

**Identifizierung protektiver Antikörper-Mimotope
aus Plasma gesunder HIV-Langzeitinfizierter
durch Phage Display**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Michael Humbert
aus Landau in der Pfalz

Frankfurt 2005

DF1

vom Fachbereich 14 (Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

ZUSAMMENFASSUNG

Auch nach 20 Jahren HIV-Forschung ist in absehbarer Zeit kein wirksamer Impfstoff in Sicht. Die weltweit steigenden Infektionszahlen zeigen, dass die Krankheit weiterhin eine der schlimmsten Epidemien der Menschheit bleiben wird. Umso mehr ist die Entwicklung eines potenten Impfstoffes nötig, um Neuinfektionen zu verhindern. Eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von HIV-1 Impfstoffen sind Patienten, die die Infektion auf natürliche Weise ohne antiretrovirale Therapie unter Kontrolle halten. Neben der zellvermittelten Immunantwort wird vermutet, dass auch die humorale Immunantwort einen entscheidenden Beitrag zum stabilen Immunstatus solcher HIV-Patienten leistet. Während der durchschnittliche HIV-Patient ohne Therapie innerhalb von meist 10 Jahren zum Vollbild AIDS progressiert, leben diese Patienten seit mehr als 15 Jahren mit der Infektion ohne Therapie und dem klinisch auffälligen Krankheitsverlauf mit abfallender CD4-Zellzahl und steigender Viruslast im Blut.

In dieser Arbeit werden solche Patienten, die auch long-term non-progressors (LTNPs) genannt werden, für eine detaillierte Analyse der humoralen Immunantwort mittels der Phage Display Methode herangezogen. Die verwendeten, auf Phagen exprimierten Peptide (Phagotope), haben unterschiedliche Länge und Konformation und sind als Fusion auf dem Phagenhüllprotein präsentiert. Pathogen-spezifische Phagen können durch Selektion mit Patientenseren isoliert werden. Die Phagenbanken wurden mit den Antikörpern der LTNP Patienten durchsucht, um HIV-1 spezifische Peptide zu isolieren, die Epitope protektiver Antikörper gegen HIV-1 repräsentieren. Diese isolierten Peptide ahmen demnach das natürliche Epitop eines Antikörpers nach, weshalb diese Phagotope auch Mimotope genannt werden. Das Ziel der Arbeit war die Isolierung protektiver HIV-1 Mimotope, die konservierte Bereiche von HIV nachahmen und, wenn als Immunogen eingesetzt, in der Lage sind, wiederum potent neutralisierende Antikörper zu induzieren. Für die Studie wurden insgesamt über 1400 selektierte Phagenklone auf ihre Spezifität hin untersucht, etwa 700 Phagenklone wurden sequenziert. Zur Identifikation konformeller Mimotope, die häufig in Verbindung mit neutralisierender Aktivität bei HIV zu finden sind, wurde eine spezielle Software (3DEX) entwickelt, die es ermöglicht, die isolierten Peptide potentiellen Regionen auf publizierten Proteinstrukturen zuzuordnen. Anhand dieses Programms wurden die selektierten Phagenpeptide analysiert und den HIV-1 Proteinen, vor allem aber dem Hüllprotein gp120, zugeordnet. Interessante Mimotope wurden in Immunisierungsstudien getestet, wobei zur Etablierung des Immunisierungsprotokolls zunächst verschiedene Injektionswege getestet wurden. Aussichtsreiche Kandidaten, die funktionellen Domänen in gp120 zugeordnet werden konnten, wurden als Phagengruppen in Mäuse injiziert, um ihre Fähigkeit zur Induktion neutralisierender Antikörper zu überprüfen. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass einige Mimotopgruppen in der Lage sind, neutralisierende Antikörper zu induzieren. Die Mausimmunsereen konnten unterschiedliche HIV-1 Isolate *in vitro* zu neutralisieren, teilweise auch Subtyp-übergreifend.

Die Arbeit zeigt somit die erfolgreiche Isolierung HIV-1 spezifischer Mimotope protektiver Antikörper aus LTNP Patienten, sowie die Verwendung dieser Mimotope als erfolgreiche Immunogene in Mäusen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Übersicht und Ziel der Studie	1
1.2	Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)	2
1.2.1	Die Entdeckung von HIV und der phylogenetische Ursprung	2
1.2.2	Aufbau des HIV und Genomstruktur	3
1.2.2.1	Struktur des Viruspartikels	3
1.2.2.2	Genomstruktur	4
1.2.2.3	Replikationszyklus	6
1.3	Der virale Hüllproteinkomplex	7
1.3.1	Das Glykoprotein gp120 im Detail	8
1.4	Die Immunantwort bei HIV	11
1.4.1	Der klinische Verlauf einer HIV-Infektion	11
1.4.2	Die nicht-progressive HIV-Infektion	12
1.4.2.1	Chemokinrezeptoren und Chemokine	13
1.4.2.2	Defekte in viralen Genen	14
1.4.3	Die zelluläre Immunantwort	15
1.4.4	Die humorale Immunantwort	15
1.4.5	Die Neutralisation	16
1.4.6	Neutralisierende Antikörper in der HIV-Infektion	16
1.4.7	Die Vakzineentwicklung	19
1.5	Die Phage Display Technologie	20
1.5.1	Phage Display in der HIV-Forschung	22
1.5.2	Immunisierung mit Mimotopen	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Geräte	25
2.2	Chemikalien, Biochemikalien, Einwegartikel und Kits	26
2.3	Lösungen und Medien	28
2.4	Zellkulturmedien	31
2.5	Zelllinien	32
2.5.1	293T	32
2.5.2	293T CD4 CCR5	32
2.5.3	U87 CD4 CCR5	32
2.5.4	TZM-bl	33
2.6	Bakterienstämme	33
2.6.1	ER2738 Host Strain (NEB)	33
2.6.2	BL21(DE3)Gold (Stratagene)	33
2.7	Primer und Biochemikalien	33
2.7.1	M13 -96pIII Primer	33
2.7.2	LIC Primer	33
2.7.3	CCR5 Δ 32bp Primer	33
2.7.4	M13KE Wildtypphage	33
2.7.5	Random Peptide Phage Libraries (Phagenbanken)	34
2.7.6	Montage Antibody Purification PROSEP-G Kit	34
2.7.7	<i>Renilla</i> Luziferase Assay System	34
2.7.8	NEW LAV BLOT I	34
2.7.9	INNOTEST™ HIV Antigen mAb	35
2.7.10	pEZ707	35
2.7.11	Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit	35
2.7.12	Vivaspin 500	35
2.7.13	Vivapure Metal Chelate spin columns	35
2.8	Die LTNP-Patienten dieser Studie	36
2.9	Protokolle	39
2.9.1	Aufarbeitung von Blutproben	39
2.9.2	Präparation von PBMCs aus Buffy Coats	39
2.9.3	CCR5 Genotyp	39
2.9.4	Anzucht von Saatviren in der Kokultur	40

2.9.5	Transfektion von 293T Zellen und Produktion rekombinanter Viren	40
2.9.6	Bestimmung des viralen Titers	41
2.9.7	Das <i>Renilla</i> Luziferase Assay System	41
2.9.8	Neutralisation von HIV-1	42
2.9.9	Vorbereitung der paramagnetischen Beads	43
2.9.10	Phage Display Selektion (Biopanning)	43
2.9.11	Vereinzeln der selektierten Phagenklone (Titern)	46
2.9.12	Konzentrationsbestimmung von Phagen	46
2.9.13	Anzucht von Einzelklonen im 96-Loch Format	47
2.9.14	Phagen-ELISA	47
2.9.15	Phagen-Amplifikation im 2 ml Format	48
2.9.16	Präparation der Phagen ssDNA	48
2.9.17	PCR, Aufreinigung und Sequenzierung der Phagen-DNA	48
2.9.18	Immunisierung mit Phagenpartikeln	49
2.9.19	Herstellung der Fusionsproteine (LIC)	50
2.9.20	Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine	52
2.9.21	Protein-ELISA	52
2.9.22	Peptid-ELISA	52
2.9.23	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)	53
2.9.24	Detektion der Immunantwort gegen Phagen im Western Blot	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Charakterisierung der Patienten	54
3.1.1	Präparation der Blutproben und Kokultur der Patientenviren	54
3.1.2	CCR5 Korezeptorgene der Patienten	55
3.1.3	Immunantwort der Patienten	56
3.1.4	Antikörpertiter der Patienten gegen V3	57
3.1.5	HIV-neutralisierende Aktivität der Patientenantikörper	58
3.2	Phage Display Biopanning	61
3.2.1	Biopanningliste	62
3.2.2	Biopanningstatistik	63
3.2.3	Phagen-ELISA	64
3.2.4	3D Epitope eXplorer - 3DEX	65
3.2.5	Analyse der Phagenklone	66
3.2.6	Sequentielles Biopanning mit MH01 und MH04	67
3.2.7	Biopanning mit MH01	72
3.2.8	Biopanning mit MH04	75
3.2.9	Biopanning mit MH02	76
3.2.10	Biopanning mit MH03	78
3.2.11	Biopanning mit MH05	79
3.2.12	Biopanning mit MH06	80
3.2.13	Biopanning mit MH07	81
3.2.14	Biopanning mit MH08	82
3.2.15	Biopanning mit dem Plasmaprobeppool von MH01-MH05	82
3.3	Immunisierung von Mäusen mit Phagen	83
3.3.1	Studie 2002 und Studie 2003	84
3.3.2	Studie 2004	84
3.3.3	Studie 2005	86
3.4	Peptidfusionsproteine	87
3.4.1	Amplifikation und Aufreinigung der Phagen-DNA	87
3.4.2	Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine	88
3.4.3	Protein-ELISA	89
3.5	Neutralisation (Studie 2004)	90
3.6	Kreuz-ELISA (Studie 2005)	94
3.7	Western Blot Analyse der Immunantwort gegen M13	95
3.7.1	Adjuvant-Effekt	95
3.7.2	Mäuse der Immunisierungsstudie 2005	96
3.8	Neutralisation (Studie 2005)	97
4	Diskussion	98
4.1	Patientencharakterisierung	98

4.1.1	Virale und zelluläre Faktoren	98
4.1.2	Neutralisationseigenschaften der Patientenseren	98
4.2	Komponenten des antiviralen Immunsystems	100
4.3	Mechanismus der Neutralisation	101
4.3.1	Neutralisierende Antikörper in der HIV-Infektion	102
4.4	Phage Display	103
4.4.1	3DEX Software	103
4.4.2	Biopanning und Statistik	104
4.4.3	Die Wahrscheinlichkeit eines beliebigen Mimotops	105
4.4.4	Sequentielles Biopanning	106
4.4.5	Biopanning einzelner Patientenproben	107
4.5	Immunisierungsstudien	110
4.5.1	Studie 2004	110
4.5.2	Studie 2005	112
4.6	Ausblick für die Immuntherapie gegen HIV-1	114
5	Literaturverzeichnis	115
5.1	Referenzen	115
5.2	Eigene Veröffentlichungen	133
5.2.1	Publikationen	133
5.2.2	Poster Präsentationen	133
5.2.3	Vorträge	134
6	Anhang	135
6.1	Tabellen der Phagotope	135
6.2	Abkürzungsverzeichnis	142

1 Einleitung

1.1 Übersicht und Ziel der Studie

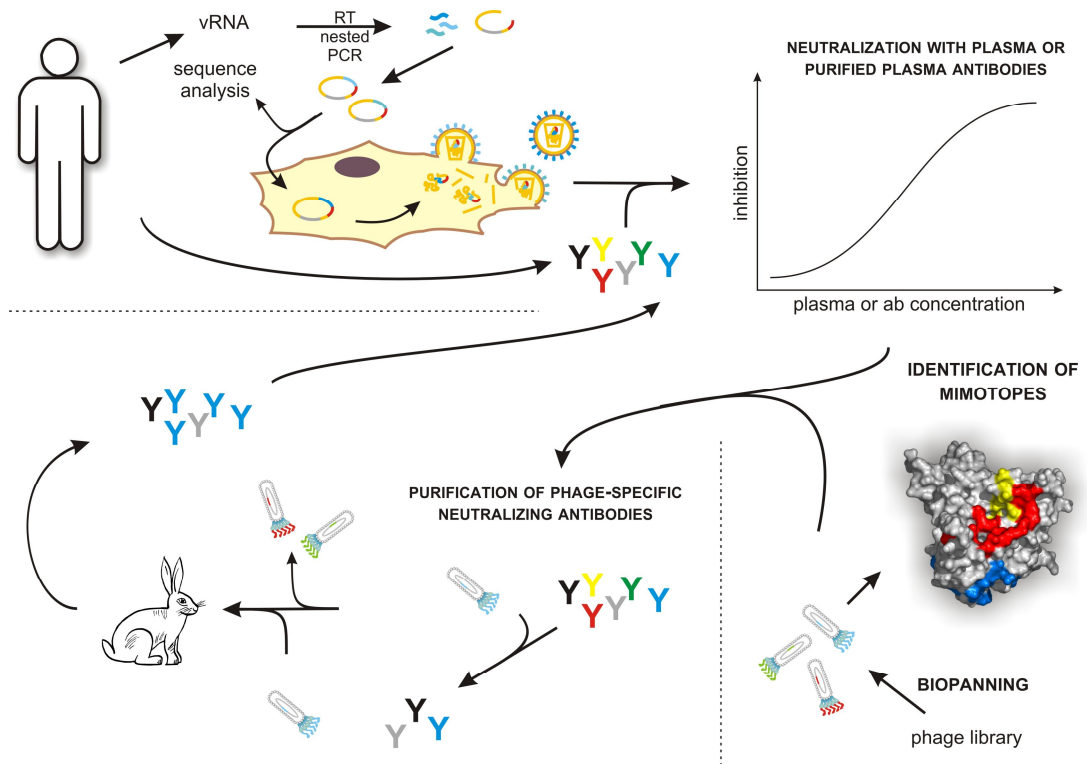


Abbildung 1.1: Übersicht der LTNP-Studie.

Die graphische Darstellung der Studie zeigt den Ablauf des Projekts mit seinen einzelnen Teilbereichen. Die zunächst isolierte virale RNA aus den Patientenproben dient zur Herstellung rekombinanter Reporterviren. Anhand der Reporterviren wird die neutralisierende Kapazität der Patientenantikörper überprüft, die weiterhin für die Selektion von Phagenbanken zur Identifizierung HIV-spezifischer Mimotope verwendet werden. Identifizierte Mimotope werden in Immunisierungsstudien auf ihre Fähigkeit hin, neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 zu induzieren, getestet.

Die graphische Übersicht in Abb. 1.1 zeigt das Projekt mit seinen einzelnen Teilbereichen und Aufgabenstellungen. Eine spezielle Gruppe von HIV-1 Patienten (sogenannte long-term non-progressors, LTNPs), die ohne antivirale Therapie mit der Infektion seit mehr als 10 Jahren leben, ohne die typischen HIV-Symptome zu entwickeln, stellen die Grundlage der Studie dar. Nach Ausschluss bekannter viraler und zellulärer Ursachen, vermuten wir, dass das Immunsystem dieser Patienten besonders gut in der Lage ist, die HIV-1 Infektion zu bekämpfen oder zumindest unter Kontrolle zu halten. Speziell der humorale Arm des Immunsystems steht in dieser Arbeit im Mittelpunkt. Die Antikörper dieser Patienten werden in einem *in vitro* Neutralisationsversuch auf ihre Fähigkeiten hin untersucht, eine HIV-1 Infektion von Zielzellen durch rekombinante Reporterviren zu verhindern. Die Kenntnis der Epitope dieser neutralisierenden Antikörper wäre für eine erfolgreiche Impfstoffentwicklung von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wird eine Selektion von Phagenbanken mit den Antikörpern der Patienten durchgeführt. Über verschiedene Selektionsschritte werden die HIV-spezifischen Phagen angereichert und selektiert und letztendlich sequenziert, um das präsentierte Peptid auf den Phagen abzuleiten. Zum einen werden die Phagen dahingehend benutzt, die neutralisierenden Antikörper aus den

Patientenproben aufzureinigen und näher zu charakterisieren, zum anderen werden die Phagen für eine Immunisierung von Kleintieren verwendet, um in diesen Tieren wiederum eine neutralisierende Antikörperantwort zu induzieren und die Spezifität und Nützlichkeit der Phagotope als Impfstoff zu beweisen. Da neutralisierende Antikörper häufig konformelle Strukturen erkennen, soll parallel zur praktischen Arbeit ein spezielles Computerprogramm zur Analyse solcher Epitope auf publizierten Proteinstrukturen entwickelt werden.

Aufgrund des sehr komplexen Themas ist die Einleitung sehr umfangreich und heterogen. Zu Beginn werden die Grundlagen von HIV besprochen, sowie die Immunologie und der Krankheitsverlauf. Es folgt ein Kapitel über die Phage Display Technologie und deren Anwendung in der heutigen Forschung, insbesondere bei der Entwicklung für einen HIV-Impfstoff.

1.2 Das Humane Immundefizienz Virus (HIV)

1.2.1 Die Entdeckung von HIV und der phylogenetische Ursprung

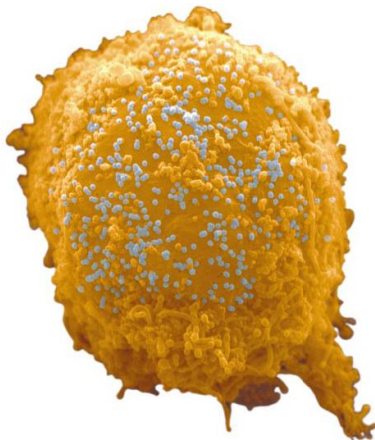


Abbildung 1.2: Infektion einer T-Helferzelle.

HIV (blau) infiziert eine T-Zelle.⁵¹

1983 wurden in zwei unterschiedlichen Forschungsinstituten Viren isoliert, die für die erworbene Immunschwäche AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) verantwortlich sein sollten. *Luc Montagnier, Françoise Barré-Sinoussi* und *Jean-Claude Chermann* nannten das im Pariser Pasteur Institut isolierte Virus LAV (Lymphadenopathy Associated Virus), welches in seinen Charakteristika den Eigenschaften des humanen T-Zell Leukämie Virus (HTLV) ähnelte.¹⁴ *Robert Gallo* und seine Mitarbeiter isolierten ein Retrovirus aus dem Blut eines AIDS-Patienten (HTLV-III, Human T-Lymphotropic Virus III), wodurch die Pariser Beobachtungen unterstützt wurden.⁹⁶ Die klinischen Diagnosen, wie eine hohe Viruslast

im Blut und der rapide Verlust der CD4⁺-Lymphozyten, konnten durch eine HTLV-Infektion jedoch nicht erklärt werden. Kurze Zeit später berichtete auch die Gruppe von *Jay A. Levy* über die Isolierung eines Virus (ARV, AIDS-associated Retrovirus) und alle drei Virusisolate ähnelten sich sehr in ihren Eigenschaften.¹⁵⁸ Auch in Deutschland gelang die Isolierung eines AIDS-assoziierten Retrovirus durch die Arbeitsgruppe von *H. Rübsem-Waigmann* am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt.²⁷⁸ Die genomische Untersuchung ergab später, dass alle vier Viren derselben Retrovirengruppe angehörten und 1984 gab ein internationales Komitee den offiziellen Namen bekannt: HIV, Human Immunodeficiency Virus.^{61,229}

Die HIV-Infektion ist beim Menschen eine recht junge Infektion. Das über die Mutationsrate berechnete Alter liegt bei etwa 650 Jahren. HIV-1 und das im Schimpansen vorkommende SIVcpz haben einen gemeinsamen Vorläufer. Im Menschen sind heute HIV-1 und HIV-2 bekannt. Der nächste Verwandte von HIV-2 ist ein Immundefizienzvirus aus Mangaben, SIVsm. Beide

Typen unterscheiden sich in ihrem Genom um bis zu 50 %, wobei HIV-2 weniger pathogen erscheint. Die hohe Variabilität im Gen des Hüllproteins erlaubt eine weitere Unterscheidung in HIV-Subtypen. Diese unterscheiden sich um bis zu 30 % im besagten Gen, wobei die Einteilung der Subtypen nach dem *env*-Gen historisch ist und heutzutage das ganze Genom berücksichtigt wird. Derzeit sind fünf HIV-2 Subtypen bekannt (A-E), sowie 10 Subtypen für die HIV-1 Gruppe M („major“, A-H, J, K). Zwei sehr divergente Gruppen von HIV-1-Isolaten werden in die Gruppen O („outlier“) bzw. N zusammengefasst.^{200,201,260} Dazu kommen auch rekombinante Formen zwischen den verschiedenen Subtypen.

1.2.2 Aufbau des HIV und Genomstruktur

Die Gruppe der Retroviren, zu denen auch HIV gehört, ist gekennzeichnet durch den Besitz des Enzyms Reverse Transkriptase, welches dem Virus die Fähigkeit verleiht, sein 9,7 kB großes, dimeres (+)RNA-Genom in DNA zu transkribieren, um die entstandene doppelsträngige DNA in das Wirtszellgenom zu integrieren. HIV gehört zu den Lentiviren, eine der vielen Gattungen der Familie der Retroviren. Lentiviren (lat. *lentus*, langsam) führen zur Erkrankungen des Nerven- und Immunsystems, wobei die Inkubationszeit viele Jahre andauern kann und daher der Krankheitsverlauf meist verlangsamt ist. Alle Retroviren enthalten die Strukturgene *gag*, *pol* und *env*, die von den so genannten LTRs (Long Terminal Repeats) eingerahmt sind.

Das Hauptmerkmal der Retroviren ist der entgegengesetzte Informationsfluss von der (+)RNA zur DNA, sowie das Vorhandensein von Strukturgenen für die Vorstufen der strukturellen Proteine.

1.2.2.1 STRUKTUR DES VIRUSPARTIKELS

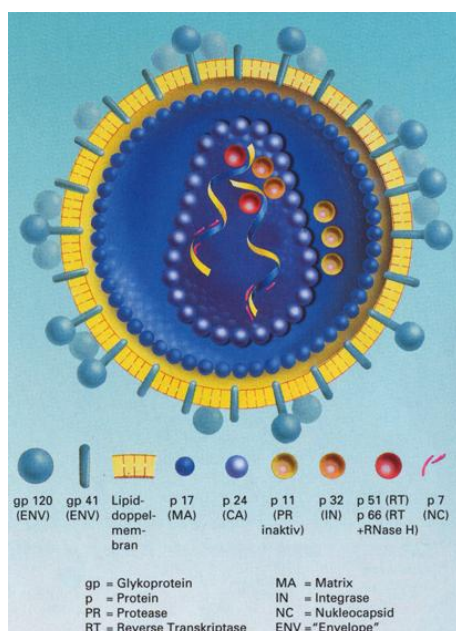


Abbildung 1.3: Schematischer Querschnitt durch einen HIV-Partikel.

Aufbau eines HIV-Partikels mit der inneren, kegelförmigen Kernmembran und der gelben Lipidhülle, die an die äußere Kernmembran grenzt. Eingehüllt in die innere Kernmembran befinden sich zwei RNA Moleküle, sowie die Enzyme.
(aus: Klinischer Leitfaden für HIV, Abbott GmbH)

Elektronenmikroskopisch bestehen zwischen HIV-1 und HIV-2 oder einzelnen Subtypen keine Unterschiede. HIV erscheint als etwa 100 nm großer, runder Partikel, dessen Lipidhülle Trimere des Transmembranproteins gp41 und daran gebunden Trimere des Hüllproteins gp120 trägt (siehe Abb. 1.3). Die Bindung von gp120 an gp41 erfolgt über hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen, wodurch der gp120-Komplex leicht abgeschert werden kann. Diese

nicht-kovalente Bindung der beiden Proteine hat den Vorteil, eine leichtere Fusion der Wirtszellmembran mit der Virushülle zu ermöglichen und erklärt zudem die geringe Infektiosität von HIV-Partikeln außerhalb des menschlichen Körpers oder seiner Körperflüssigkeiten.¹⁵⁷

Die äußere Hülle besteht aus einer Doppelphospholipidmembran, in die eine Reihe von Proteine eingelagert sind, zum einen zelluläre Membranproteine der Wirtszelle, wie beispielsweise MHC-Moleküle, Aktin und Ubiquitin, zum anderen aber auch die viruseigenen Hüllproteine gp120 und die Transmembranproteine gp41.¹⁰ Das Hüllprotein gp120 ist hochgradig glykosyliert, 58 % seiner Gesamtmasse stammen von Zuckerseitenketten.^{156,181} Die Innenseite der Virushülle besteht aus einem geometrischen Gerüst aus etwa 2000 p17-Matrixproteinen (MA), die über ihre N-terminalen myristylierten Enden in die Lipidmembran inseriert sind und so einen äußeren Kern bilden. Der innere Kern (Capsid) wird durch etwa 2000 p24-Moleküle (CA) aufgebaut und hat eine Kegelform. Zwischen den beiden Kernbereichen befindet sich die virale Protease (PR, p11), die in einer inaktiven Form vorliegt. Im Kernbereich befinden sich zwei identische Moleküle (+)RNA, die durch 2000 Kopien des Nukleocapsidproteins p7 (NC) stabilisiert werden und an die die Enzyme Reverse Transkriptase (RT, p51) mit RNase H (p66) und Integrase (IN; p32) binden. Weiterhin bildet das Protein p6 zusammen mit dem Vpr-Protein einen Komplex und ist an die äußere Kernhülle gebunden. Im Inneren des kegelförmigen Kerns sind zudem noch Nef- und Vif-Moleküle nachweisbar, die als akzessorische Proteine mitverpackt werden. Die drei weiteren akzessorischen Proteine Rev, Tat und Vpu, die in der Wirtszelle wirken, scheinen dagegen nicht verpackt zu werden. Zwei Moleküle t-RNA^{Lys3}, die für die Initiation der Reversen Transkription benötigt werden, sind ebenfalls im Capsid zu finden.²⁷⁶

1.2.2.2 GENOMSTRUKTUR

Das HIV-Genom ist etwa 9600 bis 9700 bp (base pairs) lang und besteht aus zwei (+)RNA-Molekülen (siehe Abb. 1.4). An beiden Enden (5' und 3') flankieren die so genannten LTRs (long terminal repeats) das Genom, welche nicht-translatierte, repetitive Enhancer- und Promotorsequenzen darstellen. Die LTRs werden in die Regionen U3, R und U5 unterteilt. Sie enthalten strukturelle Elemente, die als modulatorische, Enhancer- und Core-Region bezeichnet werden. Die modulatorische Region enthält Bindungsstellen für zelluläre Faktoren, wie AP-1, NFAT-1 und Ets-1, die eine Aktivierung des Nukleinsäurestoffwechsels im Kern bewirken. Die Enhancer-Region, mit Bindungsstellen für NF- κ B und Sp-1, ist hauptsächlich für die Geschwindigkeit der Virusvermehrung verantwortlich. Nach der Core-Region folgt die TAR-Region (transactivation response element) der viralen mRNA, die durch die Anlagerung von Tat zu einer beschleunigten mRNA-Synthese führt. Die Enhancer-Elemente führen zu einer verstärkten mRNA-Synthese durch die Bindung von viralen Aktivator-Proteinen (Herpesviren, HTLV, Cytokine), die bei Stimulation der T-Lymphozyten gebildet werden.

Das HIV-Genom enthält die Gene *gag*, *pol*, *env* für essentielle Enzyme und Vorstufen struktureller Proteine, sowie eine Reihe von Genen für regulatorische, akzessorische Proteine (siehe Abb. 1.4). Durch die Verwendung von überlappenden Leserastern ist in dem relativ kleinen Genom eine Fülle von Information gespeichert und durch Spleißen entstehen verschiedene mRNAs, die durch die Translation in die unterschiedlichen Vorstufen der Proteine übersetzt werden. Das Genom kodiert insgesamt 16 unterschiedliche Proteine. Proteine des *gag*- (group-specific anti-

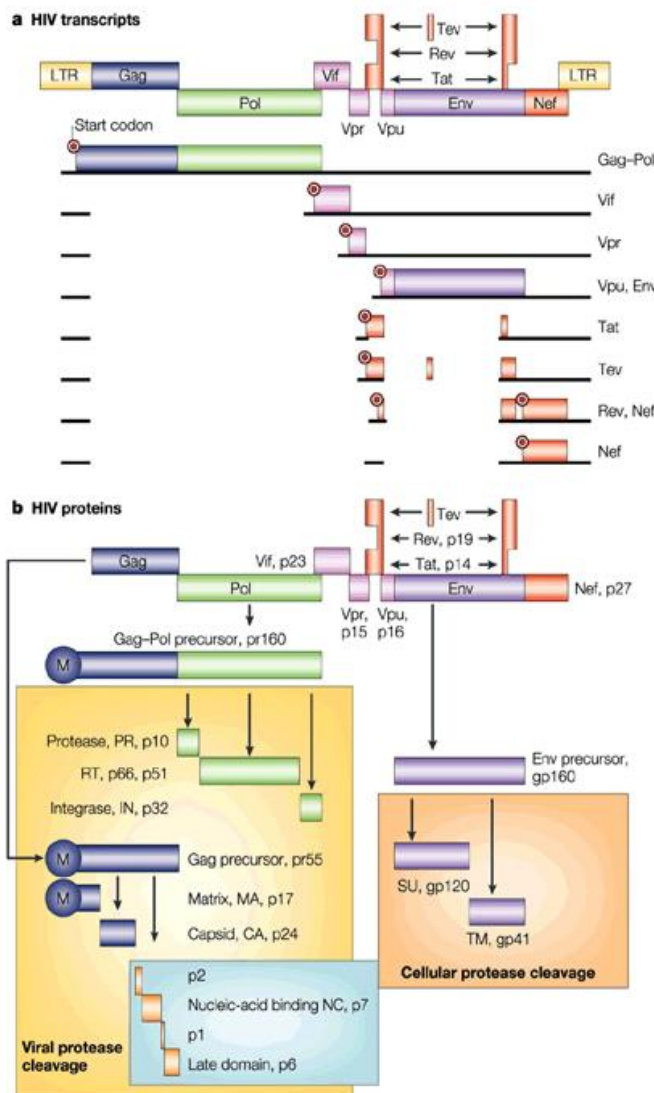


Abbildung 1.4: HIV Genom, Transkripte und Proteine.
a) Das 10 kb große virale Genom enthält offene Leseraster für 16 Proteine, die von mindestens 10 Transkripten synthetisiert werden.
b) Gag und Gag-Pol Vorläufer werden durch die virale Protease in neun Proteine prozessiert (gelbe Box). Env wird durch zelluläre Proteasen in gp120 und gp41 gespalten (orange Box).²²¹

gen) und *env*-Genen sind klassische strukturelle und enzymatische Faktoren, die alle Retroviren benötigen. HIV besitzt zusätzlich zwei regulatorische Proteine, Tat (transcriptional transactivator) und Rev (regulator of virion gene expression), sowie vier so genannte akzessorische Proteine, Nef (negative factor), Vif (viral infectivity factor), Vpr (viral protein r) und Vpu (viral protein u). Die akzessorischen Proteine werden für den Replikationszyklus *in vitro* nicht benötigt, erhöhen jedoch die Infektiosität des Virus *in vivo*. Die viralen Proteine werden von mehr als 30 mRNAs translatiert (in Abb. 1.4 sind lediglich 8 dargestellt), die alle von dem selben primären Transkript abgeleitet werden. Transkripte, die die frühen, meist regulatorischen Proteine kodieren (Tat, Rev, Nef) werden vollständig gespleißt, während die Transkripte für die späten viralen Proteine, die meist strukturelle oder enzymatische

Komponenten bilden, sowie Faktoren, die die Infektivität beeinflussen, nur einfach gespleißt oder ungespleißt sind. Rev reguliert das Umschalten zwischen früher und später Phase der viralen Genexpression, indem es den Transport der einfach gespleißten und ungespleißten viralen mRNA aus dem Nukleus in das Zytoplasma erlaubt. Tat und Nef haben nicht nur eine grundlegende Funktion für eine hohe Virusreplikation, sondern spielen auch eine wichtige Rolle im Schutz vor dem menschlichen Immunsystem.^{94,221}

1.2.2.3 REPLIKATIONSZYKLUS

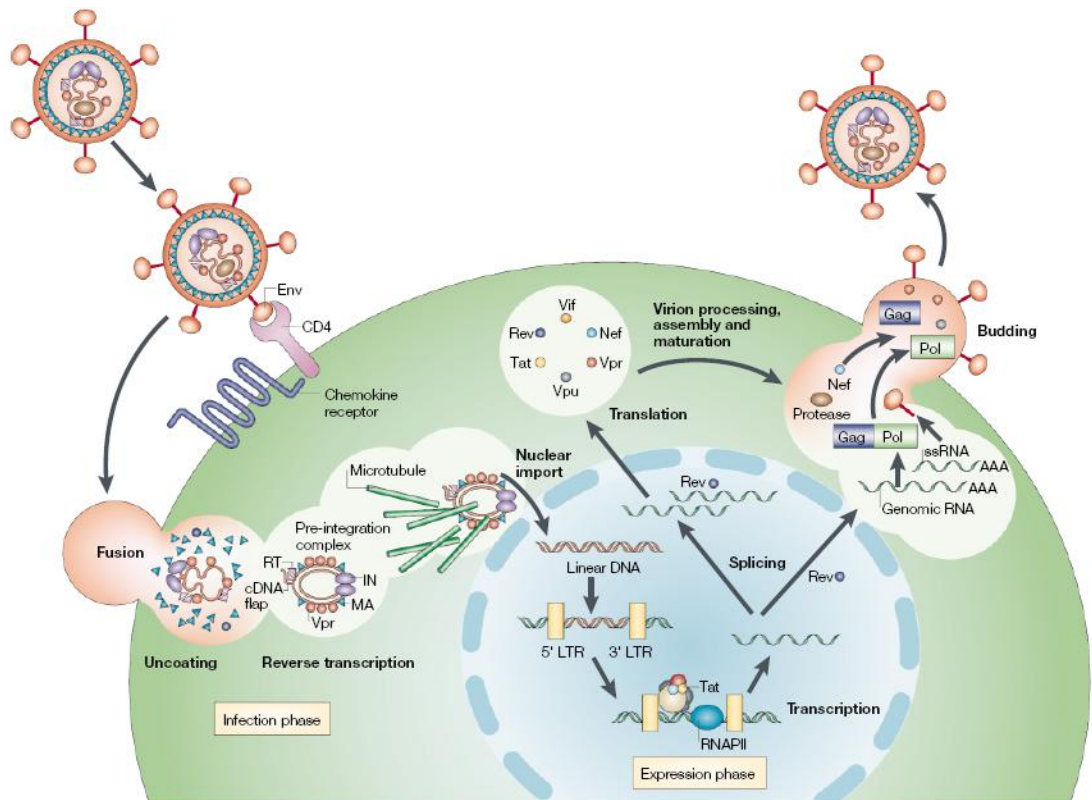


Abbildung 1.5: Der Replikationszyklus von HIV.

Nach der Bindung des viralen Hüllproteins an den CD4 Rezeptor und anschließenden konformellen Umlagerungen, erfolgt die Bindung an den Korezeptor und die Fusion der beiden Membranen. Die Reverse Transkription schreibt die virale RNA in eine komplementäre DNA um, der Präintegrationskomplex gelangt schließlich in den Kern und wird dort integriert. Virale Strukturproteine und Enzyme werden synthetisiert und zur Plasmamembran transportiert, an der neue Viren prozessiert, zusammgebaut und ausgeschleust werden.²²¹

HIV gelangt über den Austausch von Körperflüssigkeiten in den menschlichen Körper und infiziert hauptsächlich T-Helferzellen (T_H), Makrophagen, teilweise Mikrogliazellen und Dendritische Zellen (DCs). Diese als Tropismus bezeichnete Auswahl der Zielzelle wird primär zum Zeitpunkt des viralen Eintritts festgelegt. Neben CD4 als primären Rezeptor ist die Verwendung eines zweiten Rezeptors nötig. Dieser Korezeptor ist spezifisch für verschiedene Virusstämme und Zielzellen (siehe Abb. 1.5). R5-Stämme von HIV verwenden den CC-Chemokinrezeptor 5 (CCR5) als Korezeptor und können daher Makrophagen, Dendritische Zellen und T-Zellen infizieren. X4-Stämme hingegen verwenden CXCR4 als Korezeptor und können lediglich T-Zellen infizieren (siehe 1.4.2.1).⁷⁸ Zu Beginn einer HIV-Infektion werden überwiegend R5-Viren detektiert und mit fortschreitender Erkrankung dominieren X4-Viren, die den Untergang der T_H -Zellen beschleunigen und zum Vollbild AIDS führen.²⁰⁹ Dendritische Zellen scheinen eine wichtige Rolle im Transport der Viren vom Eintrittsportal zu den Lymphknoten zu spielen. Sie können produktiv durch das Virus infiziert sein oder es über einen Lektin-ähnlichen Rezeptor (DC-SIGN, DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin) einfangen und in einer infektiösen Form speichern, bevor sie es wieder an T-Zellen abgeben und diese aktivieren.^{98,147} Nach dem Eintritt wird die Virus-hülle entfernt, das RNA-Genom revers transkribiert und die entstehende doppelsträngige DNA

in das Chromosom der Zielzelle integriert. Zellkern-Lokalisationssignale an den Proteinen Integrase, Matrix und Vpr ermöglichen dem viralen Genom, durch die Poren des Zellkerns zu wandern.²²¹ Die Integration der cDNA in das Genom erfolgt mit einer Präferenz für aktive Gene und so genannte lokale „Hotspots“.^{136,251} In ruhenden Lymphozyten verhindern oft mehrere Faktoren das Abschließen der frühen Phase. Oftmals ist die Reverse Transkription ineffizient oder die verfügbare Energie in der Zelle ist für einen Transport in den Kern zu gering, wodurch das doppelsträngige Genom ohne Integration akkumuliert. Einmal aktiviert werden die T-Zellen jedoch vollständig permissiv für eine HIV-Infektion.²²¹ Nach Integration verhält sich das Provirus wie jedes andere menschliche Gen. Die Transkription beginnt am 5'-Ende und wird am 3'-Ende terminiert. Die einzelnen zellulären Faktoren, viralen Proteine und die detaillierten Abläufe, die in der Genregulation und Virusreplikation eine Rolle spielen und involviert sind, sollen hier nicht besprochen werden. Für interessierte Leser verweise ich auf meine Diplomarbeit und einige detaillierte Publikationen, die in den zitierten Rezensionen aufgeführt und zusammengefasst sind.^{57,109,129,276}

1.3 Der virale Hüllproteinkomplex

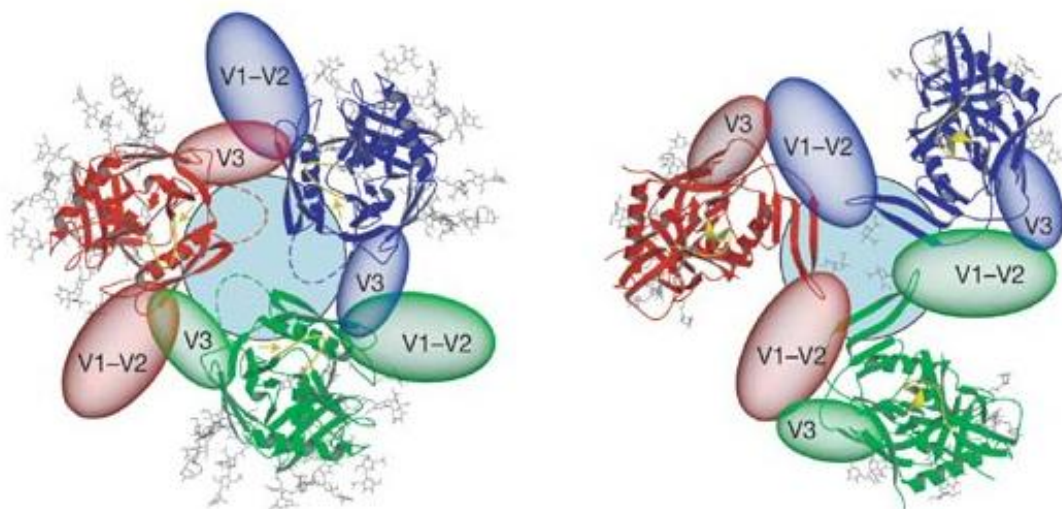


Abbildung 1.6: gp120/gp41 Trimermodell in ungebundener und CD4-gebundener Konformation.
Links Trimer in ungebundener Form. Blick von außen auf das Virion Richtung gp41 (blauer Kreis). Die drei Monomere des gp120 sind in rot, grün und blau dargestellt, deletierte Segmente in der Struktur (V1-V2, V3) als transparent-farbige Ovale, Zucker in grau. **Rechts** Gleicher Blickwinkel wie links, jedoch in CD4-gebundener Form. Die Strukturmodelle zeigen sehr deutlich die umfangreiche Umlagerung der Proteinfaltung nach Bindung an den CD4-Rezeptor.⁵³

Die Infektion mit HIV wird durch die Interaktion zwischen dem viralen Hüllprotein gp120 und dem zellulären CD4-Oberflächenmolekül initiiert. Die Bindung des gp120 an den CD4-Rezeptor verankert das Virus an die Zelloberfläche und eine weitere Interaktion mit Chemokinrezeptoren (Korezeptor) führt zu einer konformellen Umlagerung der viralen Hüllproteine, die zur Fusion der viralen und zellulären Membran führt (siehe Abb. 1.6 und 1.7).⁸³ Die Affinität von gp120 für den Chemokinrezeptor CXCR4 beträgt anhand einer Analyse mit SPR („surface plasmon resonance“) rund 500 nM.²³⁰

Das primäre Virus-spezifische Ziel auf HIV-1, welches für neutralisierende Antikörper zugänglich ist, sind die Hüllglykoproteine und hier vor allem das exponierte gp120. In der natürlichen Infektion werden neutralisierende Antikörper mit einem meist nur sehr niedrigen Titer gebildet.^{19,142,186,265} Um sich vor dem Angriff neutralisierender Antikörper an den Hüllproteinen zu schützen hat das Virus viele Verteidigungsmechanismen entwickelt. Die gp120 Proteine besitzen variable „Loops“ (V1-V5), die konservierte Strukturen und Domänen des Proteins vor der Bindung neutralisierender Antikörper abschirmen.^{225,296} Antikörper gegen den V3 Loop, der die Verwendung des Korezeptors festlegt³⁰⁰, können die Bindung von gp120 an CCR5 oder CXCR4 blockieren.²³² Obwohl die Neutralisation mit anti-V3 Antikörpern sehr potent erscheint, ist sie oft auf eine kleine Anzahl an HIV-Stämmen beschränkt (autologe Neutralisation). Jedoch gibt es hier auch Ausnahmen, die ein größeres Wirkungsspektrum haben (heterologe Neutralisation).^{106,107,266}

Die konservierten Regionen der Rezeptorbindungsstellen im gp120 Protein sind ein gutes Ziel für neutralisierende Antikörper.^{31,38,65,151,203,204,232,269,296,297} Antikörper gegen die CD4 Bindungsstelle (CD4bs) erkennen eine konformelle, also nicht-lineare Region, die teilweise mit der Bindungsstelle für CD4 überlappt. CD4 induzierte (CD4i) Antikörper binden an eine hoch konservierte Region, die für die Interaktion von gp120 mit dem Chemokinrezeptor wichtig ist. Diese Interferenz der Antikörper mit den Rezeptor- und Korezeptorbindungsstellen wird häufig für die neutralisierende Wirkung verantwortlich gemacht.

