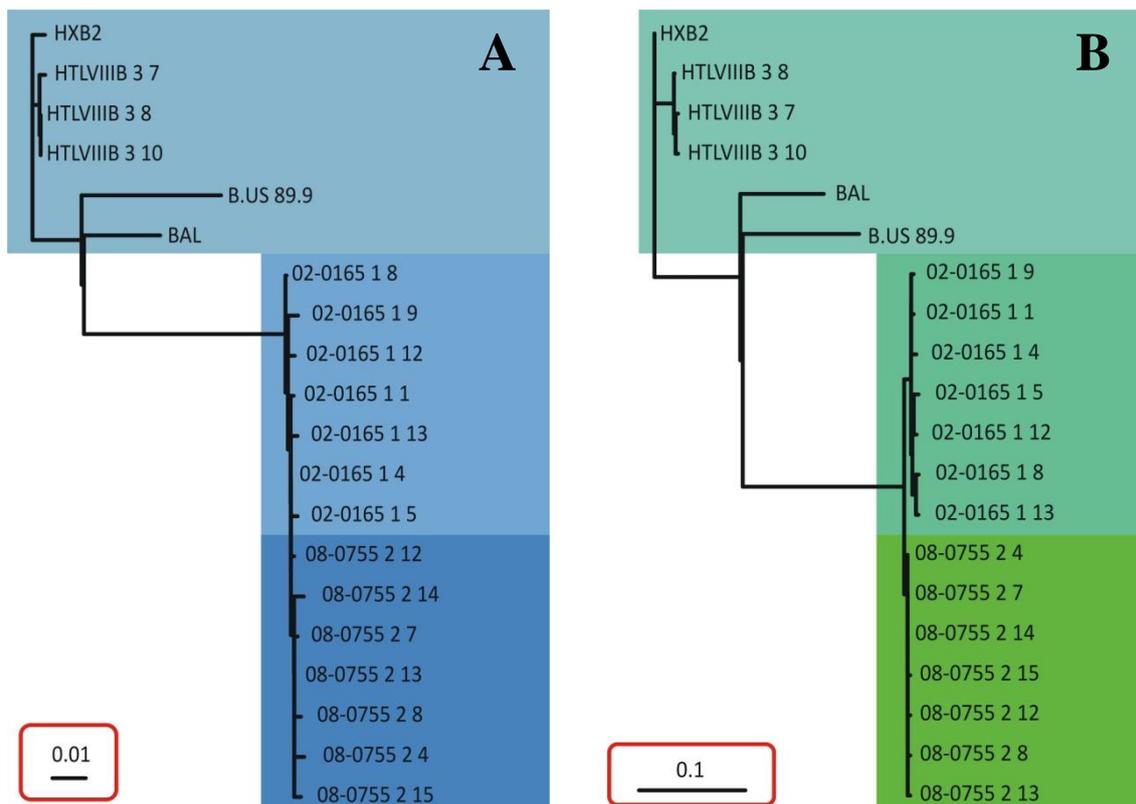


Abb.15. Neighbor-Joining-Stammbaum der konservierten und variablen Region

Neighbor-Joining-Stammbaum der gp120-Nukleotidsequenzen im Vergleich. **A:** Variable Regionen V1-V5 sind im gp120 deletiert, konservierte Regionen C1 bis C4 1014 Bp zusammengefügt, Hellblau: Referenzsequenzen, Blau: klonale Plasmidsequenzen Isolat 02-0165, Dunkelblau: klonale Plasmidsequenzen Isolat 08-0755, Rot umrandet: Maßstab entspricht 1 % Bp-Divergenz. **B:** gp120 konservierte Regionen C1-C5 deletiert, variable Regionen V1 bis V5 469 Bp zusammengefügt, Hellgrün: Referenzsequenzen, Grün: klonale Plasmidsequenzen Isolat 02-0165, Dunkelgrün: klonale Plasmidsequenzen Isolat 08-0755, Rot umrandet: Maßstab entspricht 10 % Bp-Divergenz.

Wie in Abb.15 A zu erkennen, waren die Regionen C1 bis C4 konserviert. Die Divergenz zwischen den klonalen Sequenzen der Quasispezies eines Env-Isolates war sehr gering und lag zwischen 0,1 % bis 0,5 %. Der prozentuale Unterschied der Patientenisolates zu HXB2 und BAL betrug rund 8,5 %, wobei die größte Divergenz von 10,6 % zwischen den Patientenisolates und der dualtrophen Sequenz 89.9 bestand. Die Abb.15 B zeigt den NJ-Stammbaum mit den hypervariablen Domänen. Hier lag zwischen den klonalen Sequenzen

ein prozentualer Unterschied von 0,1 % bis 0,8 % vor. Die Divergenz zwischen den Patientenisolaten und den Referenzen betrug für HXB2 23,8 %, für BAL 24,0 % und für die dualtrophe Referenz 89.6 26,9 %. Da es sich hier um in Zellkultur vermehrte Isolate handelte, ist die relativ geringe Varianz der klonalen hypervariablen Sequenzen nicht unerwartet.

Das Hydrophobizitätsprofil von gp120

Mit Hilfe einer Hydrophobizitätsberechnung lassen sich Aussagen über hydrophobe Anteile in einer AS-Sequenz treffen. Sie dienen der Vorhersage von Transmembranregionen sowie von potentiell antigenen Regionen von Polypeptiden. Mit dem Kyte & Doolittle Verfahren lassen sich Transmembranregionen sowie partielle hydrophobe Regionen detektieren (Kyte und Doolittle 1982). Maßgebend für das Ergebnis ist die Größe der partiellen Sequenzzzerlegung bei der Analyse der Sequenz (*scan-window*). Ein scan-window von 20 Bp dient dem Auffinden von Transmembranregionen. Bei einer Fenstergröße von 6 Bp werden hingegen oberflächenexponierte Regionen detektiert. Hierbei muss ein Wert von $>1,6$ auf der Kyte-Doolittle Skala überschritten werden. Eine weitere Methode ist das Berechnungsmodell nach Hopp & Woods (Hoop und Woods 1981). Dieses Modell sagt wie das Kyte & Doolittle Verfahren potentielle Epitop-Regionen auf Polypeptiden vorher, allerdings mit einer AS-Bewertung die den Schwerpunkt nicht auf hydrophobe AS legt, sondern auf AS mit antigenen Eigenschaften. Ein allgemeiner Schwachpunkt dieser Vorhersagemodelle ist die Missachtung von Faltungsstruktur sowie die fehlende Analyse von möglichen Glykosylierungen auf der Proteinoberfläche.

Gp120 zeigte im Hydrophobizitätsprofil von Kyte & Doolittle wie erwartet keine Transmembrandomänen. Lediglich das N-terminale Signalpeptid wies einen Wert von $>1,6$ über eine Länge von 10 Bp auf (Abb.16 A). Bei der Analyse von vorhandenen oberflächenexponierten Regionen zeigten sich vereinzelte Peaks auf der gesamten Sequenz. In jeder Loop-Region, mit Ausnahme der V5-Region, konnten mit dem Kyte & Doolittle-Verfahren oberflächenexponierte Regionen festgestellt werden. In der V3-Loop-Region waren deutliche Unterschiede vom Referenzisolat HXB2 zum Patientenisolat 02-0165 und 08-0755 zu sehen. Auch das Profil im V1-Loop zeigte deutliche Unterschiede der einzelnen Isolate (Abb.16 B).

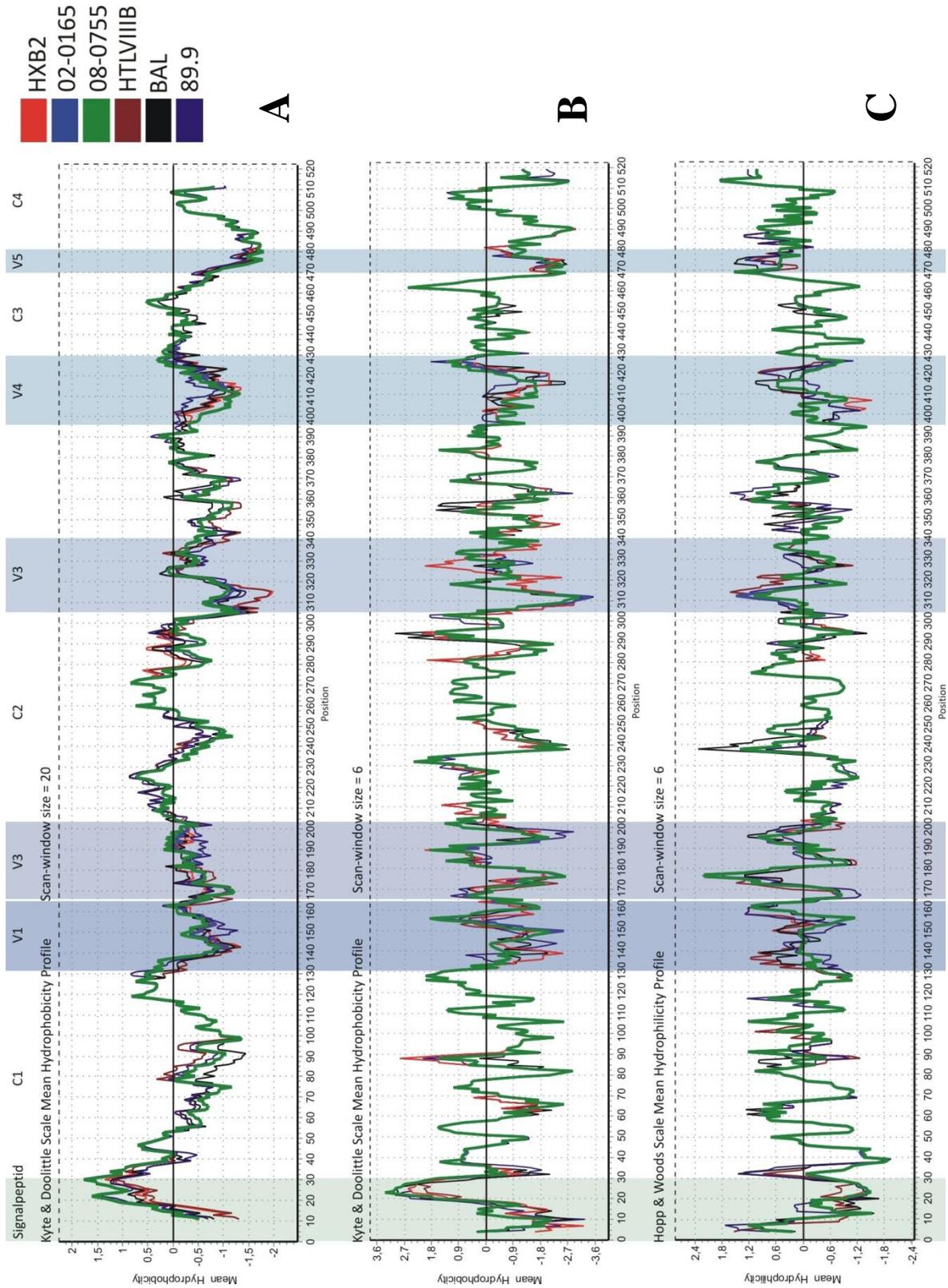


Abb.16. Hydrophobizitätsprofil des gp120

Modelberechnung nach Kyte & Doolittle/Hopp & Woods, gp120 Regionen Grün: Signalpeptid, Blau V1 bis V5. **A:** Kyte & Doolittle window-size 20. **B:** Kyte & Doolittle window-size 6. **C:** Hoop & Woods window-size 6.

Das Hopp & Woods Berechnungsmodell, mit dem Vorhersagen zu potentiellen antigenen Regionen getroffen werden sollten, ergab für die hypervariablen Loopstrukturen ebenfalls divergente Vorhersagen. Insbesondere im V1- sowie im V5-Loop unterschieden sich die einzelnen Isolate voneinander. Zwei stark exponierte Regionen waren im V2-Loop sowie in der konservierten Domäne C2 vorhergesagt (Abb.16 C).

3.5.2 Protease Spaltstelle von gp160

Die Sequenz der Furinprotease Spaltstelle im Env-Proteins zwischen seinen beiden Komponenten gp120 und gp41 wurde analysiert, um zu untersuchen, ob bei den klonierten HIV-1-Isolaten eine unterschiedliche Effizienz der proteolytischen Spaltung des gp160 in seine Ekto- und Transmembrandomäne postuliert werden kann. Die Spaltung ist eine Voraussetzung für die Funktionalität des Envelope Eintritts- und Fusionsprozesses, und damit für die Ausbildung von Syncytien im Zell-/Zellfusionsassay notwendig.

Das REKR-Motiv (Abb.17), das als hauptsächliche Spaltstelle des gp160 beschrieben wurde (Werner *et al.* 1993), war in allen Aminosäuresequenzen konserviert, wodurch grundsätzlich eine Spaltung von gp120 und gp41 möglich war. Das KAKR-Motiv (Abb.17), eine zweite mögliche Spaltstelle, ist sowohl in den Isolaten 02-1065, 08-0755 als auch in der Referenzsequenz des dualtrophen Virus B.US 89.6 (AccNo. U39362) nicht vorhanden (Morikawa *et al.* 1993). Diese wiesen einen Aminosäureaustausch von Lysin zu Arginin auf (K500R). Des Weiteren zeigten alle Isolate, bis auf Klon 2.12 des Folgeisolates, das für den gp41-N-Terminus typische duale FLG-Motiv auf (Abb.17), welches sich sieben bis acht Aminosäuren von der Spaltstelle (REKR) entfernt befindet. Alle Klone der CCR5 Δ 32/ Δ 32 Isolate wiesen an Position 4 des gp41 die inserierte Aminosäure Valin auf.

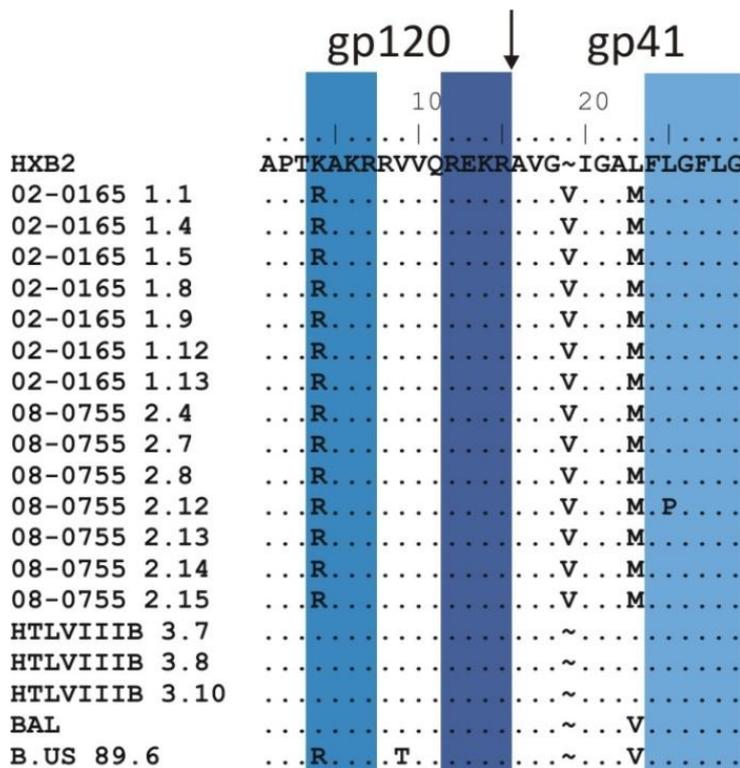


Abb.17. Aminosäuresequenzalignment der Furin-Spaltstelle im gp160

Alignment von 3 Referenzsequenzen und allen Plasmidsequenzen (17), in Blau: KAKR-Motiv, in Dunkelblau: REKR-Motiv, in Hellblau: FLG-Motiv, schwarzer Pfeil: Position der Spaltstelle.

3.5.3 Das Transmembranprotein gp41

Im gp41 ist die eigentliche Fusionsdomäne lokalisiert (Abb.18). Eine weitere Funktion ist die Verankerung der viralen Glykoproteine über die Transmembrandomäne auf der Hülle (Abb.18). Zudem besitzt gp41 mehrere Glykosylierungsmotive sowie drei Cysteinreste (Abb.18). Neuere Studien deuten aber auf eine partielle Oberflächenexposition des gp41 hin mit bisher unbekannter Funktion (Steckbeck *et al.* 2010).

In Abb.18 ist das Alignment der gp41-Sequenzen dargestellt. Zu erkennen sind, wie im gp120, konservierte und variable Regionen. Neben mehreren AS-Austauschen, vor allem im *heptad repeat 1* (C-34) sowie wie auf dem LLP-1 (*lentivirus lytic peptid*), gab es nur wenige Mutationen. Allerdings gab es in den Patientenisolaten Mutationen, die zu einer Veränderung der Glykosylierungsstellen führten. So sind an AS-Position 751 und 818 Glykosylierungsstellen der beiden Verlaufsisolate nicht vorhanden. Bei einem der drei im gp41 vorhandenen Cysteinreste kam es zu einer Mutation an AS-Position 839 (C839F). Im Vergleich von Erstisolat zu Folgeisolat gab es nur einen AS-Austausch H566N, die restliche Sequenz war identisch.