1.3.1 Das Glykoprotein gp120 im Detail

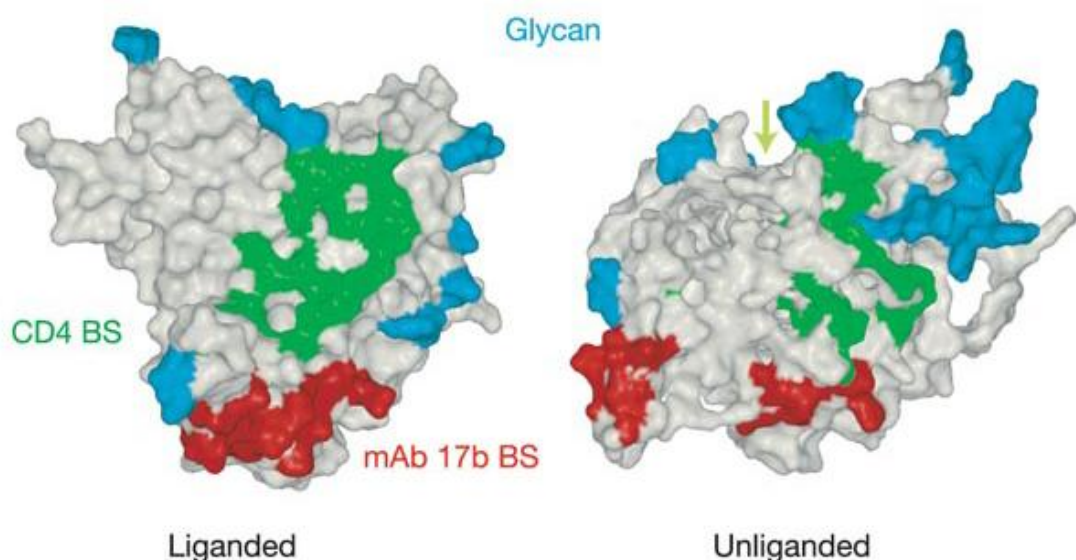


Abbildung 1.7: Das gp120 Protein mit den Bindungsstellen für CD4 und mAk 17b.

Molekulare Oberflächendarstellung von gp120 in ungebundener (rechts) und gebundener Form (links). Aminosäuren, die mit CD4 interagieren sind in grün dargestellt (CD4 BS), Aminosäuren, die den mAk 17b binden sind rot eingefärbt (mAb 17b BS) und überlappen teilweise mit der Korezeptorbindungsstelle, Aminosäurereste mit Glykosylierungsstellen sind blau.⁵³

Eine große Anzahl von Studien ermöglichten anhand von monoklonalen Antikörpern („epitope mapping“), Mutagenese („site-directed mutagenesis“) und Kristallographie ein ungefähres Bild

der Struktur und antigenen Topographie des gp120 Proteins, sowie des trimeren Komplexes (siehe Abb. 1.6 und 1.7).^{23,52,53,77,113,149-152,171,191-194,217,227,233,256,296,297,304,312}

Die CD4 Rezeptorbindungsstelle (CD4bs) liegt in einer Vertiefung an der Verbindungsstelle dreier Domänen, die die gp120 Struktur bilden: „outer domain“, „inner domain“ und „bridging sheet“. Die Bindungsstelle des CD4 Rezeptors ist innerhalb der HIV-Isolate recht konserviert und enthält keine Glykosylierungen. Die Korezeptorbindungsstelle befindet sich etwa im 90° Winkel zur CD4bs und besteht im Prinzip aus dem „bridging sheet“ und Teilen des V2 Loops. Ebenfalls an der Bindung des Rezeptors beteiligt sind Aminosäuren aus dem V3 Loop, die zudem für die Korezeptorspezifität verantwortlich sind.^{233,297,300}

Die Interaktionen zwischen dem Hüllprotein gp120 und seinen Rezeptoren ist komplex und benötigt konformelle Änderungen, die durch die Bindung an CD4 induziert werden.^{151,233,269} Die Struktur von gp120 im Komplex mit CD4 und dem mAk 17b wurde bereits im Jahr 1998 veröffentlicht und ist die Grundlage für alle bisher publizierten Strukturstudien an gp120.¹⁵¹ Um diese Struktur zu erhalten, mussten jedoch viele Kompromisse eingegangen werden. So sind die wichtigen Regionen von V1-V2 und V3 deletiert und nahezu 90 % der Glykosylierungen enzymatisch abgeschnitten. Die Struktur enthält in der publizierten Form etwa 67 % der Aminosäuren des vollständigen Proteins und hat ein Molekulargewicht von nur noch 35 kDa. Dennoch interagiert diese Kernstruktur („gp120 core“) vergleichbar zum vollständigen Protein mit CD4 und einer Anzahl von Antikörpern.^{151,227} Der Nachteil dieser Struktur ist, dass sie bereits die CD4-gebundene Form darstellt, also nicht die Konformation des gp120 Proteins im natürlichen CD4-ungebundenen Trimer widerspiegelt. Für die Analyse von Antikörpern, die Viren in ungebundener Form binden (also keine CD4 induzierte Epitope erkennen), ist das ein eher ungünstiges Modell. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation mit der Struktur des ungebundenen und vollständig glykosylierten gp120 Moleküls wurde gezeigt, dass sich durch die Bindung an CD4 nahezu die Hälfte des Proteins umfaltet und Teile des Proteins um 40 Angström bewegt werden - eine der größten Proteinumfaltungen, die je für eine Proteindomäne beobachtet wurde (siehe Abb. 1.7).^{52,53,133,148} Die CD4bs und die konservierte Korezeptorbindedomäne werden durch die hypervariable V1-V2 Loopstruktur getarnt.²⁹⁷ Vor allem in der oligomeren, funktionellen Form von gp120 sind diese relativ konservierten Rezeptorbindungsstellen für Antikörper sehr schwer zugänglich. Trotz einiger Modelle ist die Struktur des nativen trimeren Hüllkomplexes (aus gp120 und gp41) nach wie vor im Detail unbekannt.^{52,53,151,152} Die multiple Bindung einiger CD4 Rezeptoren an einen trimeren gp120 Hüllproteinkomplex verändert die Lage des V1-V2 Loops, sowie des V3 Loops und gibt die Korezeptorbindungsstellen frei. Flexible Elemente im CD4 Molekül bringen die Virusmembran und Zellmembran in Kontaktnähe und weitere konformelle Umlagerungen aktivieren die Fusionsreaktion des gp41 und letztendlich verschmelzen Virus- und Zellmembran. Die Assoziation von gp120 mit gp41 ist instabil und besteht aus offensichtlich schwachen, nicht-kovalenten Interaktionen. Regionen am N- und C-Terminus von gp120 bilden eine diskontinuierliche Bindungsdomäne für gp41.²⁹⁷ Die korrespondierende Region im gp41 für die Bindung an gp120 besteht aus einer vermeintlich N-terminalen, helikalen

Region und einer kurzen, intramolekularen Disulfidbrückenschleife. Die Struktur des im Trimer vorliegenden gp41 ist gänzlich unbekannt, bisher gibt es lediglich eine Struktur des Sechs-Helix-Bündels.⁴⁹ Jedoch wurden auch für gp41 antigene Epitopkarten erstellt, die einen groben Überblick über immunogenen Regionen und Antikörperbindungsstellen erlauben.^{50,82,127,244,312}

Untersuchungen identifizierten drei entscheidende und für die Neutralisation unterschiedlich wichtige Bereiche („faces“) im gp120 Molekül. Die neutralisierende Seite („neutralizing face“) enthält Epitope für Antikörper, die im Hüllproteintrimer binden können und eine neutralisierende Wirkung haben. Die nicht-neutralisierende Seite dagegen („non-neutralizing face“) besteht aus Epitopen, die ineffektiv in der Neutralisation sind. Vermutet wird, dass diese Region im trimeren Hüllproteinkomplex unzugänglich ist. Ein dritter Bereich ist hauptsächlich durch Glykosylierungsmuster vor dem Immunsystem abgeschirmt und daher kaum antigen („silent face“).^{41,134,214} Die variablen Loops schützen konservierte Regionen des Proteins vor Angriffen durch neutralisierende Antikörper. Und in der Tat zeigen Viren mit Deletionen in diesen Bereichen eine erhöhte Sensitivität vor Neutralisation, was die These eines Schutzschildes („variable loop shield“) stützt.¹³⁴ Die gleiche Funktion wird den Glykosylierungen zugesprochen. Im Schnitt enthält der Hüllproteinkomplex 28 potentielle N-Glykosylierungsstellen (24 in gp120 und 3-5 in gp41). Diese N-Glykane machen nahezu 50-60 % der Proteinmasse aus und Viren, die durch Deletionen wichtige N-Glykosylierungsstellen verlieren (z.B. im V3 Loop), zeigen eine erhöhte Neutralisierbarkeit.^{134,139}

Die Oberfläche der Interaktion zwischen CD4 und gp120 ist sehr groß und bedeckt eine Fläche von etwa 800 \AA^2 auf gp120 und 740 \AA^2 auf CD4. In diese Bindung ist ein ungewöhnlich großer Hohlraum auf gp120 involviert. Durch die Bindung von CD4 an gp120 wird diese Aushöhlung durch das Phenylalanin 43 („Phe-43 cavity“) von CD4 verschlossen, eine entscheidende Interaktion für die gp120-CD4 Bindung.^{151,227} Durch Mutagenesestudien und Analysen anhand monoklonaler Antikörper wurden die Aminosäuren bestimmt, die für die CCR5 Korezeptorbindung verantwortlich sind. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die CCR5 Bindungsstelle eine der höchst konservierten Regionen in gp120 darstellt, noch konservierter als die CD4 Bindungsstelle. Die Freilegung der Bindungsstelle benötigt jedoch die Bindung von CD4. Die Bindung von CD4 verändert die Lage der V1-V2 Loops und führt zur Freigabe der Korezeptorbindungsstelle.^{227,233} HIV-1 kann jedoch ganze Antikörpermoleküle von der Bindung an die CD4 induzierten Epitope ausschließen: durch die räumliche Enge zur zellulären Membran und durch die Blockade anhand der variablen Loops V1-V2.¹⁵³ Zwischen Membran und einem an CD4 gebundenen Trimer ergibt sich etwa eine Lücke von 45 \AA . Ein komplettes IgG Molekül benötigt jedoch etwa 115 \AA , ein Fab-Fragment 60 \AA und ein Fv Fragment 40 \AA .¹⁵³ Demnach ist die Neutralisation über die CD4 induzierten Epitope mit natürlichen Antikörpern auch ein sterisches Problem.

1.4 Die Immunantwort bei HIV

1.4.1 Der klinische Verlauf einer HIV-Infektion

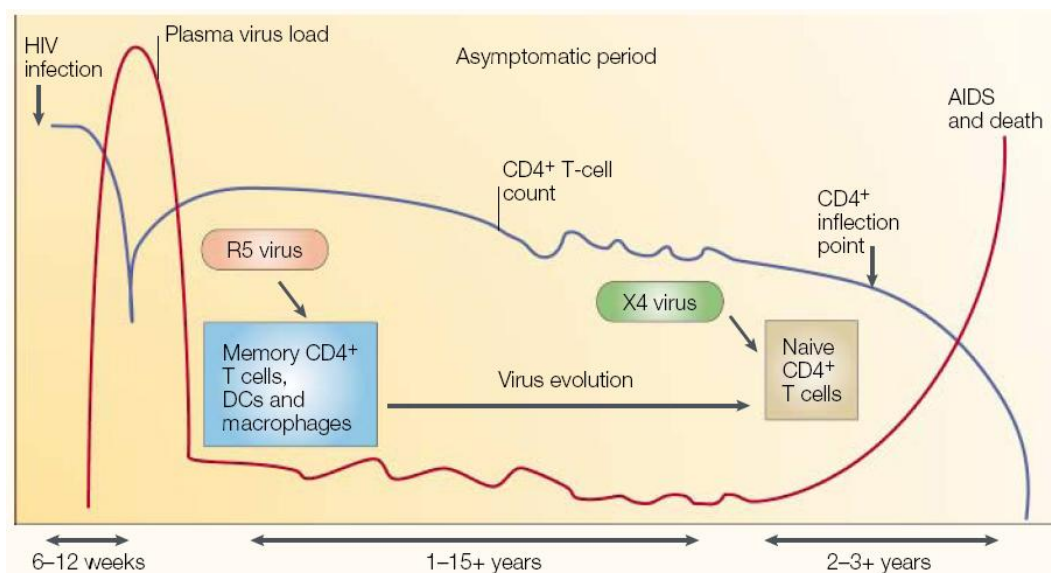


Abbildung 1.8: Der klinische Verlauf einer HIV-Infektion.

Das Diagramm zeigt das Verhältnis zwischen der HIV-1 Viruslast (rote Linie) und der CD4-T-Zellzahl (blaue Linie) über einen Zeitraum für eine typische, unbehandelte HIV-Infektion.²³⁸

Das normalerweise intakte Immunsystem zum Zeitpunkt einer HIV-Infektion reagiert auf die fremden viralen Komponenten mit der üblichen Abwehrreaktion. Zunächst wird die virale Infektion zellvermittelt bekämpft. Natürliche Killerzellen (NK Zellen) lysieren virusinfizierte Zellen und durch virale Peptide aktivierte zytotoxische T-Zellen (CTLs) greifen infizierte Zellen an. Nach zwei bis drei Wochen sind die ersten IgM-Antikörper nachweisbar, worauf die IgG-Produktion folgt. Die Immunantwort der IgGs bleibt lebenslang nachweisbar, wobei im Endstadium von AIDS die meisten Antikörper im Blut durch freie Virenpartikel abgefangen werden. Diagnostisch ist eine HIV-Infektion meist nach vier bis fünf Wochen, in seltenen Fällen erst um die neunte Woche, nachweisbar (serologisch diagnostisches Fenster). Sind spätestens nach 12 Wochen keine Antikörper nachweisbar, so ist eine Infektion unwahrscheinlich. Zusätzlich ist jedoch der Nukleinsäurenachweis über PCR zu empfehlen um jedes Risiko auszuschließen. Dieser muss auch bei dem Nachweis des Virus bei neugeborenen Kindern angewendet werden. Die Sensitivität moderner Anti-HIV-Tests liegt bei 99,9 %, die Spezifität bei über 95 %.

In den ersten sechs Wochen findet bei den meisten Infizierten die so genannte Serokonversion statt. Im Serum der Patienten lässt sich eine hohe Konzentration von p24-Antigen, sowie virale RNA nachweisen und die Patienten leiden unter Fieber, Muskelschmerzen, makulopapulärem Ausschlag und Lymphadenopathie. In der akuten Phase kurz nach der Infektion beträgt die Virusverdopplungszeit 10 Stunden und der Höhepunkt der Viruslast erscheint nach etwa drei bis vier Wochen (siehe Abb. 1.8). Durch die Immunantwort verschwinden die Symptome auch ohne Behandlung, die Viruslast im Blut sinkt und die CD4⁺-Zellzahl normalisiert sich. Der weitere Krankheitsverlauf wird vermutlich durch die an diesem Zeitpunkt vorliegende Viruslast be-

stimmt. In der folgenden symptomlosen Phase, die über Jahrzehnte andauern kann, steigt die Viruslast kontinuierlich an und die Helferzellzahl sinkt. Menschen ohne HIV-Infektion haben eine CD4⁺-Zellzahl von 700-1000 Zellen/ μ l, HIV-Infizierte mit relativ stabilem Immunsystem mehr als 500 Zellen/ μ l. Fällt die Zahl unter 200 Zellen/ μ l steigt das Risiko für opportunistische Infektionen und man spricht vom Vollbild AIDS, das Immunsystem ist zusammengebrochen. Das Umschalten des Virus von CCR5 zu CXCR4 als Korezeptor erhöht zu dieser Zeit die Wirtszellbreite und führt zu einem schnellen Abfall der Helferzellzahl (siehe 1.4.2.1).^{64,124,174}

Die Arbeit, die das Immunsystem bei einer HIV-Infektion zu leisten hat, ist immens: pro Tag werden in etwa 10^{10} Viren gebildet und 10^9 CD4⁺-T-Lymphozyten zerstört. Produktiv infizierte Zellen haben eine Lebenszeit von ungefähr 2,2 Tagen, Viren im Plasma leben etwa 12 Stunden. Der minimale Zeitaufwand für einen HIV-Replikationszyklus beträgt im Schnitt 1,2 Tage und die durchschnittliche Generationszeit (von der Freisetzung eines Virus über die Infektion einer neuen Zelle bis zur Freisetzung einer neuen Generation an Viren) wurde mit 2,6 Tagen bestimmt.^{58,220} Die Zahlen beweisen, wie schwer es für das Immunsystem und den menschlichen Körper sein muss, eine HIV-Infektion dauerhaft zu bekämpfen. Je nach Zustand des Immunsystems zum Zeitpunkt der Infektion wird der Körper mehr oder weniger erfolgreich im Kampf gegen das Virus sein. Das dies dennoch bei einigen Patienten - die auch Grundlage dieser Studie sind - der Fall ist, wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

1.4.2 Die nicht-progressive HIV-Infektion

Der Krankheitsverlauf einer HIV-Infektion kann sehr verschieden sein. Einige Patienten entwickeln bereits nach Monaten oder ein bis zwei Jahren das Vollbild AIDS und werden als „Rapid Progressors“ (RPs) bezeichnet. Andere dagegen scheinen ein sehr stabiles Immunsystem zu besitzen und leben Jahrzehnte mit der Infektion ohne nennenswerte Progression zu AIDS. Diese Patienten werden als „Slow Progressors“ (SPs), „Late Progressors“ (LPs), „Non Progressors“ (NPs) oder auch „Long-Term Non-Progressors“ (LTNPs) bezeichnet. Die Einordnung der stabilen Patienten in diese verschiedenen Bezeichnungskategorien wird sehr unterschiedlich gehandhabt und lässt sich nur schwer an bestimmten klinischen Markern festmachen. Die Grenzen sind meist fließend. Eine Gemeinsamkeit ist jedoch, dass diese Patienten weit über die durchschnittlichen zehn Jahre mit der HIV-Infektion leben, ohne Anzeichen von AIDS und die Anwendung einer modernen Medikamenten-Therapie.

Die Einteilung der Patienten in die zwei hauptsächlichen Gruppen (Progressors oder Non-Progressors) wird meist anhand der CD4⁺-Zellzahlen, sowie der Viruslast im Blut vorgenommen, da diese diagnostischen Marker ein wichtiges biologisches Merkmal der AIDS-Progression darstellen. HIV-Infizierte mit mehr als 36000 HIV-RNA-Kopien/ml entwickeln das Vollbild AIDS innerhalb von fünf Jahren, während dies nur 8 % der Patienten mit einer Viruslast unter 4500 RNA-Kopien/ml tun. Die Viruslast in nicht-progressiven Patienten ist normalerweise 20 mal niedriger als in Patienten mit Progression.^{45,211} Die latente Phase der HIV-Infektion, in der im peripheren Blut kaum eine Virusreplikation zu messen ist, trägt. In den Lymphknoten, die ein be-

trächtliches Reservoir für das Virus darstellen, läuft die Virusreplikation ungehindert und unbeobachtet weiter. Diese hohe Virusaktivität führt zur Zerstörung der Lymphknotenarchitektur über den Zeitraum der Infektion. Eine Therapie mit antiretroviralen Medikamenten kann auch bei relativ fortgeschrittenem Krankheitsstadium zu einer - wenn auch langsamen - Wiederherstellung dieser Struktur führen. Lymphknoten von LTNPs zeigen eine relativ normale Struktur mit nur kleinen Anzeichen follikulärer Lyse, wohingegen progressive Patienten eine hohe Schädigung der Organe aufweisen. Immunologische Faktoren, die die Virusreplikation in den Lymphknoten kontrollieren ohne dabei die Organarchitektur zu zerstören, könnten demnach ein guter Marker für den verspäteten Krankheitsverlauf darstellen.²¹¹ Untersuchungen zeigten, dass in RPs eine auffallend geringe virale Diversität im *Env* vorliegt, während in SPs und LTNPs eine Diversifizierung der Quasispezies stattfindet. Dies wird auf einen hohen Selektionsdruck durch das menschliche Immunsystem zurückgeführt, welches das Virus zu einer drastischen molekularen Divergenz kurz nach der Infektion treibt. Das Ausbleiben des Selektionsdrucks in der frühen Phase der Infektion führt zu einer hohen Virusreplikation und AIDS-Progression. Die Daten lassen vermuten, dass eine auftretende höhere genetische Diversität auf ein kompetentes Immunsystem schließen lässt und mit einer längeren Überlebensdauer assoziiert ist.^{72,180,240} Neben der genetischen Diversität in strukturellen oder enzymatischen Genen, können einfache Aminosäureaustausche oder -additionen eine wichtige Rolle für die Verlängerung der asymptomatischen Krankheitsphase spielen. Die Verlängerung der V2-Region in gp120 durch mehrere Asparagine wurde vorherrschend bei Virusstämmen aus SPs und LTNPs gefunden.²⁸³ Viele Studien zeigen, dass Defekte in regulatorischen oder akzessorischen Genen, wie *vpr*, *vif*, *vpu*, *rev*, *tat* und *nef* mit der Nicht-Progression korrelieren können. Ob und inwieweit eine einzelne Determinante das vollständige Ausbleiben einer AIDS-Progression erklären kann, ist nach wie vor unklar.²⁴⁰ Im folgenden sollen nun einige Faktoren, die zu einem solchen nicht-progressiven Krankheitsverlauf führen können, besprochen werden. Hierzu zählen sowohl virale Faktoren, wie Deletionen oder Mutationen in wichtigen viralen Genen, als auch Wirtsfaktoren, wie Polymorphismen in Rezeptorgenen oder durch aktivierte T-Zellen produzierte antivirale Faktoren.

1.4.2.1 CHEMOKINREZEPTOREN UND CHEMOKINE

Der virale Phänotyp korreliert mit der Fähigkeit, unterschiedliche Korezeptoren zu verwenden. T-tropische Virusstämme nutzen CD4 und CXCR4 (X4-trope Viren), M-tropische Stämme CD4 und CCR5 (R5-trope Viren) für den Viruseintritt. Die Fähigkeit der Viren beide Korezeptoren parallel (dualtrope Viren) zu benutzen wird mit einem rascheren Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht („Coreceptor switch“). LTNPs halten meist ausschließlich die Verwendung von CCR5 als Korezeptor aufrecht und produzieren teilweise große Mengen an β -Chemokinen, den natürlichen Liganden von CCR5.^{87,146,180,301} Eine Deletion von 32 Basenpaaren im offenen Leseraster für CCR5 kodiert für ein nicht-funktionelles CCR5 Protein und ist mit einer gewissen Resistenz gegen eine HIV-1 Infektion verbunden.⁷³ Diese CCR5 Δ 32bp-Deletion ist in etwa 1 %

der kaukasischen Bevölkerung zu finden und wurde mit einer verlangsamten Progressionsrate in Verbindung gebracht.^{59,87,108,146,294}

1.4.2.2 DEFEKTE IN VIRALEN GENEN

Einige Studien zeigen, dass LTNPs oft mit abgeschwächten oder defekten Viren infiziert sind, die durch eine langsamere Replikationskinetik und geringe Viruslast im Plasma, die Progression zum Vollbild AIDS verzögern. Eine Extension der V2-Domäne des gp120 wurde ausschließlich in SPs und NPs gefunden und scheint in der stetigen Aufrechterhaltung der CCR5 Korezeptorverwendung involviert zu sein.^{166,180,283}

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass die akzessorischen Gene und vor allem *vpr*, in der viralen Pathogenese eine wichtige Stellung einnehmen, da ihre Funktionen in der viralen Aktivierung, der Unterdrückung wichtiger Immunsystemfunktionen, der Depletion von Wirtszellen und auch in der viralen Reifung liegen. Eine vergleichende Untersuchung zwischen LTNPs und RPs ergab eine Anhäufung hoher genetischer Diversität in den akzessorischen Genen von LTNPs. Für *Vpr* sind ein Q3R Polymorphismus und ein Polymorphismus in einem N-terminalen Helixmotiv beschrieben. *Nef* ist essentiell für die Pathogenese *in vivo*, ermöglicht eine hohe virale Last und ist wichtig für den Krankheitsverlauf. *Nef* ist in die Bindung an CD4, sowie in die Verringerung dessen Oberflächenexpression involviert und zudem zuständig für die Interferenz mit der antiviralen Immunantwort, indem es die MHC-I Moleküle auf der Oberfläche infizierter Zellen herunterreguliert.^{9,99,134} Studien ergaben ein widersprüchliches Bild, da Versuche mit *nef*-deletierten SI Viren in den meisten Primaten kein AIDS verursachten, in einer Patientenkohorte jedoch *nef*-Deletionen und -umordnungen den Wendepunkt zur AIDS-Progression bedeuteten.²⁴⁰ Wie die *Nef*-Expression die Progression oder Nicht-Progression moduliert und welche Rolle es im viralen Zyklus einnimmt muss durch weitere Studien aber erst untersucht werden. Auch für *vif* wurde eine Veränderung beschrieben, die mit einer niedrigen Viruslast im Plasma einhergeht, bei *Vpu* wurde eine vier Aminosäureninsertion in einigen LTNP-Patienten gefunden und für *Rev* wurden beeinflussende Aminosäureaustausche beschrieben.^{5,180,264}

Abschließend lässt sich sagen, dass es in der publizierten Literatur trotz vieler Studien keine wirklichen „Konsensus-Mutationen“ gibt, die mit der nicht-progressiven HIV-Infektion in Verbindung gebracht werden können. Vielmehr scheint es wichtig zu sein, die molekularen Faktoren, die eine HIV-Infektion beschleunigen oder auch verzögern, immer im Zusammenhang mit den Wirtsfaktoren zu interpretieren. Die Identifizierung solchen Polymorphismen und die Auswirkung auf das Virus geben aber Aufschluss über mögliche therapeutische Eingriffe und Überlegungen für den Nutzen im Design neuer antiretroviraler Strategien.

1.4.3 Die zelluläre Immunantwort

Die erste immunologische Reaktion gegen eine virale Infektion ist zellvermittelt. Virusinfizierte Zellen können durch so genannte natürliche Killerzellen (NK Zellen) lysiert werden. CD4⁺-Zellen werden durch ein Antigen (virale Peptide) aktiviert, welches dendritische Zellen auf ihren MHC-II-Komplexen präsentieren und produzieren infolge der Infektion Interleukine und Interferone (Zytokine). T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1) produzieren überwiegend Interleukin-2 und Interferon- γ (IL-2, IFN- γ), Typ 2 hauptsächlich IL-4 und IL-10. T_H2-Zellen sind für die Aktivierung der humoralen Antwort entscheidend, T_H1-Zellen aktivieren durch die Zytokinbildung natürliche Killerzellen, die daraufhin infizierte Zellen angreifen. Zytotoxische CD8⁺-Zellen (CTLs, cytotoxic T-Lymphocytes) reagieren auf präsentierte Peptide auf MHC-I Komplexen.

Die Stärke der anfänglichen zytotoxischen T-Zellantwort gegen HIV-1 korreliert mit einem langsameren Abfall der CD4⁺-Zellzahl und galt daher schon lange als eine entscheidende Kontrolle der viralen Replikation.¹⁹⁸ In gesunden, nicht HIV-1 infizierten Menschen befinden sich die meisten T-Zellen in der Ruhephase. Das ändert sich nach einer HIV-Infektion. Der Mensch besitzt etwa 10¹² Lymphozyten, wovon sich 98 % in den Lymphknoten befinden. 0,5 % (10⁹) enthalten bei HIV-positiven Personen unintegrierte HIV-DNA, 0,05 % (10⁸) integrierte latente HIV-DNA und nur 0,005 % (10⁷) produzieren aktiv Viruspartikel.^{58,281} Die Zahl an aktiv HIV produzierenden Zellen ist demnach eher gering, doch die Anzahl latent infizierter Zellen ist enorm. Und diese können nach geeigneter Stimulation den Körper mit Viren überschwemmen. Die latent infizierten Zellen entgehen jeder antiviralen Therapie, sowie dem Immunsystem und stellen ein immenses Virusreservoir dar. Die zu Beginn infizierten CD4⁺-Zellen haben eine relativ kurze Halbwertszeit, Gedächtniszellen jedoch stellen einen regelrechten Zufluchtsort für HIV-1 Proviren dar und besitzen eine Halbwertszeit von 22 Wochen.⁹¹

In der primären und auch chronischen Infektion spielen die CTLs eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Infektion.^{143,146,198,240} Sowohl in LTNPs als auch in RPs wurden hohe Zahlen an HIV-spezifischen CTLs gefunden. Eine wirklich konsistente Beziehung zwischen CTL-Immunantwort, Virämie und Progressionsstatus konnte jedoch in keiner der Studien festgestellt werden.

1.4.4 Die humorale Immunantwort

Die humorale Immunantwort wird durch die CD4⁺-Zellen vom Typ 2 stimuliert, die präsentierte Peptide auf den MHC-II Komplexen erkennen und dadurch aktiviert werden. Die von den T_H2-Zellen produzierten Interleukine IL-4, IL-5 und IL-6 aktivieren B-Zellen zur Differenzierung und Produktion von IL-6, welches Plasmazellen zur Produktion von Antikörpern anregt. Zudem inhibiert das von T_H2-Zellen gebildete IL-10 die Entwicklung von T_H1-Zellen.

In der Serokonversionsphase entwickelt das Immunsystem vor allem Antikörper gegen die Hüllproteine gp120 und gp41. Empfindlich für die Neutralisation mit Antikörpern sind die V3 Region, die CD4-Bindungsdomäne und der V1- und V2-Loop, wobei die Epitope sowohl linear, also auch konformell sein können.^{40,125,157,192,295,312,313} Untersuchte Plasmaproben zum Zeitpunkt der Sero-

konversion zeigten widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Neutralisationsfähigkeit. Eine zunächst schwache Neutralisation stieg im Verlauf der Krankheit gegenüber dem in der akuten Phase isolierten Virustyp an. Weiterhin konnte eine Neutralisation des autologen Virus auf Makrophagen bereits nach zwei Monaten festgestellt werden, auf Lymphozyten jedoch erst nach einem Jahr, bei anderen Gruppen bereits nach sechs Monaten.^{1,3,8,143,164,186,219,222,239,274} Patientenserien zeigen häufig Neutralisationseigenschaften gegen autologe Viren, die sechs bis zwölf Monate vor Blutentnahme isoliert wurden, jedoch nicht gegen Viren, die zum selben Zeitpunkt isoliert wurden.⁷ Die Bildung neutralisierender Antikörper ist demnach etwas zeitversetzt und ermöglicht dem Virus durch Variantenbildung dem Immunsystem zu entkommen („immune escape“). In Studien zeigte sich, dass neutralisierende Antikörper protektiv wirken und auch die Virämie - gerade auch zu Beginn der Infektion - reduzieren können.^{38,84,103,234,312} In höheren Mengen eingesetzt ist es möglich, den Krankheitsverlauf zu verzögern und eine Infektion zu verhindern.^{118,272,277}

1.4.5 Die Neutralisation

Die Aktivität von Antikörpern gegen Virionen wird häufig als Neutralisation bezeichnet und ist definiert als der Verlust der Infektiosität infolge einer Bindung von Antikörpermolekülen an den Viruspartikel ohne das Zutun eines weiteren Agens.^{37,214}

Für HIV-1 konnte eine gute Korrelation zwischen Neutralisation und Bindung der Antikörper an die Hüllproteine gezeigt werden.^{41,93,216,243} Bei der Messung solcher Bindungen können aber irreführende Probleme auftauchen. Die Hüllproteinkomplexe von HIV-1 können Komponenten „abwerfen“ (bekannt als „shedding“), die teilweise hervorragend durch Antikörper gebunden werden und dadurch einen wichtigen „escape“-Mechanismus von HIV-1 darstellen. Die gleichen Antikörper sind jedoch nicht in der Lage funktionelle Hüllproteinkomplexe zu binden. Dies ist sehr signifikant, da viele nicht-neutralisierende oder auch neutralisierende Epitope im oligomeren HIV-1 Hüllproteinkomplex für eine Antikörperbindung nicht zugänglich sind, während diese im monomeren gp120 exponiert sind oder gar nicht vorkommen.^{79,188} Die Bindung an funktionelles Hüllprotein und die damit verbundene Neutralisation zeigt eine gute Korrelation zwischen halb-maximaler Antikörperbindung und der Antikörperkonzentration, die für eine 50 %ige Neutralisation benötigt wird. Dies lässt vermuten, dass die Neutralisation in direktem Verhältnis zur Bedeckung von potentiellen Antikörperbindungsstellen auf dem Virion steht.⁴³

1.4.6 Neutralisierende Antikörper in der HIV-Infektion

Neutralisierende Antikörper üben während der Infektion Druck auf das Virus aus, welches mit „Escapevarianten“, vor allem durch Mutationen im Hüllprotein, reagiert. Eine interessante Entdeckung ist, dass 95 % der Nukleotidmutationen im gp120 Hüllprotein zu einem Aminosäureaustausch führen.¹³⁴ Ob neutralisierende Antikörper zu Beginn einer Infektion wirklich protektiv wirken, sollte in zwei Studien mit einem SIV/Makakken Modell geklärt werden.^{135,248} Beide Studien zeigten, dass neutralisierende Antikörper bei der chronischen Infektion eine Rolle spielen,

was jedoch die Rolle bei der akuten Infektion betrifft, sind sich die Studien nicht einig. Die erste Gruppe spricht von einem eher limitierten Effekt²⁴⁸, die zweite Gruppe glaubt, die Rolle der neutralisierenden Antikörper zu Beginn der Infektion werde unterschätzt¹³⁵. Dass Antikörper gegen die Hüllproteine einen entscheidenden Schutz für den Verlust der CD4-Zellen darstellen können, zeigte sich in einer weiteren Studie mit Makakken.⁶ Dass eine solche schützende Immunantwort jedoch mit einer komplexen und längeren Antikörperreifung in Verbindung steht, wurde bereits gezeigt.⁶³ Eine sehr neue Studie an Menschen zeigte, dass der passive Transfer potent neutralisierender monoklonaler Antikörper in einer chronischen HIV-Infektion effektiv wirken und das Virus zeitweise unter Kontrolle halten kann.²⁷² Die benötigten Antikörpermengen waren vergleichbar mit den bereits im Tiermodell beschriebenen Konzentrationen.

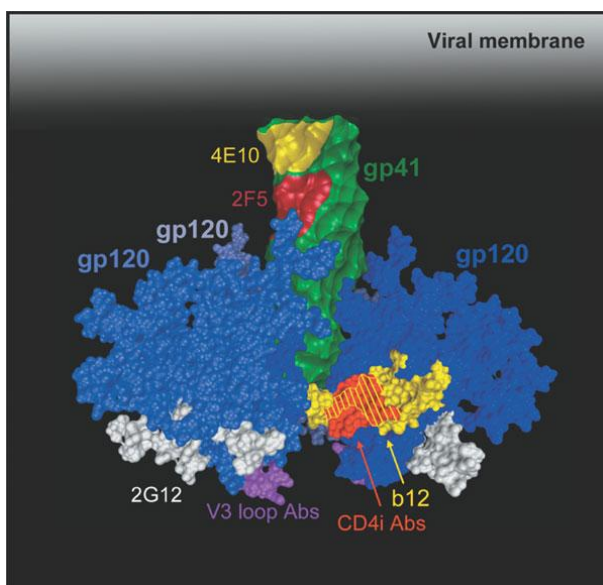


Abbildung 1.9: HIV-1 Hüllproteintrimer.

Das Modell eines funktionellen Hüllproteintrimer zeigt die Lage bekannter Epitope breit neutralisierender Antikörper (siehe Text).³⁹

Die Untersuchung HIV-infizierter Patienten bewies, dass neutralisierende Antikörper in die Kontrolle der viralen Replikation während der ersten Monate nach Infektion involviert sind und einen signifikanten Druck auf das Virus ausüben.^{231,239} Innerhalb der ersten zwei Monate nach Infektion konnten potente, autolog (aber nicht heterolog) neutralisierende Antikörper detektiert werden. Die während der Infektion gebildeten Antikörper zwingen das Virus zu spezifischen Mutationen, die zwar schrittweise, aber kontinuierlich in das HIV *env*-Gen eingeführt werden. Eine dieser Veränderungen betrifft das Glykosylierungsmuster des viralen Proteins gp120.²⁸⁹ Dieses Konzept eines sich entwickelnden „glycan shield“ wurde daher als Mechanismus postuliert, der Neutralisation durch Antikörper zu entkommen. Die Glykosylierungsmuster können auch außerhalb der bekannten neutralisierenden Determinanten liegen und sich über die Infektion strategisch verändern und umgelegt werden, um einen minimalen Effekt für die Interaktion des Hüllproteins mit den Rezeptormolekülen der Zelle zu erzielen, aber die Bindung neutralisierender Antikörper maximal zu beeinflussen. In seltenen Fällen können solche Zuckerreste, die ein wichtiges Epitop abschirmen, selbst zum Ziel neutralisierender Antikörper werden. Der breit neutralisierende Antikörper 2G12 erkennt terminale Mannosereste an Asparaginen des V3-Loops und der C3-Region, ohne dass darunter liegende Aminosäuren in die Bindung involviert sind (siehe Abb. 1.9 und Tabelle 1.1).^{241,247}

Einige neutralisierende monoklonale Antikörper, die ihre Epitope nach Bindung des Virus an CD4 erkennen („CD4 induced epitopes“, CD4 induzierte Epitope, CD4i), wurden aus Patienten isoliert und charakterisiert. X5 stammt aus einem HIV-infizierten Patienten mit relativ hohem kreuz-

neutralisierendem Antikörpertiter und wurde aus einer Phagenbank identifiziert.¹⁹⁶ Vier weitere Antikörper (23e, 49e, 21c und E51) erkennen ebenso die CD4 induzierten Epitope und wurden aus einem LTNP isoliert.^{298,299} Obwohl ihre Epitope zum Teil mit der CCR5-Bindungsstelle überlappen oder diese umgeben, neutralisieren sie sowohl R5- also auch X4-Isolate, was vermuten lässt, dass ihre Epitope nicht spezifisch für die CCR5-Bindung sind. Die Zugänglichkeit solcher Epitope für potentiell neutralisierende Antikörper wird durch eine Konformationsänderung erschwert, da diese erst nach Bindung an CD4 stattfindet.¹⁴⁹ Die Identifizierung einiger Antikörper gegen solche Domänen zeigt jedoch, dass diese zumindest in einigen Patienten immunogen wirken und aufgrund ihrer Neutralisierbarkeit ein interessantes Ziel für die Vakzineentwicklung darstellen.

Eine sehr prominente Region des gp120 Moleküls ist der variable V3-Loop, der aber trotz Variabilität Angriffspunkte für neutralisierende Antikörper enthält. Die meisten Antikörper gegen den V3-Loop, die z.B. durch Vakzinierung mit V3-Domänen oder Hüllprotein-Monomeren entstehen, erkennen lineare Epitope und besitzen keine kreuzneutralisierende Aktivität. Es wurden jedoch bereits anti-V3 Antikörper aus Patienten isoliert, die konformelle Epitope der unterschiedlichsten HIV-1 Subtypen erkennen.¹⁰⁷ Die Vermutung ist, dass der V3-Loop zwar innerhalb der Subtypen unterschiedliche Sequenzen besitzt, jedoch eine grundlegend ähnliche Struktur hat. So zeigen auch strukturell ähnliche V3-Loops unabhängig von ihrer Aminosäurezusammensetzung die gleiche Rezeptorspezifität.²⁵⁴ Strukturell konservierte Elemente der Hüllproteine können demnach kreuzneutralisierende Antikörper induzieren und wären ein wichtiger Anhaltspunkt für zukünftige Vakzine.