Fusionsdomäne

Das 16 AS große Fusionspeptid, ist am N-Terminus des gp41 lokalisiert. Dieser hydrophobe Teil dringt nach einer Kaskade von Konformationsänderungen im gesamten Env direkt in die Wirtsmembran ein und initiiert die Membranfusion.

Wie bereits in Abb.17 gezeigt, war dieser Bereich konserviert. In den Env-Sequenzen der Isolate 02-0165 und 08-0755 befand sich im Vergleich zu allen Referenzsequenzen eine Aminosäureinsertion sowie ein Aminosäureaustausch L518M (Abb.18).

LLP-1/LLP-2/LLP-3 Domäne

Die LLP-Domänen sind am cytoplasmatischen C-terminalen Bereich des gp41 lokalisiert. Ihre Funktion ist nicht vollständig geklärt, sie scheinen jedoch ebenfalls im Prozess der Zellfusion eine Rolle zu spielen und während dieses Prozesses von der cytosolischen auf die extrazelluläre Membranseite zu wechseln (Steckbeck *et al.* 2010). Die LLP Domänen bilden α -Helices aus und sind wahrscheinlich membranständig.

In den Domänen LLP-2 und LLP-3 lagen zwei AS-Austausche im Vergleich der Patientenisolate mit den Referenzsequenzen vor (T781G, A794T). In der LLP-1 Domäne konnten sieben AS-Austausche zwischen den Positionen V834 bis H844 zwischen den Verlaufsisolaten und den X4-Viren detektiert werden.

Das Hydrophobizitätsprofil von gp41

Wie für das gp120 wurde ein Hydrophobizitätsprofil der gp41 Proteine mit Hilfe des Kyte & Doolittle und Hopp & Woods Verfahrens erstellt (Abb.19).

Im Hydrophobizitätsprofil nach Kyte & Doolittle (Abb.19 **A**) waren mögliche Transmembranregionen erkennbar. Es zeigte sich, dass die TM-Domäne einen Wert von über 1,6 aufwies (AS 175-195). Einen ebenfalls hohen Skalenwert erreichte der Bereich des Fusionspeptides (AS 10-20), sowie die Sequenz vor und in der LLP-2 Region (AS 245-270). In Abb.19 **B** zeigten sich einige Hydrophobizitätsniveaus, die auf eine Oberflächenexposition schließen lassen. Im Vergleich der einzelnen Isolate und Referenzsequenzen zeigten sich nur wenige Unterschiede und keine Unterschiede im Vergleich des Erstisolates 02-0165 zum Folgeisolat 08-0755.

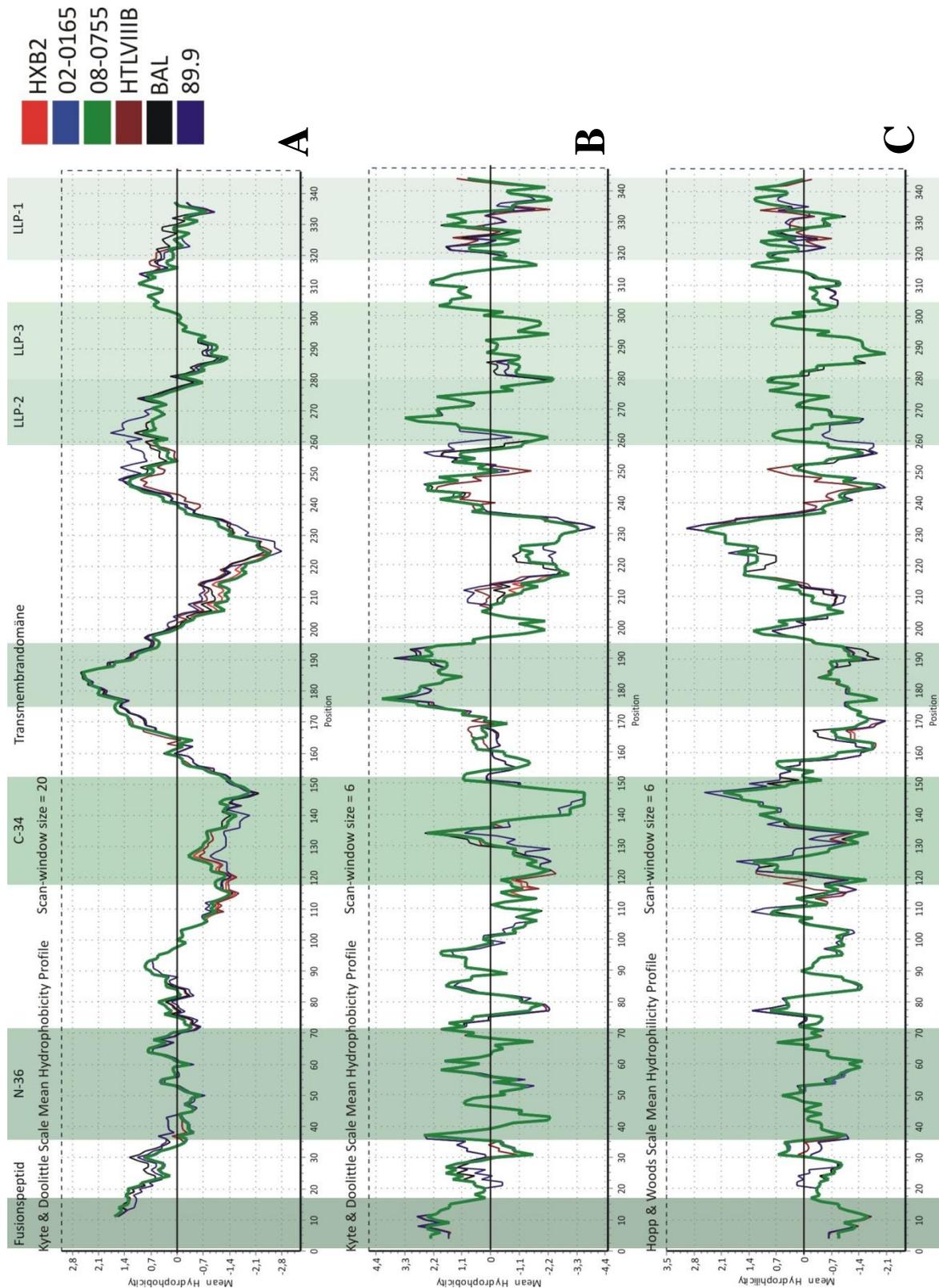


Abb.19. Hydrophobizitätsprofil des gp41

Modellberechnung nach Kyte & Doolittle/Hopp & Woods, gp41 Regionen Grün: Fusionspeptid, Heptad repeat, Transmembrandomäne und LLP-1 bis 3 eingefärbt. **A:** Kyte & Doolittle window-size 20. **B:** Kyte & Doolittle window-size 6. **C:** Hopp & Woods window-size 6.

Nach dem Hopp & Woods Vorhersagealgorithmus (Abb.19 C), mit dem ebenfalls Epitope berechnet wurden, konnten hohe Werte für den *heptad repeat 2* (C-34), sowie den Bereich zwischen TM-Domäne und LLP-2 Region von bis 3,0 berechnet werden. Im Vergleich der einzelnen Referenzsequenzen mit den Isolaten zeigten sich auch hier nur wenige Unterschiede, und keine Unterschiede vom Erst- zum Folgeisolat.

3.6 Zell/Zellfusionsassay

Durch die HIV-Envelope induzierte Membranfusion von Zellen entstehen vielkernige Zellen (Syncytien). Die Syncytienbildung ist eine charakteristische Eigenschaft von CXCR4 gebrauchenden HIV-1 Stämmen und wird als zytopathischer Effekt bezeichnet (CPE). Env-exprimierende Zellen können daher Syncytien induzieren. Durch Kokultivierung von Zellen mit definiertem Rezeptor und Korezeptorbesatz können Envelopeproteine hinsichtlich ihrer Interaktion mit den Rezeptoren anhand der Fusionsereignisse quantifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine quantitative Auswertung vorgenommen. Durch Transfektion von 293T-Zellen mit den Env-positiven Expressionsklonen (pcDNA3.1-env⁺) sollte eine Expression von gp120 und gp41 auf der Zelloberfläche erreicht werden. Hierzu wurden 293T-Zellen mit den Env-Klonen transfiziert und anschließend mit lymphoiden CD4⁺ CEM-Zellen kokultiviert. Die Auswertung erfolgte nach 16 Stunden Kultivierung qualitativ mittels Lichtmikroskopie. In der Kokultivierung mit CD4⁺ CEM-Zellen zeigten sich Syncytien in unterschiedlicher Stärke. Im Rahmen dieser Arbeit konnten bisher nur vorläufige Versuche durchgeführt werden.