Tabelle 1.1: Potente monoklonale Antikörper gegen HIV²³ (zugehöriges Epitop in Klammern, unterstrichene AS stellen die minimale Sequenzanforderung für Neutralisation dar)		
	Bindungsstelle des Antikörpers (Epitopsequenz)	Neutralisationskapazität IC₉₀/IC₅₀ < 50 µg/ml Subtyp B (29 Isolate) Alle Subtypen (90 Isolate)
b12²⁴²	CD4 Bindungsstelle (Phe-43 Nische)	19/21 (66/72 %) 31/45 (34/50 %)
2G12⁴⁴	Oligomannosereste an gp120	15/21 (52/72 %) 19/37 (21/41 %)
447-52D²⁶⁶	Spitze des V3 Loop (GPGR)	4/13 (14/45 %) 4/17 (4/19 %)
2F5³¹⁵	externe Region von gp41 (⁶⁶² ELDKWA ⁶⁶⁷ Epitop)	17/23 (59/79 %) 39/60 (43/67 %)
4E10³¹⁵	externe Region von gp41 (⁶⁷¹ NWFDIT ⁶⁷⁶ Epitop)	16/29 (55/100 %) 50/90 (56/100 %)
17b²⁹⁷	CD4 induziert (Korezeptorbindungsstelle)	limitierte Aktivität gegen primäre Isolate

Die Seren HIV-Infizierter wurden ausgiebig auf die Präsenz neutralisierender Antikörper untersucht. Fünf monoklonale Antikörper, die die Fähigkeit besitzen ein breites Spektrum an primären HIV-Isolaten (meist Subtyp B) zu neutralisieren, sind bisher beschrieben (siehe Tabelle 1.1 und Abb. 1.9).^{46,173,190,314} Zwei dieser Antikörper benötigen CD4 für eine strukturelle Umlagerung des gp120 Proteins (17b, 48d), sie binden an CD4 induzierte Epitope.²⁶⁹ Die drei ande-

ren sind in ihren Eigenschaften und Bindungsstellen äußerst gut charakterisiert (2F5, b12, 2G12). Der Antikörper b12 bindet an die CD4 Bindungsstelle von gp120 und besitzt eine ungewöhnliche, hervorstehende, fingerähnliche CDR H3, die es ihm ermöglicht in die zurückliegende Vertiefung der CD4 Bindungsstelle vorzudringen.^{42,62} Ein weiterer Antikörper mit einer ungewöhnlichen Eigenschaft ist 2G12. Dieser Antikörper bindet an eine komplexe Polymannosestruktur an der Oberfläche von gp120 und besitzt ebenfalls einige strukturelle Merkmale, die bei Antikörpern selten zu finden sind.^{237,241,247,273} 2F5 bindet an eine gut charakterisierte Domäne in gp41, die nahe der Transmembranregion liegt.^{199,213,314}

1.4.7 Die Vakzineentwicklung

Trotz der Entstehung kreuzneutralisierender Antikörper in der natürlichen HIV-Infektion, entstehen bei einer Immunisierung mit HIV-1 Hüllprotein-Monomeren vornehmlich autolog neutralisierende Antikörper. Die Immunisierung von Mäusen und Kaninchen mit Partikeln, die das Hüllprotein eines Patienten in unterschiedlicher Form (gp160, gp140) exprimierten, führte jedoch tatsächlich zu kreuzreaktiven und neutralisierenden Antikörpern.⁷⁹ Durch Immunisierung kann also durchaus eine Immunantwort induziert werden, die wirksame und breit neutralisierende Antikörper hervorbringt. Die Immunisierung mit Hüllprotein-Trimeren oder partikelassoziiertem gp160 scheint jedoch ein besserer Induktor für neutralisierende Antikörper zu sein, als die monomeren Proteine alleine. Allgemein ist der Titer solcher durch eine Immunisierung induzierten Antikörper recht niedrig. Viele Studien, die eine Induktion solcher Antikörper durch eine Immunisierung mit veränderten Hüllproteinen versuchten, erbrachten widersprüchliche Ergebnisse.²⁴⁷ Dies lässt vermuten, dass eine Veränderung oder Modifikation der Hüllproteine und der damit verbundene Effekt auf die Struktur der Moleküle und ihrer Immunogenität, sehr abhängig vom gesamten Hüllproteinkomplex ist. Dennoch gelang es durch Vakzine, die auf viralen Hüllproteinen basierten (z.B. abgeschwächte SI-Viren), oder durch verabreichte V3-Antikörper, nicht-menschliche Primaten vor einer Infektion mit homologen Viren zu schützen oder zumindest eine gute Immunantwort zu induzieren.^{63,84,173} Immunisierungen mit Env-Derivaten in Mäusen oder Kaninchen führten ebenso zu einer starken Immunantwort.^{29,88,119,120,144,168,267,305,309} Die oben bereits beschriebenen mAk (2F5, b12, 2G12), aber auch polyklonale Antikörper können durch passiven Transfer vor einer Infektion schützen, wenngleich die benötigten Titer sehr hoch sind und durch eine eventuelle Immunisierung eventuell nur schwer zu erreichen wären.^{37,159,167,173,202,215,255,284}

Den meisten Antikörpern, die eine neutralisierende Wirkung zeigen, kann HIV durch eine einfache Mutation entkommen. Die Reaktivität von Antikörpern mit monomerem gp120 ist irrelevant und sagt demnach nichts über die neutralisierende Kapazität dieser Antikörper aus.^{190,216,217,243} Es ist nicht ungewöhnlich, dass Serum in relativ hohen Verdünnungen mit isoliertem gp120 reagiert jedoch keine signifikante Neutralisationsaktivität aufweist. Zudem sind die meisten Epitope neutralisierender Antikörper im natürlich vorkommenden Protein diskontinuierlich.^{193,225} Die Kristallstruktur von gp120 verdeutlicht das Problem der Neutralisation.²⁹⁶ Das Hüllprotein be-

peptidtragenden Phagen anhand ihrer Affinität zur einer gesuchten Antigenstruktur anzureichern und zu selektieren.^{252,253,262}

Die Möglichkeiten der Expression auf der Hülloberfläche der Phagen ist immens. Neben kurzen Peptiden können auch Antikörperfragmente, Enzyme, Hormone, Inhibitoren, Toxine, Rezeptoren, Liganden oder Enzymsubstrate auf der Oberfläche exprimiert werden. Eine schöne Übersicht der Expressionsmöglichkeiten und der unterschiedlichen Phagenbanktypen, sowie Informationen zur Biologie des Phagen und viele weitere Informationen zur Phage Display Methode sind in zahlreichen Publikationen zu finden.^{12,69,74,126,129,131,137,165,257,263,268,285,291,293}

Weit verbreitet und zahlreich genutzt werden die randomisierten Peptidphagenbanken. Sie enthalten große Peptidsammlungen (10 bis 100 Millionen) und jedes Peptid ist auf der Oberfläche eines filamentösen Phagen exprimiert (siehe Abb. 1.10). Das Peptid wird durch ein zufällig mutiertes Insert im Phagen genom kodiert, wobei für die Expression der Phagotope hauptsächlich zwei virale Phagenproteine verwendet werden: das kleine Hüllprotein pIII (fünf Kopien pro Phage) und das große Hüllprotein pVIII (2500 Kopien pro Phage). Das pVIII-Protein formt den Phagenkörper und umschließt die in ihrer Größe sehr variable, einzelsträngige Phagen-DNA, das pIII-Protein dagegen befindet sich am Kopf des Phagen und ist für die Infektion der Wirtszelle über den F-Pilus verantwortlich. Die Anzahl der vorhandenen Phagenklone in einer Peptidbibliothek ist entscheidend für deren Nutzen und den Erfolg einer Affinitätsselektion (Biopanning). Eine Phagenbank mit allen möglichen Hexapeptiden besteht aus 64 Millionen (20^6) unterschiedlichen Sequenzen und wird von etwa einer Billion unterschiedlicher Hexacodons ($32^6 = 10^9$) kodiert. Die Vollständigkeit aller möglichen Sequenzen in einer Phagenbank ist jedoch nicht immer das entscheidende. Eine Bibliothek mit gleicher Größe, aber längerer variabler Region (z.B. 15mer) beinhaltet mehr mögliche Hexapeptide, als eine Bibliothek mit Klonen kurzer variabler Regionen. Da in den meisten Fällen nur wenige Aminosäurereste einer Peptidstruktur in der Bindung vorherrschen, repräsentiert eine Phagenbank mit 200 Millionen Klonen einer 15mer-Bibliothek eine größere Vielfalt kürzerer Peptidmotive, als eine Bibliothek mit kurzen Peptiden und der gleichen Anzahl von Klonen.

Das so genannte Biopanning bezeichnet die Affinitätsselektion zielbindender Phagen. Die immobilisierte Zielstruktur wird mit der Phagenbibliothek inkubiert und Phagen, die ein spezifisches Phagotop tragen, binden an diese Zielstruktur. Unspezifisch bindende Phagen werden weg gewaschen und gebundene Phagen durch einen pH-Shift oder mit dem natürlichen Liganden für die Zielstruktur eluiert. Die spezifischen Phagen werden in *E. coli* amplifiziert und einer erneuten Selektionsrunde zugeführt. Durch diese mehrfach hintereinander geschalteten Selektionsrunden werden spezifische Phagen selektiv angereichert und vermehrt. Nach normalerweise drei Selektionsrunden werden die Phagen durch Ausplattieren vereinzelt und z.B. in einem ELISA auf ihre spezifische Bindung an die Zielstruktur getestet. Die Aminosäuresequenz des Peptids positiv getesteter Phagen kann durch die Präparation und anschließende Sequenzierung der ssDNA des Phagen bestimmt werden.

Die für ein Biopanning verwendeten Zielstrukturen lassen kaum Wünsche offen und so gibt es zahlreiche Publikationen über Selektionen mit monoklonalen Antikörpern^{27,66,68,100,105,138,197,253}, polyklonalen Seren^{89,92,228}, Rezeptordomänen^{102,306}, Enzymen und Enzymsubstraten¹⁶⁹, sowie anderen Proteinen^{4,116,178,208,245,258,286,287,308}. Phagenbanken, die Antikörper aus bestimmten Patientenzellen exprimieren, können dahingehend selektiert werden, hoch affine Antikörper gegen z.B. Tumorproteine oder virale Proteine zu identifizieren.^{36,123,196,261,270} Weiterhin gibt es bereits zahlreiche Analysen über immer wieder aufzufindende, unspezifisch bindende Phagen, wie beispielsweise Plastikbinder, Strepavidinbinder und Serumalbuminbinder.^{2,21,101}

1.5.1 Phage Display in der HIV-Forschung

Da in den letzten Jahren die Anwendung der Phage Display Methode zur Identifizierung krankheits-spezifischer Antikörper stark angestiegen ist, sollen hier nur einige wenige Beispiele, die als Grundlage für diese Studie gelten, kurz erläutert werden.

Die Untersuchung der Immunantwort eines LTNP anhand einer aus seinen Blutzellen erstellten Phagenbank mit Fab-Fragmenten zeigte, dass frühe IgM Fab-Antikörper eine relativ niedrige Affinität für gp120 haben, während die untersuchten IgG-Fragmente mit hoher Affinität an gp120 binden.²⁷⁰ Der Isotypen-Switch und somatische Mutationen in der CDR3 („heavy chain third complementarity-determining region“) des IgG-Antikörpers resultieren in einem 100-fachen Anstieg der Affinität für gp120 und korrelieren zudem mit einer ähnlich ansteigenden Neutralisationskapazität. IgM Fab-Fragmente, isoliert aus einer Antikörperbank eines HIV-negativen Individuums, erkennen lediglich das gp120 Molekül.¹⁶⁰ Keines der Fragmente war jedoch in der Lage HIV-1 zu neutralisieren und daher liegt die Vermutung nahe, dass das natürliche anti-gp120 Repertoire nicht ausreicht, um eine akute HIV-Infektion zu neutralisieren. Auch in der Maus wurde bei einer Immunisierung mit Phagen ein Klassenwechsel von IgM zu IgG nachgewiesen, wobei die Immunantwort gegen Phagen bei Mäusen T-Zell abhängig ist.^{12,95,292}

Durch die Anwendung einer zufälligen Mutagenesebibliothek eines bereits bekannten neutralisierenden scFv und die Verwendungen sequentieller Selektionsrunden mit wechselnden Zielproteinen (gp120 Proteine verschiedener HIV-1 Isolate) konnten zwei neue scFv-Antikörper identifiziert werden, die potenter als der ursprüngliche Antikörper sind und ein breiteres Spektrum primärer HIV-1 Isolate neutralisieren.³¹⁰ Verschiedene Peptidbanken wurden auch auf die Bindung an gp120 analysiert.⁹⁰ Die selektierten Sequenzen konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe inhibiert die Interaktion von gp120 mit CD4 und dem mAk 17b, die zweite Gruppe bindet nur schwach an gp120, erhöht jedoch die Bindung von 17b an gp120. Ein gemeinsames Motiv in beiden Gruppen lässt den Schluss zu, dass sie überlappende Kontaktflächen besitzen und unterschiedliche konformelle Strukturen von gp120 stabilisieren. Durch die Expression von Peptiden auf der Oberfläche von Bakterien konnten in einer weiteren Studie Peptidsequenzen selektiert werden, die ebenfalls spezifisch an HIV-1 gp120 binden.²¹

Für die Anwendung der Phage Display Technik in der HIV-Forschung gibt es viele weitere Beispiele: Analyse von B-Zell-Epitopen^{85,140}, Isolierung humaner Antikörper oder Fab-Fragmenten

aus humanen Antikörperbanken^{22,25,77,140,196}, Epitopanalyse und Charakterisierung bekannter neutralisierender monoklonaler Antikörper gegen HIV-1^{81,141,206,299}, Selektion mutierter CD4 Moleküle¹⁴⁵, Identifizierung von Substraten der HIV-1 Protease¹⁷, Selektion spezifischer Peptide gegen HIV-1 Vif³⁰², sowie Selektion RT-spezifischer Fab-Fragmente aus immunisierten Mäusen²⁰⁷.

1.5.2 Immunisierung mit Mimotopen

Das dringendste Ziel in der Bekämpfung von HIV und AIDS ist die Entwicklung eines Impfstoffs. Viele solcher Versuche wurden in den vergangenen Jahren gemacht und einige, die vor allen Dingen auf der Anwendung von Peptidmimotopen als Immunogene basieren, sollen hier kurz erläutert werden.

Zwei sehr prominente Regionen des gp120 Hüllproteins sind der V3-Loop und die C-Domäne des gp41 mit dem bekannten ELDKWA-Epitop, an das der neutralisierende mAk 2F5 bindet. Diese Regionen gehören zu den so genannten PNDs („principal neutralizing determinants“). Epitop-Impfstoffe der beiden Regionen induzierten eine Epitop-spezifische Antikörperimmunantwort, die deutlich höher lag, als die Immunantwort bei der Verwendung synthetischer Peptide oder rekombinanten gp160. Dies zeigte, dass solche Epitop-Impfstoffe eine neue Strategie in der Entwicklung effektiver Impfstoffe gegen eine HIV-1 liefern können.^{55,138}

Eine der ersten Arbeiten über den erfolgreichen Einsatz von Peptidphagenbanken zur Analyse der neutralisierenden Immunantwort von HIV-Patienten und deren Einsatz als Impfstoff stammt von *Guisepe Scala*.²⁴⁶ In der Publikation aus dem Jahre 1999 wurden durch umfangreiche Selektionen mit HIV-positiven Patientenseren und Gegenselektionen mit HIV-negativen Seren, zahlreiche Peptidsequenzen angereichert, die Kreuzreaktivität mit vielen LTNP-Seren und sogar Seren SHIV-infizierter Rhesusaffen zeigten. Diese selektierten Peptide verhalten sich demnach als Nachahmer linearer oder konformeller HIV-1 Antigene, gegen die ursprünglich *in vivo* in infizierten Patienten Antikörper generiert wurden. Diese so genannten Mimotope („to mimic“, nachahmen) erzeugten in immunisierten Mäusen eine HIV-1-neutralisierende Immunantwort. Es ist also möglich das HIV-spezifische Antikörperrepertoire, induziert durch eine natürliche Infektion, dahingehend zu nutzen, HIV-spezifische Mimotope über kombinatorische Peptidbanken zu selektieren. Eines der identifizierten Mimotope repräsentiert eine bekannte immundominante Domäne des gp41, das so genannte KLIC-Motiv (601-604). Andere Mimotope konnten variablen und konservierten Domänen von gp120 zugeordnet werden. Die Weiterführung der Studie im Jahr 2001 führte zu dem Beweis, dass es wirklich möglich ist, anhand solcher Mimotope eine zum Teil schützende Immunantwort in Rhesusaffen zu induzieren.⁵⁴ Obwohl die Affen durch die intravenöse Virusgabe infiziert wurden, zeigten die Mimotop-immunisierten Affen eine deutlich niedrigere bis nicht detektierbare Virämie und lediglich einen geringen Abfall der CD4-Zellzahl. Der Schutz vor einer Progression zu AIDS-ähnlichen Symptomen zeigt die eventuelle Nützlichkeit dieser Anwendung für die Herstellung therapeutischer HIV-Impfstoffe.

In einer anderen Studie wurde die polyklonale Immunantwort HIV-Infizierter gegen ein definiertes immundominantes Epitop untersucht und wiederum wurde unter anderem das immundominante KLIC-Motiv identifiziert.⁸⁶ Die Ausweitung solcher Analysen und Zusammenstellung kleiner Mimotopbanken könnte die interessanten Bereiche der Hüllproteine identifizieren, die eine schützende Immunantwort gegen die HIV-Infektion ermöglichen. Peptidimmunogene, die auf HIV-1 Hüllproteinbereichen basieren, induzieren eine starke Immunantwort in Mäusen und Kaninchen.^{30,60,80,82,122,163,170} Ebenso induzieren Peptide basierend auf dem HIV-1 Enzym Reverse Transkriptase eine starke CTL-Antwort.⁷⁰

Eine vielfach versuchte Methode neutralisierende Immunantworten gegen HIV-1 zu induzieren, ist die Analyse bekannter Epitope potent neutralisierender monoklonaler Antikörper gegen HIV, wie beispielsweise 447-52D^{66,138}, 2F5^{13,177,213,275}, 17b/E51²⁹⁹ oder b12⁸¹, sowie der Einsatz von Env-Peptidderivaten als direkte Inhibitoren ohne eine Immunisierung durchzuführen.^{24,290} Trotz vielfacher Bemühungen konnten die Immunisierungsstrategien keine vergleichbar potenten Antikörper induzieren. Wenngleich eine gewisse Neutralisation zu beobachten war, wurde die Potenz und Breite der Neutralisation in keinem Fall erreicht. Die Vermutung, dass der Erfolg nicht nur von der Sequenz des Epitopes, sondern vielmehr auch von dessen Struktur abhängig ist, liegt sehr nahe. Viele neutralisierende Epitope entsprechen keiner linearen Erkennungssequenz, sondern binden an konformelle, nicht lineare Bereiche des Antigens. Dies hat zur Folge, dass oftmals zwar Mimotope selektiert werden, die eine offensichtliche (lineare) Homologie zum Antigen aufweisen, jedoch keine funktionell guten Antikörper induzieren können. Die Bindungsstellen diskontinuierlicher Mimotope sind schwer auszumachen und daher meist nur durch ihre Fähigkeit neutralisierende Antikörper zu induzieren, zu identifizieren. Gerade im Fall von HIV scheint dies ein wichtiger Aspekt zu sein, da neutralisierende Epitope der Hüllproteine von HIV1 nicht immundominant zu sein scheinen und daher schwer zu lokalisieren sind.^{20,54,74,100,204,246,285}

Neben den Beispielen zu HIV gibt es weitere Publikation, die zeigen, dass eine schützende Immunantwort gegen verschiedene Erreger mit spezifischen Mimotopen induziert werden kann. Darunter neutralisierende Epitope gegen das Murine Coronavirus³⁰⁸ und immunogene Mimotope aus HBV- bzw. HCV-infizierten Patienten^{92,179,228,235}, Mimotope des humanen hochmolekularen melanomassoziierten Antigens²⁸⁰, Mimotope des Kapsidpolysaccharids von Pneumokokken³⁵, sowie Peptidmimotope der Oberflächenantigene von *Entamoeba histolytica*^{175,176}, *Haemophilus influenzae*¹²⁸ oder *Plasmodium falciparum*^{71,292}.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Modell	Hersteller/Vertrieb
ABIPRISM 3100-Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems, HITACHI, Foster City CA, USA
Autoklav 2540 EL	Tuttnauer, Tel Aviv, Israel
Biofuge 15R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany
Biofuge 17RS	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany
Minifuge	Heraeus Holding, Hanau, Germany
Mikro20	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany
Beckmann Avanti J-20 Centrifuge	Beckmann Instruments Inc. CA, USA
Brutschrank FunctionLine	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Germany
ELISA Reader SpectraMax 340	Molecular Devices Corp., Sunnyvale CA, USA
ELISA Washer EL405	BIOTEK Instruments Inc., Vermont, USA
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE300	Nikon, Japan
Progressive 3CCD, Model DXC-9100P	Sony, Japan
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer Biosystems, USA
GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer Biosystems, USA
T3 Thermocycler	Whatman Biometra®, Göttingen, Germany
Hypercassette™ RPN 11642 18x24 cm	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg, Germany
Kühl-/Gefrierschränke GlassLine	Liebherr Holding GmbH, Biberach, Germany
LumiStar Galaxy	BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Germany
Magnetischer Halter	Dynal A.S., Oslo, Norway
Magnetrührer KMO2	Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik Staufen i. Br., Germany
Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
NanoDrop	NanoDrop Technologies, USA
pH-Meter HI 9321	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, Germany
Schüttelinkubator TH25 und TH30	Johanna Otto GmbH (Edmund Bühler), Hechingen, Germany
SmartSpec Plus Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Sterilbank Biosafe 1.2	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Germany
Trans-Blot SD Semi-Dry	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Wasserbad Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH (GFL) Burgwedel, Germany

2.2 Chemikalien, Biochemikalien, Einwegartikel und Kits

Produkt	Hersteller/Vertrieb
ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City CA, USA
Acrylamid/Bis- (30 %), Rotiphorese	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Agarose	Qbiogene Inc., Carlsbad CA, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
<i>Antikörper:</i>	
Peroxidase-konjugiertes Ziege Anti-Maus IgG (H+L)	Dianova, Hamburg, Germany
Peroxidase-konjugiertes Ziege Anti-Human IgG (H+L)	Dianova, Hamburg, Germany
Ziege Anti-Human IgG Fc _γ Fragment spezifisch	Dianova, Hamburg, Germany
Fluorescein (FITC)-konjugiertes Esel Anti-Ziege IgG (H+L)	Dianova, Hamburg, Germany
Peroxidase-konjugiertes Ziege Anti-Ratte IgG + IgM (H+L)	Dianova, Hamburg, Germany
HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg, Germany
Maus Anti-pIII Antikörper	New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Germany
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Bacto Tryptone	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Bacto Yeast Extract	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Bovine Serum Albumin (BSA)	Serva GmbH & Co. KG, Heidelberg, Germany
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Calcium Phosphate Transfection Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Centriprep® Centrifugal Filter Devices	Millipore, Eschborn, Germany
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Coomassie Blue G250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
DMEM	Invitrogen GmbH (Gibco), Karlsruhe, Germany
DMSO	Serva GmbH & Co. KG, Heidelberg, Germany
dNTPs	NatuTec GmbH, Frankfurt/Main, Germany
Dynabeads M-280 tosylaktiviert	Dynal A.S., Oslo, Norway
ECL™ Western Blotting System	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg, Germany
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	AppliChem, Darmstadt, Germany
EDTA-Trypsin	Invitrogen GmbH (Gibco), Karlsruhe, Germany
ELISA Platte, F-Form, 96W, Microlon	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
ER2738 Host Strain glycerol culture	New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Germany
Essigsäure 99 %	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Ethanol 99,8 %	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Falcon 50 ml PP Conical Tube Falcon 14 ml PP Round-Bottom Tube	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
FCS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany
Ferricyanid, Ferrocyanid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Ficoll - Pancoll human	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany
Formaldehyd 37 %	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany
Formamid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Freeze `N Squeeze	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
G418 (Neomycin)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
G-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Glycerol/Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Glycin	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Glycin-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany

Hygromycin	MP Biomedical GmbH, Eschwege, Germany
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg, Germany
Imidazol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Innotest™ HIV Antigen mAb	Innogenetics GmbH, Heiden, Germany
IPTG	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Kalimchlorid	AppliChem, Darmstadt, Germany
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
LB-Agar, LB-Medium	Invitrogen GmbH (Gibco), Karlsruhe, Germany
M13 -96 Primer	Interactiva Biotechnologie GmbH, Ulm, Germany
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, Germany
Microlite™ 2 FB Microtiter® Plates	Thermo Electron Corporation, Dreieich, Germany
Milchpulver	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Montage® Antibody Purification Kits	Millipore, Eschborn, Germany
MPL + TDM Adjuvant System	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Natriumacetat	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Natriumazid	Serva GmbH & Co. KG, Heidelberg, Germany
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
NEW LAV BLOT I (72251)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Nickel(II)sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
NucleoBond® PC100	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany
NucleoSpin®-Extract II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany
o-Phenylendiamin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
OPTITRAN BA-S 83 Reinforced NC 0,2 µm, 200 mm x 3 m	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Germany
PBS 10x, PBS 1x	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Perchlorsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Ph.D.™ Phage Display Peptide Library	New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Germany
Phosphat-Citrat Puffer Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Polyethylenglykol-6000 (PEG-6000)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany
Renilla Luciferase Assay System	Promega Corporation, Madison WI, USA
Roti®-Phenol-Chloroform	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Schwefelsäure (Titrisol®)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
SDS 99 %	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Select Peptone 140	Invitrogen GmbH (Gibco), Karlsruhe, Germany
SmaI	New England BioLabs GmbH, Frankfurt, Germany
T4 DNA Polymerase LIC qualified	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden, Germany
TEMED	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Tetracyclin	AppliChem, Schwalbach/Ts., Germany
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Tris	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Tris-HCl	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Tween-20	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Vivapure Metal Chelate spin columns Vivaspin 500 (MWCO 50000)	Vivascience, Hannover, Germany
Wasserstoffperoxid 30 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
XGal	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Germany
Zellkulturplatten 96-Loch costar®	Corning Inc., Corning NY, USA

2.3 Lösungen und Medien

Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4

Stammlösung 10x PBS:

80 g NaCl

2 g KCl

2 g KH_2HPO_4

11,6 g Na_2HPO_4

in dH_2O lösen, pH einstellen, auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren.

1x PBS:

10 % 10x PBS

90 % dH_2O , autoklavieren.

Tris buffered saline (TBS) pH 7.5

Stammlösung 20xTBS:

8 g NaCl

0,2 g KCl

3 g Tris

in dH_2O lösen, pH einstellen, mit dH_2O auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren.

LB-Medium

10 g Bacto Tryptone

5 g Bacto Yeast Extract

5 g NaCl

in dH_2O lösen, pH einstellen, auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren.

Top-Agar

10 g Bacto Tryptone

5 g Bacto Yeast Extract

5 g NaCl

1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

7 g Agarose

mit dH_2O auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren, in 50 ml Aliquots aufheben.

PBS/0,25 % Gelatine-Lösung (PBSG)

1,25 g (= 2,5 %) Gelatine mit 10x PBS auf 50 ml auffüllen, autoklavieren (10x PBSG).

1x PBS/0,25 % Gelatine: 5 ml 10x PBSG mit dH_2O auf 50 ml auffüllen (PBSG).

25 % PEG-6000/2,5 M NaCl-Lösung

62,5 g PEG-6000 + 36,5 g NaCl

mit dH_2O auf 250 ml auffüllen, autoklavieren, unter Rühren abkühlen lassen.

5 % Milchpulver/PBS/0,5 % Tween-20 (5 % MPBST)

5 g Milchpulver

10 ml 10x PBS

500 μl Tween-20

mit dH_2O auf 100 ml auffüllen.

0,2 M Glycin-HCl (pH 2.2) mit 1 mg/ml BSA - Elutionspuffer

2,23 g Glycin-HCl mit dH₂O auf 80 ml auffüllen, pH auf 2.2 einstellen, 100 mg BSA hinzugeben, auf 100 ml auffüllen, sterilfiltrieren.

1 M Tris-HCl (pH 9.1) - Neutralisationspuffer

15,76 g Tris-HCl mit dH₂O auf 80 ml auffüllen, pH einstellen, auf 100 ml auffüllen, sterilfiltrieren.

0,1 M Boratpuffer (pH 9.5) – Puffer B

2,47 g H₃BO₃ (Borsäure)
in 300 ml dH₂O lösen, pH mit 5 M NaOH einstellen, auf 400 ml auffüllen, autoklavieren.

PBS (pH 7.4)/0,1 % BSA – Puffer C

100 ml PBS + 100 mg BSA, sterilfiltrieren.

0,2 M Tris (pH 8.5)/0,1 % BSA – Puffer D

2,42 g Tris
mit dH₂O auf 80 ml auffüllen, pH mit 1 M HCl einstellen, 100 mg BSA, auf 100 ml auffüllen, sterilfiltrieren.

Tetracyclin-Stock (1000x)

10 mg/ml Tetracyclin in 70 % Ethanol lösen. [Endkonzentration 10 µg/ml].
Tetracyclin-Base löst sich sehr schlecht. Zu 9 ml 70 % Ethanol müssen etwa 1 ml 1 N HCl zugegeben werden, um das Antibiotikum in Lösung zu bringen.

Ampicillin-Stock (1000x)

100 mg/ml Ampicillin in dH₂O lösen. [Endkonzentration 100 µg/ml].

Chloramphenicol-Stock (1000x)

20 mg/ml Chloramphenicol in 100 % Ethanol lösen. [Endkonzentration 20 µg/ml].

Glucose-Stock (50x)

50 % Glucose in dH₂O. [Endkonzentration 1 %].

dTTP- und dATP-Stock

25 mM in dH₂O. [Endkonzentration 0,8 mM].

IPTG-Stock (1000x)

Proteinexpression: 1 M in dH₂O. [Endkonzentration 1 mM].
Titern von Phagen: 0,5 M in dH₂O.

XGal-Stock

Titern von Phagen: 200 mg/ml in DMF.

12x TBE-Puffer

129,6 g Tris-HCl
 66 g Borsäure
 9 g EDTA
 1000 ml dH₂O hinzugeben.

3 % Formaldehyd-Lösung

3,24 ml 37 % Formaldehyd + 36,76 ml dH₂O.

XGal-Färbelösung

für 40 ml gebrauchsfertige Lösung:

200 mg/ml X-Gal:	40 µl	[1 g in 5 ml DMF]
1 M MgCl ₂ :	40 µl	[10,17 g in 50 ml dH ₂ O]
100 mM Ferricyanid:	1200 µl	[1,65 g in 50 ml dH ₂ O]
100 mM Ferrocyanid:	1200 µl	[2,11 g in 50 ml dH ₂ O]

auf 40 ml mit dH₂O auffüllen, aliquotieren, -20°C. Vor Benutzung erwärmen und sterilfiltrieren.

1,5 M Tris (pH 8.8)

72,68 g Tris
 mit dH₂O auf 300 ml auffüllen, pH mit 1 M HCl einstellen, auf 400 ml auffüllen.

0,5 M Tris (pH 6.8)

24,23 g Tris
 mit dH₂O auf 300 ml auffüllen, pH mit 1 M HCl einstellen, auf 400 ml auffüllen.

3 M Tris (pH 8.0)

18,17 g Tris
 mit dH₂O auf 40 ml auffüllen, pH mit 1 M HCl einstellen, auf 50 ml auffüllen.

10 % SDS

20 g SDS
 mit dH₂O auf 200 ml auffüllen.

10 % APS

1 g Ammoniumperoxodisulfat
 mit dH₂O auf 10 ml auffüllen, aliquotieren, einfrieren (-20°C).

10x TGS Laufpuffer (SDS PAGE)

30 g Tris + 144 g Glycin + 10 g SDS
 mit dH₂O auf 1000 ml auffüllen.
Der pH Wert muss nicht eingestellt werden !!!

10x Probenpuffer (SDS PAGE)

50 ml Glycerin + 15 g SDS + 16,6 ml 3 M Tris pH 8.0 + 25 ml β-Mercaptoethanol + 50 mg Bromphenolblau.

Coomassie Färbelösung (SDS PAGE)

50 ml abs. Ethanol + 34 ml Perchlorsäure + 800 ml dH₂O + 0,4 g Coomassie Blue G250.
Gele 60 min färben, Lösung abschütten, Gel zum Entfärben mit reichlich Wasser in der Mikrowelle für 15 Minuten bei voller Leistung kochen.

12 % Trenngel (SDS PAGE)

34 ml dH₂O + 40 ml 30 % Rotiphorese + 25 ml 1,5 M Tris pH 8.8 + 1 ml 10 % SDS.
Für 2 Gele à 5 ml: 50 µl APS + 25 µl TEMED.

4 % Sammelgel (SDS PAGE)

61 ml dH₂O + 13 ml 30 % Rotiphorese + 25 ml 0,5 M Tris pH 6.8 + 1 ml 10 % SDS.
Für 2 Gele à 2,5 ml: 25 µl APS + 12 µl TEMED.

10x Towbin Transfer Puffer (Western Blot)

30 g Tris + 144 g Glycin
 mit dH₂O auf 1000 ml auffüllen.
 500 ml 1x Towbin Puffer: 50 ml 10x Towbin Puffer + 100 ml Methanol + 350 ml dH₂O.
Der pH Wert (liegt normalerweise zwischen 8.1 bis 7.5) darf nicht nachjustiert werden !!!

PBS/0,5 % Tween-20 Waschlösung (Western Blot)

100 ml 10x PBS + 895 ml dH₂O + 5 ml Tween-20.

2.4 Zellkulturmedien

293T und TZM-bl

DMEM Medium (500 ml)
 10 % FCS (50 ml)
 2 % L-Glutamin (10 ml)
 1 % Penicillin/Streptomycin (5 ml)

293T CD4 CCR5

DMEM Medium (500 ml)
 10 % FCS (50 ml)
 2 % L-Glutamin (10 ml)
 1 % Penicillin/Streptomycin (5 ml)
 700 µg/ml G418 (Neomycin) für CCR5 [1 g/ml]
 100 µg/ml Hygromycin für CD4 [100 mg/ml]

U87 CD4 CCR5

DMEM Medium
 15 % FCS (75 ml)
 2 % L-Glutamin (10 ml)
 1 % Penicillin/Streptomycin (5 ml)
 300 µg/ml G418 (Neomycin) [1 g/ml]
 1 µg/ml Puromycin [10 µg/µl]

Makrophagenmedium

RPMI 1640 Grundmedium
4 % humanes AB-Serum
5 ml MEM nichtessentielle AS (100-fach)
5ml MEM Natriumpyruvat (100 mM)
2 ml Vitamine (100-fach)

PBMC Medium

RPMI 1640 Grundmedium
15 % FCS (75 ml)
2 % Glutamin (11,5 ml)
1 % Penicillin/Streptomycin (5,75 ml)

2.5 Zelllinien

2.5.1 293T

Die Zelllinie stammt von humanen embryonalen Nierenzellen ab und enthält das stabil transfizierte große T-Antigen aus SV40, wodurch Plasmide mit diesem Replikationsursprung nach Transfektion in die Zelle amplifiziert werden können. Die Zellen wachsen adhärent und wurden alle 3-4 Tage durch Behandlung mit EDTA-Trypsin-Lösung abgelöst und mit frischem Medium verdünnt. Die Zellen sind mit klassischen Transfektionsmethoden hoch transfizierbar.

2.5.2 293T CD4 CCR5

Diese Zellen leiten sich von der oben beschriebenen 293T Zelllinie ab und enthalten zusätzlich die stabil transfizierten Gene für die HIV Rezeptoren CD4 und CCR5, die mit einem Resistenzgen versehen sind. CD4 kann mit Hygromycin, CCR5 mit Neomycin (G418) selektiert werden. Die Zellen wachsen adhärent und werden mit beiden Antibiotika durch Zugabe zum Medium ständig unter Selektionsdruck gehalten.

2.5.3 U87 CD4 CCR5

Diese Zelllinie stammt von menschlichen Glioblastoma-Zellen ab (U87MG). Die Zelllinie ist stabil mit den Genen für die Rezeptoren CD4 und CCR5 transfiziert, die unter der Kontrolle eines MLV Promotors liegen. Die Zellen sind sehr adhärent, wachsen langsam und sollten bei einer Dichte von maximal 80 % gesplittet werden.

(NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Catalog Number: 4035)

2.5.4 TZM-bl

Früher als JC53-bl (clone 13) bezeichnet, leiten sich die TZM-bl Zellen von HeLa Zellen ab und exprimieren stabil große Mengen an CD4, CCR5 und CXCR4.^{288,289} Als Reporter wurden die Gene der Luciferase und β -Galactosidase unter der Kontrolle des HIV-1 Promotors integriert. Die Zelllinie ist hochsensitiv für Infektionen mit verschiedenen HIV-1 Isolaten. Die Indikatorzelllinie erlaubt durch beide Reporterenzyme eine leichte und quantitative Analyse der HIV-Infektion (z.B. Titerbestimmung) durch Messung der β -Gal- oder Luziferaseexpression.

(NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Catalog Number: 8129)

2.6 Bakterienstämme

2.6.1 ER2738 Host Strain

$F' lacI^q.D(lacZ)M15 proA^+B^+ zzzf::Tn10(Tet^R)/fhuA2 supE thi D(lac-proAB)D(hsdMS-mcrB)5 (r_k^- m_k^- McrBC^-)$

Host strain von *NEB* für die Phagenbanken, geliefert als 50% Glycerol-Kultur, nicht kompetent. Bei -70°C lagern, auf LB_{Tet^-} -Platten ausstreichen.

2.6.2 BL21(DE3)Gold

E. coli B F- *dcm+* *Hte ompT hsdS*($r_B^- m_B^-$) *gal I*(DE3) *endA Tet^a*

Bakterienstamm von *Stratagene*, ermöglicht die Expression von rekombinanten Proteinen durch den T7-Promotor.

2.7 Primer und Biochemikalien

2.7.1 M13 -96pIII Primer

Sequenz: 5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'

2.7.2 LIC Primer

M13pEZ-fw-Primer: 5'-TG GTG GCG GCC GCC CCC AGC TTC TAT TCT CAC TCT-3'

M13pEZ-rev-Primer: 5'-CT GCC GCT GCC GCT CCC ACC GGC CGA ACC TCC ACC-3'

2.7.3 CCR5D32bp Primer

CCR5d: 5'-CAA TGT GTC AAC TCT TGA CAG G-3'

CCR5r: 5'-ACC TGC ATA GCT TGG TCC AAC C-3'

2.7.4 M13KE Wildtypphage

Der Wildtyp Phage ist identisch mit den Phagen aus den gekauften Phagenbanken der Firma *NEB*, präsentiert jedoch am pIII Hüllprotein kein Peptid und dient als Kontrollphage für die ELISAs und die Immunisierungsversuche. Der Phage kann durch Transformation des M13KE Vek-

tors ohne pIII-Peptidfusion in den mitgelieferten *E. Coli* Strain erzeugt werden. Der resultierende Phagen entspricht den Phagen der Phagenbank mit Ausnahme des pIII Proteins, welches im Wildtyp keine Peptidfusion trägt. Der Phage wird zur Detektion durch den anti-M13-HRP-Antikörper erkannt, da dieser gegen das große Hüllprotein pVIII (Phagenkörper) gerichtet ist.

2.7.5 Random Peptide Phage Libraries (Phagenbanken)

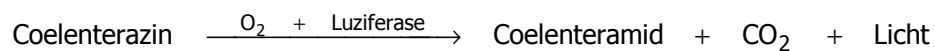
Die Phagenbanken sind kommerziell über die Firma *New England Biolabs* erhältlich. Der Kit enthält die jeweilige Phagenbank, zwei verschiedene Primer (-28 gIII und -96 gIII) und den Wirtstamm *E. coli* ER2738. Es werden drei verschiedene Banken angeboten (7mer, zyklische 7mer, 12mer), die sich jeweils in der Länge oder der Konformation der präsentierten Peptide unterscheiden. Die Peptide werden auf dem Bakteriophagen M13 in Fusion mit dem Hüllprotein pIII exprimiert. Die 7mer-Bank enthält $2 \cdot 10^9$ unabhängige Klone, die zyklische 7mer-Bank $3,7 \cdot 10^9$ unabhängige Klone. Die Banken enthalten also alle möglichen 20^7 ($1,28 \cdot 10^9$) 7mer-Sequenzen. Die 12mer-Bank dagegen repräsentiert mit ihren $1,9 \cdot 10^9$ unabhängigen Klonen nur einen kleinen Teil der $4,1 \cdot 10^{15}$ möglichen Kombinationen (20^{12}). Die Banken sind so ausgelegt, dass die eingesetzte Menge von 10 μ l je nach Lot etwa 40-100 Kopien jeder einzelnen Sequenz enthält.

2.7.6 Montage Antibody Purification PROSEP-G Kit

Der Kit der Firma *Millipore* dient zur Aufreinigung der Antikörper (IgG) aus dem Plasma der Patientenproben. Sämtliche Antikörperfraktionen wurden nach der Anleitung des Herstellers aufgereinigt und danach in Centripreps (YM-50 MW) der Firma Amicon (*Millipore*) auf 1 bis 2 ml aufkonzentriert (45 Minuten, 1200 g).

2.7.7 Renilla Luciferase Assay System

Das „*Renilla* Luciferase Assay System“ der Firma *Promega* dient zur Quantifizierung eines Reporters in Säugetierzellen. Die Luciferase der Seeanemone *Renilla reniformis* ist ein monomeres 36 kDa Protein und katalysiert die biolumineszente Oxidation von Hohltierluziferin (Coelenterazin) und der damit verbundenen Produktion von Licht:



Eine posttranslationale Modifikation für die Aktivität des Enzyms ist nicht nötig und es kann daher direkt nach der Translation als genetischer Reporter eingesetzt werden.

2.7.8 NEW LAV BLOT I

Mit dem NEW LAV BLOT I der Firma *Bio-Rad* können HIV-1 Antikörper in humanem Serum oder Plasma nachgewiesen werden. Die gelieferten Nitrozellulosestreifen enthalten sämtliche HIV-1 Proteine und eine interne anti-IgG Kontrolle zur Validierung des ordnungsgemäßen Testablaufs. Das Erscheinen von spezifischen Farbbanden auf den Nitrozellulosestreifen zeigt das Vorhandensein von HIV-1 Antikörpern gegen das jeweilige HIV-1 Protein im Serum oder Plasma an.

2.7.9 INNOTEST™ HIV Antigen mAb

Der Kit der Firma *Innogenetics* dient zum Nachweis und zur Quantifizierung von HIV in humanem Serum, Plasma oder Zellkulturüberstand. Er basiert auf einem Enzymimmunoassay und ist in der Lage das Kapsid-Protein p24 von HIV-1 zu detektieren und zu quantifizieren. Der Test wurde laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.7.10 pEZ707

Der Vektor dient zur Expression rekombinanter Fusionsproteine und wurde freundlicherweise von *B. Kay* zur Verfügung gestellt.¹¹² Der Vektor enthält die Alkaline Phosphatase als Fusionspartner und eine Klonierungsstelle zur Ligase-unabhängigen Klonierung (LIC). Weiterhin enthält der Vektor einen T7 Promotor zur IPTG-induzierten Expression und das exprimierte Fusionsprotein besitzt einen His-Tag zur Aufreinigung.

2.7.11 Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit

Der IgG Aufreinigungs-Kit der Firma *Pierce* dient zur schnellen Aufreinigung vieler Serumproben mit einer trotzdem sehr gut Reinheit. Das Melon-Gel bindet hierbei alle kontaminierenden Serumproteine, nicht jedoch das IgG. Nach einer Inkubation von 5 Minuten kann die Probe abzentrifugiert werden und die kontaminationsfreien Antikörper werden gesammelt. Mit diesem Kit wurden sämtliche Serumproben der Mimotop-immunisierten Mäuse aufgereinigt.

2.7.12 Vivaspin 500

Die Zentrifugationsfilter der Firma *Vivascience* dienen zur Aufkonzentrierung der aufgereinigten Antikörper. Sie besitzen einen MWCO von 50 kDa und können ebenso zum Pufferwechsel verwendet werden, um die Antikörper in einem späteren Zellkulturversuch für die Neutralisation zu verwenden.

2.7.13 Vivapure Metal Chelate spin columns

Diese Proteinaufreinigungssäulen dienen zur schnellen Aufreinigung von His-Tag-Proteinen über Zentrifugationssäulen, die mit verschiedenen Metallionen beladen werden können. Die Säulen wurden laut Herstellerprotokoll für die Aufreinigung der Proteine verwendet.

2.8 Die LTNP-Patienten dieser Studie

Die Kohorte dieser Studie bestand aus insgesamt 13 Patienten, die von Kooperationspartnern in Spanien und Deutschland zur Verfügung gestellt wurden. Die spanischen Patienten wurden in den achtziger und neunziger Jahren durch Drogenkonsum mit HIV-1 infiziert und sind bisher untherapiert. Sie haben ein relativ stabiles Immunsystem, zeigen keinen CD4-Abfall und eine niedrige Viruslast. Der klinische Verlauf der Patienten ist durch die Kooperationspartner sehr gut dokumentiert und zum Teil auch schon in einer Studie veröffentlicht.²³⁶ All diese Patienten entsprechen dem klassischen Bild des LTNPs mit einer stabilen, nahezu normalen CD4-Zellzahl und einer über mehr als 15 Jahre hinweg niedrigen Viruslast im Blut, trotz einer fehlenden antiviralen Therapie. Von allen spanischen Patienten (MH01 bis MH07) wurde in dieser Studie ein Bio-panning mit Phagenbanken durchgeführt.

Neben den spanischen Patientenproben wurden auch einige deutsche HIV-Infizierte in die Studie einbezogen, darunter auch Patienten, die bei der Geburt infiziert wurden. All diese Patienten entsprechen nicht dem klassischen Bild des LTNPs. Teilweise ist die Viruslast der Patienten deutlich höher, wenn auch die CD4-Zellzahl relativ stabil bleibt. Dennoch wurden sie in die Studie integriert, um ein möglichst breites Spektrum an Patienten und auch Subtypen in die Studie einzubeziehen. Von den deutschen Patienten wurde nur Patient MH08 für das Phage Display herangezogen.

Die wichtigsten Daten der Patienten sind in der folgenden Übersichtstabelle auf den nächsten zwei Seiten zusammengefasst.