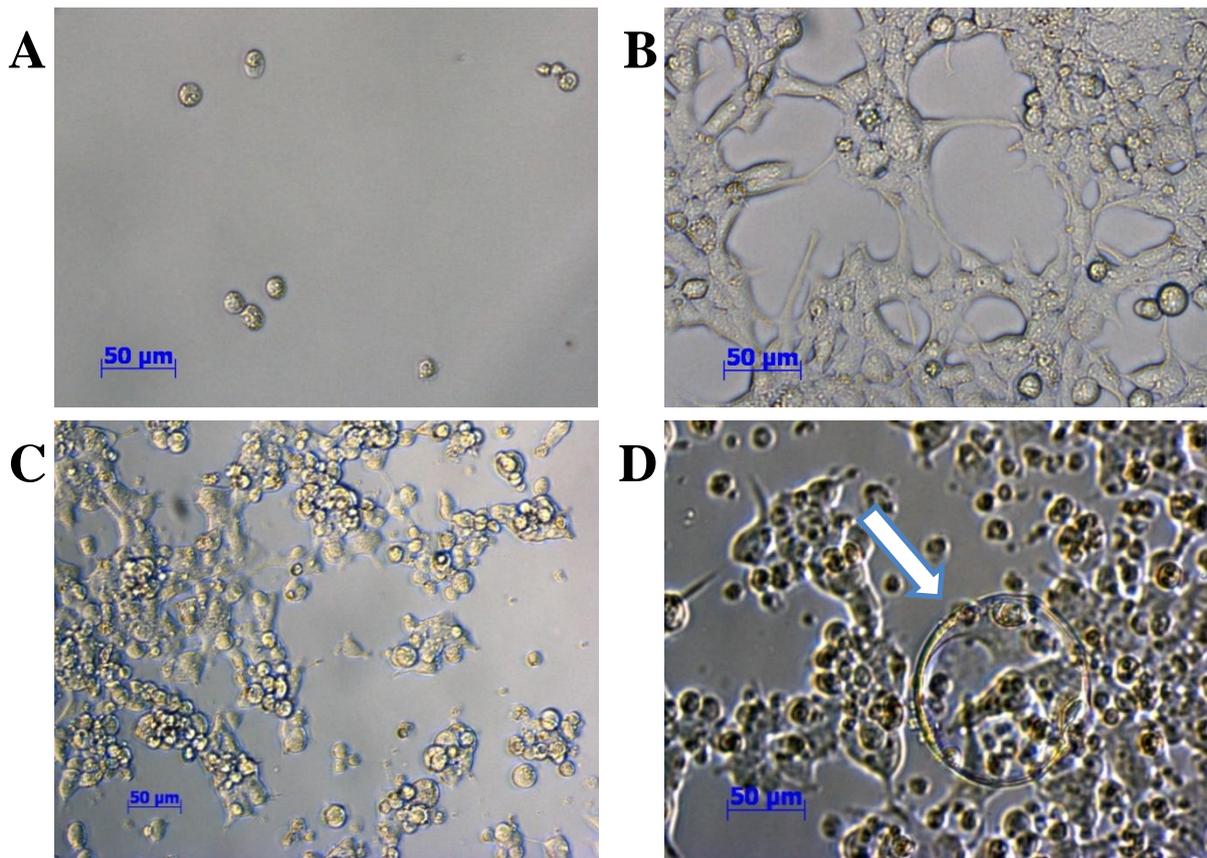


Abb.20. Zell/Zellfusionsassay

Lichtmikroskopische Aufnahme, 200fach vergrößert, Blau: Maßstab in μm . **A:** CEM-Zellen. **B:** 293T-Zellen **C:** kokultivierte 293T-Zellen und CD4^+ CEM-Zellen nach 16 h bei 37°C , 5 % CO_2 . **D:** kokultivierte Env^+ 293T-Zellen und CD4^+ CEM-Zellen nach 16 h bei 37°C , 5 % CO_2 , Pfeil: Syncytie.

Wie in Abb.20 **D** zu erkennen, bildeten sich in den env^+ 293T-Zellen in Kokultur mit CD4^+ CEM-Zellen Syncytien. Der Durchmesser der Syncytien erreichte eine Größe von bis zu $100 \mu\text{m}$. Die Mehrheit der Syncytien war jedoch deutlich kleiner und erreichte einen Durchmesser von $10 \mu\text{m}$. In Abb.20 **C** ist die Negativkontrolle dargestellt. Zu erkennen sind zum einen die adhären wachsenden Env -negativen 293T Zellen und zum anderen die CEM-Suspensionszellen. Eine optische Unterscheidung im Lichtmikroskop von Syncytien mit geringem Durchmesser und den CEM-Zellen erwies sich als schwierig. Die Env^+ 293T-Zellen, welche mit dem Envelope des $\text{CCR5}\Delta 32/\Delta 32$ Erstisolates 02-0165 transfiziert wurden, zeigten die stärkste Syncytienbildung. Alle anderen Env^+ 293T-Zellen wiesen ebenfalls Syncytien auf, allerdings mit geringerer Anzahl und mit kleinerem Durchmesser. Der Fusionsassay zeigte die prinzipielle Funktionalität der HIV-1 Hüllglykoproteine auf der Zelloberfläche.

4 DISKUSSION

Bei der Charakterisierung von zwei primären HIV-Verlaufsisolaten aus einem infizierten Patienten, der homozygoter Träger der CCR5 Δ 32 Mutation war (Oh *et al.* 2008), wurde neben dem CXCR4-Korezeptor der Gebrauch von CX3CR1 identifiziert, einem alternativen Korezeptor von HIV (Combadiere *et al.* 1998, Demiroglu 2008). Inhibitionsexperimente ließen jedoch fraglich erscheinen, ob eine geringe endogene CXCR4-Expression im GHOST-Reporterzellpanel zur Infizierbarkeit der CX3CR1-exprimierenden GHOST-Zelllinie beitrug (Friedel 2010). In einer anderen Reporterzelllinie ohne CXCR4 Hintergrundexpression U87.CD4.CX3CR1, konnte der CX3CR1-Gebrauch gesichert ausgeschlossen werden. Überraschend war jedoch der Befund, dass die CXCR4 vermittelte Infektion dieser speziellen Isolate durch Fraktalkin, dem natürlichen CX3CR1 Liganden, gehemmt werden konnte (Flamme 2012).

Daher wurde die Suche nach Besonderheiten in funktionellen Domänen dieses Hüllproteins, das in Abwesenheit von CCR5 im infizierten Patienten evolviert war, auf das gesamte gp160 [Oberflächenprotein (gp120) einschließlich Transmembranprotein (gp41)] ausgeweitet. Dazu wurde ein PCR-System etabliert, um *full-length-env* DNA-Fragmente für eine Expressionsklonierung zu amplifizieren. Rekombinante Plasmide wurden in Bakterien vermehrt und sequenziert. Funktionale Env-Varianten wurden mit Env-Sequenzen von Referenzstämmen mit unterschiedlichem Korezeptorgebrauch verglichen. Die funktionalen Env-Expressionsklone stehen nun zur funktionalen molekularen Charakterisierung von putativen Domänen, die den Korezeptorgebrauch beeinflussen, zur Verfügung. Vorläufige Zell/Zell-Fusionsexperimente zeigten die Expression der Hüllproteinvarianten in transfizierten humanen Zelllinien.

4.1 PCR-Design und Vergleich von DNA-Polymerasen für *full-length* Env-Amplifikation aus viraler genomischer RNA

Zur Etablierung der *full-length-envelope* PCR mussten verschiedene Faktoren berücksichtigt werden. Es mussten Primerpaare ausgewählt werden, die sowohl das komplette Env- als auch Rev-ORF amplifizierten, umgebenfalls einen späteren Rev-abhängigen pre-mRNA Transport in das Zytoplasma zu ermöglichen. Die Primer mussten zudem Restriktionsenzymchnittstellen aufweisen, die sich sowohl zur Klonierung in den eukaryonten Expressionsvektor als auch zur Umklonierung in rekombinante HIV eigneten.