GSH Code	Patient	Geschlecht Geb.datum Alter 2005	Diagnosejahr Infektion Infektionsweg	Probendatum (Code)	Viruslast [Kopien/ml]	CD4/ μ l	CD4 [%]
Long-Term Non-Progressor Patienten aus Spanien (Dr. Soriano) - LTNPs							
MH01	FSP	männlich 1969 36 HCV Alkoholiker	1990 IDU Subtyp B	11.09.2001	2388	522	24
MH02	ABLP	männlich 1962 43 HCV Alkoholiker	1990 IDU Subtyp B	26.10.1995 (1276, 2x) 21.01.1998 (6728, 2x) 12.06.2001 (24299) 22.06.2001 19.04.2002 02.09.2002 (66506) 16.01.2003 06.05.2003 04.09.2003 08.01.2004 20.05.2004 27.09.2004 20.01.2005	- 3548 9920 9920 6236 16821 12009 7618 6443 5349 8236 4160 4267	- - 837 962 609 855 726 528 594 667 551 625 494	- - - 26 21 19 22 16 22 23 19 25 26
MH03	JAG	männlich 1964 41 HCV Alkoholiker	< 1986 IDU Subtyp B	18.09.1997 (5264, 2x) 21.09.1999 (14942) 25.01.2000 (16911) 13.02.2001 (auch 22561) 18.10.2001 06.05.2002 (47673) 21.10.2002 04.08.2003 12.12.2003 05.06.2004 (MH03II) 24.09.2004	< 500 - - < 50 < 50 < 50 64 < 50 < 50 < 50 < 50 1130 < 50	- - - 616 754 891 736 609 713 513 660	- - - 32 29 33 32 29 31 27 30
MH04	BBN	männlich 1967 38 HCV Alkoholiker	< 1987 IDU Subtyp B	05.10.1995 (1194) 11.01.1996 (1541) 03.02.1998 (6879) 02.07.1998 (8811) 10.01.2001 14.06.2001 (24344) 16.08.2002 (65040) 16.05.2003 15.12.2003 04.05.2004	- - - - 2288 2299 - 2933 1462 824	- - - - 558 558 - 560 714 672	- - - - 31 - - 40 42 42
MH05	JCMM	männlich 1964 41 HCV Methadonuser	< 1985 IDU Subtyp B	12.09.1996 (2476) 29.10.1998 (10196, 2x) 19.04.2001 (23535) 04.05.2001 30.10.2001 27.03.2002 20.08.2002 04.03.2003 04.09.2003 04.02.2004 09.06.2004 (MH05II) 08.10.2004	- < 50 66 66 < 50 < 50 < 50 < 50 < 50 < 50 < 50 - < 50	- - - 540 714 651 920 864 1053 814 - 640	- - - 45 34 31 40 36 39 37 - 40
MH06	RGF	männlich HCV	< 1986 IDU Subtyp B	24.02.1994 (253, 2x) 05.06.1997 (4291, 2x) 15.02.2001 (auch 22586) 21.11.2001 27.05.2003	547 3871 11018 4936 1470	- - 1305 1320 1144	- - - 30 26
MH07	PAPR	männlich HCV	< 1986 IDU Subtyp B	30.11.2000 21.11.2001 17.04.2002 18.06.2004 (MH07II)	< 50 52 55 < 50	1260 1023 1320 672	30 31 30 28

Long-Term Non-Progressor Patienten aus Deutschland (Dr. Wintergerst) - LTNPs							
MH08	DG	männlich 15.10.1956 49	1988 Blutprodukt Subtyp C	21.02.2002 Verlauf seit 1989 dokumentiert	19000	437	-
MH09	TS	männlich 17.04.1992 13 HGV	April 1992 perinatal Subtyp A	01.03.2002	58000	643	-
MH10	JP	männlich 15.09.1980 25	September 1980 perinatal Subtyp B	07.03.2002	23000	555	-
MH11	FP	weiblich 03.05.1989 16	Mai 1989 Blutprodukt Subtyp F	28.05.2002 HAART ab 2004 wegen CD4 Abfall	48000	422	-
MH12	NB	weiblich 24.12.1990 15	Dezember 1990 perinatal Subtyp B	04.07.2002	58000	704	-
MH13	WH	männlich 28.05.1952 53	Dezember 1993 Subtyp B	07.08.2002	16000	1035	-

IDU = i.v. drug user (Drogenkonsument).

HCV = Hepatitis C, HGV = Hepatitis G (Ko-Infektion).

Die gelb hinterlegten Plasmaproben wurden für die Phage Display Selektion verwendet.

2.9 Protokolle

2.9.1 Aufarbeitung von Blutproben

Die Aufarbeitung der Blutproben dient der Gewinnung und Auftrennung von Plasma, Serum und peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMCs). Mit einer Dichtegradienten-Zentrifugation nach der Ficoll-Hypaque-Methode lassen sich die PBMCs isolieren und bestehen zu 90 % aus Lymphozyten und zu 10 % aus Monozyten.

Die Blutröhrchen (Plasma und Serumröhrchen) werden für 10 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Plasma und Serum (Überstand) werden abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert, 10 Minuten bei 1500 rpm. Anschließend werden Plasma und Serum aliquotiert und eingefroren. Das Zellpellet im Plasma kann für eine eventuelle HIV-Kokultur verwendet und zur Aufreinigung der PBMCs mitgenutzt werden. Das abzentrifugierte Blut wird abgenommen, gemessen und die Röhrchen zweimal mit PBS gespült und das Blut somit verdünnt. Das verdünnte Blut wird 1:1 auf das vorgelegte Ficoll (Pancoll) geschichtet (25 ml Ficoll + 25 ml verdünntes Blut). Der Gradient wird zentrifugiert, 30 Minuten bei 2000 rpm ohne Bremse. Nach der Zentrifugation erscheint die Interphase aus den PBMCs als weißer Schleier zwischen einer gelben Phase (Plasma und Thrombozyten) und einer farblosen, viskosen Phase (Ficoll). Am Boden des Röhrchens befinden sich die sedimentierten Erythrozyten und Granulozyten. Die Interphase wird abgenommen, mit PBS zum Waschen aufgefüllt und 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets werden in 50 ml PBS gewaschen und wie oben zentrifugiert. Nach dem Resuspendieren werden die Zellen gezählt und je nach Verwendung eine entsprechende Zellzahl eingefroren ($5 \cdot 10^6$ /ml in 10 % DMSO/90 % FCS) oder für eine Kokultur verwendet (siehe 2.9.4).

2.9.2 Präparation von PBMCs aus Buffy Coats

Zum Füttern einer HIV-Kultur wird wöchentlich ein Buffy Coat zur Isolation der PBMCs aufbereitet. Das Blut eines Buffy Coat Beutels wird auf zwei 50 ml Röhrchen verteilt, mit PBS aufgefüllt und gemischt. Das verdünnte Blut wird auf vier Röhrchen mit je 25 ml Ficoll verteilt. Der Gradient wird für 30 Minuten bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wird wie oben beschrieben abgenommen und die Zellen werden mehrmals mit PBS gewaschen. Nach dem Zählen wird die benötigte Zellzahl in Medium resuspendiert und für die Kokultur verwendet.

2.9.3 CCR5 Genotyp

Zur Bestimmung des CCR5 Genotyps wird eine PCR durchgeführt. Für die PCR werden folgende Mengen eingesetzt: 5 µl genomische DNA, 1 µl dNTPs (10 mM), je 1 µl CCR5d-Primer und CCR5r-Primer (10 pmol/µl), 5 µl 10x Puffer, 1 µl Polymerase, 36 µl dH₂O. Die PCR wird zunächst für drei Minuten bei 94°C gestartet, danach werden 35 Zyklen gefahren: 30 Sekunden 94°C, 30

Sekunden 55°C, 30 Sekunden 72°C. Am Ende schließt sich nochmals eine Inkubation von fünf Minuten bei 72°C an. Von der PCR werden 10 µl auf einem Agarosegel analysiert, 40 µl werden aufgereinigt und in 25 µl dH₂O aufgenommen. Hiervon werden 3 µl für die Sequenzreaktion eingesetzt.

2.9.4 Anzucht von Saatviren in der Kokultur

Eine Kokultur besteht zum einen aus HIV-infizierten Zellen (PBMCs) eines Patienten und zum anderen aus PBMCs eines Buffy Coats und dient zur Anzucht von Viren, um später virale RNA zu isolieren oder um das entstehende Saatvirus für Infektionsversuche zu verwenden. Die Zellen des Patienten und die Spenderzellen werden über eine Ficoll-Gradienten aufgereinigt und durch Zugabe von PHA (7,5 µg/ml) werden die Zellen zunächst für drei Tage aktiviert. Danach findet ein Wechsel in IL2-Medium (20 IU/ml) statt. Zur Anzucht von Saatviren wird die Kokultur wöchentlich mit frischem Medium und frischen aktivierten Zellen aus Spendern versorgt. Die Pflege der Kultur ist unter dem Mikroskop zu beobachten und je nach Aussehen durch teilweisen Mediumwechsel und Füttern mit frischen Zellen zu versorgen, wobei die produzierte Menge an Virus wöchentlich anhand eines kommerziellen p24-ELISAs (Innogenetics) überprüft wird. Der Saatvirusüberstand und die Zellen können in Einfriermedium (10 % DMSO/90 % FCS) bei -80°C gelagert werden.

2.9.5 Transfektion von 293T Zellen und Produktion rekombinanter Viren

293T Zellen sind mit hoher Effizienz durch die klassische Kalziumphosphat-Methode transfizierbar. Durch das Mischen einer DNA-Kalziumlösung mit einem Phosphatpuffer fällt ein DNA-Kalziumphosphat-Komplex aus, welcher von den Zellen durch Phagozytose aufgenommen wird. Die Transfektion dient hier zur Herstellung rekombinanter Viren für die Neutralisationsversuche. Für die beschriebene Transfektion wird der „Calcium Phosphate Transfection Kit“ der Firma *Sigma* verwendet.

In einer großen Zellkulturflasche werden am Tag vor der Transfektion $3 \cdot 10^7$ Zellen ausgesät. Zwei Stunden vor Transfektion wird das Medium getauscht. 25 µg Plasmid + 120 µl 2,5 M CaCl₂ werden mit dH₂O auf 1,2 ml aufgefüllt. Unter Blasenbildung wird die DNA-Lösung in 1,2 ml vorgelegten 2-fach HEPES Puffer getropft. Danach wird kurz gevortext und die Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Inhalt wird auf die Zellen gegeben, gut verteilt und die Zellen für 48 Stunden unter täglicher Zugabe (kein Austausch) von frischem Medium inkubiert. Der Überstand wird schließlich abgenommen, 1:10 aufkonzentriert, steril filtriert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Der Virentiter (IU/ml) in den eingefrorenen Aliquots wird durch Infektion einer Reporterzelllinie (TZM-bl) bestimmt (siehe 2.9.6).

2.9.6 Bestimmung des viralen Titers

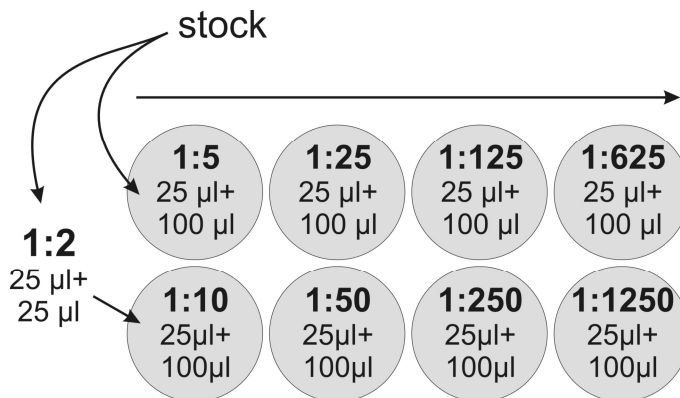


Abbildung 2.1: Verdünnungsreihe.

Schema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe zur Bestimmung des viralen Titers in aufkonzentrierten Transfektionsüberständen.

Für die Bestimmung des Virentiters wird eine Reporterzelllinie verwendet, die das Gen der β -Galactosidase unter der Kontrolle des HIV-1 Promotors besitzt. Nach Infektion mit HIV-1 erscheinen die infizierten Zellen nach Inkubation mit einer XGal-Lösung blau und können gezählt werden. Durch die Infektion mit unterschiedlichen Virenkonzentrationen (Verdünnungsreihe) lässt sich der Titer als infektiöse Einheiten pro ml (IU/ml) bestimmen.

Der Test wird im 96-Loch Format (Zellkulturplatte) durchgeführt. Pro Loch werden 10^4 TZM-bl Zellen in 100 µl Medium ausgesät. Am nächsten Tag wird die Verdünnungsreihe in Duplikaten für jeden zu testenden Virusüberstand in einer separaten 96-Loch Zellkulturplatte hergestellt (siehe Abb. 2.1). Das Medium der Zellen wird abgezogen und die Verdünnungsreihe auf die Zellkulturplatte übertragen. Nach 48 Stunden werden die Zellen einmal mit 180 µl PBS gewaschen und anschließend mit 50 µl 3 % Formaldehyd für 3 Minuten fixiert. Die Zellen werden erneut gewaschen und schließlich mit 100 µl XGal-Färbelösung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag werden die blauen Zellen pro Verdünnung gezählt und der Titer berechnet:

$$\text{IU / ml} = \text{Anzahl blauer Zellen} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 10$$

2.9.7 Das Renilla Luziferase Assay System

Dieses System beruht auf der Messung einer Reportergens in Säugerzellen, der *Renilla* Luziferase. Dieses Gen wird über rekombinante HI-Viren in die Säugerzellen eingeführt und ermöglicht eine Quantifizierung der Infektion anhand von Lichteinheiten, die durch die Substratumsetzung des Enzyms entstehen. Der Versuch wird in 96-Loch Platten durchgeführt.

Am Tag zuvor werden 10^4 Rezeptorzellen pro Loch ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die Zellen infiziert und für 48 Stunden im Brutschrank unter CO_2 inkubiert. Nach zwei Tagen werden die infizierte Zellen zunächst mit 180 µl PBS vorsichtig gewaschen und die Platte anschließend gründlich ausgeklopft um letzte Pufferreste zu entfernen. Die Zellen werden mit 60 µl Lysispuffer bei Raumtemperatur für 15-30 Minuten lysiert. Für die Messung werden 20 µl Lyseüberstand in weiße Messplatten transferiert. Das Luminometer wird zunächst gründlich mit Wasser gereinigt und anschließend mit 1,5 ml Substratlösung vorge-spült. Pro well werden 100 µl Substratlösung dispensiert und eine Integration über 10 Sekunden

durchgeführt, mit einer Messverzögerung von einer Sekunde. Folgende Einstellung sind am Gerät vorzunehmen:

<i>Microplate:</i> Dynatech 96	<i>Gain:</i> 255
<i>Test Type:</i> Well Mode	<i>Reading Direction:</i> horizontal
<i>No. of Intervals:</i> 30	<i>Meas. Interval Time [s]:</i> 0,3
<i>Tot. Integ. Time/well [s]:</i> 9 s	<i>Delay:</i> 1 s
<i>Evaluation Type:</i> Sum	

Pro Platte wird eine Messzeit von etwa 15 Minuten benötigt. Nach der Messung wird das Gerät ausgiebig mit Wasser und 70 % Ethanol gespült, trocken gepumpt und ausgeschaltet.

2.9.8 Neutralisation von HIV-1

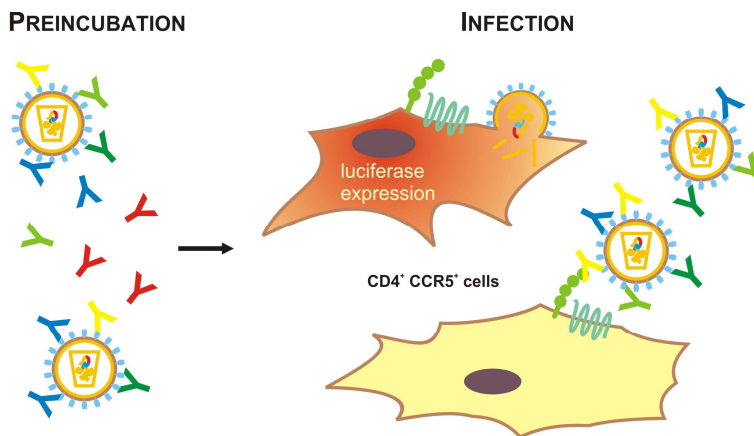


Abbildung 2.2: Neutralisationsschema.

Nach einer Vorinkubation der Viren mit den verschiedenen Antikörperverdünnungen werden Rezeptorzellen infiziert. Infizierte Zellen exprimieren das durch die Viren eingebrachte Luziferase Reportergen. Anhand der gemessenen Luziferaseaktivität nach 48 Stunden kann die Inhibition in Bezug auf eine Kontrolle berechnet werden.

Die Neutralisationskapazität der Patienten- und Mäuseseren wird anhand rekombinanter Viren mit einem Luziferase Reportergen durchgeführt. Die Neutralisation von HI-Viren kann durch eine reduzierte Luziferaseaktivität in den Zellen festgestellt werden. Anhand von Kontrollseren kann sodann eine einfache Umrechnung auf eine Inhibition (in Prozent) erfolgen. Der Versuch wird im 96-Loch Format durchgeführt (siehe Abb. 2.2).

Zunächst werden 10^4 Rezeptorzellen pro Loch ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die zu testenden Seren in seriellen Verdünnungen mit HI-Viren vorinkubiert. Pro Loch werden hierfür 100 infektiöse Einheiten (IU, infectious units) verwendet. Dies ergibt einen MOI von 0,01. Da die Versuche immer in Triplikaten durchgeführt werden sind pro Verdünnung 300 IU nötig. Das Endvolumen pro Loch beträgt 100 μ l, also 300 μ l pro Ansatz (Triplikate). Die Serumverdünnungen und Viren werden zunächst in diesen 300 μ l Gesamtvolumen für eine Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln vorinkubiert, um ein Binden der Antikörper an die Viren zu ermöglichen. Nach dieser Stunde wird das Medium von den vorbereiteten Zellen abgenommen und durch die Virus-Antikörpermischung ersetzt. Die infizierten Rezeptorzellen werden für zwei Tage inkubiert, danach wie oben beschrieben lysiert und die Luziferaseaktivität im Luminometer gemessen (siehe 2.9.7).

Die gemessenen Werte der Luziferaseaktivität (rLU, relative light units) werden unter Einbezug einer Kontrolle in eine Inhibition in Prozent umgerechnet. Ebenso wird die Standardabweichung der rLU-Werte als Abweichung in Prozent Inhibition berechnet.

Hierfür werden die folgenden Formeln verwendet:

$$\text{Inhibition [\%]} = \left(1 - \left(\frac{\phi rLU_{AK}}{\phi rLU_K}\right)\right) \cdot 100$$

ϕrLU_{AK} = Mittelwert rLU mit Antikörper

ϕrLU_K = Mittelwert rLU der Kontrolle (unspezifischer Antikörper)

$$\text{Standardabweichung [\%]} = \left(\frac{\text{StAw}_{rLU_{AK}}}{\phi rLU_K}\right) \cdot 100$$

$\text{StAw}_{rLU_{AK}}$ = Standardabweichung der rLU_{AK} – Triplikate

2.9.9 Vorbereitung der paramagnetischen Beads

Für das Biopanning müssen paramagnetische Beads (M-280 tosylactivated) mit einem anti-human Antikörper (Fc_γ -spezifisch) zur Immobilisierung der Patientenantikörper bestückt werden. Die Beads werden gut durchmischt und 2 ml der Suspension in ein 15 ml Röhrchen überführt. Im magnetischen Halter wird der Überstand entfernt und die Beads werden zweimal mit je 5 ml Puffer A gewaschen und danach wieder in 2 ml Puffer A resuspendiert. Nun werden pro 10^7 Beads 3 μg reiner Antikörper hinzugegeben, kurz gevortext und die Beads werden über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert (die Beads dürfen sich nicht absetzen). Am nächsten Tag wird der Überstand im magnetischen Halter abgenommen und die Beads werden zweimal mit 5 ml kaltem Puffer (4°C) für 5 Minuten im Rotator gewaschen. Danach werden die Beads in 5 ml Puffer D resuspendiert und für vier Stunden im Schüttler bei 37°C geblockt. Anschließend werden die Beads nochmals für 5 Minuten mit 5 ml kaltem Puffer C gewaschen (Rotator) und sodann in 2 ml Puffer C resuspendiert und aufgehoben. Die korrekte Immobilisierung des Schaf-anti-human Antikörpers kann anhand eines Esel anti-Schaf-FITC Antikörpers im Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Die fertig bestückten Beads sind unbegrenzt lagerbar (evtl. Zugabe von Natriumazid ist möglich) und können nach einmaligem Waschen mit PBS direkt für das Biopanning verwendet werden.

2.9.10 Phage Display Selektion (Biopanning)

Die Anreicherung spezifischer Phagen für HIV-Antikörper erfolgt über verschiedene Selektionsschritte mit der Phage Display Methode (Biopanning, siehe Abbildung 2.3). Für die so genannte positive Selektion werden die Plasmaproben der zu untersuchenden Patienten verwendet, für die negative Selektion ein Plasmapool aus fünf HIV-negativer Individuen.

Für das Biopanning werden die zuvor hergestellten paramagnetischen Beads verwendet (siehe 2.9.9), die mit einem anti-human Antikörper bestückt sind, der spezifisch humanes IgG über den Fc_γ -Teil bindet. Für die einzelnen Selektionsschritte wird für jede Phagenbank ein eigener Ansatz vorbereitet. Es ist darauf zu achten, dass keine Kreuzkontaminationen zwischen den

Phagenbanken auftreten, insbesondere bei den langen Waschschritten. Am besten verwendet man für jedes Reaktionsgefäß eine neue Spitze und arbeitet generell mit gestopften Spitzen. Kleinste Kontaminationen führen aufgrund der zwischendurch anstehenden Amplifikationen zur Anreicherung der kontaminierenden Phagen.

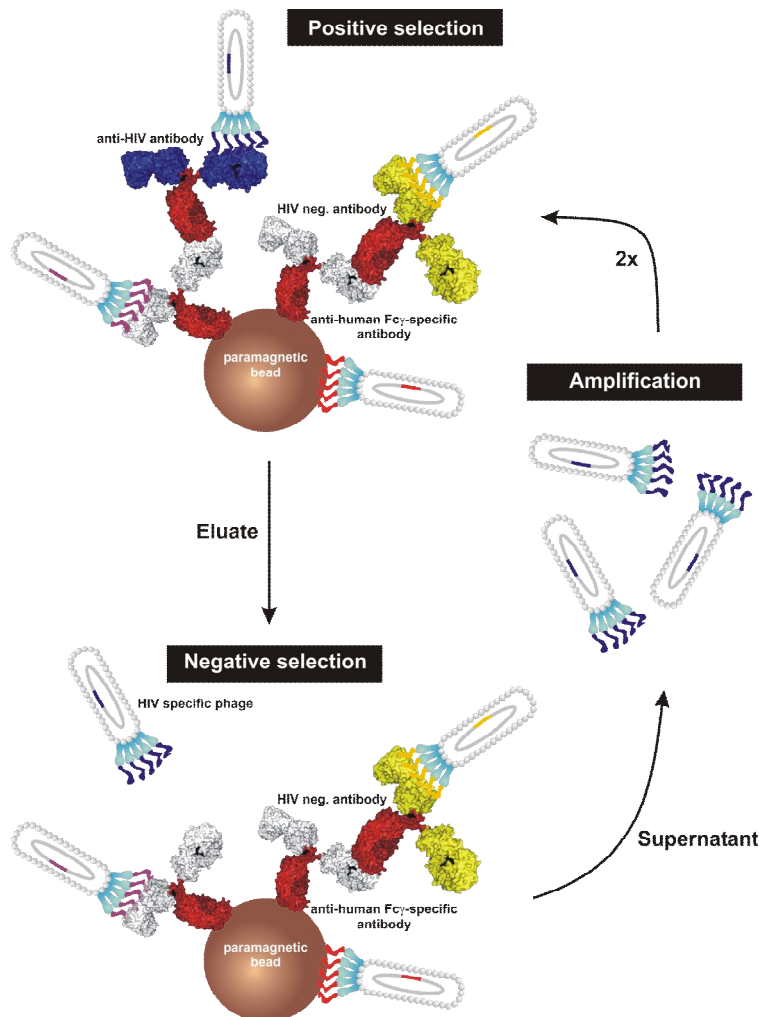


Abbildung 2.3: Ablaufschema des Biopannings.
Übersicht über den Ablauf der durchgeführten Selektionsmethode zur Anreicherung HIV-spezifischer Phagen (siehe Text).

Die Ansätze werden über Nacht bei 4°C im Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wird der Überstand verworfen und die Beads werden zehnmal mit 1 ml PBSGT gewaschen. Für jeden Ansatz wird ein Reaktionsgefäß mit 90 μ l 1 M Tris-HCl (pH 9.1) zur Neutralisation vorbereitet. Die gewaschenen Beads werden in 600 μ l 0,2 M Glycin-HCl (pH 2.2 mit 1 mg/ml BSA) resuspendiert und zur Elution der Phagen 5 Minuten bei Raumtemperatur im Rotator inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und sofort zur Neutralisation in die vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt. Die neutralisierten Phagen werden anschließend zur negativen Selektion verwendet.

1. POSITIVE SELEKTION

Für jeden Patienten werden drei Ansätze vorbereitet, um alle drei Phagenbanken gleichzeitig zu verwenden. Hierfür werden 300 μ l der vorbereiteten Beads einmal mit 1 ml PBS gewaschen und danach in 300 μ l PBSG resuspendiert. Der Ansatz wird zu drei Ansätzen à 100 μ l Beads pro Reaktionsgefäß aufgeteilt. Die Reaktionsgefäße werden auf 1 ml aufgefüllt (650 μ l PBSG, 250 μ l Plasma 1:100 in PBSG) und für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Rotator inkubiert. Danach werden die Beads sechsmal mit 1 ml PBSGT gewaschen und anschließend die Phagenbanken hinzugegeben (990 μ l PBSG + 10 μ l Original-

1. NEGATIVE SELEKTION

Wie oben bereits geschrieben wird in der negativen Selektion ein Plasmapool aus fünf Kontrollindividuen (HIV-negativ) verwendet.

Der Ansatz zur Vorinkubation der Beads mit den IgGs entspricht dem Ansatz der positiven Selektion mit Ausnahme des verwendeten Plasmas, welches in der negativen Selektion durch den HIV-negativen Plasmapool (1:100 in PBSG) ersetzt wird. Nach der zweistündigen Inkubation im Rotator werden die Beads wie oben beschrieben gewaschen und mit den Phagen aus der 1. positiven Selektion inkubiert (600 µl Eluat aus der 1. positiven Selektion + 100 µl 10x PBSG + 300 µl dH₂O). Der Ansatz wird wieder über Nacht bei 4°C im Rotator inkubiert. Am folgenden Tag wird der Überstand (!) abgenommen und zur Amplifikation verwendet.

1. AMPLIFIKATION

Nach der 1. negativen Selektion erfolgt die 1. Amplifikation. Hierzu werden die Phagen des Überstandes im natürlichen Bakteriophagenwirt *E. coli* vermehrt. Eine ER2738 Übernachtskultur wird 1:100 in 25 ml LB-Medium verdünnt. 900 µl des abgenommenen Phagenüberstandes aus der 1. negativen Selektion wird hinzugegeben und die Kultur für 4 ½ Stunden bei 225 rpm geschüttelt. Danach wird die Kultur abzentrifugiert und aus dem Überstand werden mit 1/3 25 % PEG/2,5 M NaCl (~ 8 ml) über Nacht bei 4°C die Phagen ausgefällt. Die über Nacht ausgefallenen Phagen (weiße Wolke) werden pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 1 ml PBS resuspendiert, eventuelle Bakterienreste werden erneut abzentrifugiert und der Überstand nochmals mit 1/3 PEG/NaCl gefällt. Das Phagenpellet wird anschließend in 200 µl PBS/0,02 % NaN₃ resuspendiert und für eine zweite Biopanningrunde verwendet.

2. POSITIVE SELEKTION

Die 2. positive Selektion entspricht der 1. positiven Selektion mit Ausnahme der Phageninkubation. Anstelle der Original-Phagenbank werden die Phagen der 1. Amplifikation verwendet (800 µl dH₂O + 100 µl 10x PBSG + 100 µl der 1. Amplifikation).

2. NEGATIVE SELEKTION

Dieser Selektionsschritt entspricht der 1. negativen Selektion unter Verwendung der Phagen aus der 2. positiven Selektion.

2. AMPLIFIKATION

Zur Amplifikation der zweiten Runde wird der Phagenüberstand aus der 2. negativen Selektion verwendet. Das Protokoll entspricht dem der 1. Amplifikation.

3. POSITIVE SELEKTION

Die 3. positive Selektion entspricht der 2. positiven Selektion unter Verwendung der Phagen aus der 2. Amplifikation. Nach der 3. positiven Selektion werden die Phagen zur Analyse der Einzel-

kclone getitert und im Phagen ELISA getestet (siehe 2.9.11 und 2.9.14). Es schließt sich keine weitere Biopanningrunde an.

2.9.11 Vereinzeln der selektierten Phagenklone (Titern)

Zur Herstellung von Einzelklonen für eine Analyse im Phagen-ELISA und zur Präparation der ssDNA, werden die Phagen aus der letzten Biopanningrunde getitert.

10 µl einer Verdünnungsreihe (10^{-3} bis 10^{-6}) der 3. positiven Selektion werden zu 200 µl einer ER2738 Übernachtskultur gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die infizierte *E. coli* Kultur wird zu 3 ml auf 45°C vorgewärmten Top-Agar/IPTG/XGal gegeben, kurz gevortext, auf eine Agarplatte gegossen und gleichmäßig verteilt. Nach dem Erkalten wird die Platte invertiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag sind die durch einzelne Phagen infizierten Bakterien als blaue Plaques auf der Platte sichtbar und können zur Bestimmung der Phagenkonzentration (plaque forming units, pfus/ml) gezählt und zur Verwendung im Phagen-ELISA gepickt werden. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden sollten Platten zum Picken einzelner Klone nicht mehr als 100-150 Plaques aufweisen.

2.9.12 Konzentrationsbestimmung von Phagen

Die Konzentration an Phagenpartikeln in einer Lösung kann außer durch das zeitaufwendige Titern auf Agarplatten auch durch eine spektroskopische Messung erfolgen. Die zu messenden Phagen sollten hierzu jedoch zweimal mit PEG/NaCl gefällt werden, um eine möglichst reine Phagensuspension zu erhalten. Die Messung kann sowohl in einer UV-Küvette am Spektrometer, als auch an einem NanoDrop-Gerät durchgeführt werden.

DIE MESSUNG AM SPEKTROMETER

Die Phagenlösung wird 1:100 verdünnt (7 µl Phagensuspension + 693 µl dH₂O) und es wird ein Absorptionsscan durchgeführt. Die Lösung wird in einer 10 mm Quarzküvette von 240 nm bis 320 nm gemessen. Die regionalen Peaks bei A_{269} und A_{320} werden verwendet, um einen korrigierten Messwert (A_{269}^*) für die Formel zu errechnen.

$$A_{269}^* = A_{269} - A_{320}$$

$$\text{Phagenpartikel/ml} = \frac{A_{269}^* \cdot 6 \cdot 10^{16}}{7223}$$

DIE MESSUNG AM NANODROP

Die Messung am NanoDrop ist wesentlich einfacher und schneller. Es wird eine UV-Messung mit 2 µl unverdünnter Phagensuspension durchgeführt. Die Software erlaubt die direkte Anzeige der beiden erforderlichen Peaks bei A_{269} und A_{320} . Die obige Formel dient hier ebenso zur Berechnung des Titers, jedoch muss das Ergebnis nochmals mit 10 multipliziert werden, da die NanoDrop-Geräte einen „Lichtgang“ von nur 1 mm verwenden.

2.9.13 Anzucht von Einzelklonen im 96-Loch Format

Die einzelnen Phagenklone von den Titerplatten werden für den Phagen-ELISA in 96-Loch Zellkulturplatten amplifiziert (Stammplatten). Falls nötig wird eine frische ER2738 Übernachtskultur 1:100 in LB-Medium verdünnt und die Platte mit 200 µl/Loch befüllt (frische Titerplatten enthalten genug *E. Coli*, bei älteren Platten sollte eine frische Übernachtskultur verwendet werden). Die einzelnen Phagenklone werden mit einer sterilen gelben Spitze ausgestochen und kurz im Loch resuspendiert. Die beiden letzten Löcher werden für die Kontrollen frei gelassen. Ein Loch wird nur mit Medium befüllt und in das zweite wird der Wildtypphage gegeben. Die Platten werden über Nacht bei 30°C mit 150 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wird der Überstand für den Phagen-ELISA eingesetzt. In diesem Format lassen sich 94 Phagenklone (+ 2 Kontrollen: Wildtypphage sowie leeres Loch) gleichzeitig auf ihre Spezifität testen.

2.9.14 Phagen-ELISA

Der Phagen-ELISA wird im 96-Loch Format durchgeführt und dient dazu Phagen, die spezifisch für das eingesetzte Zielprotein im Biopanning sind, zu identifizieren. Das Patientenplasma wird hierzu 1:5000 verdünnt (2 µl auf 10 ml PBS) und die ELISA-Platten werden mit jeweils 100 µl/Loch über Nacht bei 4°C mit Antikörpern beschichtet. Bei jedem ELISA wird eine Kontrollplatte mit einem HIV-negativen Plasmapool mitgetestet. Am nächsten Tag werden die Platten mit 200 µl/Loch 5 % MPBS zwei Stunden bei 37°C geblockt. Die Platten werden dreimal mit dH₂O gewaschen und aus den Phagen-Stammplatten werden 50 µl/Loch auf die geblockten Platten übertragen (parallel dazu auch auf die Kontrollplatte). Als Kontrolle wird zusätzlich in einem Loch der Wildtypphage getestet. Die Platten werden über Nacht bei 4°C im Kühlraum inkubiert. Am nächsten Tag werden die Platten wieder dreimal gewaschen und mit einem anti-M13-Antikörper 1:5000 in 5 % MPBST für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten werden fünfmal gewaschen und anschließend mit 100 µl/Loch OPD-Lösung entwickelt und nach sechs Minuten mit 100 µl/Loch 1 N Schwefelsäure abgestoppt. Die Platten werden im ELISA-Reader bei 492 nm (Absorption OPD) und 620 nm (Referenzwellenlänge) gelesen und anschließend ausgewertet. Für das Zielprotein positive Phagen müssen eine dreimal höhere OD als die des Wildtypphagen aufweisen (bei besonders vielen positiven Phagen wurde ein Cut-off festgelegt, der fünfmal höher ist als der Wert des Wildtypphagen). Positive Phagen werden amplifiziert, die ssDNA wird präpariert und die DNA zur Ermittlung des Peptidinserts sequenziert (siehe 2.9.16).

2.9.15 Phagen-Amplifikation im 2 ml Format

Zur Herstellung von Phagenstocks und zur Präparation von Phagen-DNA werden einzelne Phagenklone in 15 ml Röhren amplifiziert. Diese werden mit 2 ml LB-Medium/ER2738 Übernachtskultur (1:100) befüllt und der Phage hinzugegeben. Die Röhren werden fünf Stunden bei 37°C geschüttelt und parallel dazu werden zwei Reaktionsgefäße vorbereitet: ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl PEG/NaCl und ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl PEG/NaCl. Nach der Inkubationszeit wird die Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wird aufgeteilt. 1,5 ml Kultur werden in das vorbereitete 2 ml Reaktionsgefäß transferiert (Phagen zur Lagerung), der Rest der Kultur wird zur ssDNA Präparation im 1,5 ml Reaktionsgefäß benutzt. Nach dem Vortexen werden die Reaktionsgefäße über Nacht bei 4°C stehen gelassen um die Phagen auszufällen. Am nächsten Tag werden die Phagen für 20 Minuten bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Phagenpellet im 2 ml Reaktionsgefäß wird in 200 µl PBS/NaN₃ resuspendiert und bei 4°C gelagert. Die Phagen im zweiten Reaktionsgefäß dienen zur DNA Extraktion und Sequenzierung des Peptidinserts (siehe 2.9.16).

2.9.16 Präparation der Phagen ssDNA

Der Rest der oben amplifizierten Phagen zur DNA-Extraktion wird nach der Fällung über Nacht abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl Iodidpuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl abs. Ethanol wird der Ansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die ssDNA zu pelletieren. Die gefällte DNA wird bei 15000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert und das Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend unter Vakuum getrocknet. Die DNA wird in 20 µl ddH₂O resuspendiert und zur Sequenzierung verwendet (siehe 2.9.17).

2.9.17 PCR, Aufreinigung und Sequenzierung der Phagen-DNA

Die Sequenzierung der Phagen DNA zur Analyse des exprimierten Peptids erfolgt an einem *ABI-PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer* (Kapillarsequenzierer) mit fluoreszenzmarkierten dNTPs.

Für einen PCR Ansatz werden 4 µl ssDNA, 1 µl M13 -96pIII Primer, 10 µl HPLC Wasser, 2 µl Premix und 3 µl 5x Sequenzpuffer gemischt. Das verwendete PCR Programm beginnt ohne Hotstart mit 25 Zyklen: 10 Sekunden 96°C, 5 Sekunden 45°C und 4 Minuten 60°C.

Zur Aufreinigung werden dem Ansatz anschließend 100 µl dH₂O, 10 µl 3 M Natriumacetat pH 4,6, sowie 250 µl absolutes Ethanol hinzugegeben. Nach einer Zentrifugation bei 15000 rpm für 15 Minuten wird der Überstand verworfen und das Pellet zum Waschen in 250 µl 70 % Ethanol resuspendiert und erneut für 5 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die DNA getrocknet, in 20 µl Formamid resuspendiert oder bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

2.9.18 Immunisierung mit Phagenpartikeln

STUDIE 2004

Verschiedene Phagen werden nach Ähnlichkeit der Peptidmotive gruppiert und als Pool immunisiert. Sechs Mausgruppen werden mit spezifischen, selektierten Phagen immunisiert, eine Kontrollgruppe erhält den Wildtypphagen. Die C57BL/6-Mäuse (pro Gruppe vier Mäuse) werden viermal im Abstand von einer Woche oral (mit einer Magensonde) oder i.p. immunisiert, pro Immunisierung mit 10^{12} Phagen in 200 μ l isotoner NaCl-Lösung. Zwei Wochen nach dem 4. Boost werden die Mäuse ausgeblutet und die Mäuseseren in einem *in vitro* Neutralisationsversuch auf ihre neutralisierende Kapazität hin untersucht (siehe 2.9.8).

STUDIE 2005

Für die Immunisierung werden C57BL/6 Mäuse verwendet. Die Phagen werden für die Immunisierung gruppiert, zum einen nach bekannten Motiven, zum anderen aber auch anhand der potentiell identifizierten konformellen Epitope. Insgesamt werden die interessanten Phagen in 10 unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Eine weitere Mausgruppe wird mit Wildtypphagen immunisiert, eine zweite Gruppe mit unspezifischen Phagen. Jede Gruppe besteht aus fünf Mäusen und jede Maus wird zunächst mit 10^{12} Phagen i.p. immunisiert. Nach drei Wochen wird der 1. Boost s.c. durchgeführt und alle 14-Tage s.c. geboostet. Die letzten zwei Immunisierungen erfolgen im Abstand von nur einer Woche. Eine Woche nach dem letzten Boost werden die Mäuse ausgeblutet und die Seren auf neutralisierende Antikörper hin untersucht.

2.9.19 Herstellung der Fusionsproteine (LIC)

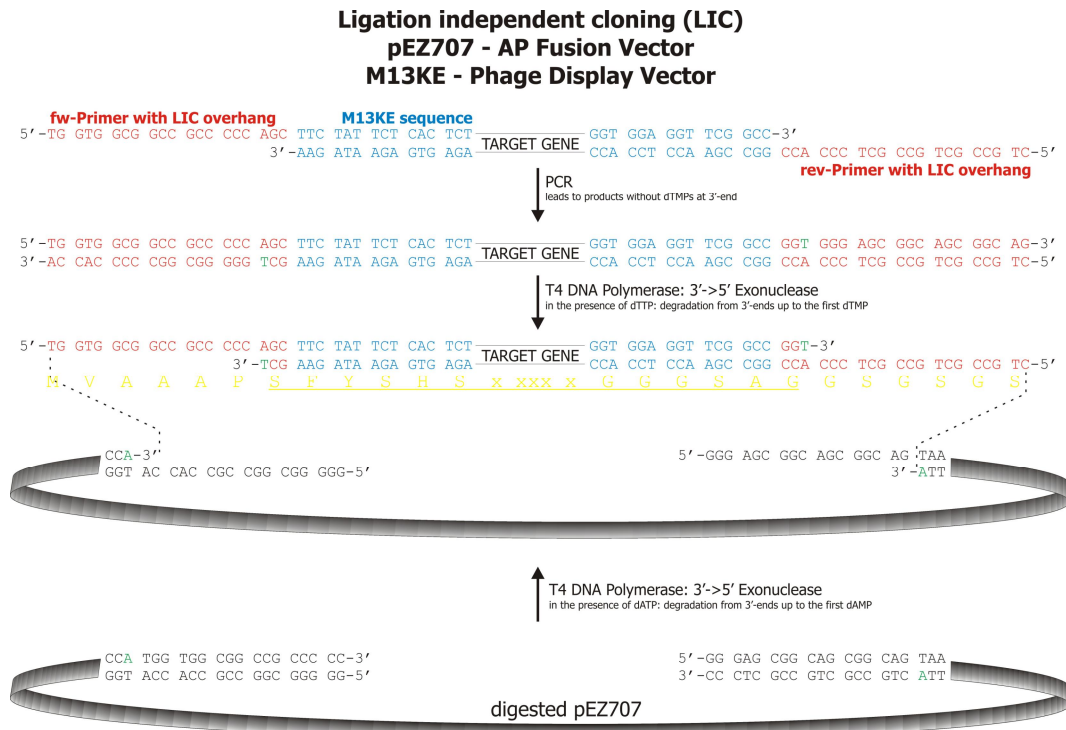


Abbildung 2.4: Funktionsweise des „Ligation Independent Cloning“ (LIC).

Übersicht über die einzelnen Schritte der Ligase-unabhängigen Klonierung zur Herstellung von Peptid-Fusionsproteinen.

Das Prinzip der Ligase-unabhängigen Klonierung (LIC; siehe Abb. 2.4) ist sehr simpel.^{11,76} Beide Primer für die PCR enthalten einen 5'-Überhang (Abb. 2.4, rot) und einen komplementäres 3'-Ende zur Zielsequenz (Abb. 2.4, blau). Nach der PCR liegen Produkte vor, die im 3'-Ende kein dTMP aufweisen. Durch die anschließende Behandlung des PCR Produktes mit T4 DNA Polymerase im Beisein des dTMPs werden die 3'-Enden bis zum ersten dTMP abgebaut. Dieser selektive Abbau wird durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4 DNA Polymerase durchgeführt und kann durch die Präsenz des jeweiligen Nukleotids in der Lösung forciert werden. Umgekehrt zum PCR Produkt wird der geschnittene Vektor mit 3'-Enden ohne dAMP im Beisein von dAMP mit der T4 DNA Polymerase behandelt. Die entstandenen Überhänge sind komplementär zu den entstandenen Überhängen im PCR Produkt. Beide Produkte werden aneinandergelagert und in *E. Coli* BL21(DE3)GOLD transformiert.

Für die Klonierung des Peptidinserts als Fusionsprotein wird eine PCR mit der präparierten ssDNA des Phagen durchgeführt (siehe 2.9.16):

	50 µl Ansatz	10 Ansätze
dH ₂ O	36 µl	360 µl
10x Polymerase Puffer	5 µl	50 µl
M13KE ssDNA (1:10 verdünnt)	2 µl	-
M13pEZ-fw (10 pmol/µl)	1 µl	10 µl
M13pEZ-rev (10 pmol/µl)	1 µl	10 µl
dNTPs (10 mM)	4 µl	40 µl
DNA-Polymerase	1 µl	10 µl

Für die PCR werden folgenden Bedingungen verwendet:

95°C	120 s		
40 Zyklen		95°C	30 s
		52°C	30 s
		72°C	30 s
72°C	4 Minuten		
4°C	∞		

Das PCR Produkt wird mit einem PCR Aufreinigungskit aufgereinigt (NuceloSpin Extract II) und mit 40 µl dH₂O eluiert. Anschließend wird das Produkt im Beisein von dTTP mit der T4 DNA Polymerase behandelt, um die zum Vektor komplementären Überhänge zu erzeugen:

	20 µl Ansatz	10 Ansätze
PCR Produkt	10 µl	-
dTTP (25 mM)	0,64 µl	6,4 µl
DTT (100 mM)	0,2 µl	2 µl
T4 DNA Polymerase (3000 U/ml)	1 µl	10
10x Polymerase Puffer	2 µl	20
ddH ₂ O	6,16 µl	61,6

Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten bei 30°C und 10 Minuten bei 70°C. Nach dieser Behandlung muss das Produkt sofort eingesetzt oder eingefroren (-20°C) werden.

Der Vektor pEZ707 wird zunächst mit dem Enzym *Sma*I verdaut:

7,7 µl Vektor (entspricht 10 µg)	
15 µl <i>Sma</i> I (= 300 U; entspricht einem 30-fachen Überverdau)	
5 µl 10x NEB Puffer 4	
22,3 µl dH ₂ O	
25°C	120 min
65°C	20 min
4°C	∞

Der Verdau des Vektors wird auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft und der Vektor wird sofort in Aliquots zu je 2,5 µl (entspricht etwa 0,5 µg) eingefroren (-20°C). Die Aliquots werden für die Behandlung mit der T4 DNA Polymerase im Beisein von dATP eingesetzt (gleiche Inkubationszeit wie beim PCR Produkt):

	20 µl Ansatz	10 Ansätze
verdauter Vektor pEZ707	2,5 µl	-
dATP (25 mM)	0,64 µl	6,4 µl
DTT (100 mM)	0,2 µl	2 µl
T4 DNA Polymerase (3000 U/ml)	1 µl	10 µl
10x Polymerase Puffer	2 µl	20 µl
ddH ₂ O	13,66 µl	136,6 µl

Die komplementären Produkte (10 µl PCR Produkt + 20 µl verdauter Vektor) werden im Reaktionsgefäß vermischt und für drei Minuten auf 70°C erhitzt. Danach wird das Reaktionsgefäß für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Ansatz wird in *E. coli*

BL21(DE3)GOLD transformiert und am nächsten Tag werden Klone für die Sequenzierung gepickt. Positive Klone werden für eine Proteinexpression verwendet.

2.9.20 Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine

Zur Expression werden die Klone angeimpft und bei einer OD_{600} von etwa 1,4 mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und über Nacht das Protein exprimiert. Die Zellpellets werden am nächsten Tag lysiert und über Metall-Chelat-Säulen (*Vivascience*) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt (siehe 2.7.13).

2.9.21 Protein-ELISA

Der Protein-ELISA wird auf die gleiche Weise durchgeführt, wie der oben bereits beschriebene Phagen-ELISA (siehe 2.9.14). Das Protein wird in einer Konzentration von 200 ng/Loch über Nacht bei 4°C an die ELISA-Platte gebunden. Nach dem Waschen und Blocken werden die in PBST verdünnten Mäuseseren über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird gewaschen und eine Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem anti-Maus-HRP Antikörper (1:2000 in 5 % MPBST) durchgeführt. Die Platte wird fünfmal gewaschen und gebundene Antikörper werden mit einem OPD-Substrat detektiert.

2.9.22 Peptid-ELISA

Zur Abschätzung des anti-V3 Antikörpertiters der Patienten wird ein Peptid-ELISA durchgeführt. Das verwendete V3-Peptid besteht aus 35 Aminosäuren (CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTEIIGDIRQAHC), repräsentiert den HIV-1 Subtyp B und ist über zwei endständige Cysteine zyklisiert. Zunächst werden pro Loch 500 ng Peptid (in 100 µl/Loch in PBS) über Nacht bei 4°C immobilisiert. Am nächsten Tag wird die Platte ausgeklopft und mit 200 µl MPBST für zwei Stunden bei 37°C geblockt. Die Platte wird dreimal gewaschen (PBST), ausgeklopft und mit den seriellen Verdünnungen (100 µl/Loch) der Patientenplasmen in Duplikaten für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platte wird fünfmal gewaschen und mit einem HRP-gekoppelten anti-human Antikörper (100 µl/Loch) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach fünfmal Waschen wird die Platte gut ausgeklopft und mit dem OPD-Substrat (100 µl/Loch) entwickelt. Nach sechs Minuten wird die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt und bei 492 nm (620 nm Referenzwellenlänge) im ELISA-Reader gelesen. Als Ausschlusswert („cut-off“) wird die dreifache OD des Mittelwertes der unspezifischen Reaktion eines HIV-negativen Serumpools (in der höchsten Konzentration) mit dem V3-Peptid verwendet.

2.9.23 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)

Die Gelelektrophorese wird mit einem 12 %igen Trenngel und 4 %igen Sammelgel in einer *Bio-Rad* Mini-PROTEAN® 3 Kammer nach Herstelleranleitung durchgeführt. Die Gellösungen sowie deren Herstellung sind unter Abschnitt 2.3 zu finden.

Die aufzutragenden Proben werden vorbereitet ($x \mu\text{l}$ Probe, $5 \mu\text{l}$ 10x Probenpuffer, mit dH_2O auf $20 \mu\text{l}$ auffüllen), für 5 Minuten aufgekocht und vorsichtig in die auspolymerisierten Taschen gefüllt. Die Gelkammer wird mit 500 ml TGS befüllt und das Gel gestartet. Das Gel läuft zunächst für 20 Minuten bei 100 V, danach bei 180 V bis die Front aus dem Gel gelaufen ist. Der Gellauf wird gestoppt, das entnommene Gel gefärbt oder für einen Western Blot Transfer verwendet.

2.9.24 Detektion der Immunantwort gegen Phagen im Western Blot

Für die Detektion der in den Phagen-immunisierten Tieren induzierten Antikörper gegen die verschiedenen Phagenproteine wurde zunächst eine Gelelektrophorese mit Phagenpartikeln und sodann ein Western Blot durchgeführt. Nach dem Gellauf werden das Gel, die Nitrocellulosemembran und das Whatman Papier zunächst in Towbin Puffer äquilibriert. Der Transfer wird nach dem Semi-Dry Verfahren der Firma *Bio-Rad* nach Anleitung durchgeführt. Bei konstanten 120 mA werden die Proteine für 90 Minuten auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Danach wird die Membran in die benötigten Streifen zerschnitten und mit 5 % MPBST für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Danach werden die Streifen mit dem Immuns serum (1:5000 in 5 % MPBST) oder einem Maus anti-pIII Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Membranstreifen fünfmal mit PBST gewaschen. Es folgt die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Antikörper (1:5000 in 5 % MPBST) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach fünfmaligem Waschen mit PBST und zweimaligem Waschen mit dH_2O werden die Western Blot Streifen mit einer ECL-Lösung nach Herstellerangaben auf einem Hyperfilm entwickelt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Patienten

3.1.1 Präparation der Blutproben und Kokultur der Patientenviren

Die maximal einen Tag alten Blutproben wurden zunächst aufbereitet und nach Plasma, Serum und PBMCs getrennt (siehe 2.9.1). Die Plasma- und Serumproben wurden aliquotiert und eingefroren. Die PBMCs wurden über einen Ficollgradienten präpariert, gezählt und ebenfalls in Aliquots eingefroren. Je nach gelieferter Menge an Blut, wurde von den Patienten eine unterschiedliche Anzahl Aliquots an Plasma, Serum und Zellen erhalten. Ein Aliquot der isolierten Zellen wurde direkt für die Präparation der DNA zur Analyse des CCR5 Korzeptorgens verwendet. Von einem Teil der PBMCs wurde eine Kokultur mit frischen PBMCs zur Anzucht der Patientenviren angelegt. Die Anzucht führte zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Von den 13 Patienten wurde mit MH01 bis MH11 eine Anzucht zur Herstellung von Saatviren versucht. Lediglich die Kulturen der Patienten MH01, MH02, MH04 und MH06 waren erfolgreich. Die Kulturen der Patienten MH01, MH02 und MH04 waren nach 29 Tagen in einer Verdünnung von 1:100 positiv für das Antigen p24 (siehe Tabelle 3.1 und 2.7.9) und die PBMCs wurden daraufhin am 30. Tag eingefroren. Die Kokultur von MH06 war nach 43 Tagen bei einer Verdünnung von 1:100 nur schwach positiv und wurde am 44. Tag eingefroren. Alle anderen Kokulturversuche waren nach 30-40 Tagen noch nicht positiv und die Anzucht wurde deswegen abgebrochen. Von drei der positiven Kulturen wurde zusätzlich die Virusmenge anhand der Aktivität der Reversen Transkriptase bestimmt (siehe Tabelle 3.1). Die Messung der p24-Menge und RT-Aktivität sollte nur semiquantitativ durchgeführt werden, eine quantitative Bestimmung war nicht vorgesehen, da die Messungen nur zur Beobachtung des Kulturverlaufs dienen sollten. Die aus der Kultur eingefrorenen Zellen und die Viren im Überstand der Kultur wurden zur Präparation der viralen RNA verwendet. Das präparierte Material diente sodann zur Sequenzierung der viralen Gene und zur Herstellung rekombinanter Reporterviren. Diese Ergebnisse sind jedoch Teil einer anderen Doktorarbeit (S. Antoni).

Tabelle 3.1: Messwerte der Kokulturen				
	MH01	MH02	MH04	MH06
p24-ELISA 1:100 (OD)	2,38	2,00	3,01	0,50
RT Aktivität (cpm/ml)	9664	2550	17296	--

3.1.2 CCR5 Korezeptorgene der Patienten

Um die CCR5-Gene hinsichtlich einer Deletion von 32 bp zu untersuchen, welche mit verlangsamter Krankheitsprogression einhergeht, wurde eine PCR durchgeführt (siehe 2.9.3).

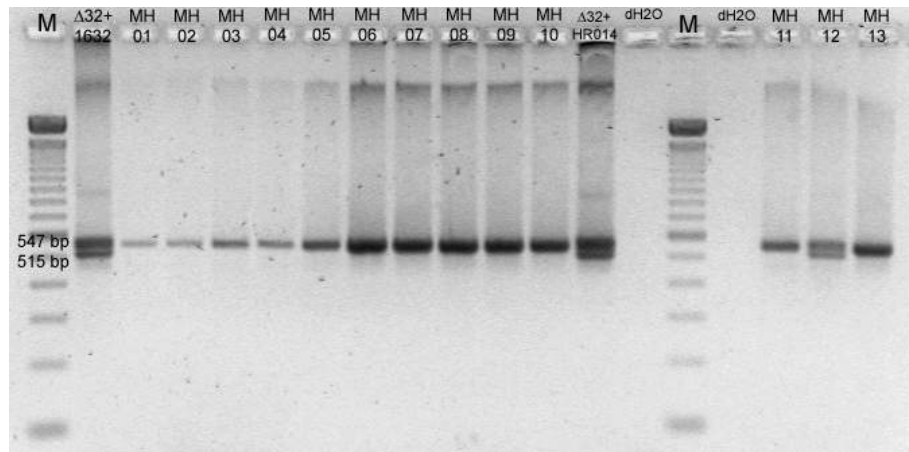


Abbildung 3.1: Ergebnis der CCR5-PCR.

Die PCR der CCR5 Korezeptorgene führt zu einem spezifischen Bandenmuster. Bei Homozygotie für das Wildtypgen erhält man eine Bande mit 547 bp. Ist bei einem Allel die 32 bp Deletion vorhanden (heterozygot) treten zwei Banden auf: 547 und 515 bp. Bei einer Deletion in beiden Allelen (homozygot für die Deletion) erhält man lediglich die Bande bei 515 bp.

Das Ergebnis der PCR zur Überprüfung der CCR5 Korezeptorgene ist in der Abbildung 3.1 dargestellt. Das 1 %ige Agarosegel zeigt das amplifizierte Bandenmuster für alle Patienten (MH01 bis MH13), sowie die Wasserkontrolle und zwei Kontrollen, die heterozygot für die CCR5 Δ 32bp Deletion sind (1632 und HR014). Neben den zwei positiven Kontrollen zeigt lediglich Patient MH12 eine (heterozygote) Deletion in einem der Korezeptorallele. Alle anderen Patienten sind homozygot für das Wildtyp Korezeptorgen. Da bei MH12 die heterozygote Δ 32bp Deletion für den langsamen Krankheitsverlauf verantwortlich sein könnte, wurde dieser Patient von der Studie ausgeschlossen.

3.1.3 Immunantwort der Patienten

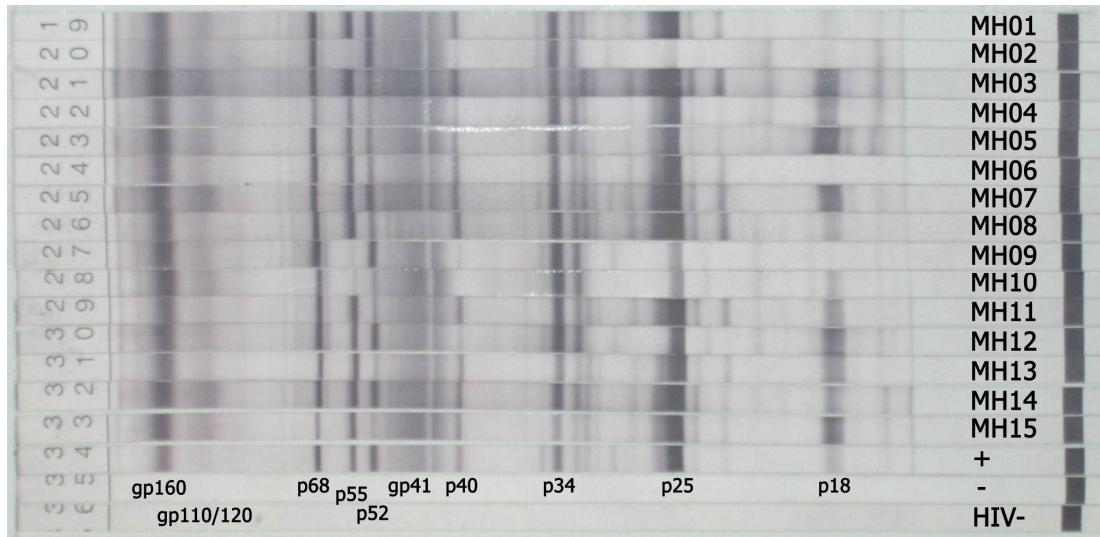


Abbildung 3.2: Immunantwort der Patienten gegen die verschiedenen HIV-1 Proteine.

Die kommerziell erhältlichen Western Blot Streifen ermöglichen die Detektion von Antikörpern gegen spezifische HIV-1 Proteine in den verschiedenen Patientenproben. Die Western Blot Streifen enthalten alle HIV-1 Proteine sowie eine interne Positivkontrolle. Alle Patienten zeigen eine sehr gute Immunantwort gegen den Vorläufer (gp160) der für die Infektion wichtigen Hüllproteine gp120 und gp41 (siehe Text).

Die durchgeführten Western Blots mit einem kommerziellen HIV-1 Testsystem zeigen die Immunantwort der einzelnen Patienten gegen die verschiedenen HIV-1 Proteine. Die Abbildung 3.2 zeigt 15 Patienten (MH01-MH15), eine Positiv- (+) und Negativkontrolle (-), sowie eine zusätzliche Kontrolle mit HIV-negativem Serum (HIV-). Die Patienten zeigen alle eine sehr gute und eindeutige Immunantwort gegen das gp160 Vorläuferprotein, aus welchem die für die Infektion wichtigen Hüllproteine gp120 und gp41 entstehen. Auch die Immunantwort gegen die Reverse Transkriptase (p68 und p52) ist gut zu erkennen, wobei nicht jeder Patient gleich stark mit p52 reagiert. Hier gibt es deutlich Unterschiede, z.B. zwischen Patient MH09 und Patient MH04. Der Gag-Vorläufer p55 wird ebenso nicht von allen Patienten gleich gut erkannt. MH03 zeigt eine sehr starke Reaktion, während bei MH02 nur eine sehr schwache Bande zu erahnen ist. Entsprechend der Reaktion gegen p55 fällt auch die Reaktion gegen p24 (p25) aus, einem Produkt des Vorläufers. Die mit p55 nur sehr schwach reagierenden Seren haben auch gegen p24 deutlich weniger Antikörperreaktion (z.B. MH02 im Vergleich zu MH03). Ein weiteres Produkt des p55 Gag-Vorläuferproteins ist p17 (p18). Dieses Protein wird auch nicht von jedem Patientenplasma erkannt, jedoch unabhängig von der Reaktion mit p55 (z.B. MH06). Die fehlende Reaktion bei p55 dürfte also auf einen niedrigeren Spiegel gegen p24 zurückzuführen sein. Die Reaktion gegen das Enzym Integrase (p34) ist nur bei zwei Patienten schwächer: MH13 und MH15. Doch das Signal entspricht der Positivkontrolle (+).

3.1.4 Antikörpertiter der Patienten gegen V3

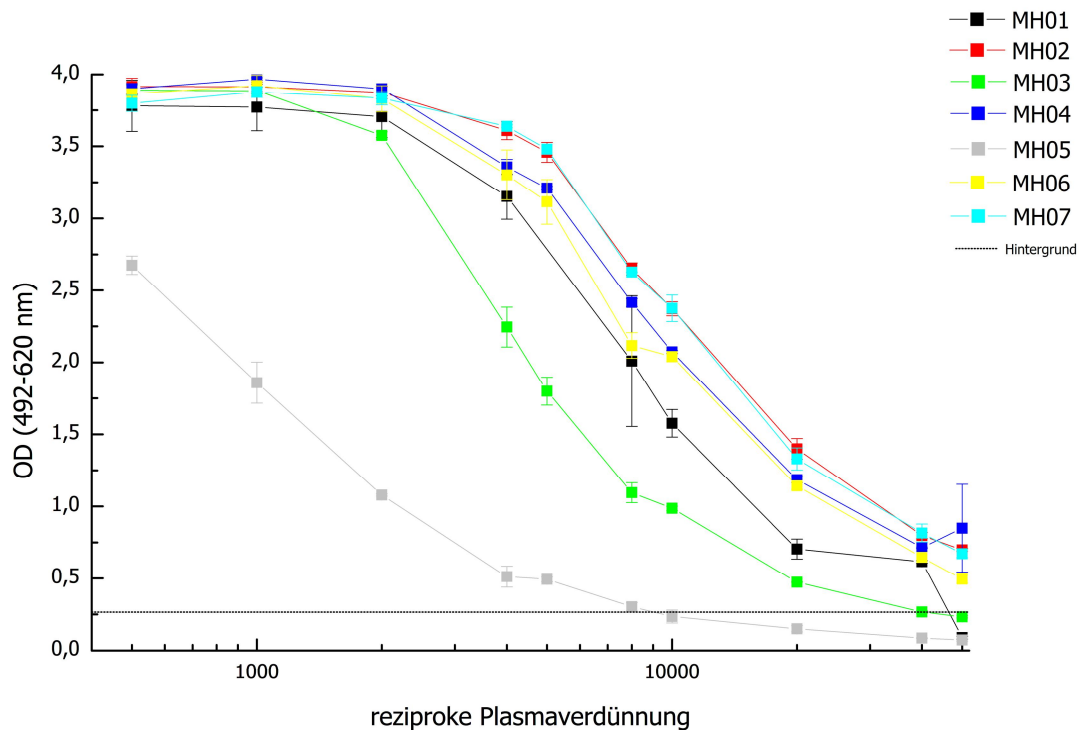


Abbildung 3.3: Antikörpertiter gegen den V3-Loop aus gp120.

Das Diagramm zeigt die Reaktion der seriell verdünnten Patientenplasmen MH01 bis MH07 mit einem V3-Loop Peptid. Der Antikörpertiter gegen V3 ist die Verdünnung, bei der noch eine deutlich spezifische Reaktion mit dem Peptid vorliegt. Die unspezifische Reaktion als dreifacher Mittelwert eines HIV-negativen Serumpools ist als „cut-off“ Linie (Hintergrund) aufgetragen.

Zur groben Abschätzung des Antikörpertiters gegen gp120 wurde ein V3 Peptid-ELISA durchgeführt (siehe 2.9.22). Das zyklisierte Peptid (CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHC) besteht aus 35 Aminosäuren und repräsentiert die V3-Konsensussequenz des HIV-1 Subtyp B. Die zur engen Gruppe der LTNP's gehörenden Patienten MH01 bis MH07 (alle Subtyp B) wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe (1:500 bis 1:50000) mit diesem Peptid im ELISA getestet. Die Ergebnisse als optische Dichte (OD) durch die Umsetzung des Farbstoffes OPD anhand eines HRP-gekoppelten anti-human Antikörpers sind in Abb. 3.3 zu sehen. Wie den Kurven zu entnehmen ist, besteht zwischen den einzelnen Patienten nur ein leichter Unterschied im Antikörpertiter, lediglich Patient MH05 und MH03 besitzen einen deutlich niedrigeren Titer gegen den V3-Loop. Als Titer wird die reziproke Plasmaverdünnung bezeichnet, die noch ein deutlich positives Signal über der unspezifischen Reaktion (HIV-negativer Serumpool) ergibt. Somit ergeben sich aus Abb. 3.3 folgende anti-V3 Titer:

	MH01	MH02	MH03	MH04	MH05	MH06	MH07
anti-V3 Titer	40000	> 50000	20000	> 50000	8000	> 50000	> 50000

3.1.5 HIV-neutralisierende Aktivität der Patientenantikörper

Die Antikörper aus den Plasmaproben wurden aufgereinigt und zur Neutralisation von HIV-1 Reporterviren eingesetzt, um eine neutralisierende Aktivität nachzuweisen (siehe 2.7.6). Da die vollständige Neutralisationsstudie in einer anderen Doktorarbeit (S. Antoni) ausführlich besprochen wird, sollen an dieser Stelle lediglich vier Beispiele aufgeführt werden, um die neutralisierende Aktivität der Patientenproben zu belegen. Die aufgereinigten IgGs der Patienten MH01 und MH04 wurden zur Neutralisation der rekombinanten heterologen primären Viren HR010 und YU2 verwendet. Der durch Transfektion der infektiösen Virus-DNA in 293T-Zellen hergestellte Virenüberstand wurde zunächst mit einer seriellen Verdünnung der Antikörper vorinkubiert und danach zur Infektion von Rezeptorzellen verwendet. Nach zwei Tagen wurde die Luziferaseaktivität in den Zellen gemessen und die Inhibition in Bezug auf die Negativkontrolle (Inkubation mit HIV-negativen IgGs) berechnet (siehe 2.9.7 und 2.9.8).

Die Abbildungen 3.4 und 3.5 zeigen die Neutralisationskurven für die Antikörper der Patienten MH01 und MH02. Auf der X-Achse ist die Antikörperverdünnung in logarithmischer Skalierung dargestellt, auf der Y-Achse die Inhibition in Prozent bezogen auf die Kontrolle. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messpunkten, sowie die Standardabweichung dieser drei Messwerte.

Die vier Graphen zeigen, dass Antikörper beider Patienten eine heterologe Neutralisation bewirken. Sowohl das Virus HR010, als auch YU2 werden durch die aufgereinigten Antikörper neutralisiert. Die halbmaximale Neutralisation (IC₅₀) liegt für MH01/HR010 bei einer Antikörperverdünnung von 1:850, für MH01/YU2 bei 1:2100. Die Werte für Patient MH02 sind ähnlich. Der IC₅₀ für HR010 liegt bei 1:1400, für YU2 bei 1:1500. Die IC₉₀-Werte (90 % Neutralisation) für MH01 liegen mit Virus HR010 bei 1:190 und mit Virus YU2 bei 1:140. Für MH02 ergeben sich die IC₉₀-Werte 1:260 (HR010) und 1:300 (YU2). Eine Übersicht der IC-Werte ist in Tabelle 3.2 zu finden. Damit enthalten die LTNP Seren Antikörper, die selbst heterologe primäre HIV-1 Isolate neutralisieren können.

Tabelle 3.2: IC-Werte der Neutralisation				
	IC₅₀		IC₉₀	
	MH01	MH02	MH01	MH02
HR010	1:850	1:1400	1:190	1:260
YU2	1:2100	1:1500	1:140	1:300
Mittelwert	1:1457	1:1450	1:165	1:280
	1:1463		1:223	

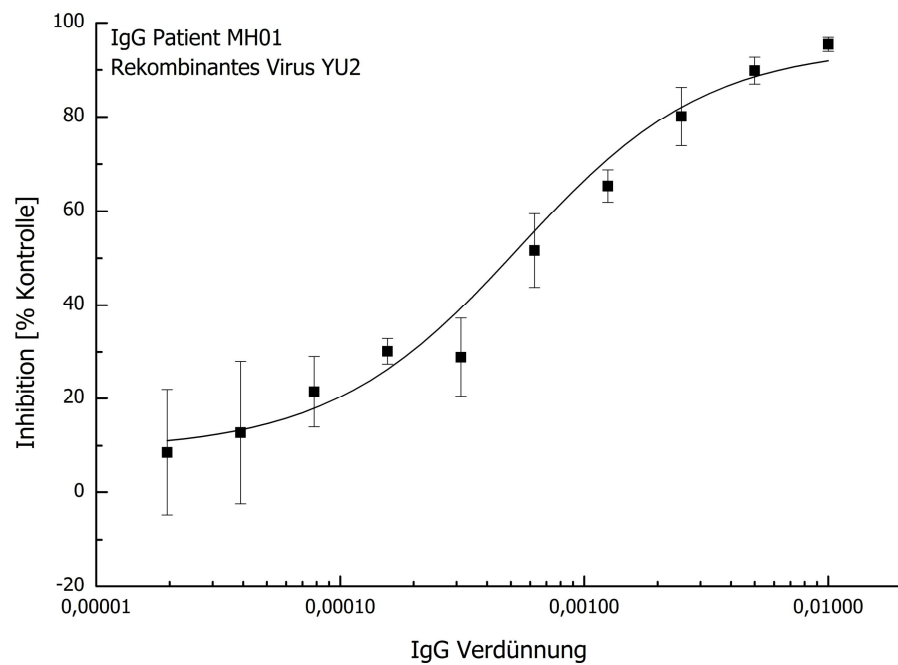
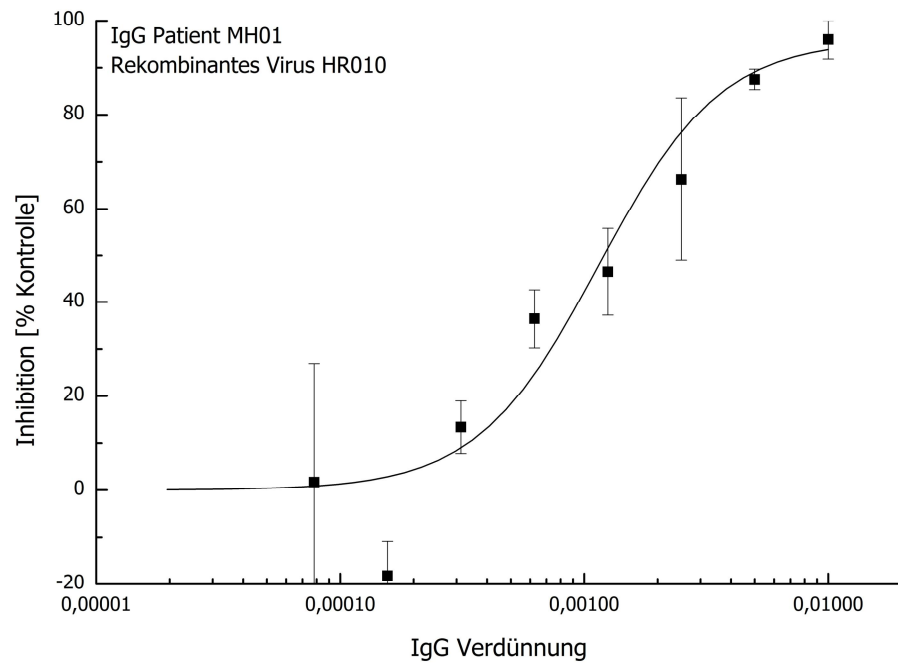


Abbildung 3.4: Neutralisationskurven der Antikörper von MH01 mit den rekombinanten Reporterviren HR010 und YU2.

Die Neutralisationskurven mit den aufgereinigten IgGs des Patienten MH01 zeigen den zu erwartenden sigmoidalen Verlauf, mit zunehmender Antikörperverdünnung nimmt die Inhibition (Neutralisation) ab.

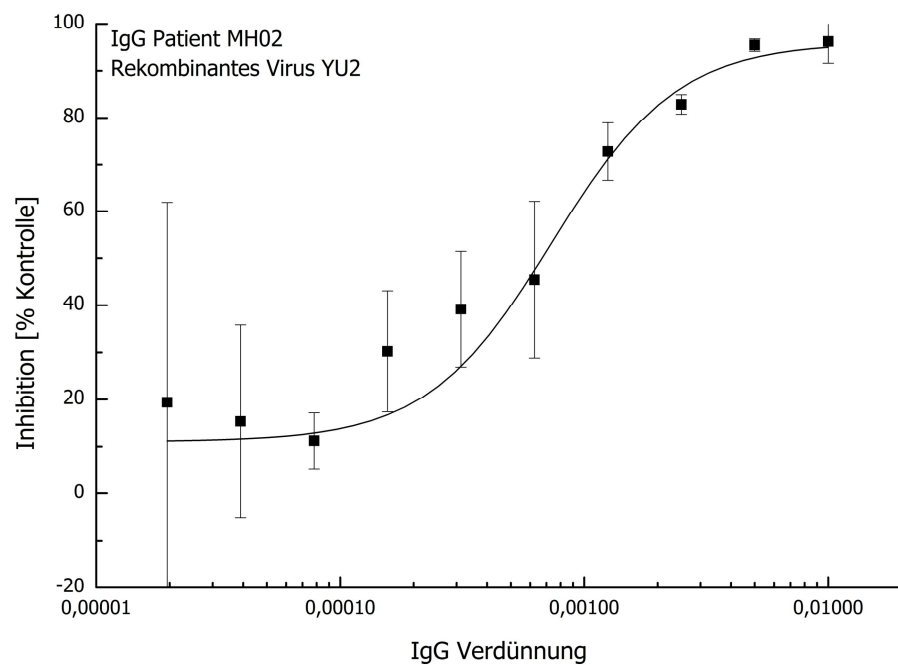
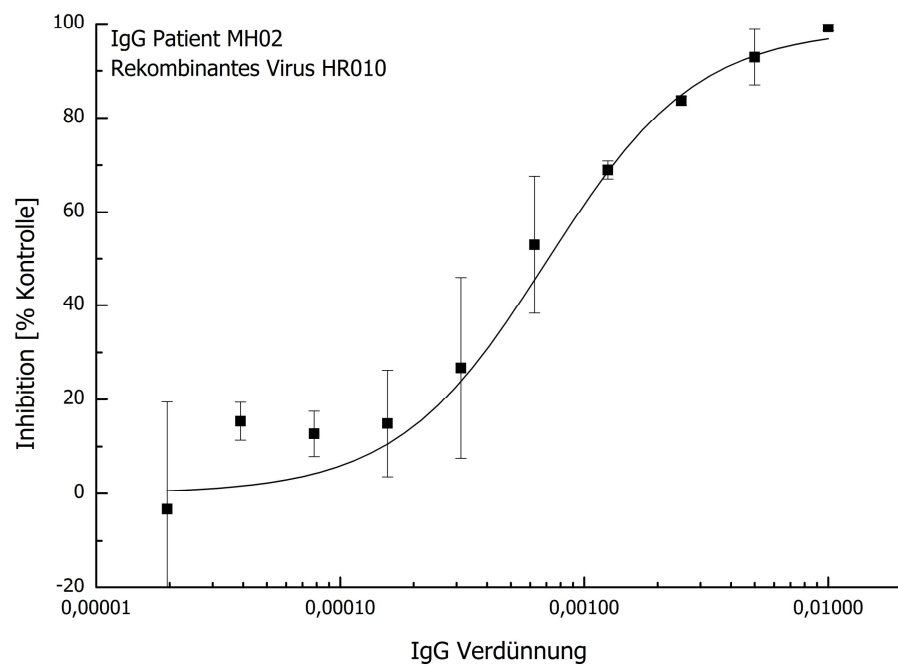


Abbildung 3.5: Neutralisationskurven der Antikörper von MH02 mit den rekombinanten Reporterviren HR010 und YU2.

Die Neutralisationskurven zeigen den zu erwartenden sigmoidalen Verlauf, mit zunehmender Antikörperverdünnung nimmt die Inhibition (Neutralisation) ab.

3.2 Phage Display Biopanning

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Selektion der Phagenbanken und der Analyse der selektierten Phagenklone. Das Plasma der Patienten MH01 bis MH08 wurde für eine Selektion mit drei verschiedenen Phagenbanken verwendet. Zwei Phagenbanken präsentieren lineare randomisierte Peptide mit einer Länge von sieben bzw. 12 Aminosäuren, eine Phagenbank besteht aus zyklischen Peptiden mit sieben Aminosäuren zwischen zwei Cysteinen (siehe 2.7.5). Generell wurden alle Selektionen nach einem standardisierten und etablierten Protokoll durchgeführt. Jede Selektion bestand aus drei positiven Selektionen, sowie zwei negativen Selektionen mit dazwischen liegenden Amplifikationsschritten (siehe 2.9.10). Nach der dritten positiven Selektion wurden die Phagen durch Titern vereinzelt und in einem Phagen-ELISA auf ihre Spezifität hin geprüft (siehe 2.9.11 und 2.9.14). Positive Phagen wurden sequenziert und das präsentierte Peptidinsert auf Homologie zu HIV-1 Proteinen, insbesondere zu dem Hüllprotein gp120, untersucht. Für die sequentiellen Biopannings mit zwei unterschiedlichen Plasmaproben (BP 1/02 und BP 2/02) wurden lediglich zwei positive Selektionen, sowie eine negative Selektion durchgeführt.

Auf den nächsten Seiten soll zunächst ein Überblick über alle durchgeführten Selektionen gegeben werden, sowie eine Statistik für die einzelnen Biopannings mit der Anzahl der positiven Klone in jeder Phagenbank. Weiterhin wird als Beispiel für alle durchgeführten ELISAs ein Phagen-ELISA aufgeführt, der exemplarisch die ELISA-Resultate und die Auswahl der positiven Klone verdeutlichen soll. Bevor dann die einzelnen Phage Display Selektionen mit den unterschiedlichen Patientenproben im Detail besprochen werden, wird eine eigens für diese Arbeit entwickelte Software zur Analyse der Phagenpeptide vorgestellt (3DEX). Diese Software ermöglicht die Lokalisation konformeller Epitope auf der Oberfläche publizierter Proteinstrukturen anhand einiger Vorgaben wie Abstand der zu findenden Aminosäureatome und Größe des Suchrahmens.

3.2.1 Biopanningliste

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der durchgeführten Biopannings				
BP Code	Positive Selektion	Negative Selektion	Eluat	Positive Klone [%] im Phagen-ELISA
1/02	1 ⁺ MH01001 2 ⁺ MH01004	HIV-negativ Pool	2 ⁺	28-50
2/02	1 ⁺ MH01004 2 ⁺ MH01001	HIV-negativ Pool	2 ⁺	19-49
3/02	MH01001	HIV-negativ Pool	3 ⁺	35-56
4/02	MH01004	HIV-negativ Pool	3 ⁺	52-64
5/02	MH01002	HIV-negativ Pool	3 ⁺	6-35
10/03	MH01003	HIV-negativ Pool	3 ⁺	(kaum Klone)
11/03	MH01005	HIV-negativ Pool	3 ⁺	(kaum Klone)
12/03	Pool MH01-05	HIV-negativ Pool	3 ⁺	(kaum Klone)
13/03	MH01007	Präabsorption HIV-negativ Pool	3 ⁺	wenig Klone, nur 12mer
14/03	MH01007	HIV-negativ Pool	3 ⁺	wenig Klone, nur 12mer
15/03	MH01006	HIV-negativ Pool	3 ⁺	45-75
16/03	MH02008	HIV-negativ Pool	3 ⁺	38
17/03	MH01002 (W)	HIV-negativ Pool	3 ⁺	1-34
18/03	MH01003 (W)	HIV-negativ Pool	3 ⁺	6-46
19/04	MH01005 (W)	HIV-negativ Pool	3 ⁺	3-14
20/04	MH01007 (W)	HIV-negativ Pool	3 ⁺	3-9

Die Tabelle 3.3 zeigt alle durchgeführten Selektionen mit den LTNP Plasmen, sowie die verwendeten Patientenproben für die positive Selektion und negative Selektion, das getiterte Eluat für den Phagen-ELISA und die Prozentangabe der am Ende erhaltenen positiven Klone. Wenn nicht anders ausgewiesen, wurde jede Selektion mit allen drei unterschiedlichen Phagenbanken durchgeführt (7mer, c-7mer-c, 12mer). Generell wurde für die Gegenselektion ein Serenpool von fünf Patienten verwendet, die keine HIV-Infektion haben, jedoch mit HCV infiziert sind. Bei einer Selektion wurde auch eine Präabsorption der Phagenbank mit dem negativen Plasmaprobenpool durchgeführt (BP 13/03). Meist wurde das 3. positive Eluat getitert, um Einzelklone für den Phagen-ELISA zu picken. In zwei Fällen wurde das 2. positive Eluat verwendet (BP 1/02 und BP 2/02). Für vier Patienten wurde das Biopanning nochmals wiederholt, da die erste Selektion nicht erfolgreich verlief (BP 17/03 bis BP 20/04). Bei allen Selektionen wurden zwischen 1-75 % positive Klone im Phagen-ELISA identifiziert.

Vom Biopanning Code (BP Code) leiten sich im folgenden die Bezeichnungen der Phagenklone ab, z.B. 1-c.13. Die erste Zahl „1“ steht für die Biopanningnummer (BP 1/02), gefolgt von einem „c“ als Bezeichnung der Phagenbank (c7c) und der Nummer „13“ für den Phagenklon.

3.2.2 Biopanningstatistik

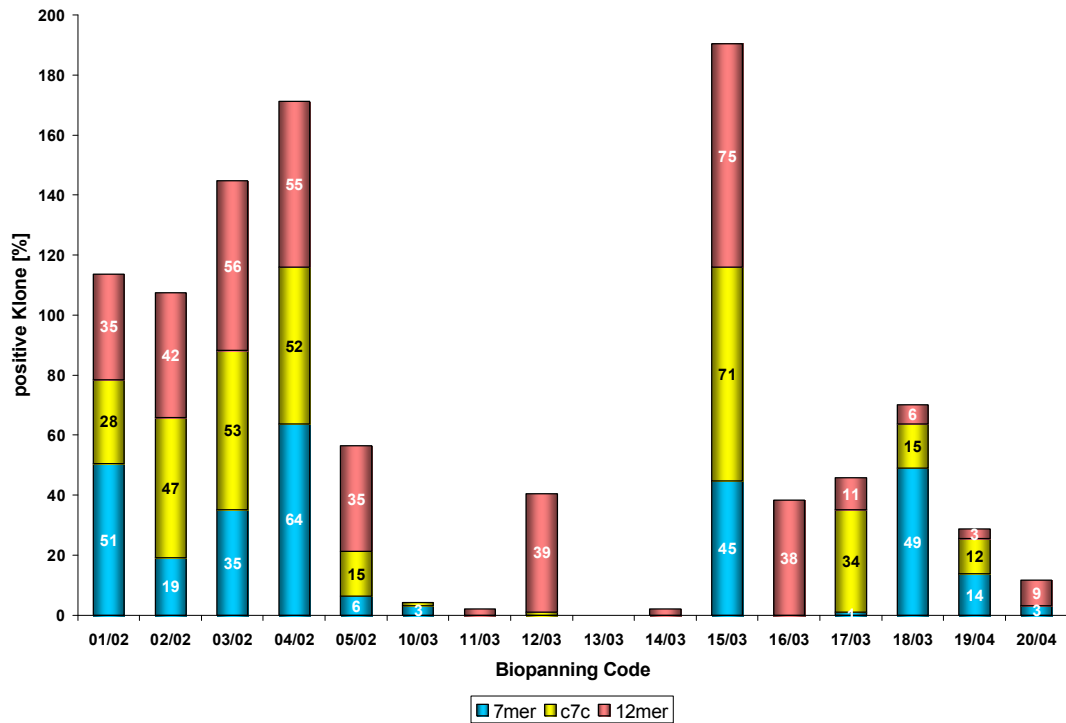


Abbildung 3.6: Statistik aller durchgeführten Selektionen.

Die Balken und eingetragenen Werte zeigen die Anzahl der positiven Klone in Prozent der getesteten Klone jedes einzelnen Biopannings und den verwendeten drei unterschiedlichen Phagenbanken.

Die Abbildung 3.6 zeigt die Statistik für alle durchgeführten Selektionen mit den einzelnen Phagenbanken. Die Prozentzahl positiver Phagenklone im ELISA ist den Balken zu entnehmen. Einige Plasmen selektierten nur sehr schlecht spezifische Phagen (BP 10/03, 11/03, 13/03 und 14/03), durch eine Wiederholung konnten jedoch einige wenige Phagen isoliert werden (BP 17/03 bis 20/04). In 12/16 Selektionen konnten Phagen aus der 12mer-Bank mit einer Prozentzahl von $\geq 3\%$ isoliert werden. Für die 12mer-Bank ergibt sich für die Prozentzahl positiver Klone ein Durchschnitt von 34 %. Werden auch die weniger erfolgreichen Selektionen mit einberechnet ergibt sich ein Durchschnitt von 26 %. Für die 7mer-Bank (10/16) ergeben sich die Werte 35 % bzw. 19 % und für die zyklische 7mer-Bank (9/16) 36 % und 22 %. Insgesamt über alle Selektionen lieferte die 12mer-Bank die besten Resultate, gefolgt von der zyklischen 7mer-Bank. Relativ wenig Ausbeute wurde mit der linearen 7mer-Bank erhalten.

Die meisten Phagenklone konnten im Biopanning 15/03 mit dem Plasma von MH06 selektiert werden, gefolgt von BP 4/02 mit dem Plasma von MH04 und BP 3/02 mit der Plasmaprobe von MH01. Sehr schlecht verliefen die ersten Selektionen mit MH03 (10/03), MH05 (11/03), MH07 (13/03 und 14/03), die später nochmals wiederholt wurden (18/03, 19/04 und 20/04). Zwar konnte hier die Ausbeute erhöht werden, dennoch gehörten sie zu den am wenigsten erfolgreichen Biopannings.