Die PCR musste eine gute Sensitivität aufweisen, um auch aus Zellkulturüberstand mit niedriger Viruslast ein DNA-Produkt zu generieren.

Die sekundärreichen Struktur der HIV-RNA, insbesondere die extrem stabilen Sekundärstrukturen des Rev-Responsive Elements (RRE) am 5'-Ende des gp41 ORF, mussten vollständig denaturiert sein, um Syntheseabbrüche der DNA-Polymerase an den Sekundärstrukturelementen zu vermeiden. Daher wurden verschiedene Polymerasen ausgetestet. Unter den drei getesteten Polymerasemixen war weder das Expand High Fidelity System von der Fa. Roche, noch der PfuUltra HotStart Mix der Fa. Agilent geeignet. Hierbei ist zu erwähnen, dass die PfuUltra Polymerase von Agilent lediglich einmal getestet wurde und daher weitere Tests notwendig wären, um die Schlussfolgerung eines generellen PCR Versagens abzusichern. Der Long PCR Enzyme Mix von der Fa. Fermentas zeigte hingegen schon in der ersten Testreihe sehr gute Ergebnisse. Die für die PCR angewandte optimale Annealingtemperatur lag bei 65°C, die Elongationstemperatur für dieses Enzym lag bei 68°C mit einer Elongationsdauer von bis zu 7 min. Das Amplifikat besaß die gewünschte Größe von 3000 Bp, allerdings trat immer eine schwache Nebenbande von 800 Bp auf. Eine 800 Bp Nebenbande zeigte sich ebenfalls bei dem getesteten Expand High Fidelity Enzym Mix, allerdings als Hauptprodukt.

Vermutlich war die Enzympräparation von Fermentas im Gegensatz zum Polymerase-Mix von Roche besser für die 3000 Bp langen Amplifikate geeignet. Möglicherweise sind Pufferkomponenten im Fermentas-PCR-Puffer enthalten, die eine partielle Renaturierung der viralen genomischen Transkripte von ca. 9.5 kBp Länge besser verhindern als bei dem Roche Präparat. Mit dem Fermentas-Enzym konnten $9,3 \times 10^3$ geq/ml zuverlässig amplifiziert werden und die Ausbeute an PCR-Produkt lag in der Regel bei 5 µg (50 µl Ansatz). Es konnte von allen Virusstocks, die untersucht werden sollten (Isolat 02-0165 und 08-0755, Referenzvirus HTLVIII B und BAL), ausreichend DNA für die Klonierung amplifiziert werden.

4.2 Env-Klonierung in den eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3.1

Da HIV durch seinen Replikationsmechanismus zu jedem Zeitpunkt im infizierten Patienten als eine Mischung von eng verwandten Virusvarianten vorliegt, unter denen auch Defektviren enthalten sein können, wurden von jedem Virusstock mehrere Klone mit richtigem Restriktionsfragmentmuster sequenziert. Nur Klone mit einem durchgehenden Leserahmen sollten für die vergleichende Sequenzanalyse und den Zell/Zellfusionsassay

eingesetzt werden. Von dem Erstisolat (02-0165) wurden insgesamt 7/12 Klonen mit funktionaler Env-Sequenz erhalten, von dem Verlaufsisolat (08-0755) waren es 7/14 Klone und 3/11 Klone von dem X4-Referenzvirus HTLVIII_B. Alle BAL Klone wiesen jedoch ein um 400 Bp verkürztes Insert auf. Der Vergleich mit der Datenbanksequenz von BAL zeigte das Vorliegen einer zweiten XhoI Restriktionsenzymschnittstelle im gp41 zwischen Transmembran- und LLP-2 Domäne. Die XhoI Schnittstelle wurde bei der sticky-end Klonierung in den pcDNA3.1 Vektor verwendet. Die Klone mit verkürztem Insert wurden aus diesem Grund nicht weiter verwendet. Zur Durchführung der funktionalen Analysen muss die Klonierung mit modifiziertem Antisenseprimern nachgeholt werden, um ein klonales Env mit charakterisiertem CCR5 Korezeptorgebrauch zu erzeugen.

4.3 Strukturelle Analyse des Hüllproteins

Eine detaillierte vergleichende Analyse der vollständigen Hüllproteinsequenzen der HIV Isolate aus dem CCR5-defizienten Patienten sollte dazu beitragen den Einfluss von Proteinstrukturen auch außerhalb des V3-Loops im Hüllprotein auf den Rezeptor/Korezeptorgebrauch zu analysieren. Im Folgenden werden zunächst Ergebnisse aus dem Sequenzvergleich der Oberflächeneinheit (SU) gp120 diskutiert.

4.3.1 Sequenzunterschiede im Oberflächenprotein gp120

Für den Vergleich zwischen den HIV-Hüllproteinsequenzen der HIV Isolate mit unterschiedlichem Korezeptorgebrauch wurden die Aminosäuresequenzen zugrunde gelegt, d.h. synonyme Mutationen wurden nicht berücksichtigt. Die mit dem universalen genetischen Code translatierten Nukleotidsequenzen wurden auf Unterschiede zwischen dem CCR5 Δ 32/ Δ 32 Erstisolat und seinem Folgeisolat, sowie auch Unterschiede zwischen von X4-, R5- und dualtrophen R5/X4-Viren analysiert. Die Auswertung der hypervariablen Schleifen V1/V2, V3-V5 im gp120 zeigte deutliche Unterschiede in der AS-Komposition aller fünf Bereiche zwischen den beiden Verlaufsisolaten und den Referenzsequenzen. Diese zahlreichen Aminosäureaustausche verursachten eine fast vollständige Veränderung der putativen Glykosylierungspositionen auf dem Oberflächenhüllprotein. In der Literatur ist allerdings nicht beschrieben, dass diese einen direkten Einfluss auf den Korezeptorgebrauch haben könnten. Dennoch sind die deutlichen Unterschiede der Glykosylierungsmuster als Hinweis auf eine erfolgte Anpassung der HIV-Quasispezies im CCR5 Δ 32/ Δ 32 Patienten zu interpretieren. Veränderungen des Glykosylierungsmusters

ermöglichen einen besser Schutz vor einer Antigenerkennung (Immunescape, Bontjer *et al.* 2009). Diese Veränderungen überwogen im V1- und V4-Loop.

Weitere Aminosäuresubstitutionen wurden in den hypervariablen Regionen identifiziert. So zeigte sich vor allem bei dem direkten Vergleich der AS-Abfolge eine stärkere phylogenetische Ähnlichkeit der beiden CCR5 Δ 32/ Δ 32-Isolate zum R5-Virus BAL und zum dualtrophen Referenzvirus 89.6. Dies spiegelte sich auch in der NJ-Stammbaumanalyse über die gesamte Env-Sequenz wider (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist es sehr schwierig von einer Sequenzhomologie auf die tatsächliche Strukturhomologie zu schließen. Beschrieben wurde, dass im Wesentlichen die Ladung der AS-Position 11 und 24/25 im V3-Loop für den Korezeptorgebrauch ausschlaggebend ist (Lengauer *et al.* 2007). AS-Insertionen und Deletionen haben hier jedoch die Position der entsprechenden AS verschoben. Diese Insertionen und Deletionen werden vermutlich durch die hohe strukturelle Dynamik des V3-Loops kompensiert. Vermutlich spielt auch die Ladung angrenzender AS eine Rolle im Korezeptorgebrauch. Studien, die die V3-Loop Dynamik untersuchten, zeigten dass eine zu hohe Dynamik des V3-Loops zu einer verstärkten Neutralisierung durch Antikörper führte (Yokoyama *et al.* 2012). Im Vergleich des Erstisolates zum Folgeisolat zeigte sich im V3-Loop ein AS-Austausch (N6T). Es ist nicht auszuschließen, dass der Austausch des polaren ungeladenen Asparagins zu dem hydrophoben Tyrosin einen Einfluss auf das an Position 5 befindliche Glykosylierungsmotiv hatte.

Die Analyse der konservierten C1 bis C3 Regionen im gp120, erfolgte nur auf Grundlage der Sequenzinformationen. Es zeigte sich, dass wie erwartet weniger AS-Mutationen vorlagen. Die häufigsten Veränderungen traten in der C2 und C3 Region auf die auch eine Rolle bei der CD4-Rezeptorbindung spielen (Lasky *et al.* 1987) Die Analyse der Hydrophobizitätsprofile zeigte keine Unterschiede zwischen Erstisolat 02-0165 und Folgeisolat 08-0755 im Hinblick auf Ladung und antigene Eigenschaften. Im Vergleich zu den Referenzsequenzen zeigten sich jedoch Unterschiede auf der C2 sowie C3 Region. Beide Isolate aus dem CCR5 Δ 32/ Δ 32 Patienten wiesen im Gegensatz zu den Referenzviren weniger starke antigene Epitope an AS-Position 240 und 360 auf. Diese Positionen in der C2 und C3 Region sind Bestandteil putativer Glykosylierungsstellen, die in den Patientenisolaten fehlten. Eine verringerte Ladung der Oberfläche würde eine mögliche Antikörperselektion und -erkennung erschweren. Es wurden keine weiteren

Auffälligkeiten im Aminosäuresequenzvergleich der Isolate und Referenzstämme festgestellt.

Insbesondere gab es keine eindeutigen Hinweise auf Ursachen für die Änderung des CCR5-Gebrauchs zwischen Erst- und Folgeisolat. Nach phänotypischen Untersuchungen konnte das Erstisolat beide Korezeptoren zum Eintritt in die Zielzelle nutzen, obwohl basierend auf der V3-Loop Sequenzanalyse nach der genotypischen Vorhersage des Korezeptorgebrauchs mit Vorhersagetool (`geno2phenocoreceptor`, Daten nicht gezeigt) das Erstisolat lediglich den CXCR4 Korezeptor gebrauchen kann. Ob die beobachtete einzelne Mutation an Position 6 im V3-Loop diesen starken phänotypischen Einfluss hat, müssen weitere Experimente zeigen. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist die zusätzliche Glykosylierungsposition im V4-Loop. Dieses Motiv war sowohl in der R5-Referenzsequenz als auch im Erstisolat 02-0165 an AS 423 des gp120 lokalisiert. Allerdings zeigten 3D-Modelle keine räumliche Nähe von V3 und V4-Loop (Yokoyama *et al.* 2012). Es besteht dennoch die Möglichkeit, dass sich dieses Epitop durch Konformationsänderung des gp120 während der Bindung an das CD4 in die Nähe eines möglichen Korezeptors bewegt. Sequenzvergleiche des V4-Loops mit einer größeren Anzahl von R5- und X4-Viren wären hilfreich, um eine zufällige Mutation auszuschließen.

4.3.2 Sequenzunterschiede im Transmembranprotein gp41

Die Fusion der Virusmembran mit der Wirtsmembran ist nach der Rezeptor/Korezeptor Interaktion ein wesentlicher Schritt bei der Infektion der Wirtszelle. Die Schwierigkeiten bei der Zielzellfindung sowie die notwendigen Konformationsänderungen werden durch den SU-Anteil des gp160 bedingt. Der TM-Anteil im gp41 dient der räumlichen Annäherung der Membranen. Die Fusion wird durch eine Verankerung des nach Konformationsänderungen kurzzeitig freigelegten Fusionspeptids im gp41 in der Wirtzellmembran ausgelöst. Gp41 kann in zwei Bereiche eingeteilt werden: zum einen der N-terminale Bereich der außerhalb der Virusmembran lokalisiert ist, und in dem das Fusionspeptid sowie zwei repetitive Heptadsequenzen (Heptad Repeats) liegen, sowie zum anderen der C-terminale Bereich, der innerhalb der Virusmembran lokalisiert ist und drei LLP-Domänen besitzt.

Ähnlich wie im gp120 erwies sich im Sequenzvergleich der Großteil des gp41 mit den C5 und C6 Domänen als relativ konserviert. In dem 346AS großen gp41 Protein kam es

lediglich in der LLP-1 Domäne zu häufigeren Mutationen bei dem Vergleich von Referenzsequenzen mit den Patientenisolaten, so dass hier eine veränderte Struktur vorstellbar wäre. Im gp41 sind vier bis sechs Glykosylierungspositionen beschrieben. Es zeigte sich, dass zwei der sechs Glykosylierungsstellen in den Isolaten des CCR5 Δ 32/ Δ 32 Patienten nicht vorhanden waren. Diese fehlenden Positionen werden vermutlich wenig Einfluss besitzen, da diese im C-terminalen zytosolischen Proteinanteil lokalisiert sind. Der Vergleich von Erstisolat zum Folgeisolat wies lediglich zwei AS-Austausche an Positionen auf, von denen keine biologische Relevanz bekannt ist. Bei der Analyse des Hydrophobizitätsprofile der gp41 konnten die Transmembrandomänen jeweils eindeutig lokalisiert werden. Auffällig war eine erhöhte Hydrophobizität an AS-Positionen 250 bis 270 in allen untersuchten Isolaten. Hier zeigte vor allem das dualtrophe Referenzvirus einen deutlich erhöhten Wert. Die Region zwischen Transmembrandomäne und der LLP-2 Region wies ein hohes Hydrophobizitätsniveau in der Auswertung nach dem Hoop & Woods Verfahren auf. Diese Region könnte daher in Wechselwirkung mit anderen Proteinen treten. Weitere Ergebnisse zur C-terminalen Region und einer möglichen Interaktion bei der Fusion wurden von Hollier und Dimmock im Jahr 2005 veröffentlicht (Holliere und Dimmock 2005; Cheung *et al.* 2005).

4.4 Zellfusion zur funktionalen Charakterisierung der Hüllproteine

Vergleichende Sequenzanalysen sind grundsätzlich eindimensional und erlauben im wesentlichen Unterschiede in der linearen Aminosäuresequenz zu identifizieren. Die Konsequenzen einzelner Aminosäureaustausche für die dreidimensionale Proteinstruktur und Funktion vorherzusagen ist nur möglich, wenn Daten aus Röntgenstrukturanalysen kristallisierter Proteine vorliegen. Daher sind phänotypische Bioassays von wesentlicher Bedeutung, um Sequenzunterschiede mit funktionalen Unterschieden zu korrelieren. Für die Charakterisierung der Interaktion des HIV Hüllproteins mit Rezeptor/Korezeptor und anschließender Fusion sind Zell/Zellfusionsexperimente beschrieben, die es insbesondere im Zusammenspiel mit spezifischen Inhibitoren erlauben, Mutationen funktional zu analysieren.

Vorläufige Zell/Zellfusionsexperimente mit Env-exprimierenden transfizierten Zellen in Kokultur mit CD4⁺ Zellen (CEM) konnten erfolgreich durchgeführt werden. Mithilfe dieses Experimentes konnte gezeigt werden, dass das HIV-1 gp160 korrekt exprimiert wurde, eine korrekte Faltung stattfand, sowie posttranslationale Proteinmodifikationen und

die proteolytische Spaltung funktionell waren. Nur ein funktionales gp120/gp41 Trimer ist in diesem Versuchsaufbau in der Lage eine Zellfusion auszulösen. Die Kontrolle der Transfektionseffizienz und die Bestimmung des Anteils Env-exprimierender 293T-Zellen durch Antikörper-Anfärbung und anschließender FACS-Analyse wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt, sondern es wurde vorrangig zunächst kontrolliert, ob das transfizierte *full-length* Hüllprotein funktional exprimiert wird. Weder der Zeitpunkt nach Transfektion noch das Mischungsverhältnis der kokultivierten Zellen wurden bisher optimiert.

Der Zell/Zellfusionassay mit CEM-Zellen in Kokultur sollte so modifiziert werden, dass die Fusionsaktivität quantifiziert werden kann. Insgesamt ist jedoch festzustellen, dass mit allen Env-Expressionklonen aus den verschiedenen Virusstocks (außer BAL) ein zytopathischer Effekt in Form von Syncytienbildung beobachtet wurde, so dass von einer grundsätzlichen Funktionalität der Env-Klone ausgegangen werden kann. Die Env-Klone stehen nur für die Optimierung des Fusionsassays und der weiteren funktionalen Charakterisierung der Evolution des Korezeptorgebrauchs zur Verfügung.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte von den primären Virusisolaten des CCR5 Δ 32/ Δ 32 Patienten das Hüllprotein kloniert und vollständig sequenziert werden. Plasmidpräparationen stehen für weitere Versuche zur Verfügung. Zur Verbesserung des Zell/Zellfusionsassays sollte als kokultivierte Zelllinie anstelle der CEM Zelllinie eine adhärente Zelllinie mit Reportersystem für eine erfolgreiche Fusion eingesetzt werden. Für diese Zwecke steht im Labor eine HeLa-CD4 Zelllinie zur Verfügung, die β -Galaktosidase unter Kontrolle des HIV-LTR Promotors exprimiert. Wird nun ein TAT-Expressionsplasmid (HIV-spezifischer Transkriptionsaktivator) zusammen mit dem Env-Expressionsvektor transfiziert, wird bei Kokultivierung der 293T-Zellen mit den HeLa-CD4. β Gal-Zellen bei erfolgreicher Env-vermittelter Fusion die β -Galaktosidase Expression durch Inkubation mit Substrat nachweisbar. Die angefärbten Zellen sind quantifizierbar. Alternativ kann die CEMX174SEAP Hybridzelllinie eingesetzt werden, in der eine sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP) unter LTR-Kontrolle steht.