3.2.3 Phagen-ELISA

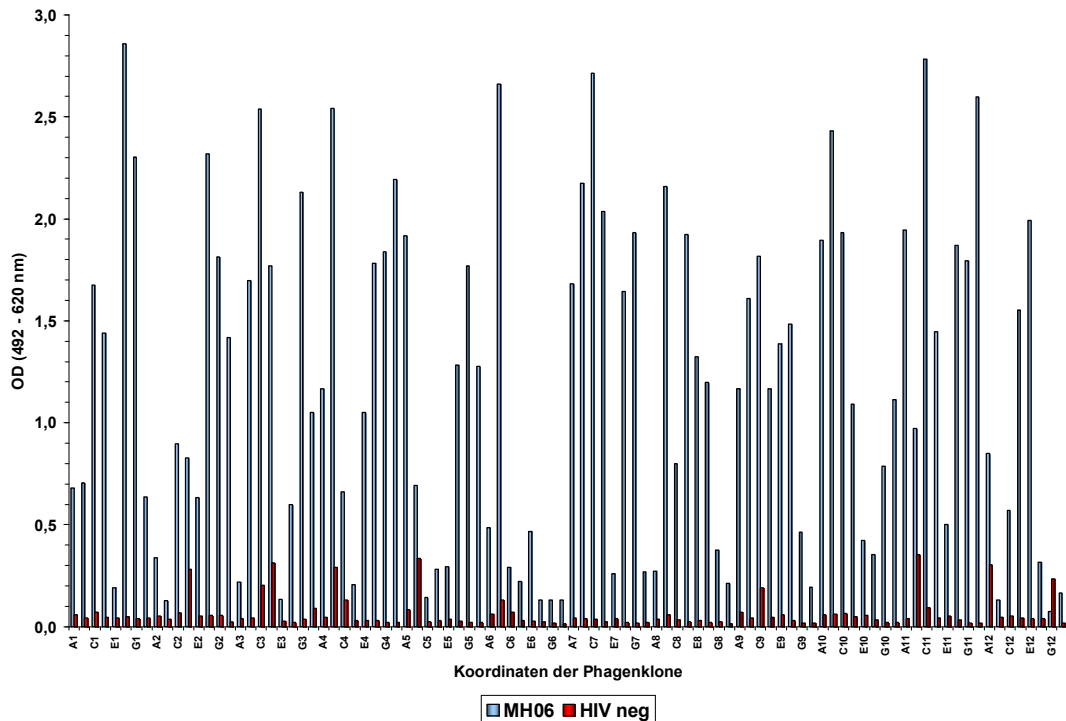


Abbildung 3.7: Phagen-ELISA.

Typisches Ergebnis eines Phagen-ELISAs für die Identifikation positiver Einzelklone nach dem Biopanning. Dargestellt ist das Ergebnis der 12mer-Bank, selektiert mit Plasma von Patient MH06. Die Reaktion der einzelnen Phagenklone mit dem Plasma von MH06 ist in blau, die Reaktion mit einem Kontroll-Serenpool in rot dargestellt. Der Graph zeigt die große Anzahl positiver Phagenklone dieser Selektion. Der „Cut-off“ lag bei einer OD von 0,5 (5-fache OD des Wildtypphagen; ganz rechts) und wurde hier aufgrund der vielen positiven Klone hochgesetzt.

Der Phagen-ELISA diente zur Identifikation positiver Phagenklone aus dem getiterten Eluat der letzten positiven Selektion. Ein beispielhafter Graph als Resultat ist in Abbildung 3.7 zu sehen. In dieser Selektion mit IgG von Patient MH06 waren in der 12mer-Bank 75 % der Klone positiv für das zur Selektion benutzte Plasma, verglichen mit einem Serenpool aus fünf HIV-negativen Patientenseren als Kontrolle. Der Graph zeigt deutlich die gelungene Selektion HIV-spezifischer Phagenklone. Die Höhe der Reaktion (OD) der meisten Klone ist sehr deutlich über der des Wildtypphagen (ganz rechts, H12), welcher als zusätzliche Kontrolle auf jedem ELISA mitgeführt wurde. Insgesamt wurden für diese Arbeit im ELISA mehr als 1400 einzelne Phagenklone getestet. Über alle erfolgreichen Selektionen ergibt sich eine Prozentzahl an positiven Klone von 32 % für die 7mer-Bank, 36 % für die zyklische 7mer-Bank und 34 % für die 12mer-Bank. Werden auch die nicht erfolgreichen Selektionen mit einberechnet ergeben sich folgende Werte: 19 % für die 7mer-Bank, 22 % für die zyklische 7mer-Bank und 26 % für die 12mer-Bank. Jeder positive Phagenklon wurde dann zunächst amplifiziert, die Phagen-DNA wurde präpariert und ein Phagenstock angelegt. Mehr als 700 Phagenklone wurden letztendlich sequenziert. Die Peptidinserts aller sequenzierten Phagenklone wurden analysiert und durch eine speziell entwickelte Software (3DEX) auf Homologie zu gp120 (und eventuellen anderen HIV-1 Proteinen) untersucht.

3.2.4 3D Epitope eXplorer - 3DEX

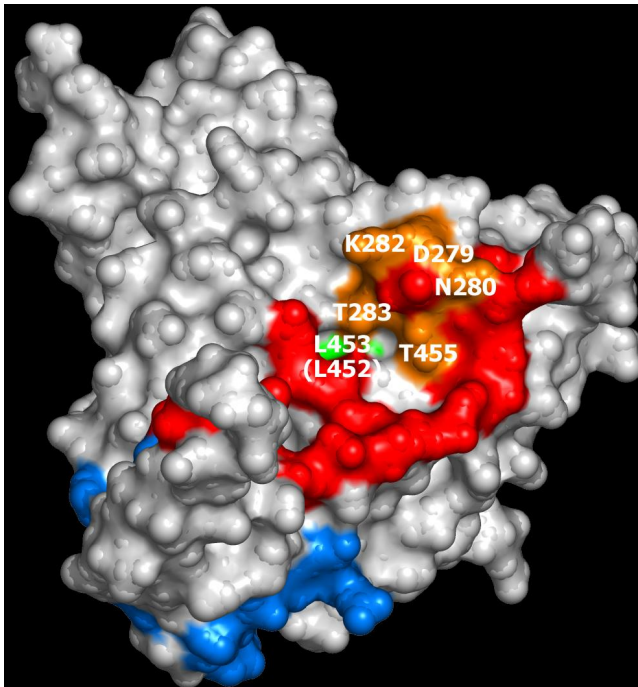


Abbildung 3.8: Phagotop LLTTNKD, dargestellt auf der Oberfläche von gp120.

Die 3DEX Software konnte die Aminosäuren des Phagotops 2-7.2 einer kontinuierlichen Region auf gp120 zuordnen. Die CD4bs ist in rot, die CCR5bs in blau dargestellt. Fünf Aminosäuren (TTNKD) überlappen mit der CD4bs (orange), die zwei Leucine sind nicht exponiert (grün) und daher wohl nicht teil des konformellen Epitops.¹³⁰

Antikörper mit neutralisierenden Eigenschaften besitzen oft ein konformelles Epitop und binden seltener an lineare Strukturen. Die Identifizierung solcher konformellen Epitope ist sehr schwer und meist nur durch umfangreiche Mutationsstudien zu erreichen. Spezielle Software und Hochleistungsrechner sind nötig, um molekulardynamische Rechnungen durchzuführen und die Bindung zweier Proteine zu simulieren („protein docking“). Der Aufwand an Zeit und Geld ist immens, und daher wurde zur Identifizierung solcher konformellen Epitope in publizierten Proteinstrukturen eine eigene Software entwickelt. Die Software läuft auf jedem PC mit Windows-System, ist sehr einfach in der Bedienung und ermöglicht die

schnelle und gleichzeitige Analyse vieler Sequenzen. Der Algorithmus sucht lineare Peptidsequenzen in 3D-Strukturen (pdb-Dateien) über vorgegebene Restriktionen, wie Atomabstand und Suchrahmen. Um wirklich nur die Aminosäuren für die Suche zu berücksichtigen, die an der Oberfläche exponiert sind und daher an der Bindung eines Antikörpers beteiligt sein können, wurde eine Funktion integriert, die zunächst die Oberfläche des importierten Proteins berechnet. Die Oberflächenfunktion kann an- oder abgeschaltet werden und für das Ausmaß der Exposition der Aminosäuren können zwei Schwellenwerte ausgewählt werden ($\leq 20\%$ oder $> 50\%$). Um eventuelle lineare Epitope zu identifizieren oder falls keine publizierte Struktur vorliegt, kann die Software ebenfalls vorgegebene Proteinsequenzen nach linearer Homologie zu den selektierten Peptiden analysieren. Die benötigten Proteinsequenzen können einfach über Textdateien importiert werden. Da Mimotope oftmals nicht die identischen aber ähnliche Aminosäuren zum Epitop aufweisen, gibt es ebenfalls die Möglichkeit, einen Joker einzuschalten. Dieser kann den Platz jeder Aminosäure annehmen. Dadurch lassen sich zusätzlich Peptidsequenzen als potentielle Epitope identifizieren, selbst wenn nicht alle Aminosäuren in der 3D-Suche zugeordnet werden können.

Ein Beispiel ist in Abbildung 3.8 zu sehen. Die 3DEX Software konnte das Phagotop eines selektierten Klons (2-7.2) einigen Aminosäuren auf der Oberfläche von gp120 zuordnen. Die detail-

lierte Funktionsweise der Software und einige weitere Beispiele sind in der dazugehörigen Publikation zu finden.¹³⁰

3.2.5 Analyse der Phagenklone

Alle unterschiedlichen Phagen einer Selektion wurden in einer Tabelle zusammengefasst, die im Anhang zu finden ist (siehe Kapitel 6.1). Neben der Bezeichnung des Phagenklons ist ebenso die Häufigkeit in der Spalte „Anzahl“ aufgeführt. Die Phagen wurden untereinander nach Homologien sortiert und in Gruppen geordnet. Ähnlichkeiten zu anderen Phagenklonen oder Gruppen anderer Selektionen wurden ebenso vermerkt, wie augenscheinliche Homologien zu bekannten Domänen in den HIV-1 Proteinen, vor allem gp120 und gp41. Die Analyse der Peptidsequenzen wurde mit der eigens für dieses Projekt entwickelten Software 3DEX durchgeführt (siehe 3.2.5). Alle Sequenzen wurden hauptsächlich hinsichtlich ihrer Homologie zu dem HIV-1 Hüllprotein gp120 untersucht und zwar mit den folgenden Einstellungen: als Referenzatom wurde das C α -Atom gewählt, der Atomabstand betrug 7 Angström, der Suchrahmen wurde auf vier Aminosäuren eingestellt und die Oberflächenfunktion wurde mit dem Schwellenwert 20 % aktiviert. Die Ergebnisse sind in der Spalte „Alignment 3D gp120“ zusammengefasst. Die meisten Klone wurden ebenfalls ohne die Verwendung der Oberflächenfunktion untersucht, jedoch mit wechselnden Parametern, so dass diese im einzelnen nicht aufgeführt sind. In dieser Analyse wurden neben gp120 noch andere Strukturen von HIV-1 Proteinen importiert, darunter Tat, p24, Nef und die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease. Aufgrund der Masse an Resultaten, wurden für alle Analysen nur die Ergebnisse mit mindestens vier Aminosäuren Homologie berücksichtigt und aufgelistet. Da eine lineare Homologie mit vier oder mehr aufeinander folgenden Aminosäuren sehr selten auftritt, wurden diese ebenfalls, sofern vorhanden, in der Spalte „Alignment 3D ohne Oberfläche“ eingeordnet. Besondere lineare Homologien werden im erklärenden Text zu den Selektionen erwähnt.

Die Wahrscheinlichkeit p , durch Zufall ein bestimmtes Motiv von vier Aminosäuren zu finden, liegt bei unter 2 %. Diese Wahrscheinlichkeit berechnet sich aus der Anzahl der zur Verfügung stehenden Aminosäuren (20), der zu findenden Aminosäuren (4) und der in allen HIV-1 Proteinen vorkommenden Aminosäureanzahl (ca. 2919):

$$p = \left(\frac{1}{20}\right)^4 \cdot 2919 = 0,018$$

Berücksichtigt man nur die Aminosäuren der Hüllproteine, so wird die Wahrscheinlichkeit ein Vierermotiv zufällig zu finden noch geringer und fällt weit unter 1 %. Für gp120 mit etwa 511 Aminosäuren ergibt sich so für p ein Wert von 0,003, für gp41 (345 Aminosäuren) ein Wert von $p = 0,002$ und für gp160 (856) ein p -Wert von 0,005 (siehe 4.4.3).

Homologien der einzelnen Phagen untereinander oder unter den Gruppen wurden in den Tabellen grau hinterlegt. Identische Klone aus unterschiedlichen Selektionen wurden in den Tabellen mit der Bezeichnung des Klons in rot hinter der Peptidsequenz vermerkt (bei Ähnlichkeit steht dem Namen ein „>“ voran, bei identischer Sequenz ein „=“). Bei linearen Homologien (vor al-

lem gp120 V3 Loop und gp41 KLIC-Motiv) ist zusätzlich die Sequenz der Region aus dem zugehörigen Patientenisolat angegeben und homologe Aminosäuren sind gelb eingefärbt. Konformelle Homologien zu der publizierten Struktur wurden, wenn die identifizierten Aminosäuren mit den bekannten Rezeptor- und Korezeptorstellen überlappen, rot umrandet.¹⁵¹ Wurde eine konformelle Homologie ohne diese Überlappung gefunden, sind die Aminosäuren unterbrochen rot umrandet. In den Spalten der Alignments sind Aminosäuren, die an die Bindung an CD4 involviert sind, rot dargestellt, Aminosäuren, die sich an der Bindung an CCR5 beteiligen, blau. Orange dargestellte Aminosäuren sind nicht direkt an der Bindung des Rezeptors beteiligt, verlieren aber dennoch nach Bindung des Rezeptors ihre Zugänglichkeit.

Aminosäuremotive werden im Ein-Buchstaben-Code in großen Buchstaben dargestellt. Sollten Motive nicht in allen Klonen an allen Positionen identisch sein, jedoch die Mehrheit der Phagenklone ein dominantes Motiv zeigen, werden die wechselnden Aminosäuren mit tief gestellten Buchstaben dargestellt und repräsentieren die an dieser Position am häufigsten gefundene Aminosäure. Neben den ausführlichen Übersichtstabellen im Anhang (siehe Kapitel 6.1), in denen sämtliche selektierten Klone, geordnet nach ihrer Homologie zu finden sind, werden im Text des Ergebnisteils einzelne Motive nochmals in kleinen vereinfachten Tabellen dargestellt. Diese enthalten nicht die Informationen zu den 3DEX-Analysen, geben jedoch einen kleinen Überblick über die im Text behandelten Aminosäuresequenzen und Homologien, vor allem wenn diese linear mit den HIV-1 Proteinsequenzen der Patientenviren verglichen werden.

3.2.6 Sequentielles Biopanning mit MH01 und MH04

BIOPANNING MIT MH01/MH04

Die ersten beiden Selektionen wurden mit dem Plasma der Patienten MH01 und MH04 durchgeführt. Die Selektion 1/02 wurde in der ersten positiven Selektion mit MH01 und in der zweiten positiven Selektion mit MH04, die Selektion 2/02 in der ersten positiven Selektion mit MH04 und in der zweiten positiven Selektion mit MH01, durchgeführt. Für den Phagen-ELISA wurde das Eluat der zweiten positiven Selektion getitert. Im Phagen-ELISA wurden für das Biopanning 1/02 zwischen 28 und 50 % positive Phagen selektiert, für das Biopanning 2/02 zwischen 19 und 49 % (siehe Abb. 3.6). Für die Sequenzierung wurden die am stärksten reagierenden Phagen ausgewählt.

Tabelle 3.4: Lineare gp120 V3-Loop Motive aus BP 1/02											
Name	Anzahl	Sequenz									
V3-Loop 308-319 ¹	MH01 MH04	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A
1-c.1			L	G	P	P	R	A	F		
1-c.3			Q	G	P	G	R	A	M		
1-c.4	18		L	G	P	G	R	A	F		
1-c.12			I	G	P	G	A	A	Y		
1-c.31			R	G	P	G	R	A	F		
1-c.34			I	G	P	G	R	G	F		
1-7.5				A	I	G	T	A	F	L	

¹ alle angegebenen Aminosäurepositionen richten sich nach der Nummerierung des HXB2-Isolates

Name	Anzahl	Sequenz												
gp41 596-608	MH01 MH04	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	A	V
1-12.2	7	H	A	C	T	G	K	L	R	C	T	T	T	
1-12.4		L	P	C	Q	G	K	S	A	C	S	T	T	
1-12.5	2		M	C	Q	G	K	N	I	C	T	T	I	Q
1-12.10	5	T	P	C	L	G	K	L	P	C	S	T	T	
1-12.15	2	T	N	C	V	G	K	D	R	C	L	T	L	
1-12.17		H	P	S	P	G	K	A	N	N	A	L	P	

Die Übersichtstabelle mit allen sequenzierten Phagen von der Selektion mit dem Plasma der Patienten MH01/MH04 (BP 1/02) ist im Anhang zu finden (siehe Tabelle 6.1). Dort ist auch das Ergebnis der Analyse der Phagotope mit der eigens hierfür entwickelten Software 3DEX angegeben. Einzelne Phagenklone, die im Text näher besprochen werden, sind in kleinere Tabellen zusammengefasst, diese enthalten jedoch nicht die Informationen der 3DEX-Analyse.

Dass es wirklich möglich ist, mit einer polyklonalen Plasmaprobe HIV-spezifische Phagen zu selektieren, zeigen die immundominanten Motive, die immer sehr zahlreich in den Selektionen gefunden werden. Hierbei handelt es sich vor allem um den V3-Loop in gp120, sowie eine Region in gp41, die ein immundominantes Motiv mit der Aminosäureabfolge ⁶⁰¹KLIC⁶⁰⁴ enthält (KLIC-Motiv). Diese auffälligen linearen Motive sind in den Tabellen 3.4 und 3.5 aufgelistet. Es zeigt sich, dass die Spitze des V3-Loops mit der bekannten Aminosäureabfolge ³¹²GPGRAF³¹⁷ in ihrer kompletten Länge in einigen Phagenklonen wiederzufinden ist (1-c.4 und 1-c.31). Klon 1-c.4 wurde 18 mal selektiert und insgesamt sieben Klone zeigen dieses lineare V3-Motiv (siehe Tabelle 3.4). Neben dieser sehr typischen Region an der Spitze des V3-Loops wurde noch ein weiteres Motiv selektiert, welches N-terminal am Beginn des V3-Loops liegt (³⁰⁰NNNTRKR³⁰⁶). Dieses Motiv spiegelte sich jedoch nur in einem einzigen Phagenklon (1-c.5: NLNTSKE) wieder. Das bekannt immundominante KLIC-Motiv aus dem gp41 Protein (Aminosäuren 601-604) wurde ebenfalls in mehreren Klonen selektiert (siehe Tabelle 3.5). Insgesamt fünf Klone zeigen ein KLIC ähnliches Motiv (1-12.2, 1-12.4, 1-12.5, 1-12.10 und 1-12.15), wobei einige Klone bis zu maximal sieben mal gefunden wurden. Sehr konserviert unter den verschiedenen Klonen zeigen sich die Cysteine C⁵⁹⁸ und C⁶⁰⁴, die das Motiv flankieren und für eine kleine Loopform im gefalteten Protein sorgen (siehe Tabelle 3.5). Das Glycin G⁶⁰⁰ und das Lysin K⁶⁰¹ sind ebenfalls konserviert und zumindest in einigen Klonen wurden zumindest das Lysin L⁶⁰² und/oder eines der beiden Threonine (T⁶⁰⁵/T⁶⁰⁶) selektiert. Der Phagenklon 1-12.17 (HPSPGKANNALP) zeigt nur zwei identische Aminosäuren zum bekannten Motiv (G⁶⁰⁰K⁶⁰¹), wurde jedoch aufgrund dieser beiden konservierten Aminosäuren in die gp41-Gruppe mit eingeordnet. Die weiterführende Sequenz des Klons (HPSPGKANNALP) deckt sich mit selektierten Sequenzen aus der zyklischen 7mer-Bank (1-c.18, 1-c.22, 1-c.23 und 1-c.25, siehe Tabelle 6.1), sowie vielen Phagenklonen aus dem Biopanning 3/02, in dem das Plasma des Patienten MH01 alleine verwendet wurde (siehe Tabelle 6.3). Obwohl diese auffällige Sequenzabfolge (NNALP) gerade in BP 3/02 sehr häufig gefunden wurde, konnte keine lineare Homologie zu gp41 festgestellt werden. Daher ist unklar, ob

diese Phagenklone ein Epitop von gp41 darstellen, welches möglicherweise im nativ gefalteten Protein dem KLIC-Motiv benachbart ist.

Eine weitere, häufige aber sehr kurze Peptidsequenz ist in den Klonen 1-12.1 (NPDRSLMPLNLL) und 1-12.9 (FRNPDLKVPLRV) zu finden. Während in diesem Biopanning nur zwei Klone die Abfolge NPD aufwiesen, wurden in den Biopannings 2/02, 3/02 und 4/02 viele verschiedene Klone mit diesen drei oder nur zwei Aminosäuren selektiert (NP, NPD, PD; siehe Tabellen 3.10 sowie 6.2, 6.3 und 6.4). Eventuell ist das Motiv eine Art Fortsetzung der Aminosäureabfolge NNALP, da in anderen Klonen beide Motive hintereinander zu finden sind (z.B. BP 3/02 Klon 3-c.50 NNALPDT, siehe Tabelle 6.3). Eine signifikante lineare oder konformelle Homologie konnte jedoch zu keinem HIV-1 Protein gefunden werden.

Der Klon 1-c.10 (SPTSGSH) enthält eine Sequenz, die identisch in Klon 3-12.12 (TTMSPTSGGRLP) aus BP 3/02 wiederzufinden ist. Der Phagenklon 1-c.20 (THPWGTA) ist in seiner Sequenz absolut identisch zu Klon 3-c.17. Beide Motive konnten weder linear noch konformell einem der viralen Proteine zugeordnet werden.

Ein in fünf Klonen auftretendes, auffälliges Motiv ist in Tabelle 3.6 dargestellt (FR_EPPPE), welches nur in diesem einen Biopanning angereichert wurde und auch nicht in den Biopannings mit den einzelnen Patientenplasmaproben (MH01 und MH04) auftaucht (siehe 3.2.7 und 3.2.8, sowie Tabellen 6.3 und 6.4). Das Motiv konnte keinem Protein, weder linear noch konformell, eindeutig zugeordnet werden. Bei drei Klonen besteht jedoch eine konformelle Homologie zu p24 (E¹²⁸P¹²⁵P¹²³P¹²²): 1-7.6 (FREPPPPE), 1-7.10 (FREPPPPL) und 1-7.22 (FRSPPPPE).

Tabelle 3.6: Motive aus BP 1/02

Name	Sequenz						
1-7.6	F	R	E	P	P	P	E
1-7.10	F	R	E	P	P	P	L
1-7.19	F	R	E	P	G	T	Y
1-7.22	F	R	S	P	P	P	E
1-7.25	F	R	T	P	P	M	D

Eine häufige Peptidsequenz mit dem Konsensus L^R/LTTxKx ist in Tabelle 3.7 dargestellt. Drei ähnliche Sequenzen wurden in BP 2/02 selektiert und zum Vergleich mit in die Tabelle aufgenommen (siehe Tabelle 3.7). Die meisten Klone dieser Gruppe zeigen ein potentiell konformelles Epitop, überlappend mit der CD4-Rezeptorbindungsstelle auf gp120. Vor allem der Klon 1-7.1 (LRTTAKL) zeigt mit insgesamt fünf Aminosäuren (R⁴⁶⁹T²⁸³T⁴⁵⁵A²⁸¹K²⁸²) und der Klon 1-7.14 (LLTTAKP) mit vier Aminosäuren (T²⁸³T⁴⁵⁵A²⁸¹K²⁸²), eine auffallend große konformelle Übereinstimmung zur gp120 Struktur, insbesondere zur CD4-Rezeptorbindungsstelle (siehe Tabelle 6.1). Zwei Vierermotive, die sich lediglich in der Position des letzten Threonins in der Kristallstruktur unterscheiden, konnten in Klon 1-7.23 (MRTTDKT) zugeordnet werden: T²⁷⁸D²⁷⁹K²⁸²T²⁸³ und T²⁷⁸D²⁷⁹K²⁸²T⁴⁵⁵ (siehe Tabelle 6.1). Die weiteren Phagenklone dieser Gruppe besitzen auch meist Vierermotive, jedoch überlappen diese nicht mit bekannten Rezeptor- oder Korezeptorbindungsstellen (siehe Tabelle 6.1).

Tabelle 3.7: Motive aus BP 1/02

Name	Sequenz						
1-7.1	L	R	T	T	A	K	L
1-7.14	L	L	T	T	A	K	P
1-7.4	L	K	T	T	H	K	Y
1-7.9	L	K	T	T	L	K	L
1-7.11	L	H	T	T	M	K	S
1-7.12	L	L	T	T	S	K	M
1-7.8	L	L	T	T	S	R	M
1-7.18	L	L	V	T	S	K	P
1-7.20	L	K	T	T	I	K	M
1-7.17	R	R	T	T	E	K	P
1-7.21	M	R	T	T	E	K	Y
1-7.23	M	R	T	T	D	K	T
1-7.28	F	Y	S	T	T	K	L
1-7.16	F	F	S	T	A	K	S
2-7.2	L	L	T	T	N	K	D
2-7.15	L	R	T	T	A	K	L
2-7.18	L	R	T	P	E	R	Y

Einige weitere Peptidsequenzen wurden seltener gefunden. Unter diesen Phagen zeigen nur zwei Klone Vierermotive: 1-12.3 (VTPTRILSSSFT) und 1-12.7 (HKYPCSTTNCSP), doch wurde Klon 1-12.7 immerhin sieben mal selektiert. Beide Peptidsequenzen überlappen nicht mit Aminosäuren, die in die Rezeptorbindung involviert sind. Eine größere Homologie zu gp120 (bei Klon 1-12.7 mit zwei Einzelmotiven, die insgesamt neun Aminosäuren ausmachen) ist zu erreichen, wenn die Oberflächenberechnung von 3DEX ausgeschaltet wird. Dennoch überlappen nur wenige Aminosäuren mit den für die Infektion wichtigen Bindungsstellen der Rezeptoren (siehe Tabelle 6.1).

BIOPANNING MIT MH04/MH01

Das zweite Biopanning mit den gleichen Patienten (BP 2/02), jedoch in umgekehrter Reihenfolge bezüglich auf die positiven Selektionen, ergab etwa die gleiche Anzahl an positiven Phagen im ELISA. Die Sequenzen aller Phagenklone sind in der Übersichtstabelle im Anhang (Tabelle 6.2) zu sehen. Auch in dieser Selektion mit umgekehrter Reihenfolge der Plasmaproben wurden viele lineare Motive der immundominanten Regionen des Hüllproteinkomplexes (gp120 und gp41) isoliert. Das GPGRAF-Motiv aus dem V3-Loop ist in 12 Phagenklonen zu erkennen, die teilweise mehr als einmal selektiert wurden und allesamt aus der zyklischen 7mer-Bank sind (siehe Tabelle 3.8). Das zweite Motiv aus dem V3-Loop (³⁰⁰NNNTRKR³⁰⁶), welches bereits im Klon 1-c.5 des Biopannings 1/02 gefunden wurde, ist in dieser Selektion häufiger aufgetreten. In insgesamt fünf Klonen ist diese Sequenzabfolge des N-terminalen V3-Loops zu erkennen (siehe Tabelle 3.8). Interessant ist, dass in der Einzelselektion mit MH01 (siehe Tabelle 6.3) keine Phagenklone diese Aminosäureabfolge repräsentieren, während in der Einzelselektion mit MH04 viele Phagenklone mit dem Motiv auftauchen (siehe Tabelle 6.4 und 3.15). Dies lässt vermuten, dass die Sequenz hauptsächlich durch Antikörper selektiert wurde, die in Patient MH04 vorliegen.

Tabelle 3.8: Lineare gp120 V3-Loop Motive aus BP 2/02								
Name	Anzahl	Sequenz						
V3-Loop 308-319	MH01	I	G	P	G	R	A	F
	MH04	M	G	P	G	R	A	F
2-c.2		L	G	P	G	R	A	F
2-c.7		Q	G	P	H	P	Y	L
2-c.8		M	G	P	S	R	A	F
2-c.10		W	G	P	G	A	V	F
2-c.12		L	G	P	G	R	A	L
2-c.14	2	I	G	P	G	R	G	F
2-c.16		T	G	P	S	R	A	Q
2-c.17		W	F	G	F	W	N	P
2-c.18		L	G	P	G	R	A	W
2-c.21	3	T	G	P	G	R	A	W
2-c.22	3	I	G	P	S	R	A	W
2-c.29	2	C	G	P	S	R	A	H
V3-Loop 300-306	MH01	N	N	N	T	R	R	G
	MH04	N	N	N	T	R	K	G
2-c.1		N	N	A	A	P	H	S
2-c.15		N	T	N	T	S	K	K
2-c.20		N	N	N	T	S	K	K
2-c.26	2	N	T	N	T	S	K	S
2-c.28	2	N	Q	N	T	A	K	T

Das lineare KLIC-Motiv aus gp41 wurde sieben Klonen zugeordnet, ein Klon (2-12.1) wurde neun mal isoliert (siehe Tabelle 3.9). Teilweise sind einige dieser besprochenen linearen V3- und KLIC-Klone identisch mit Klonen aus dem BP 1/02 (siehe Tabelle 3.4 und 3.8: 1-c.1 = 2-c.2 und siehe Tabelle 3.5 und 3.9: 1-12.2 = 2-12.9).

Tabelle 3.9: Lineare gp41 KLIC-Motive aus BP 2/02																	
Name	Anzahl	Sequenz															
gp41 596-608	MH01	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	A	V	P	W	N
	MH04																
2-12.1	9	T	N	C	V	G	K	D	R	C	V	T	L				
2-12.9	2	H	A	C	T	G	K	L	R	C	T	T	T				
2-12.19	2		M	C	Q	G	K	N	I	C	T	T	I	Q			
2-12.30	2		Q	C	V	G	K	Q	N	C	M	T	Q	V			
2-12.15						G	K	T	N	C	T	T	Y	W	C	T	N
2-12.28						G	K	T	N	C	T	T	Y	W	C	P	N
2-c.24	2				M	G	K	L	H	C	R						

Die Klone 2-c.9 (GLLEPWK) und 2-c.13 (MMLEPWK) zeigen eine lineare Aminosäuresequenz aus dem Tat-Protein: ⁸LEPWK¹² (siehe Tabelle 6.2). Ein wirklich seltenes Beispiel für eine lineare Homologie mit fünf aufeinander folgenden Aminosäuren, die einen nicht immundominanten Bereich betrifft.

Die unter BP 1/02 bereits erwähnten Motive mit den Aminosäuren NP, NPD oder PD tauchen hier nun in großer Anzahl auf. 11 Phagenklone zeigen eines dieser kurzen Motive. Weitere Klone zeigen eine auffällige Sequenz mit zwei aufeinander folgenden Prolinen, sowie zwei Tryptophanen (siehe Tabelle 3.10). Der Abstand der zwei Tryptophane (WxxxW) hat Ähnlichkeit mit dem Epitop für den monoklonalen neutralisierenden Antikörper 2F5 (siehe Tabelle 1.1 und Abb. 1.9): ELDKWASLW. Eine größere Übereinstimmung mit dem bekannten 2F5-Epitop kann in den Phagenklonen jedoch nicht gefunden werden (siehe Tabelle 3.10). Die Mehrheit der Phagenklone aus Tabelle 3.10 besitzt auch keine konformelle Homologie zu gp120. Lediglich vier der Sequen-

zen (2-12.6, 2-12.13, 2-12.26 und 2-12.39) besitzen Motive, die teilweise mit den Rezeptor- und Korezeptorbindungsstellen überlappen (siehe Tabelle 6.2).

Tabelle 3.10: Motive aus BP 2/02

Name	Sequenz																	
2-7.1			N	P	M	W	P	I	Q									
2-7.5			N	P	D	T	G	M	P									
2-7.8			N	P	D	M	L	Y	A									
2-7.10			N	P	D	D	M	T	R									
2-7.14	F	P	N	P	D	Y	I											
2-7.9	Y	R	P	P	D	M	S											
2-12.10		W	K	P	D	E	S	M	S	L	L	L	H					
2-12.11	L	L	V	P	D	L	S	L	H	P	L	P						
2-12.34	F	P	N	P	D	L	W	S	L	P	A	R						
2-12.27	Y	A	P	P	D	Y	S	P	P	N	L	F						
2-12.29		T	S	P	D	Y	S	P	P	L	L	W	W					
2-12.14			L	P	H	Y	S	P	P	L	L	T	L	L				
2-12.6			E	Q	V	Q	S	P	P	W	A	P	A	W				
2-12.13			H	S	V	K	L	P	P	W	S	S	V	W				
2-12.16					S	H	F	P	P	W	S	L	A	W	T	H		
2-12.39							Y	P	P	W	N	L	T	W	L	S	T	P

Zwei Phagenklone, die Ähnlichkeit zu selektierten Sequenzen aus dem BP 1/02 aufweisen, besitzen Homologie zur gp120 Struktur (siehe Tabellen 3.7 und 6.2). Der Klon 2-7.2 (LLTTNKD) besitzt fünf Aminosäuren, die eine konformelles Epitop darstellen könnten und mit der CD4-Rezeptorbindungsstelle überlappen. Die beiden Leucine konnten auch durch die 3DEX Software zugeordnet werden, sind jedoch nicht vollständig an der Oberfläche exponiert und daher wohl nicht teil des potentiellen Epitops (siehe Abb. 3.8). Fünf Aminosäuren aus Klon 2-7.15 (LRTTAKL) können konformell der Rezeptorbindungsstelle zugeteilt werden (siehe Tabelle 6.2). Weiterhin ist dieser Phage absolut identisch mit Klon 1-7.1 (siehe Tabelle 3.7).

Aus der 12mer-Bank wurden zwei Phagen isoliert, deren Aminosäuresequenz zumindest teilweise mit wichtigen Rezeptorbindungsstellen überlappt, wobei die gefundenen Motive jedoch länger sind. Bei 2-12.2 (KAPLSTLSGSLL) überlappen P¹²⁴ und L¹²⁵ mit der CD4-Bindungsstelle, bei 2-12.33 (KTAIGQLSSTLL) sogar drei Aminosäuren (K²⁸²T²⁸³A²⁸¹). Die anderen zugeordneten Aminosäuren, die im Fall von 2-12.2 das Fünfermotiv vervollständigen, liegen in der Nähe der Rezeptorbindungsstelle. Bei Klon 2-12.33 sind zwei verschiedene Dreiermotive zu finden, die auf der Oberfläche des Proteins kolokalisieren (siehe Tabelle 6.2).

3.2.7 Biopanning mit MH01

In der Selektion 3/02 wurden nach Biopanning 15/03 und 4/02 die meisten Phagenklone selektiert. Aus der 7mer-Bank konnten 35 %, aus der zyklischen 7mer-Bank 53 % und aus der 12mer-Bank 56 % positive Klone im Phagen-ELISA detektiert werden (siehe Abb. 3.6). Die komplette Liste der sequenzierten Phagen ist in der Tabelle 6.3 im Anhang zu sehen, eine Auswahl befindet sich in Tabelle 3.11. Wie bei BP 1/02 bereits erwähnt, wurde ein Motiv besonders häufig in den Phagen vorgefunden: NNA_LP_D. Insgesamt zeigen 45 Phagen ein untereinander ähnliches Motiv mit der ein oder anderen Abwandlung (siehe Tabelle 6.3). Keine der Phagensequenzen konnte eindeutig einem HIV-1 Protein zugeordnet werden, wenn auch einige Phagen Ho-

mologie zu gp120 aufweisen, jedoch meist in denen für die Infektion unwichtigen Domänen („non-neutralizing“ und „silent face“, siehe 1.3). Für die Mehrheit der Klone konnten lediglich Dreiermotive in gp120 gefunden werden. Mit Ausnahmen gibt es auch Homologien, die aus vier oder mehr Aminosäuren bestehen, wobei diese nur selten mit wichtigen Rezeptorbindungsstellen überlappen (siehe Tabelle 6.3).

Tabelle 3.11: Motive aus BP 3/02													
Name	Sequenz												
3-7.27							N	N	N	A	L	P	T
3-c.4							K	N	N	A	L	P	Y
3-12.52							A	N	N	A	S	P	T
3-12.24		E	G	P	S	P	L	N	N	A	T	L	T
3-12.38	S	P	V	K	H	I	H	N	N	S	L	P	
3-12.49							Q	N	N	A	L	P	Y
3-c.37							N	N	N	A	S	P	D

Im Klon 3-7.27 (NNNALPT) überlappen drei Aminosäuren mit der CD4-Bindungsstelle: N²⁷⁹N²⁸⁰A²⁸¹. Die dritte Aminosäure N²⁷⁶ liegt in der Nähe der Bindungsregion, ist aber nicht direkt in die Bindung des Rezeptors involviert (siehe Tabellen 3.11 und 6.3). Vier Aminosäuren aus dem Phagen 3-c.4 (KNNALPY) konnten in der Struktur von gp120 zugeordnet werden, das Motiv K³³⁷N³³⁹N³⁴⁰A³³⁶ befindet sich jedoch in der dem Rezeptor abgewandten Domäne. Dies gilt ebenso für die Klone 3-12.52, 3-12.38 und 3-c.37 (siehe Tabelle 3.11). Eine Kolo-kalisation von zwei Dreiermotiven, die potentiell ein Epitop bilden könnten, weist der Phagenklon 3-12.24 auf (EGPSPLNNATLT). Vier der Aminosäuren (P¹²⁴N²⁸⁰A²⁸¹T²⁸³) sind für die Bindung des Rezeptors wichtig. Die zwei Motive, die in der Sequenz der Klons 3-12.49 (QNNALPYPVSPL) zu finden sind, liegen zwar in der Nähe wichtiger Aminosäuren auf gp120, überlappen jedoch nicht mit für die Infektion notwendigen Bereichen (siehe Tabellen 3.11 und 6.3).

Tabelle 3.12: Motive aus BP 3/02													
Name	Sequenz												
3-c.17	T	H	P	W	G	T	A						
3-12.12	T	T	M	S	P	T	S	G	G	R	L	P	
3-12.20	H	K	T	P	H	T	T	Q	S	T	A	L	
3-12-21	D	N	P	P	R	D	N	G	S	L	T	Q	
3-12.1	T	C	I	T	K	T	A	D	L	T	R	R	
3-12.37	T	D	I	T	K	T	A	D	L	T	R	R	

Einige Peptidsequenzen sind sehr interessant, so ist Klon 3-c.17 (THPWGTA, siehe Tabelle 3.12) identisch mit Klon 1-c.20 aus BP 1/02 (siehe Tabelle 6.1). Vier weitere Phagen zeigen Peptide mit ähnlicher Sequenz und alle haben fünf identische Aminosäuren: THPWG (siehe Tabelle 6.3). Fünf Aminosäuren aus Klon 3-12.12 (siehe Tabelle 3.12) sind in gleicher Abfolge ebenso in Phagenklon 1-c.10 (siehe Tabelle 6.1) zu finden: SPTSG. Trotz dieser auffälligen Häufigkeit, ebenso durch das Auftreten in verschiedenen Selektionen, konnte keine der Sequenzen eindeutig einem HIV-1 Protein zugeordnet werden.

Viele selektierten Sequenzen zeigen nicht mehr als drei Aminosäuren Homologie zu gp120. Vier Klone immerhin vier Aminosäuren (3-12.2, 3-12.6, 3-12.26 und 3-12.25), jedoch liegen alle

Motive in für die Infektion irrelevanten Bereichen des Proteins. Obwohl in zwei Klonen eine Übereinstimmung von fünf Aminosäuren zu finden ist (3-12.20 und 3-12.21), sind die zugeordneten Aminosäuren wiederum in der „silent face“ lokalisiert (siehe Tabellen 3.12 und 6.3). Zwei sehr interessante Phagen hinsichtlich der projizierten strukturellen Homologie konnten dennoch selektiert werden. 3-12.1 und 3-12.37 (siehe Tabelle 3.12) zeigen ein gemeinsames Motiv ($T^{283}K^{282}T^{455}A^{281}D^{279}$), welches mit allen fünf Aminosäuren die CD4-Bindungsstelle überlappt (siehe Tabelle 6.3). Wie in den zwei sequentiellen Selektionen zuvor, konnten auch hier wieder lineare Sequenzen, die den immundominanten Regionen entsprechen, isoliert werden. Neben den bereits bekannten Sequenzen aus dem V3-Loop (gp120), wurden ebenso KLIC-Motive (gp41) selektiert. Klon 3-7.7 (AIGTAFL) ist identisch zu Klon 1-7.5 (siehe Tabelle 3.4). Eine Besonderheit der linearen Klone mit den Sequenzen aus dem V3-Loop ist jedoch auffällig. Wurden in den sequentiellen Selektionen (siehe Tabellen 3.4 und 3.8) lediglich Phagen aus der 7mer-Bank isoliert, so finden sich in dieser Selektion auch Phagen aus der 12mer-Bank (siehe Tabelle 3.13).

Tabelle 3.13: Lineare gp120 V3-Loop Motive aus BP 3/02																	
Name	Sequenz																
V3-Loop 306-323	R	G	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	I	I
3-7.1					V	G	P	G	S	A	F						
3-7.28					G	G	P	G	S	A	F						
3-12.22	K	P	P	V	L	G	P	G	Q	A	F	Y					
3-12.23			Y	H	V	G	P	A	A	G	L	Y	K	T			
3-12.36			T	Y	K	G	P	G	Q	S	F	Y	S	V			
3-12.30			S	P	F	G	P	G	S	A	L	Y	R	P			
3-c.15							L	G	R	Q	A	Y	L				
3-7.7						A	I	G	T	A	F	L					
3-12.17						A	L	G	S	A	F	L	L	T	A	S	S

Auch unter den linearen Sequenzen des KLIC-Motivs gibt es in diesem Biopanning Besonderheiten. Während in den zwei vorausgegangenen Selektionen das zentrale KLIC-Motiv dominiert hat (siehe Tabellen 3.5 und 3.9), kommt nun in zwei Klonen (3-12.3 und 3-12.28) eine weitere lineare Aminosäureabfolge zum Vorschein, die C-terminal des bekannten KLIC-Motivs liegt (siehe Tabelle 3.14): $^{607}AVPW^{610}$. Da sich diese Aminosäuren außerhalb der immundominanten Region befinden, ist die Selektion dieser Klone sehr interessant, zumal in BP 4/02 weitere Phagenklone diese Sequenz - noch mehr zum C-Terminus hin verschoben - besitzen (siehe Tabelle 3.16).