Mithilfe der vorliegenden Env-Klone sollen Hüllproteine mit phänotypisch unterschiedlichem Korezeptorgebrauch analysiert werden. Es können gezielt Mutationen in das Hüllprotein eingeführt werden, um eine funktionelle Charakterisierung zu ermöglichen. Die verschiedenen kompletten Hüllprotein-ORFs können außerdem in ein

rekombinantes HIV kloniert werden. Damit können dann Virus/Zellfusionsexperimente durchgeführt werden. Der Einsatz von Zelllinien, die unterschiedliche Korezeptoren exprimieren, in Kombination mit spezifischen Inhibitoren, wie AMD3100 oder TAK779 (siehe AIDS Referenz Reagenzien Katalog) sollte eine detaillierte Struktur-Funktionsanalyse erlauben. Zur Charakterisierung der Evolution des Korezeptorgebrauches im CCR5 Δ 32/ Δ 32 Patienten sollten zunächst sowohl der AS-Austausch auf dem V3-Loop, als auch die Mutation der Glykosylierungsstelle im V4-Loop weiter untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Bindung und die Fusion eines HIV-Partikels an und in die Zielzelle ist ein essentielles Ereignis im Replikationszyklus von HIV. Dieser Vorgang der Fusion in die Wirtszelle, benötigt initial die Interaktion des HIV Hüllproteins (*Env*) mit dem CD4-Rezeptor und einem Chemokinrezeptor. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin eine strukturelle und funktionale Charakterisierung des vollständigen Hüllproteins von HIV aus einem CCR5-defizienten Patienten durchzuführen. In den vorangegangenen Arbeiten war in den HIV-Isolaten aus dem Patienten jeweils nur der V3-Loop des Hüllproteins sequenziert worden. Insbesondere sollte daher untersucht werden, ob Domänen im Hüllprotein außerhalb des V3-Loops einen Einfluss auf den Korezeptorgebrauch haben.

Dazu wurde eine *full-length-envelope* PCR etabliert, welche in der Lage ist, verschiedene HIV-Isolate über eine Länge von 3000 Nukleotiden zu amplifizieren. Es wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1 zur Klonierung des *full-length-envelope* in NEB5alpha kompetente Zellen ausgewählt, und die rekombinanten Plasmide in NEB5alpha kompetenten Zellen vermehrt. Zur Identifikation funktionaler Env-Klone wurde eine Sequenzierungsstrategie entwickelt. Es folgte eine Auswertung der klonalen Sequenzen auf Nukeotid- und Aminosäureebene von zwei Verlaufsisolaten des CCR5 Δ 32/ Δ 32 Patienten im Vergleich zu Referenzviren für CXCR4- und CCR5-Korezeptor. Funktionale Expressionsplasmide wurden anschließend in 293T-Zellen transfiziert. In einem vorläufigen Zell/Zellfusionsassay wurden Env⁺-293T-Zellen mit CEM-Zellen kokultiviert, um die Funktionalität des exprimierten gp160 zu untersuchen.

Mit der etablierten *full-length-envelope* PCR konnte erfolgreich das 3000 Bp Große Produkt amplifiziert werden. Die Klonierung in den Expressionsvektor pcDNA3.1 verlief ebenfalls erfolgreich. Mit Ausnahme des R5-Referenzvirus wurden von allen Virusisolaten mindestens drei funktionale Klone erhalten. Die anschließende Sequenzauswertung zeigte Unterschiede in Glykosylierungsmustern und der AS-Zusammensetzung von X4 und R5 Referenzviren zu den Isolaten des CCR5 Δ 32/ Δ 32 Patienten. Das Erstisolat zeigte im Vergleich zum Folgeisolat nur wenige AS-Substitution, und eine Deletion. Es konnte der Verlust einer putativen Glykosylierungsstelle gezeigt werden, sowie ein AS-Austausch auf den für den Korezeptorgebrauch wichtigen V3-Loop.

Die Env⁺ 293T-Zellen, welche mit CD4⁺-CEM Zellen kokultiviert wurden, zeigten Syncytienbildung. Der vorläufige Fusionsassay zeigte die prinzipielle Funktionalität der HIV-1 Hüllglykoproteine auf der Zelloberfläche.

Zur weiteren Charakterisierung der Evolution des Korezeptorgebrauches im CCR5 Δ 32/ Δ 32 Patienten ist es erforderlich einen quantitativen Fusionsassay zu etablieren, mit dem sowohl die Rolle des AS-Austausches im V3-Loop als auch die Mutation der Glykosylierungsstelle im V4-Loop weiter untersucht werden können.

6 SUMMARY

The entry of HIV-1 into a host cell is mediated by the interaction of the viral envelope with the CD4-receptor and a co-receptor, mainly the chemokine receptors CCR5 or CXCR4. HIV co-receptor use is mainly determined by the V3 loop of the viral envelope protein. Mutations in the CCR5 receptor are known to have a strong influence on the course of the HIV infection. A functional 32bp deletion in the CCR5 gene correlates with a slow progression of the disease in heterozygous carriers and, if the gene is homozygous mutated, individuals are almost not susceptible to HIV. Nevertheless, a few HIV-infected people with a homozygous CCR5 Δ 32 genotype were described and one of them was identified in the German HIV-1 seroconverter cohort of the Robert Koch-Institute. In previous studies it was shown that the virus of this patient isolated early in infection could use the CCR5 and the CXCR4 co-receptor. During the course of infection the virus lost the CCR5 use and increased the CXCR4 co-receptor use.

The aim of this study was to analyze the sequential virus isolates from the homozygous CCR5 Δ 32 patient in more detail by full length envelope sequencing and characterization. Therefore, a full length envelope PCR was established and the resulting 3000 bp envelope fragment cloned into the expression vector pcDNA3.1. Furthermore, a sequencing strategy was designed for structural characterization and a cell-cell-fusion assay was performed to determine the functional expression of gp120/gp41 in transfected 293T-cells by co-culture with CD4⁺ CEM-cells.

The sequence analysis showed several differences between the first and the follow up isolate of the CCR5 Δ 32/ Δ 32 patient. We detected numerous amino acid substitutions, especially one in the hyper variable region 3, as well as the loss of a putative glycosylation motif within the hyper variable loop region 4. Comparisons of the reference sequences with the isolates from the CCR5 Δ 32/ Δ 32 patient revealed several insertion and deletions within the entire gp160.

Subsequent experiment should comprise a quantifiable cellfusion assay to clarify the role of the missing glycosylation motif and the substituted amino acids. Viral escape by CXCR4 use during antiretroviral treatment of patients with CCR5 antagonist might be caused by alternative amino acid changes and therefore contribute to treatment failure.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Alkhatib G, Berger EA. HIV coreceptors: from discovery and designation to new paradigms and promise. *Eur J Med Res.* 2007 Oct 15;12(9):375-84. Review. PubMed PMID: 17933717.

Allan JS, Coligan JE, Lee TH, Barin F, Kanki PJ, M'Boup S, McLane MF, Groopman JE, Essex M. Immunogenic nature of a Pol gene product of HTLV-III/LAV. *Blood.* 1987 Jan;69(1):331-3. PubMed PMID: 3024760.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983 May 20;220(4599):868-71. PubMed PMID: 6189183.

Brett K, Characterization of the coreceptor usage of HIV-1 isolates of patients with CCR5 mutations. Humboldt Universität Berlin. Apr 2010.

Bontjer I, Land A, Eggink D, Verkade E, Tuin K, Baldwin C, Pollakis G, Paxton WA, Braakman I, Berkhout B, Sanders RW. Optimization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins with V1/V2 deleted, using virus evolution. *J Virol.* 2009 Jan;83(1):368-83. Epub 2008 Oct 15. PubMed PMID: 18922866; PubMed Central PMCID: PMC2612307.

Cairns JS, D'Souza MP. Chemokines and HIV-1 second receptors: the therapeutic connection. *Nat Med.* 1998 May;4(5):563-8. Review. PubMed PMID: 9585229.

Cheung L, McLain L, Hollier MJ, Reading SA, Dimmock NJ. Part of the C- terminal tail of the envelope gp41 transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 is exposed on the surface of infected cells and is involved in virus-mediated cell fusion. *J Gen Virol.* 2005 Jan;86(Pt 1):131-8. PubMed PMID: 15604440.

Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science.* 1986 Jul 18;233(4761):343-6. PubMed PMID: 2425430.

Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, et al. Human immunodeficiency viruses. *Science.* 1986 May 9;232(4751):697. PubMed PMID: 3008335.

Cohen EA, Subramanian RA, Göttlinger HG. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;214:219-35. Review. PubMed PMID: 8791729.

Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 1998 Jan 22;391(6665):397-401. PubMed PMID: 9450757.

De Clercq E. The design of drugs for HIV and HCV. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Dec;6(12):1001-18. Review. PubMed PMID: 18049474.

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 Jun 20;381(6584):661-6. PubMed PMID: 8649511.

Demiroglu C, Characterization of HIV-1 isolates from patients with CCR5 coreceptor mutations. Technische Universität Berlin. Dec 2008.

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 May 10;272(5263):872-7. PubMed PMID: 8629022.

Flamme H, Charakterisierung des alternativen Korezeptorgebrauchs von HIV-Isolaten. Ruhr-Universität Bochum. Jul 2012.

Friedel M, Co-receptor usage of HIV-1 isolates from a patient with a homozygous $\Delta 32/\Delta 32$ mutation in the CCR5 Co-Receptor. Humboldt Universität Berlin. Nov 2010.

- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984 May 4;224(4648):500-3. PubMed PMID: 6200936.
- Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology*. 1987 Jan;156(1):171-6. PubMed PMID: 3643678.
- Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS*. 1991 Jun;5(6):617-37. PubMed PMID: 1652977.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1981 Dec 10;305(24):1425-31. PubMed PMID: 6272109.
- Hollier MJ, Dimmock NJ. The C-terminal tail of the gp41 transmembrane Envelope glycoprotein of HIV-1 clades A, B, C, and D may exist in two conformations: an analysis of sequence, structure, and function. *Virology*. 2005 Jul 5;337(2):284-96. PubMed PMID: 15913700.
- Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Jun;78(6):3824-8. PubMed PMID: 6167991; PubMed Central PMCID: PMC319665.
- Kaplan AH, Manchester M, Swanstrom R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J Virol*. 1994 Oct;68(10):6782-6. PubMed PMID: 8084015; PubMed Central PMCID: PMC237104.
- Knarr G, Modrow S, Todd A, Gething MJ, Buchner J. BiP-binding sequences in HIV gp160. Implications for the binding specificity of bip. *J Biol Chem*. 1999 Oct 15;274(42):29850-7. PubMed PMID: 10514465.
- Kücherer C. HIV-1 escape variants using alternative coreceptors in addition to CXCR4 emerge during the course of infection of a homozygous CCR5delta32 patient. 7th European HIV Drug Resistance Workshop, Stockholm, Sweden, 2009 Mar.
- Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 1982 May 5;157(1):105-32. PubMed PMID: 7108955.
- 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 Sep 11;50(6):975-85. PubMed PMID: 2441877.
- Lengauer T, Sander O, Sierra S, Thielen A, Kaiser R. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat Biotechnol*. 2007 Dec;25(12):1407-10. PubMed PMID: 18066037.
- 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 Jun 25;265(18):10373-82. PubMed PMID: 2355006.
- Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, Czeizel A, Claustres M, de la Rúa C, Ferrari M, Ferrec C, Glover G, Grinde B, Güran S, Kucinkas V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C, Schwartz M, Spitsyn V, Timar L, Beckman L, Parmentier M, Vassart G. The deltaCCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Genet*. 1998 Mar;7(3):399-406. PubMed PMID: 9466996.
- McDermott DH, Colla JS, Kleeberger CA, Plankey M, Rosenberg PS, Smith ED, Zimmerman PA, Combadière C, Leitman SF, Kaslow RA, Goedert JJ, Berger EA, O'Brien TR, Murphy PM. Genetic polymorphism in CX3CR1 and risk of HIV disease. *Science*. 2000 Dec 15;290(5499):2031. PubMed PMID: 11187812.
- Milich L, Margolin B, Swanstrom R. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J Virol*. 1993 Sep;67(9):5623-34. PubMed PMID: 8350415; PubMed Central PMCID: PMC237966.

- Mizuochi T, Matthews TJ, Kato M, Hamako J, Titani K, Solomon J, Feizi T. Diversity of oligosaccharide structures on the envelope glycoprotein gp 120 of human immunodeficiency virus 1 from the lymphoblastoid cell line H9. Presence of complex-type oligosaccharides with bisecting N-acetylglucosamine residues. *J BiolChem*. 1990 May 25;265(15):8519-24. PubMed PMID: 2341393.
- 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 Feb;61(2):570-8. PubMed PMID: 2433466; PubMed Central PMCID: PMC253982.
- Morikawa Y, Barsov E, Jones I. Legitimate and illegitimate cleavage of human immunodeficiency virus glycoproteins by furin. *J Virol*. 1993 Jun;67(6):3601-4. PubMed PMID: 8497067; PubMed Central PMCID: PMC237708.
- Oh DY, Jessen H, Kücherer C, Neumann K, Oh N, Poggensee G, Bartmeyer B, Jessen A, Pruss A, Schumann RR, Hamouda O. CCR5Delta32 genotypes in a German HIV-1 seroconverter cohort and report of HIV-1 infection in a CCR5Delta32 homozygous individual. *PLoS One*. 2008 Jul 23;3(7):e2747. PubMed PMID: 18648518; PubMed Central PMCID: PMC2453227.
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. 1996 Mar 15;271(5255):1582-6. PubMed PMID: 8599114.
- Peters PJ, Bhattacharya J, Hibbitts S, Dittmar MT, Simmons G, Bell J, Simmonds P, Clapham PR. Biological analysis of human immunodeficiency virus type 1 R5 envelopes amplified from brain and lymph node tissues of AIDS patients with neuropathology reveals two distinct tropism phenotypes and identifies envelopes in the brain that confer an enhanced tropism and fusogenicity for macrophages. *J Virol*. 2004 Jul;78(13):6915-26. Erratum in: *J Virol*. 2005 Mar;79(5):3227. PubMed PMID: 15194768; PubMed Central PMCID: PMC421670.
- Raport CJ, Schweickart VL, Eddy RL Jr, Shows TB, Gray PW. The orphan G-protein-coupled receptor-encoding gene V28 is closely related to genes for chemokine receptors and is expressed in lymphoid and neural tissues. *Gene*. 1995 Oct 3;163(2):295-9. PubMed PMID: 7590284.
- Rosen FS. The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J Clin Invest*. 1985 Jan;75(1):1-3. PubMed PMID: 3155526; PubMed Central PMCID: PMC423383.
- Steckbeck JD, Sun C, Sturgeon TJ, Montelaro RC. Topology of the C-terminal tail of HIV-1 gp41: differential exposure of the Kennedy epitope on cell and viral membranes. *PLoS One*. 2010 Dec 7;5(12):e15261. PubMed PMID: 21151874; PubMed Central PMCID: PMC2998427.
- Travis BM, Dykers TI, Hewgill D, Ledbetter J, Tsu TT, Hu SL, Lewis JB. Functional roles of the V3 hypervariable region of HIV-1 gp160 in the processing of gp160 and in the formation of syncytia in CD4+ cells. *Virology*. 1992 Jan;186(1):313-7. PubMed PMID: 1727607.
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2002 Aug;Chapter 2:Unit 2.3. PubMed PMID: 18792934.
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. 1977 Sep;50(3):481-92. PubMed PMID: 301762.
- Werner A, Levy JA. Human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 is cleaved after incubation with recombinant soluble CD4. *J Virol*. 1993 May;67(5):2566-74. PubMed PMID: 8474162.
- Wyatt R, Moore J, Accola M, Desjardin E, Robinson J, Sodroski J. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J Virol*. 1995 Sep;69(9):5723-33. PubMed PMID: 7543586; PubMed Central PMCID: PMC189432.
- 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 Jun 18;393(6686):705-11. PubMed PMID: 9641684.
- Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural dynamics of HIV-1 envelope Gp120 outer domain with V3 loop. *PLoS One*. 2012;7(5):e37530. Epub 2012 May 18. PubMed PMID: 22624045; PubMed Central PMCID: PMC3356331.

8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 08.10.2012

.....

Stefan Fiedler