Tabelle 3.14: Lineare gp41 KLIC-Motive aus BP 3/02																	
Name	Sequenz																
gp41 596-612	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	A	V	P	W	N	A
3-12.8		M	C	Q	G	K	N	I	C	T	T	N	Q				
3-12.9		A	C	T	F	K	N	V	C	T	T	K	P				
3-12.18		A	C	T	F	K	N	V	V	T	T	K	P				
3-12.10		M	C	Q	G	K	N	I	C	T	T	I	Q				
3-12.41	T	N	C	V	G	K	D	R	C	V	T	L					
3-12.3					G	S	L	I	Q	H	T	Q	V	P	W	E	
3-12.28					K	L	V	M	H	T	A	V	P	Y	H	I	
3-12.50	D	A	C	Q	Q	S	L	F	C	T	F	I					

3.2.8 Biopanning mit MH04

Neben der Selektion 15/03 mit MH06 (siehe 3.2.12) wurden in diesem Biopanning 4/02 mit der Plasmaprobe des Patienten MH04 am meisten Klone selektiert. Aus der 7mer-Bank wurden 64 % positive Klone identifiziert, die Selektion mit der zyklischen 7mer-Bank ergab 52 % positive Klone und aus der 12mer-Bank wurden 55 % positive Klone isoliert (siehe Abb. 3.6).

Tabelle 3.15: Lineare gp120 V3-Loop Motive aus BP 4/02

Name	Sequenz													
V3-Loop 304-319	R	K	G	I	H	M	G	P	G	R	A	F	Y	A
4-c.12						K	G	P	G	R	A	L		
4-c.14						T	G	P	G	R	A	W		
4-c.18						E	G	P	Y	P	W	L		
4-c.27						Q	G	P	H	P	F	L		
4-c.33						Q	G	P	H	P	Y	L		
4-c.45						Y	G	P	G	R	A	N		
4-12.3			F	D	S	E	G	P	A	R	G	F	F	V
4-12.41	A	K	F	P	I	N	G	R	G	L	I	Y		
4-12.45	A	K	T	I	T	T	G	P	L	S	S	F		
V3-Loop 498-314	R	P	N	N	N	T	R	K	G	I	H	M	G	P
4-c.3			N	L	N	T	S	K	S					
4-c.5			N	T	N	T	G	K	T					
4-c.11			N	L	N	T	A	K	A					
4-c.21			N	E	N	T	T	K	S					
4-c.42			N	L	N	T	T	K	F					
4-7.5			N	M	N	P	D	E	T					
4-7.25		M	N	L	N	T	Y	K						
4-7.28		N	N	T	N	T	F	K						
4-7.52		V	N	L	N	T	H	K						

Auch in dieser Selektion wurden zahlreiche Phagenklone isoliert, die Sequenzabfolgen aus dem V3-Loop besitzen. In insgesamt neun unterschiedlichen Klonen wurde ein GPGRAF-Motiv gefunden, in weiteren neun Klonen das NNNT-Motiv (siehe Tabelle 3.15). Beide Motive wurden ja bereits in den vorangegangenen Selektionen häufig identifiziert, da der V3-Loop als sehr immunogen bekannt ist (siehe Tabellen 3.4, 3.8 und 3.13).

Das ebenso immundominante KLIC-Motiv aus gp41 konnte nur in drei Klonen identifiziert werden (siehe Tabelle 3.16). Jedoch zeigt die Tabelle 3.15 eine weitere auffällige Sequenzabfolge ($^{608}\text{VPWxxxW}^{614}$), die außerhalb des immundominanten Bereichs liegt und so ähnlich schon in zwei Klonen aus BP 3/02 (siehe Tabelle 3.14) gefunden wurde. Diesmal wurden jedoch insgesamt 13 verschiedene Phagen isoliert. Die zwei Tryptophane mit drei dazwischen liegenden Aminosäuren sind in gleicher Anordnung auch in BP 2/02 zu finden (siehe Tabelle 3.10).

Ein sehr häufiges Motiv, welches in 31 isolierten Phagen vorkommt, besteht aus den Aminosäuren PD, PPW oder NPD (siehe Tabelle 6.4). Während die Mehrheit dieser Klone kaum Homologie zur gp120 Struktur aufweist, gibt es jedoch einige wenige, deren Peptidsequenzen auf der Oberfläche von gp120 ein potentiell Epitop bilden. Fünf Aminosäuren aus Klon 4-12.1 (YKQPIDGGRLLF) sind identisch mit in die CD4-Bindung involvierten Aminosäuren ($\text{P}^{369}\text{I}^{371}\text{D}^{368}\text{G}^{367}\text{G}^{366}$, siehe Tabelle 6.4). Identisch mit der Sequenz von Klon 1-12.7 (siehe 3.2.6) ist Phage 4-12.24. Trotz hoher Homologie überlappen nur wenige Aminosäuren mit wichtigen Rezeptorbindungsstellen (siehe Tabelle 6.4). Ein Vierermotiv, das zudem in der Nähe der Rezep-

tor- und Korezeptorbindungsstelle liegt, ist bei Klon 4-12.29 (TNTPPWDQAWGL) zu erkennen, wobei die Positionen der Aminosäuren für das Motiv zwei Möglichkeiten ergeben: T³⁸⁸N³⁸⁶T³⁷³P³⁶⁹ oder T⁴¹³N³³²T⁴¹⁵P⁴¹⁷ (siehe Tabelle 6.4).

Tabelle 3.16: Lineare gp41 Motive aus BP 4/02													
Name	Sequenz												
gp41 596-608	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	A	V
4-c.25					G	K	N	T	C	T	S		
4-c.36				Y	M	K	L	P	C	T			
4-12.11		M	C	Q	G	K	N	I	C	T	T	I	Q
gp41 604-616	C	T	T	A	V	P	W	N	T	S	W	N	N
4-7.58				A	V	P	I	W	A	R			
4-7.1					V	P	E	W	P	I	N		
4-7.2					V	P	W	A	P	E	W		
4-7.4					V	P	W	E	T	V	W		
4-7.23					V	R	W	S	A	E	W		
4-7.29					V	P	W	H	W	S	W		
4-7.37					V	P	W	N	A	A	W		
4-7.44					V	P	W	S	P	T	W		
4-7.60					V	P	W	H	T	T	W		
4-c.41					V	W	P	H	P	Y	L		
4-c.49					V	P	W	S	P	E	W		
4-12.48					V	P	W	S	P	E	T		
4-12.31					V	P	W	A	Q	S	W		

Die Selektion mit dem Plasma des Patienten MH04 erbrachte einen wirklich interessanten Phagen. Dieser Phage zeigt eine erstaunliche Ähnlichkeit mit der Sequenz der Bindungsstelle für den monoklonalen neutralisierenden Antikörper 2F5 (siehe Tabelle 1.1 und Abb. 1.9). Der isolierte Klon 4-12.46 mit der Sequenz ELPPWSSVWRTP stimmt an fünf Positionen exakt mit dem bekannten Epitop überein: ELDKWASLW (siehe Tabelle 6.4). Ähnliche Sequenzen wurden bereits in BP 2/02 selektiert, jedoch nicht mit einer solch verblüffend hohen Homologie (siehe 3.2.6). Gerade im Hinblick auf die zu Beginn des Kapitels besprochene geringe Wahrscheinlichkeit (siehe 3.2.5), eine solch hohe Sequenzübereinstimmung zu finden (vor allem auch nicht in direkter Abfolge), ist dieser Klon bemerkenswert.

Ein Klon aus dieser Selektion (4-12.26, siehe Tabelle 6.4) ist absolut identisch mit Klon 2-12.16 aus dem sequentiellen Biopanning mit MH04 und MH01 (siehe Tabelle 3.10). Unter den restlichen Sequenzen gibt es keine Besonderheiten. In den meisten Klonen wurden lediglich drei Übereinstimmungen mit gp120 gefunden. Nur vier Phagen zeigen größere Motive mit vier Aminosäuren (4-7.13, 4-7.32, 4-7.46 und 4-c.4), alle liegen jedoch in uninteressanten Proteinbereichen.

3.2.9 Biopanning mit MH02

In den Biopannings 5/02 und 17/03 wurden die drei Peptidphagenbanken mit der Plasmprobe des Patienten MH02 selektiert. Im ersten (5/02) ergaben sich für die 7mer-Bank 6 % positive Klone, für die zyklische Bank 15 % und für die 12mer-Bank insgesamt 35 %. Aufgrund der geringen Ausbeute wurde später nochmals eine Selektion mit dem Patientenplasma durchgeführt. In Selektion 17/03 war die totale Ausbeute zwar nicht besser, doch aus der zyklischen 7mer-

Bank wurden wesentlich mehr Klone isoliert, die Ausbeute stieg hier auf 34 % positive Klone im Phagen-ELISA. In dieser Wiederholung ergaben sich für die zwei anderen Peptidbanken schlechtere Werte. Die 7mer-Bank brachte so gut wie keinen positiven Klon hervor (1 %), die 12mer-Bank nur 11 % (siehe Abb. 3.6). Alle Peptidsequenzen sind in den Tabellen 6.5 und 6.6 im Anhang zu sehen.

Tabelle 3.17: Lineare gp41 KLIC-Motive aus BP 5/02 und 17/03

Name	Sequenz																
gp41 ₅₉₆₋₆₁₂	L	G	I	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	T	V	P
5-c.1					A	C	T	G	R	L	I						
5-c.4					S	C	A	G	R	L	L						
5-c.10					A	C	H	G	R	L	V						
5-c.13					A	C	T	G	R	L	M						
5-12.1					F	C	A	G	A	L	T	C	T	T	L	P	
5-12.3		H	T	P	L	C	E	G	R	L	V	C	R				
5-12.4		L	H	R	S	C	A	G	Q	L	L	C	T				
5-12.5			E	G	V	C	I	G	R	L	S	C	I	Y			
5-12.10				F	G	C	L	G	K	L	V	C	D	Y	P		
5-12.18				S	S	C	M	G	R	L	S	C	I	A	L		
5-12.19		Q	V	N	T	C	L	G	R	M	I	C	T				
5-12.28			S	F	T	C	Y	G	R	L	T	C	A	P			
5-12.33	N	H	L	I	Q	C	T	G	R	L	T	C					
17-c.3							S	G	R	V	M	L	C				
17-c.4					A	C	S	G	R	L	T						
17-c.10							Y	G	R	L	M	C	S				
17-c.12							S	G	R	L	S	C	A				
17-c.14							T	G	R	L	L	C	V				
17-12.1				S	S	C	M	G	R	L	S	C	I	A	L		
17-12.2				T	S	C	Q	G	R	L	H	C	S	V	M		
17-12.4	Q	E	M	R	C	T	N	G	R	L	I	C					

Die meisten Phagotope aus dem BP 5/02 zeigen das bereits bekannte KLIC-Motiv aus dem Transmembranprotein gp41 (siehe Tabelle 3.17): ⁵⁹⁸CSGKLICTT⁶⁰⁶. Vier Klone aus den 7mer-Banke und 9 Klone aus der 12mer-Bank besitzen die Sequenzabfolge in unterschiedlicher Form. Bemerkenswert ist die abweichende Position konservierter Aminosäuren in den isolierten Klonen im Vergleich zu anderen Selektionen. Während bei den sequentiellen Selektionen mit MH01 und MH04 (siehe Tabellen 3.5 und 3.9) vor allen Dingen das G⁶⁰⁰ und das K⁶⁰¹ konserviert sind, ist bei MH02 in allen Klonen das C⁵⁹⁸ und das G⁶⁰⁰ wiederzufinden. Weiterhin kommt in der Mehrheit der Klone das L⁶⁰² und das zweite Cystein (C⁶⁰⁴) vor (siehe Tabelle 3.17). Es zeigt sich also deutlich eine etwas unterschiedliche Immunantwort der Patienten hinsichtlich der immundominanten Region im gp41. Interessanterweise wurden mit MH02 keine linearen Sequenzen des V3-Loops isoliert.

Unter den Einzelklonen gibt es keine auffälligen Sequenzen mit Homologie zur gp120 Struktur. Die Analyse mit 3DEX ergab für Klon 5-7.1 (WVSLDEW) eine Homologie von vier Aminosäuren, die jedoch in einer uninteressanten Region des Hüllproteins liegen („non-neutralizing face“). Der zweite Klon 5-7.6 (STSPTHR), enthält zwei kleine Dreiermotive, die zwar in der Struktur kolokalisieren, aber in der „silent face“ liegen (siehe Tabelle 6.5). Ähnliche Peptidsequenzen wurden auch mit anderen Patientenproben isoliert, so z.B. bei Biopanning 10/03 bzw. 18/03 (siehe Tabelle 3.19) und bei 12/03 (siehe Tabelle 3.24). Interessanterweise konnte dieses Motiv teilweise

ebenso in der Wiederholung der Selektion (BP 17/03) gefunden werden: 17-c.2 (SPTHVLA) und 17-c.11 (SPTHQLM) besitzen ein Teilmotiv (siehe Tabelle 6.6). Wie eingangs bereits erwähnt konnte im Biopanning 17/03 nur die Ausbeute der zyklischen 7mer-Bank gesteigert werden. Neben dem häufig gefundenen KLIC-Motiv (siehe Tabelle 3.17), wurden neben den zwei oben bereits erwähnten Klonen nur zwei weitere mit anderen Peptiden isoliert. Diese wiesen aber keine Homologie zu gp120 auf, es konnten lediglich Dreiermotive zugeordnet werden (siehe Tabelle 6.6).

3.2.10 Biopanning mit MH03

Auch mit den Antikörpern von Patient MH03 mussten zwei Selektionen durchgeführt werden, da das erste Biopanning nur wenig positive Phagen ergab. In der ersten Selektion 10/03 waren lediglich 3 % der 7mer-Phagen und 1 % der zyklischen 7mer-Phagen positiv im ELISA. Aus der 12mer-Bank konnte kein einziger Klon isoliert werden. Zunächst wurde noch einmal der ELISA mit weiteren Einzelklonen wiederholt, um dennoch einige Sequenzen zu erhalten (diese zusätzlichen Klone wurden aufgrund der geringen Anzahl nicht in die Statistik mit einbezogen). Später wurde die komplette Selektion wiederholt und im Biopanning 18/03 war die positive Ausbeute besser. Aus der 7mer-Bank reagierten 49 %, aus der zyklischen 7mer-Bank 15 % und aus der 12mer-Bank immerhin noch 6 % der isolierten Phagen spezifisch mit den Patientenantikörpern (siehe Abb. 3.6). Beide Tabellen mit allen selektierten Klonen sind im Anhang zu finden (siehe Tabellen 6.7 und 6.8).

Während das Biopanning mit MH02 lediglich lineare KLIC-Motive ergab (siehe Tabelle 3.17) und keine V3-Loop Phagen isoliert wurden, zeigten die Selektionen mit der Plasmaprobe des Patienten MH03 das entgegengesetzte Resultat. In keinem der beiden Biopannings wurden Phagen isoliert, die das Motiv aus dem gp41 Protein repräsentierten, jedoch wurden einige Phagenklone mit einem V3-Motiv gefunden (siehe Tabelle 3.18). Die Phagen zeigen die bekannte Spitze des V3-Loops mit der Sequenz ³¹²GPGRAF³¹⁷ jedoch nur sehr unvollständig. Konserviert sind hauptsächlich die Aminosäuren ³¹²GPG³¹⁴.

Tabelle 3.18: Lineare gp120 V3-Loop Motive aus BP 10/03 und 18/03															
Name	Sequenz														
V3-Loop 302-318	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	K	A	F	Y
10-12.4			S	K	T	I	M	A	G	P	E	L	R	L	
10-12.6	W	I	Y	T	L	P	P	A	G	P	G	M			
10-12.7	M	E	Y	P	L	P	A	M	G	P	K	F			
10-12.0									G	F	G	N	M	P	A
10-c.5							S	Y	G	L	G	S	L		
18-7.2				K	D	L	H	T	G	P					
18-7.11				K	M	T	H	K	G	P					
18-7.13				K	S	Y	H	Y	G	P					

Der Phage 10-7.6 (TSAVPPA) zeigt eine Peptidabfolge, die das gp41 ⁶⁰⁷AVP⁶⁰⁹-Motiv aus BP 4/02 (siehe Tabelle 3.16) beinhaltet (siehe Tabelle 6.7).

14 Klone besitzen untereinander eine deutliche Homologie (siehe Tabelle 3.19). Das daraus abgeleitete Konsensusmotiv $SPI_{T}HW_{F}$ ist bereits aus der Selektion mit MH02 bekannt, in der fünf Klone dieses Motiv aufwiesen (siehe 3.2.9). Eine Homologie zur Struktur des Hüllproteins gp120 ist jedoch in keiner Sequenzabfolge zu finden, die zugeordneten Motive bestehen meist aus nur drei Aminosäuren (siehe Tabelle 6.7 und 6.8).

Tabelle 3.19: Motive aus BP 10/03 und 18/03																		
Name	Sequenz																	
10-c.2								L	S	P	T	L	H	F				
10-12.3						F	R	S	S	P	T	H	F	S	F	H	N	A
10-12.8	M	N	N	F	Q	Y	S	S	P	T	H	F						
18-12.3			N	S	S	L	F	T	S	P	T	H	Y	I				
10-7.5					K	G	I	Y	S	P	A							
10-12.1			L	S	P	Q	F	L	S	P	T	H	W	P				
10-12.5					F	Q	Q	R	S	P	I	H	W	Y	T	P		
10-12.2				A	S	S	H	R	S	P	I	W	D	S	I			
18-7.1							S	V	S	P	I	H	W					
18-7.16							T	V	S	P	I	H	W					
18-c.2					A	H	V	S	P	I	W							
18-7.20						N	I	S	P	I	W	W						
18-7.8						H	R	S	P	V	H	W						
18-12.2	H	Y	R	L	P	P	E	S	P	G	L	W						
18-c.1										Y	D	A	W	F	N	L		
18-c.5										Y	D	L	W	F	N	E		
18-c.14										Y	D	M	W	Y	N	L		
18-c.3										Y	D	R	W	L	N	E		
18-c.10										Y	D	R	W	Y	N	S		

Die Phagen 10-12.1 und 10-c.2 (siehe Tabelle 3.19) beinhalten ein zweites Motiv (LSPT), welches auf der Oberfläche von gp120 zu finden ist und mit zwei Aminosäuren auch die Rezeptorbindungsstelle überlappt (siehe Tabelle 6.7). Das Motiv ist in ähnlicher Weise in Klon 19-7.4 (siehe Tabelle 3.20) bei MH05 zu finden. Lediglich zwei Aminosäurepositionen sind vertauscht. Ein zweites Motiv besteht aus den Aminosäuren YDxWxN und wurde in fünf Phagen isoliert (siehe Tabelle 3.19). Weder die Einzelmotive dieser fünf Phagen noch das Konsensusmotiv zeigen Homologie zur gp120 Struktur (siehe Tabelle 6.8).

3.2.11 Biopanning mit MH05

Tabelle 3.20: Motive aus BP 19/04																		
Name	Sequenz																	
19-c.5			S	P	T	H	K	A	A									
19-c.6	D		S	P	C	V	A	C										
19-7.4	L	L	S	T	P	W	Y											
19-7.3	L	K	F	P	Y	A	Y	-	H	Y	T	S	Y	A	P			
19-7.5									H	T	H	Y	T	N	Y			
19-7.7									H	E	H	Y	S	N	Y			
19-7.10											H	F	T	N	Y	V	T	
19-c.1					A	G	T	M	L	H	L	S	D	Y				

Die erste Selektion mit der Plasmaprobe von Patient MH05 war nicht erfolgreich und aus diesem Grund wurde eine zweite Selektion durchgeführt. Im ersten Biopanning 11/03 waren so gut wie keine Phagenklone im ELISA positiv. Die Wiederholung (BP 19/04) ergab 14 % positive Klone aus der 7mer-Bank, 12 % aus der zyklischen 7mer-Bank und 3 % aus der 12mer-Bank (siehe

auch Abb. 3.6). Wie in der vorangegangenen Selektion mit MH03 war es sehr überraschend, kaum Phagotope der immundominanten Bereiche vorzufinden. Lediglich ein Phage (19-c.3) repräsentierte das KLIC-Motiv aus gp41 (siehe Tabelle 6.9), ansonsten wurden keine lineare Sequenzen dieser sonst so typischen Bereiche isoliert.

19-c.5 und 19-c.6 (siehe Tabelle 3.20) zeigen Ähnlichkeit zu isolierten Phagen aus dem Selektionen mit MH02 und MH03 (siehe Tabellen 3.19, 6.5-6.8).

Ähnlich zu den Klonen 10-12.1 und 10-c.2 ist der Phage 19-7.4 (siehe Tabellen 3.19 und 3.20). Die Abfolge LSTP besitzt zwei Aminosäuren, die mit der Rezeptorstelle auf gp120 überlappen. Größere Homologien zum Hüllprotein sind unter allen Phagen jedoch nicht zu finden, meist finden sich nur Dreiermotive. Trotzdem gibt es noch ein weiteres auffälliges Motiv. Fünf Klone zeigen eine hohe Übereinstimmung untereinander mit dem Konsensus HYTNY (siehe Tabelle 3.20).

3.2.12 Biopanning mit MH06

Die mit Abstand am meisten Klone wurden mit MH06 isoliert. 45 % der Phagen aus der 7mer-Bank, 71 % aus der zyklischen 7mer-Bank und 75 % aus der 12mer-Bank reagierten im ELISA positiv und spezifisch mit der Plasmaprobe des Patienten MH06 (siehe Abb. 3.6). Die Übersicht mit allen sequenzierten Klonen ist im Anhang zu finden (siehe Tabelle 6.10).

Zunächst wurden wiederum die linearen Motive aus dem V3-Loop in gp120 sowie aus gp41 gefunden. Insgesamt sechs Klone besitzen Aminosäuren, die exakt auf die Positionen im V3-Loop passen (siehe Tabelle 6.10). Sie sollen hier aber nicht noch einmal aufgelistet werden, da gegenüber den anderen Selektionen keine Besonderheit besteht. Dies ist jedoch der Fall bei den vermeintlichen KLIC-Motiven aus dem Transmembranprotein gp41 (siehe Tabelle 3.21). Alle Motive sind N-terminal verschoben und zeigen nicht das zentrale KLIC-Motiv, welches bisher zumeist in den Phagensequenzen vorzufinden war (siehe Tabellen 3.5, 3.9, 3.14, 3.16 und 3.17). Da die Homologie zu gp41 nicht wirklich eindeutig ist, da teilweise sehr viele Aminosäuren variieren, wurden alle vier Klone zusätzlich zur Analyse in 3DEX verwendet. Interessanterweise gibt es teilweise eine Homologie zu gp120, und einzelne Aminosäuren überlappen mit Rezeptor- und Korezeptorbindungsstellen. Weiterhin gibt es einige lineare Übereinstimmungen zu den HIV-1 Proteinen p24 oder Tat (siehe Tabelle 6.10).

Tabelle 3.21: Lineare gp41 Motive aus BP 15/03													
Name	Sequenz												
gp41 590-602	Q	Q	L	L	G	I	W	G	C	S	G	K	L
15-12.4		S	L	V	S	V	W	E	I	P	G	K	L
15-12.5		S	V	Y	L	G	R	L	A	P	G	V	Q
15-12.6		S	V	L	S	V	W	E	I	P	G	K	L
15-12.11		S	L	S	I	T	W	A	P	P	G	K	L

In 14 Klonen wurde mehr oder weniger eine Aminosäureabfolge gefunden, die dem Konsensus (MS)^F/YSWG entspricht. Trotz dieser Häufigkeit konnte keines der Peptide auf der Oberfläche von gp120 gefunden werden (siehe Tabelle 6.10).

Vier weitere Phagen zeigen ein gemeinsames Motiv: 15-12.1, 15-12.3, 15-12.16 und 15-12.19 besitzen das zentrale Motiv TWRD. Zwei dieser Klone (15-12.16 und 15-12.19) haben untereinander acht homologe Aminosäuren (SKQTWRDL) und die ersten vier Aminosäuren bilden ein Motiv, welches in der Nähe der Bindungsstelle für den CD4 Rezeptor liegt (siehe Tabellen 3.22 und 6.10).

Name	Sequenz													
15-12.1			A	K	M	T	W	R	D	V	L	A	I	M
15-12.3		T	T	K	Y	T	W	R	D	S	L	V	T	
15-12.16	H	S	S	K	Q	T	W	R	D	L	I	H		
15-12.19	L	P	S	K	Q	T	W	R	D	L	N	L		
15-12.7	G	I	I	W	D	H	S	S	L	P	T	L		
15-12.20	Y	V	R	L	G	P	L	S	P	T	S	P		

Etwas größere Homologie zu der Kristallstruktur von gp120 ist in den Phagen 15-12.7 und 15-12.20 zu finden. Der Phage 15-12.7 (GIWDHSSLPTL) stimmt in fünf Positionen mit gp120 überein und zwei der identifizierten Aminosäuren überlappen mit der bekannten Bindungsstelle für den CD4-Rezeptor (siehe Tabellen 3.22 und 6.10). Das Motiv LSPT aus Klon 15-12.20 konnte in gleicher Form bei Klon 10-12.1 und 10-c.2, sowie ähnlich bei Klon 19-7.4 gefunden werden (siehe Tabellen 3.19, 3.20 und 3.22).

3.2.13 Biopanning mit MH07

Die Plasmaprobe des Patienten MH07 ergab durchweg schlechte Resultate. Die Selektion wurde insgesamt dreimal wiederholt. Für das letzte Biopanning 20/04 ergaben sich am Ende 3 % positive Klone in der 7mer-Bank und 9 % in der 12mer-Bank. Aus der zyklischen 7mer-Bank konnte kein einziger positiver Klon selektiert werden (siehe Abb. 3.6).

Es wurden hauptsächlich immundominante Motive selektiert, wobei interessanterweise keine Sequenzen mit Homologie zu gp41 isoliert wurden (siehe Tabelle 6.11). Neun Phagenklone repräsentieren die Spitze des V3-Loops aus gp120 mit den Aminosäuren ³¹²GPGRAF³¹⁷ (siehe Tabelle 3.23). Phagenklon 14-12.1 wurde insgesamt 10 mal selektiert. Alle Phagen zeigen das zentrale GPGRAF-Motiv nur unvollständig, die Homologie ist aber deutlich zu erkennen, zumal viele Überstimmungen N-terminal im V3-Loop zu finden sind.

Name	Sequenz														
V3-Loop 304-319	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T
20-12.2			K	S	L	H	Y	G	P	Y	R	T	S	L	
20-12.6	S	L	I	N	Y	T	L	G	P	W	P	E			
20-12.3	A	S	Q	H	I	P	L	D	K	A	F	P			
20-12.4		N	K	T	I	H	T	G	S	T	A	F	F		
13-12.1		T	N	S	H	H	L	A	W	I	E	L	L		
13-12.2			I	P	W	H	V	G	P	G	R	L	Y	Q	
13-12.3			K	L	I	N	F	G	P	M	R	S	L	P	
13-12.5		N	K	M	I	H	T	G	P	T	R	A	W		
14-12.1			K	S	L	H	Y	G	P	Y	R	T	S	L	

Unter den Einzelklonen gibt es so gut wie keine Homologie zur gp120 Struktur. Die Analyse mit 3DEX ergab für die meisten Klone keine Motive oder nur maximal drei Aminosäuren. Die Überprüfung des Phagen 20-12.1 (RLIEKTTTPWGP) ergab eine Übereinstimmung zum gp120 Protein. Er besitzt zwei Dreiermotive (EKT/TTP), die auf der Oberfläche von gp120 kolokalisieren. Das Motiv liegt aber in der „non-neutralizing face“ des Proteins und kommt daher als Epitop für einen neutralisierenden Antikörper kaum in Frage (siehe Tabelle 6.11).

3.2.14 Biopanning mit MH08

Auch die Selektion mit der Probe des Patienten MH08 ergab keine besonders guten Ergebnisse. Lediglich aus der 12mer-Bank konnten positive Phagen selektiert werden. Nach dem ELISA waren 38 % der getesteten Klone positiv. Die überwältigende Mehrheit der Klone zeigte das KLIC-Motiv aus gp41, wobei Klon 18-12.1 insgesamt 16 mal (!) isoliert wurde. Die Sequenz dieses Klons konnte identisch oder ähnlich auch in vielen anderen Biopannings isoliert werden (siehe Tabellen 3.5 und 3.9). Obwohl zwei andere Klone untereinander eine große Übereinstimmung aufweisen (18-12.14, RTFHMEEEWMI und 18-12.23, WHHVEEEWMI), zeigen weder die Sequenzen der Einzelklone noch die Konsensussequenz eine Homologie zu gp120. Die Sequenzen der Klone sind im Anhang in Tabelle 6.12 zu finden.

3.2.15 Biopanning mit dem Plasmapool von MH01-MH05

Für die Entwicklung eines Impfstoffes wären Phagen interessant, die möglichst mit vielen Patientenseren und Subtypen kreuzreagieren. In dieser Selektion wurde daher ein Pool aus fünf Patientenplasmen verwendet, um Mimotope zu identifizieren, die spezifisch für häufig gebildete Antikörper in den Patienten sind. Das Biopanning ergab jedoch nur für die 12mer-Bank gute Resultate. Hier waren 39 % der Klone im Phagen-ELISA positiv (siehe Abb. 3.6).

Die Sequenzen aller Phagen sind in der Tabelle 6.13 im Anhang zu sehen. Es war nicht anders zu erwarten, dass gerade auch mit einem solchen Pool immundominante Motive selektiert werden, da gerade gegen diese Proteindomänen jeder Patient Antikörper besitzen wird. So zeigen drei Phagen eine Aminosäureabfolge, die bereits aus den ersten Biopannings bekannt ist und N-terminal im V3-Loop liegt (siehe Tabelle 3.8, 3.15 und 6.13). Auch in den restlichen selektierten Klonen tauchen Motive auf, die bereits aus anderen Biopannings bekannt sind (siehe Tabelle 3.24).

Tabelle 3.24: Motive aus BP 12/03																
Name	Sequenz															
12-c.1	S	P	T	H	A	P	M									
12-c.2	P	G	P	V	P	P	M									
12-12.1				T	S	V	H	A	P	P	W	D	H	T	W	
12-12.11					A	T	S	Q	P	P	W	D	S	A	W	S
12-12.7	L	F	R	P	S	A	I	L	P	P	W	N				
12-12.2	S	E	S	R	P	D	Y	S	P	P	W	L				
12-12.3		A	R	S	P	D	Y	F	P	P	L	L	Q			
12-12.4				S	P	S	Y	D	P	P	L	L	F	Y	H	
12-12.9		T	A	T	P	D	L	T	L	Y	Y	M	P	G		
12-12.6		D	Y	F	P	R	S	Y	S	A	S	N	T			

Aus BP 4/02 ist bereits das PPW-Motiv bekannt (siehe Tabelle 6.4), welches hier ebenso in einigen Phagen zu finden ist (siehe Tabelle 3.24). Klon 12-c.1 (SPTHAPM) besitzt das ebenfalls schon beschriebene SPTH-Motiv (siehe Tabellen 6.5 und 3.19) und zeigt eine Homologie von vier Aminosäuren mit der gp120 Struktur. Eine Aminosäure überlappt mit der CCR5-Bindungsstelle, jedoch liegt das Motiv größtenteils in der „silent face“ und ist daher wohl weniger interessant. In der Peptidsequenz von 12-12.6 befindet sich ein Vierermotiv, welches nicht mit für die Infektion wichtigen Aminosäuren identisch ist (siehe Tabellen 3.24 und 6.13). Ein Phagenklon zeigt eine außerordentlich hohe Homologie zu gp120. Die Sequenzabfolge TATPDLTL aus Phage 12-12.9 (siehe Tabelle 3.24) kolokalisiert auf der Oberfläche des Proteins und könnte daher durchaus ein Epitop eines Antikörpers darstellen. Es besteht aus insgesamt zwei Dreiermotiven, sowie zwei zusätzlichen Aminosäuren. Von den acht beteiligten Aminosäuren überlappen fünf mit der CD4-Rezeptorbindungsstelle (siehe Tabelle 6.13).

3.3 Immunisierung von Mäusen mit Phagen

Die Analyse der in den Biopannings selektierten Phagenklone ergab viele interessante Übereinstimmungen vor allem mit dem Hüllprotein gp120. Phagenklone, die eine Homologie zur gp120 Struktur zeigen und ein potentielles Epitop auf dessen Oberfläche bilden, könnten Mimotope darstellen, die durch in den Plasmaproben vorhandene neutralisierende Antikörper angereichert wurden. Interessant sind vor allem diejenigen Phagen, die eine Überlappung mit bekannt wichtigen Domänen des Proteins aufweisen, wie z.B. der Rezeptor- oder Korezeptorbindungsstelle. Diese Mimotope, sofern sie denn Epitope neutralisierender Antikörper imitieren, müssten im Idealfall wiederum in der Lage sein, Antikörper zu induzieren, die eine neutralisierende Aktivität gegen HIV-1 aufweisen. Bei positivem Ausgang wären solche Mimotope bestmögliche Kandidaten für eine HIV Impfstoffentwicklung. Aus diesem Grund wurde in mehreren Studien zunächst ein Immunisierungsprotokoll etabliert, indem die kompletten Phagen als Immunogene eingesetzt wurden, um Peptid-spezifische Antikörper in Mäusen zu induzieren. In weiteren Studien wurden außerdem interessante Kandidaten aus den Selektionen ausgewählt und für eine Immunisierung verwendet. Nach Abschluss der Immunisierung wurden die Seren der immunisierten Tiere *in vitro* auf ihre neutralisierende Aktivität gegen HIV-1 untersucht.

Insgesamt wurden bisher vier Studien durchgeführt. Die ersten Immunisierungen mit einem Einzelphagenklon im Jahre 2002 und 2003 waren jedoch nicht erfolgreich und werden aus diesem Grund nicht detailliert besprochen, dienten jedoch zur Grundlage der Protokolletablierung und daher soll die Vorgehensweise bei der Immunisierung kurz dargestellt werden.

3.3.1 Studie 2002 und Studie 2003

Die erste Immunisierung diente hauptsächlich der Etablierung eines Protokolls für die Immunisierung mit Phagenpartikeln. Es wurden Balb/C Mäuse intranasal und intraperitoneal mit 10^{12} Phagenpartikeln in 100 μ l isotoner NaCl-Lösung insgesamt fünfmal immunisiert (Woche 0, 3, 6, 13, 14). Die Untersuchung des Bluts durch ELISA-Tests ergab, dass die Mäuse keine peptid-spezifischen Antikörpertiter aufwiesen. Jedoch waren die Titer gegen den Wildtypphagen bei den i.p.-immunisierten Mäusen deutlich höher, als bei den Mäusen, die die Phagenpartikel intranasal verabreicht bekommen hatten.

Die zweite Studie wurde an Kaninchen durch die Firma *Pineda* (Berlin) durchgeführt. Es wurden vier intradermale Immunisierungen mit jeweils $5 \cdot 10^{12}$ Phagen in 200 μ l isotoner NaCl-Lösung durchgeführt (Tag 1, 20, 30, 40, 75). In der Blutprobe nach 90 Tagen konnte ein leichter Antikörpertiter gegen das Peptid im ELISA festgestellt werden. Die erreichten Antikörpertiter waren jedoch nicht ausreichend für eine *in vitro* Neutralisation von HIV-1.

3.3.2 Studie 2004

Für die dritte Studie wurden interessante Phagen mit ähnlichen Sequenzen in einzelne Gruppen geordnet und als Pool immunisiert (siehe Tabelle 3.25, nächste Seite). Jede Gruppe bestand aus vier bis sieben Phagen und insgesamt gab es sechs spezifische Gruppen, sowie eine Kontrollgruppe. Pro Immunisierung wurden 10^{12} Phagen, resuspendiert in 200 μ l isotoner NaCl-Lösung, verwendet. Die C57BL/6-Mäuse wurden fünfmal im Abstand von einer Woche oral oder i.p. immunisiert. Zwei Wochen nach dem 4. Boost wurden die Mäuse ausgeblutet und die Mäuseseren in einem *in vitro* Neutralisationsversuch getestet. Für diese Neutralisation wurden rekombinante Reporterviren verwendet, die ein *Renilla* Luziferasegen zur Detektion tragen. Hierfür stehen verschiedene Viren zu Verfügung, die unterschiedliche HIV-1 Hüllproteine (gp160) auf der Oberfläche tragen. So können die Seren gegen verschiedene HIV-1 Stämme getestet und die Neutralisation mit dem gleichen Reportersystem gemessen werden.

Tabelle 3.25: Phagen der Immunisierungsstudie 2004			
Phage	Patient	Peptid	Informationen
KLIC Gruppe 1 (Maus Nr. 1-4) [U 1/4]			
1-12.8	MH01/MH04	HACTGKLRCTIT	6x
1-12.17	MH01/MH04	HPSPGKANNALP	NNALP-Motiv
2-12.1	MH04/MH01	TNCVGKDRCVTL	9x
3-12.10	MH01	MCQGNICTTIQ	3x, oft selektiert
5-12.1	MH02	FCAGALTCTTLP	8x
15-12.6	MH06	SVLSVWEIPGKL	2x
15-12.11	MH06	SLSITWAPPGKL	auch Homologie zu p24
V3 Gruppe 2 (Maus Nr. 5-8 oral) (Maus Nr. 29-32 i.p.)			
3-7.1	MH01	VGPGSAF	5x
1-c.4	MH01/MH04	LGPGRAF	18x
14-12.1	MH07	KSLHYGPYRTSL	10x
13-12.5	MH07	NKMIHTGPTRAW	4x
WxxxW Gruppe 3 (Maus Nr. 9-12) [U 11]			
4-7.4	MH04	VPWETVW	4x
4-c.1	MH04	AWAPPWEPAW	8x
2-12.16	MH04/MH01	SHFPPWSLAWTH	4x (keine Zuordnung)
2-12.37	MH04/MH01	NGFDARLAPWQH	
4-12.46	MH04	ELPPWSSVWRTP	
CD4bs Gruppe 4 (Maus Nr. 13-16)			
3-7.3	MH01	INNALPT	4x
3-12.24	MH01	EGPSPLNNATLT	CD4bs
3-12.37	MH01	TDITKTADLTRR	CD4bs, CCR5bs
1-7.9	MH01/MH04	LKTTLKL	CD4bs, CCR5bs
1-12.3	MH01/MH04	VTPTLILSSSFT	kreuzreaktives Motiv
Gemischte Gruppe 5 (Maus Nr. 17-20) [U 19]			
1-12.18	MH01/MH04	SSLHIPTWPVQP	gp120, gp41, p24, RT
1-12.7	MH01/MH04	HKYPCSTTNCSP	6x, gp120
4-c.5	MH04	NTNTGKT	3x, RT, gp120
5-12.32	MH02	SPRTDYQLLHLW	gp41
3-12.11	MH01	NWGYSGLAKIA	5x
Unbekannte Gruppe 6 (Maus Nr. 21-24)			
17-c.4	MH02	ACSGRLT	8x
10-12.1	MH03	LSPQFLSPHWP	oft selektiertes Motiv
18-7.1	MH03	SVSPIHW	9x
19-c.1	MH05	AGTMLHLSDY	5x
15-12.20	MH06	YVRLGPLSPTSP	(gp120)
Kontrollen mit Wildtyp-Phage Gruppe 7			
WT	oral	Maus Nr. 25-28	
WT	i.p.	Maus Nr. 33-37	

Nach der Immunisierung wurden zunächst alle Mäuseseren in einem ersten Neutralisationsversuch auf ihre neutralisierende Kapazität hin untersucht. Hierfür wurde der HIV-1 Stamm D117.III verwendet. Für diesen ersten Neutralisationsversuch wurde von allen Mäuseseren eine Verdünnung von 1:30 benutzt.

3.3.3 Studie 2005

Für die letzte große Studie wurden ebenfalls verschiedene Phagen mit ähnlicher Zuordnung in Gruppen eingeteilt, insgesamt in 10 Gruppen (siehe Tabelle 3.26). Für die Immunisierung wurden wieder C57BL/6-Mäuse verwendet (pro Gruppe fünf Mäuse). Jede Maus wurde mit 10^{12} - 10^{13} Phagen immunisiert. Die erste Immunisierung wurde i.p. durchgeführt und viele der insgesamt 60 Mäuse starben innerhalb von ein bis zwei Tagen. Die überlebenden Mäuse wurden daraufhin in den folgenden Immunisierungen subkutan gespritzt. Leider konnten durch das massive Sterben der Mäuse für diese Arbeit nicht mehr alle Phagengruppen analysiert werden. Die Analyse der überlebenden Mäuse im Western Blot und in der Neutralisation sind jedoch unter Kapitel 3.7 und 3.8 beschrieben.

Tabelle 3.26: Phagotope für die Immunisierungsstudie 2005																					
Name	Anzahl	Sequenz Insert								Alignment 3D gp120	Alignment 3D ohne Oberfläche	Patient									
Klon										a-Atom_7A_4er_20 %	gp120										
Gruppe 1 - gp120 V3 GPGRAF Mimotope																					
1-c.4	18							L	G	P	G	R	A	F						MH01/MH04	
3-7.7	6							A	I	G	T	A	F	L						MH01	
4-12.45				A	K	T	I	T	T	G	P	L	S	S	F					MH04	
10-12.4				S	K	T	I	M	A	G	P	E	L	R	L					MH03	
15-12.10				A	S	A	K	W	S	I	G	P	G	R	A					MH06	
20-12.2	3			K	S	L	H	Y	G	P	Y	R	T	S	L					MH07	
Gruppe 2 - gp120 V3 NNNT Mimotope																					
1-c.5	3					N	L	N	T	S	K	E								MH01/04	
2-c.20						N	N	N	T	S	K	A								MH04/01	
4-c.5	3					N	N	T	T	G	K	T								MH04	
12-12.12				T	L	N	S	N	T	T	K	P	P	L	A					N460 S461 - N280 T455 T283 K282 N262 S447 N295 T297 (silent)	
18-7.2	3					K	D	L	H	T	G	P								MH01-MH05 MH03	
Gruppe 3 - gp41 KLIC Mimotope																					
1-12.8	6	H	A	C	T	G	K	L	R	C	T	T	T							MH01/04	
2-12.1	9	T	N	C	V	G	K	D	R	C	V	T	T	L						MH04/01	
3-12.10	3	M	C	Q	G	K	N	I	C	T	T	I	Q							MH01	
5-12.1	6	F	C	A	G	A	L	T	C	T	T	L	P							MH02	
15-12.6	2	S	V	L	S	V	W	E	I	P	G	K	L							V120/127 L122/125 S199 V200 (V2)	
17-c.4	6					L	A	C	S	G	R	L	T							N-term KLIC MH06 MH02	
Gruppe 4 - gp41 KLIC-VPW Mimotope																					
3-12.3		G	S	L	I	Q	H	T	Q	V	P	W	E							MH01	
3-12.28		K	L	V	M	H	T	A	V	P	Y	H	I							MH01	
4-7.58						A	V	P	I	W	A	R								MH04	
4-7.4	4					V	P	W	E	T	V	W								MH04	
4-7.37	2					V	P	W	N	A	A	W								MH04	
Gruppe 5 - gp41 WxxxW Mimotope																					
2-12.6		E	Q	V	Q	S	P	P	W	A	P	A	W							Q442 S440 P438 P437	
2-12.13		H	S	V	K	L	P	P	W	S	S	V	W							S199 V200 K121 L122 P124	
2-12.16	4			S	H	F	P	P	W	S	L	A	W	T	H						
2-12.39						Y	P	P	W	N	L	T	W	L	S	T	P				L122/125 S199 T198 P124
4-c.1	6			A	W	A	P	P	W	E	P	A	W								
4-12.46				E	L	P	P	W	S	S	V	W	R	T	P						ELDKWASLW
Gruppe 6 - gp120 CD4 binding site																					
1-7.1		L	R	T	T	A	K	L												(R469) T283 T455 A281 K282	
1-7.14		L	L	T	T	A	K	P												(R469) T283 T455 A281 K282	
1-7.23		M	R	T	T	D	K	T												RTT 456 455 283 DKT 461 460 462	
1-7.7		L	S	L	V	P	P	A												L122 S199 L125 V127 L125 S199 L122 V120 L125 S199 L122 V200	
2-7.2		L	L	T	T	N	K	D												(L452 L453) T455 T283 N280 K282 D279 3DEX Beispiel	
Gruppe 7 - gp120 CD4 binding site																					
2-12.33		K	T	A	I	G	Q	L	S	S	T	L	L							K282 T283 A281 - S199 T198 L122 M39 G441 Q442 - Q114 L111 S110	
2-12.2		K	A	P	L	S	T	L	S	G	S	L	L							P124 L122 S199 T198 L125 (V2) S291 T280 L285 S284 G283 (Rückseite)	
3-12.1		T	C	I	T	K	T	A	D	L	T	R	R							T283 K282 T455 A281 D279	
3-12.37		T	D	I	T	K	T	A	D	L	T	R	R							T283 K282 T455 A281 D279	
4-12.1		T	D	I	Y	K	Q	P	I	D	G	R	L	L	F					P369 I371 D368 G367 Q365 research meeting 2005	
Gruppe 8 - NNALP-NPD Mimotope																					
3-7.4						L	P	N	N	A	L	P								L125 P124 N197 (V2) P238 N92 N94 N280 N279 A281 (IGSN)	
3-7.27						N	N	N	A	L	P	T									N276 N279 N280 A281 (IGSN) max. 3
3-7.3	4					T	N	N	A	L	P	T									LPT 125 124 123
3-12.24		E	G	P	S	P	L	N	N	A	T	L	T								S199 P124 L122 - N280 A281 T283 Q044 N340 N339 A336 V200 S199 P124 L122 (V2/V3)
3-12.49						Q	N	N	A	L	P	Y	P	V	S	P	L				N339 N340 A336 S334 (Rückseite)
3-c.37						N	N	N	A	S	P	D									D412 R335 K337 A336 (V4)
3(c).39						N	P	D	D	R	K	A									P369 D368 V372 T373 (CD4be)
3-7.26						N	P	D	V	T	R	S									
Gruppe 9 - Gemischte Mimotope																					
1-12.7	6	H	K	Y	P	C	S	T	T	N	C	S	P							S334/411 T413 T415 N332 T198 N197 C126 S195 T287 N295 C445 S446	
1-12.3				V	T	P	T	R	I	L	S	S	S	F	T						V89 T90 P28 T240 V200 T198 P124 I201 L122 S199 S199 L122 P124 L125
2-12.26		K	G	E	Q	P	S	L	P	L	W	P	R								STTNCs 199 123 198 197 126 195 // 411 413 415 332 296 446 Q1YP - STTNC 258 373 364 369 - 394 392 388 386 385
3-12.11	5	N	W	G	Y	S	G	M	L	A	K	I	A								V1PT 430 123 124 198 ILS 109 111 110
20-12.1		R	L	I	E	K	T	T	P	W	G	P									E267/268 K231 T232 - T240 T90 P238 (non-neutr.)
Gruppe 10 - Gemischte Mimotope																					
5-7.6		S	T	S	P	T	H	R												S334 T413 S411 - P417 T415 H330 (silent) L122/125 S199 P124 T198 (V2)	
10-12.1				L	S	P	Q	F	L	S	P	T	H	W	P						Q044 N340 N339 A336
12-12.9				T	A	T	P	D	L	T	L	Y	M	P	G						T283 A281 T455 - P368 - L122 T198 L125
15-12.7				G	I	I	W	D	H	S	S	L	P	T	L						S199 L122 P124 T198 L125
19-7.4		L	L	S	T	P	W	Y													L122/125 S199 T198 P124
19-c.6		D	S	P	C	V	A	C													S199 P124 C126 V127 A129

3.4 Peptidfusionsproteine

Die Herstellung der Peptidfusionsproteine dient zur Detektion peptidspezifischer Antikörper in den Mäuseseren. Aufgrund der massiven Immunantwort gegen die Phagenhülle selbst, sind die spezifischen Antikörper, die gegen das Peptid am pIII-Protein gerichtet sind, nur schwer zu detektieren. Die Peptidinserts wurden durch PCR mit der Phagen-DNA amplifiziert, in ein Alkaline Phosphatase Fusionsprotein über die LIC-Methode kloniert, in BL21(DE3)GOLD transformiert und positive Klone wurden exprimiert und das Protein aufgereinigt.

3.4.1 Amplifikation und Aufreinigung der Phagen-DNA

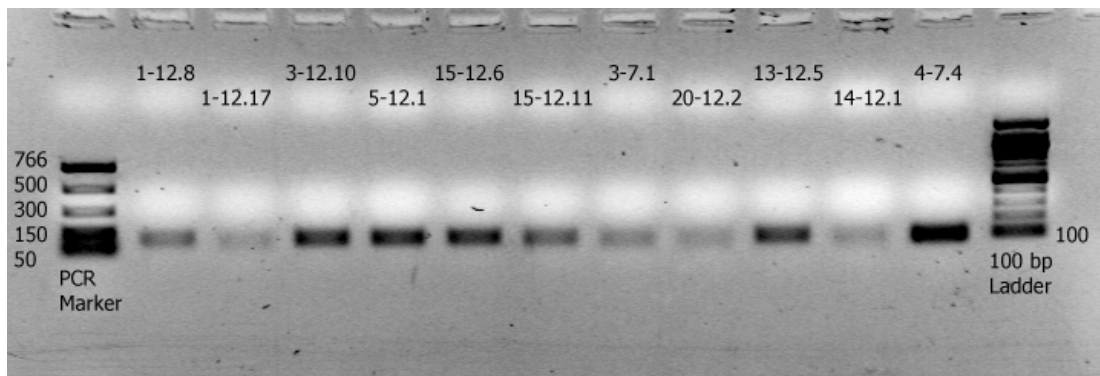


Abbildung 3.9: PCR-Produkt.

Das 1 %ige Agarosegel zeigt die amplifizierten PCR-Produkte für die Klonierung des Phagenpeptidinserts in einen Fusionsproteinvektor. Die Produkte haben je nach Phagenbank eine Größe um die 100 bp.

Die PCR der Phagen-DNA mit den spezifischen Primern für die LIC-Klonierung ergab eine scharfe Bande um die 100 bp. Aufgrund der benötigten hohen Konzentration für die Klonierung wurden die PCR-Produkte mit einem PCR-Aufreinigungskit aufgereinigt und in einem kleinen Volumen aufgenommen. Abbildung 3.9 zeigt eine Auswahl von amplifizierten PCR-Produkten vor der Aufreinigung. Man sieht, dass trotz der großen Primerüberhänge für das Annealing in der Ligase-unabhängigen Klonierung, nur eine spezifische Bande der richtigen Größe erscheint. Der Größenunterschied zwischen der 7mer-Bank (z.B. 4-7.4) und der 12mer-Bank (z.B. 13-12.5) ist in den amplifizierten Produkten nicht zu erkennen.

3.4.2 Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine

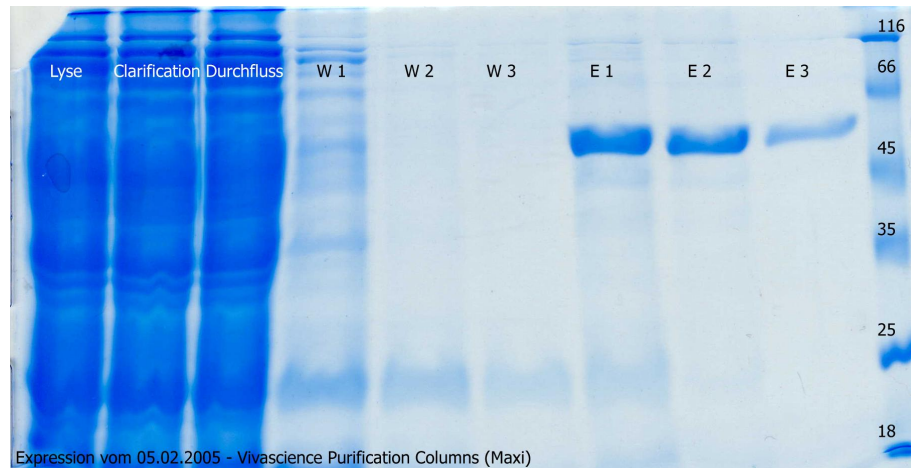


Abbildung 3.10: Proben der Proteinaufreinigung.
Das 12 %ige SDS-Gel zeigt die Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte des AP-Fusionsproteins. Von links nach rechts: Lyse, Klärungssäule, Durchfluss der Aufreinigungssäule, Waschschrte 1-3, Elutionsschritte 1-3, Proteinmarker.

In Abb. 3.10 sind die einzelnen Schritte mit den entnommenen Proben der Proteinaufreinigung zu sehen. Die ersten drei Taschen zeigen die Lyse, den Durchfluss der Klärungssäule und den Durchfluss der Aufreinigungssäule. Die drei Waschschrte entfernen effizient die kontaminierenden Proteine aus der Lösung. In der ersten Fraktion der Elution wird das meiste Protein von der Säule gewaschen, im zweiten Elutionsschritt etwas weniger und im dritten Elutionsschritt wird noch ein wenig des spezifischen Proteins eluiert. Das unfusionierte Protein hat etwa eine Größe von 53 kDa, ein fusioniertes Protein besitzt ein Molekulargewicht von 56 kDa.

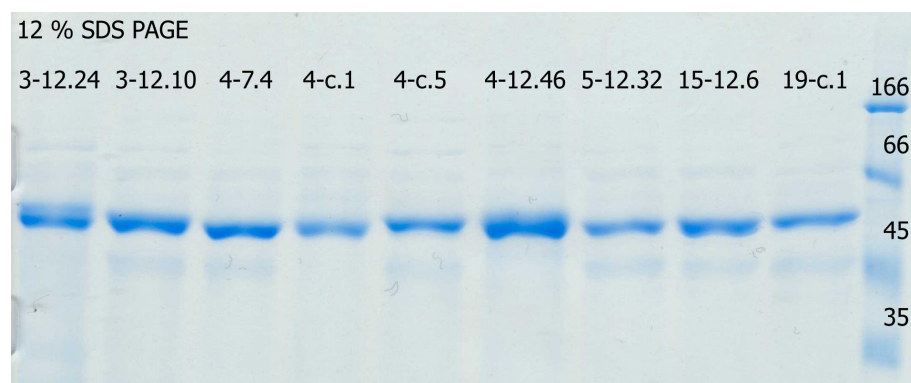


Abbildung 3.11: Fusionsproteine.
Die SDS-PAGE zeigt eine Übersicht verschiedener aufgereinigter Alkaline Phosphatase (AP) Fusionsproteine mit Peptiden aus selektierten Phagen.

Das Gel der Abb. 3.11 zeigt eine Übersicht verschiedener, klonierter und exprimierter Fusionsproteine nach der erfolgreichen Aufreinigung über den His-Tag. Alle Proteine besitzen eine Größe von etwa 56 kDa.

3.4.3 Protein-ELISA

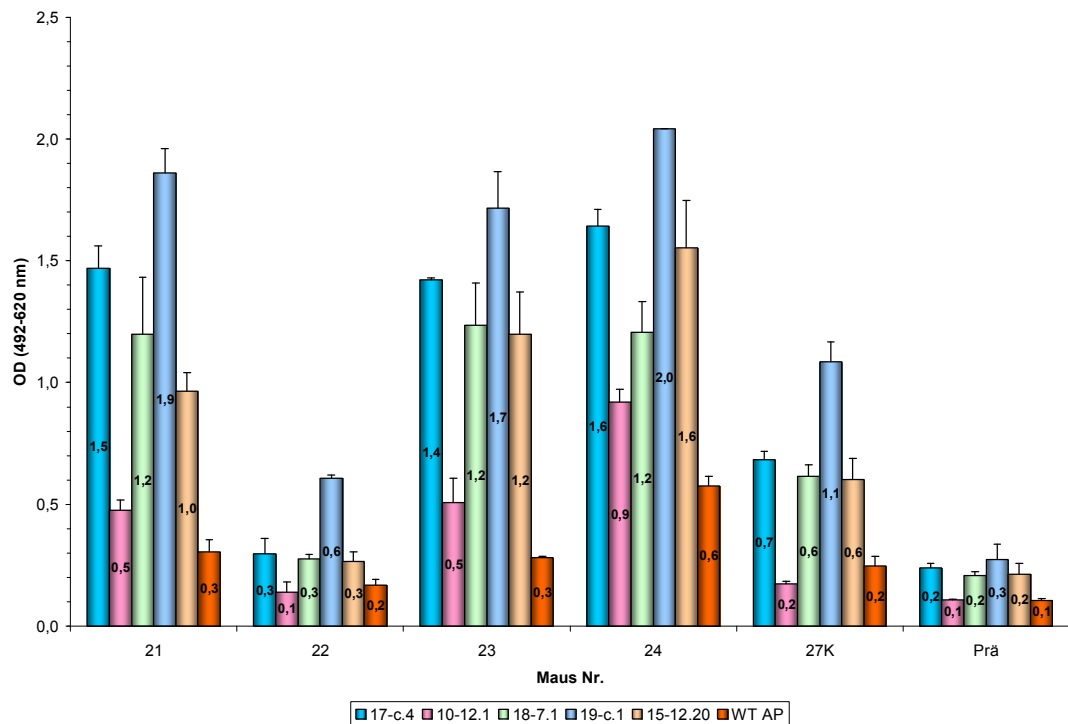


Abbildung 3.12: ELISA mit AP-Fusionsproteinen und immunisierten Mäuseseren.

Der Protein-ELISA zeigt die Reaktivität der immunisierten Mäuseseren mit den aufgereinigten AP-Fusionsproteinen.

Im obigen ELISA (Abb. 3.12) wurden alle Mäuse der Gruppe 6 aus der Immunisierungsstudie 2004 gegen die verschiedenen Fusionsproteine getestet, die das Peptid der zur Immunisierung verwendeten Phagen enthalten. Zusätzlich wurden die Mäuseseren gegen das Wildtypprotein (ohne Peptidfusion) getestet. Die Mäuse 21-24 wurden mit der Phagengruppe immunisiert, Maus 27K erhielt den Wildtypphagen, aufgetragen ist ebenfalls das Prä-Immuserum einer Maus dieser Gruppe (Prä). Das Ergebnis zeigt deutlich, dass einige der Mäuse eine zum Teil sehr starke Reaktion mit dem Fusionsprotein zeigen. Für die einzelnen Phagenpeptide fällt die Reaktion sehr unterschiedlich aus. Einige Peptide induzierten eine weitaus höhere Immunantwort in den Mäusen als andere Phagenpeptide, wie in der unterschiedlichen OD zu sehen ist. Die hohe Reaktivität der Kontrollmaus (27K) ist durch das Grundgerüst der Fusionsproteine zu erklären. Für die Klonierung werden Primer verwendet, die im konstanten Bereich des pIII-Proteins binden. Somit enthält jedes Fusionsprotein einen Bereich, welcher auch im Wildtypphagen vorhanden ist. Somit ist auch eine gewisse Reaktivität gegen alle Fusionsproteine mit einer Wildtypphagen-immunisierten Maus zu erwarten.

3.5 Neutralisation (Studie 2004)

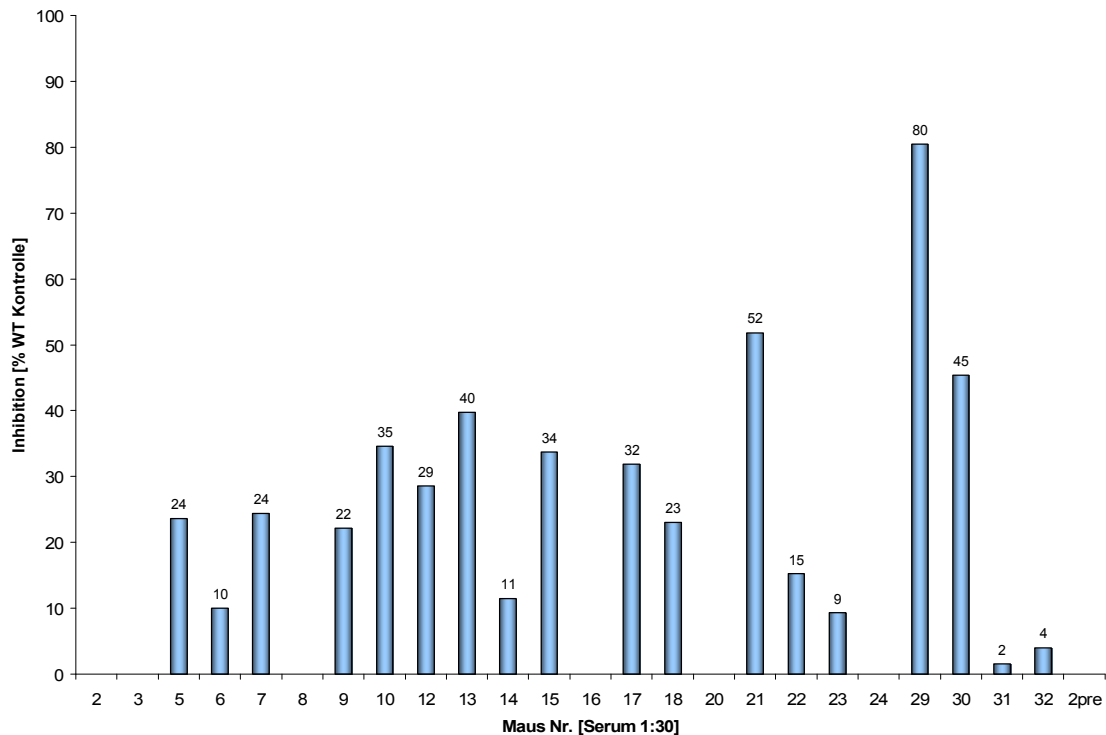


Abbildung 3.13: Neutralisation von HIV-1 D117III durch Mimotop-immunisierte Mäuseseren.

Dargestellt ist die Neutralisationskapazität aller immunisierten Mäuseseren gegen den HIV-1 Stamm D117III. Alle Neutralisationen wurden auf die Kontrolle (mit Wildtypphagen immunisiert) berechnet und sind als Inhibition in Prozent bezogen auf diese Kontrolle dargestellt.

Das Ergebnis in Abb. 3.13 zeigt deutlich, dass einige Mäuse eine neutralisierende Immunantwort gebildet haben. Diese Immunantwort ist jedoch nicht besonders hoch, der Titer der neutralisierenden Antikörper in dem Blut der Mäuse ist demnach relativ niedrig. In der gemessenen Verdünnung zeigen lediglich Maus 29 und Maus 21 eine Neutralisation über 50 %. Alle anderen Mäuse liegen unter dieser als Richtwert vorgegebenen Marke. Um dennoch abzuschätzen, wie gut die entstandene Immunantwort gegen HIV-1 durch die Immunisierung mit HIV-spezifischen Phagen ist, wurden weitere Neutralisationsstudien durchgeführt. Für diese wurden jedoch Verdünnungsreihen der Seren verwendet und zudem auch weitere HIV-1 Stämme benutzt.

Die Seren wurden für die weiteren Neutralisationsversuche zunächst seriell in Medium verdünnt, von 1:10 bis 1:40 und entsprechend dem Protokoll für eine Stunde mit den jeweiligen rekombinanten Viren vorinkubiert. Alle gemessenen Werte wurden auf die Kontrolle, einer mit Wildtypphagen-immunisierten Maus, bezogen und als Inhibition in Prozent dargestellt.

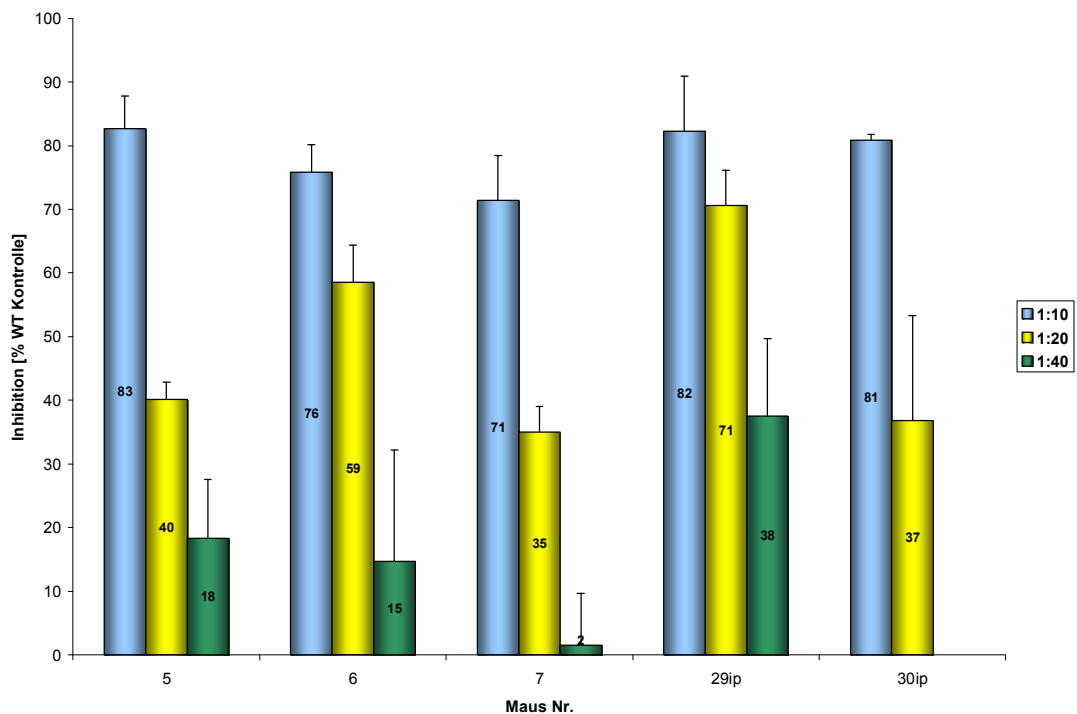


Abbildung 3.14: Neutralisation von D117III durch V3-Mimotop-immunisierte Mäuseseren.

Die Grafik zeigt die Neutralisationskapazität der Mäuseseren, die mit V3-Mimotopen (Gruppe 2) immunisiert wurden. Mäuse 5-7 wurden oral, Mäuse 29 und 30 i.p. immunisiert.

Die V3-immunisierten Mäuse zeigen, wenn auch mit einem sehr niedrigen Titer, eine deutliche neutralisierende Aktivität bezogen auf die mit dem Wildtypphagen immunisierte Maus. Die Mäuse zeigen eine Inhibition zwischen 70 und 80 % bei einer Verdünnung von 1:10 gegenüber der Kontrollmaus. Bei einer Verdünnung von 1:20 liegt die Neutralisation je nach Maus bei 35 bis 70 %. Bei einer Verdünnung von 1:40 ist lediglich bei Maus 29 eine noch deutliche Aktivität von fast 40 % zu erkennen (Abb. 3.14).

Die Neutralisationskapazität der restlichen Mäuseseren sind in Abb. 3.15 dargestellt. Bei einer Verdünnung von 1:10 neutralisieren die Seren das Virus D117III zwischen 41 und 80 %. Bei einer weiteren Verdünnung des Serums ist die Neutralisation bei allen Mäusen unter der 50 % Marke. Die Titer gegen HIV-1 dürften demnach sehr niedrig sein.

Einige Mäuseseren mit guter Neutralisationskapazität wurden zusätzlich gegen zwei weitere HIV-1 Stämme getestet (JR-CSF und MH08). In Abb. 3.16 ist die Neutralisation von JR-CSF dargestellt. Auch hier zeigte sich, dass die Neutralisation des Virus nur in sehr hohen Serumkonzentrationen zu erreichen ist, in der zwischen 52 und 73 % der Viren inhibiert werden, wiederum im Vergleich zur Kontrolle, die mit einem Wildtypphagen immunisiert wurde. In höheren Verdünnungen wird die Marke der 50 %igen Neutralisation nicht mehr erreicht. Ein Mausserum (Nr. 21) zeigt gegen diesen HIV-1 Stamm keine neutralisierende Aktivität.

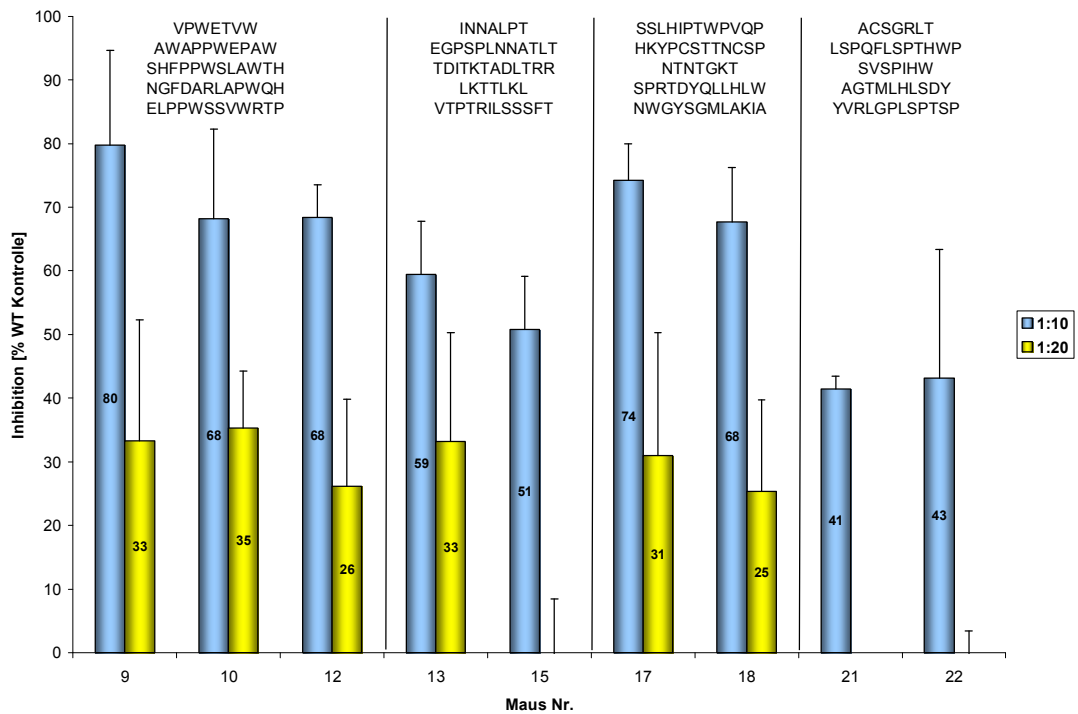


Abbildung 3.15: Neutralisation von D117III durch Mimotop-immunisierte Mäuseseren.
 Die Grafik zeigt die Neutralisationskapazität der Mäuseseren, die mit verschiedenen linearen und konformellen Mimotopen oral immunisiert wurden.

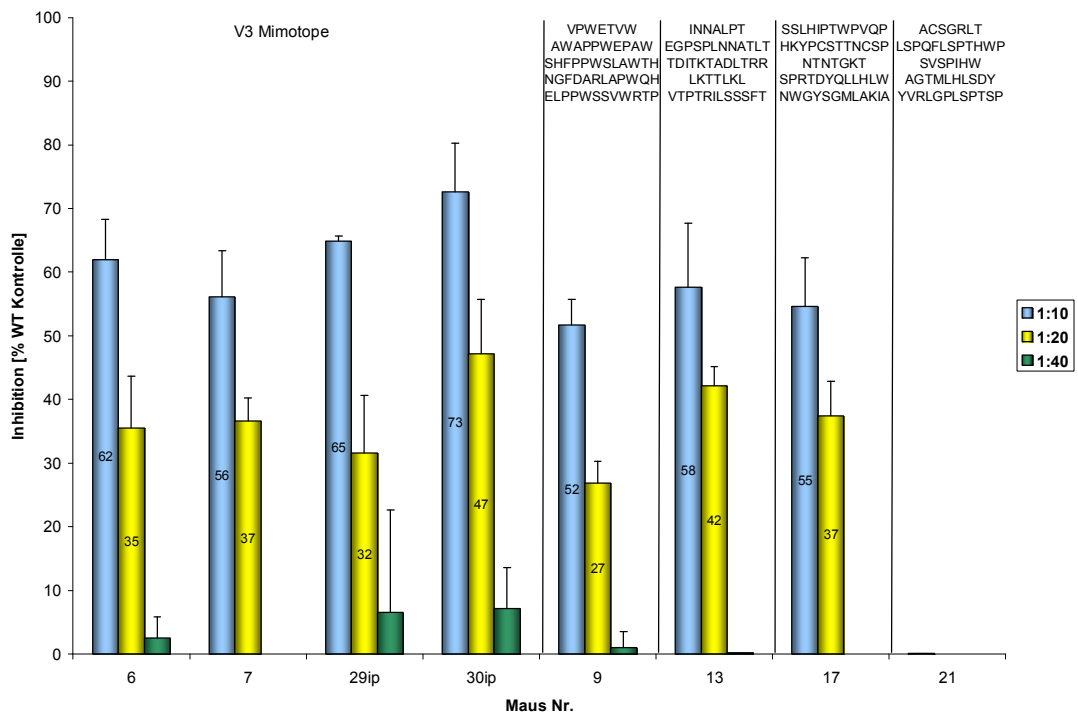


Abbildung 3.16: Neutralisation von JR-CSF durch Mimotop-immunisierte Mäuseseren.
 Einige Mäuse aus den vorangegangenen Neutralisationsstudien wurden zusätzlich noch gegen weitere HIV-1 Stämme getestet. Hier dargestellt ist die Neutralisation des rekombinanten Virus JR-CSF in verschiedenen Verdünnungsstufen.

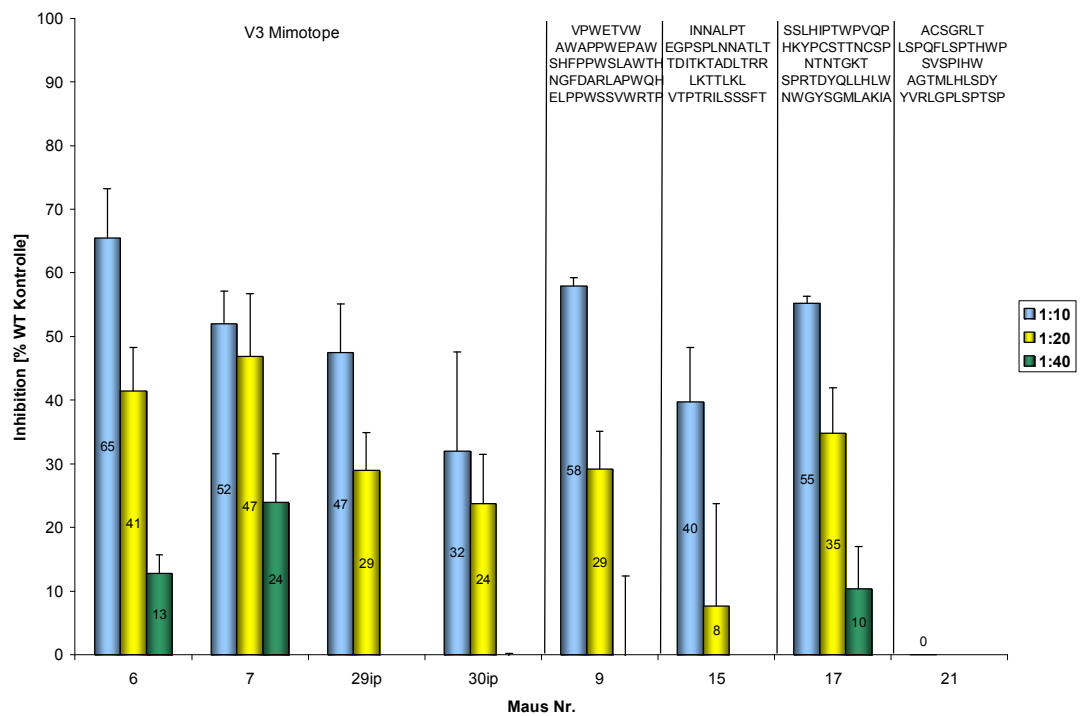


Abbildung 3.17: Neutralisation von MH08 durch Mimotop-immunisierte Mäuseseren.

Einige Mäuseseren wurden ebenfalls gegen ein primäres Virus des LTNP-Patienten MH08 (Subtyp C) getestet. Die Neutralisationsaktivität der oral immunisierten Mäuse zeigt in der niedrigsten Verdünnung teilweise nur wenig mehr als 50 %, in einigen Fällen liegt die Neutralisation bereits unter diesem Wert.

Neben JR-CSF wurde die Neutralisationsaktivität einiger Mäuseseren ebenso gegen ein primäres Virus getestet. MH08 ist ein rekombinantes Virus mit dem Hüllprotein des LTNP-Patienten MH08 (Subtyp C). In der höchsten Serumkonzentration zeigt sich eine neutralisierende Aktivität von 32-65 %. Bei einer Verdünnung von 1:20 fallen alle Mäuseseren bereits unter die Marke von 50 % Neutralisation. Maus Nr. 21 zeigt auch hier (ebenso wie bei JR-CSF) keine Neutralisationseigenschaften gegen das Virus (siehe Abb. 3.17).

3.6 Kreuz-ELISA (Studie 2005)

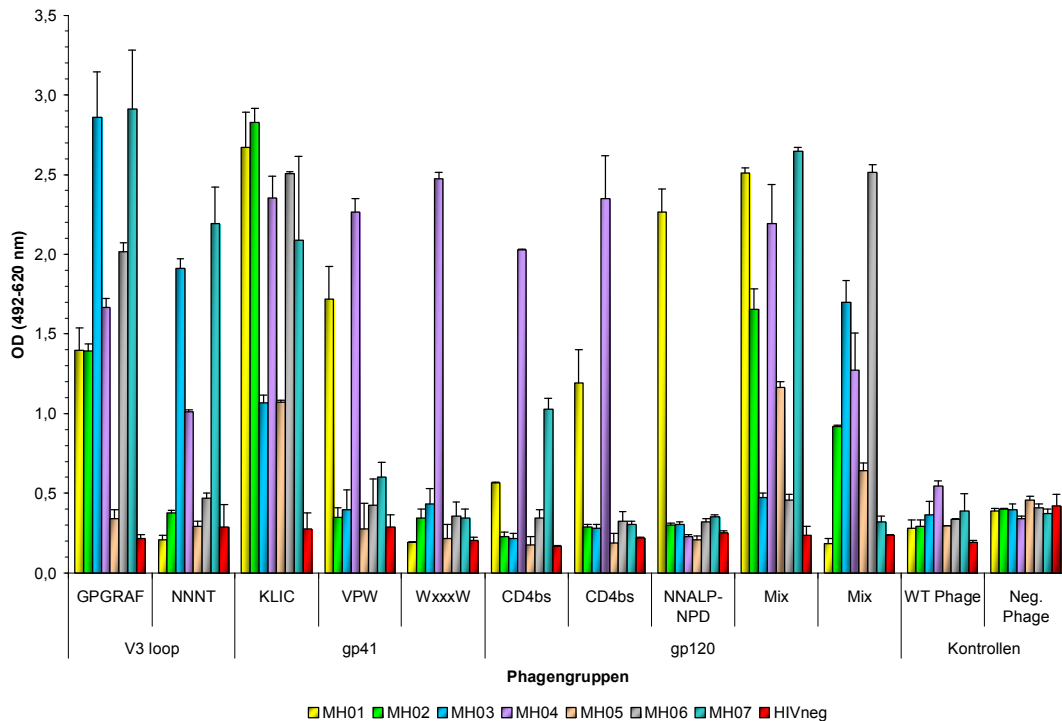


Abbildung 3.18: Phagen-ELISA zur Bestimmung der Kreuzreaktivität der Phagengruppen.

Der ELISA zeigt die Reaktivität jeder Phagengruppe für die Immunisierungsstudie 2005 mit den Patientenseren MH01 bis MH07. Zusätzlich wurden im ELISA der Wildtypphage (WT) und ein unspezifischer Phage (Neg.) getestet, sowie ein HIV-negativer Plasmapool (HIVneg).

Die Phagengruppen für die Immunisierungsstudie 2005 wurden alle als Phagenpool im ELISA auf ihre Kreuzreaktivität hin untersucht. Der Phagenpool wurde immobilisiert und gegen die einzelnen Patientenseren getestet. Als Kontrolle für die Spezifität der Patientenseren wurde zusätzlich ein HIV-negativer Plasmapool (HIVneg, rot) getestet. Für die Festlegung des Hintergrundsignals im ELISA wurden der Wildtypphage (WT) und ein unspezifischer Phage (Neg.) verwendet. Der Phagen-ELISA zeigt sehr deutlich, dass einige Phagengruppen Kreuzreaktivität aufweisen. Vor allem die Phagengruppe 3, 6 und 9 enthalten Phagenklone, die auch mit anderen als die für die Selektion verwendeten Patientenproben reagieren. Phagengruppe 3 enthält Phagotoppe aus den Selektionen mit MH01, MH02, MH04 und MH06. Wie die Abb. 3.18 zeigt reagiert der Pool jedoch auch deutlich mit MH07 und leicht mit MH03 und MH05. Die Phagengruppe 6 zeigt eine leichte Kreuzreaktivität mit Probe MH07. Am interessantesten ist jedoch die Phagengruppe 9, da diese potentiell konformelle Epitope, identifiziert mit 3DEX, enthält. Alle Mimotope wurden mit MH01, MH04 oder MH07 isoliert, reagieren jedoch ebenfalls mit MH02 und MH05.

3.7 Western Blot Analyse der Immunantwort gegen M13

3.7.1 Adjuvant-Effekt

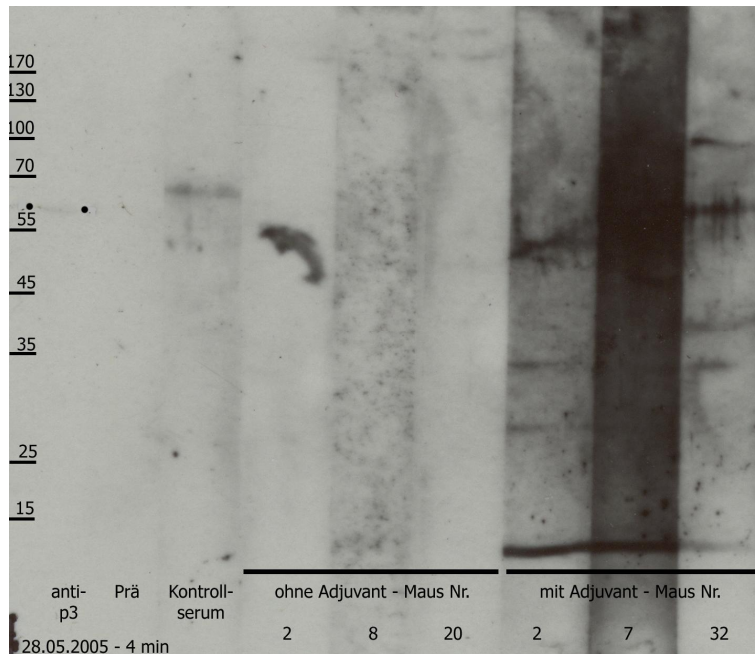


Abbildung 3.19: Western Blot mit Phagenpartikeln.

Der WB dient zum Vergleich zwischen den Mäuseseren, die mit Adjuvant immunisiert wurden und den Mäuseseren, die ohne Adjuvant immunisiert wurden. Der Effekt der deutlich gesteigerten Immunantwort ist in den rechten Streifen zu erkennen.

Der durchgeführte Western Blot (WB) mit Phagenpartikeln sollte den Effekt des Adjuvant für eine gesteigerte Immunantwort gegen den Phagen, vor allem aber auch gegen die Hüllproteine belegen (siehe Abb. 3.19). Die Mäuse ohne Adjuvant (2, 8 und 20) wurden von der Immunisierungsstudie 2004 (fünf Immunisierungen oral) verwendet, die Mäuse mit Adjuvant wurden lediglich zweimal i.p. immunisiert (2, 7 und 32). Als Kontrolle wurde ein Prä-Immuserum, sowie zweites Mäuseserum verwendet, die positive Kontrolle ist ein mAk gegen das Phagenhüllprotein p3 (anti-p3). Die Bande des anti-p3 Antikörpers ist sehr schwach zu erkennen und wurde mit zwei Punkten markiert. In den Mäuseseren, die ohne Adjuvant oral immunisiert wurden, sind keine Banden gegen p3 oder auch p8 (~ 5 kDa) zu erkennen. Dagegen zeigen die mit Adjuvant i.p. immunisierten Mäuse eine deutlich Immunantwort gegen p8 (~ 5 kDa, dicke Bande ganz unten), und vor allem auch Maus 32 (ganz rechts) eine deutliche Bande in der Höhe von p3. Das p3 Protein hat eine Größe von 42,5 kDa, zeigt jedoch im SDS Gel ein anders Laufverhalten und läuft hier über der Markerbande von 55 kDa. Aufgrund dieses ungewöhnlichen Laufverhaltens wurde auch der positive anti-p3 Antikörper zur Identifikation der richtigen Bande ausgewählt. Das p3 Protein besitzt die Peptidfusion für die HIV-spezifischen Mimotope und eine Immunantwort gegen dieses Hüllprotein lässt ebenfalls eine Immunantwort gegen das Peptid selbst vermuten. Die Steigerung der Immunantwort gegen M13 ist demnach bereits nach zwei i.p.-Immunisierungen in Kombination mit dem Adjuvant sehr deutlich zu erkennen.

3.7.2 Mäuse der Immunisierungsstudie 2005

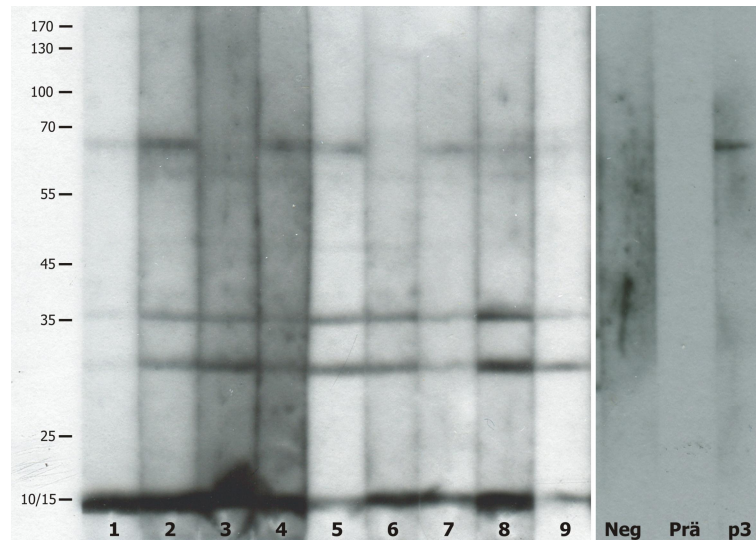


Abbildung 3.20: Western Blot Analyse der Mäuseseren.

Die Analyse zeigt die Reaktivität der immunisierten Mäuseseren sc.1 bis sc.9 aus der Studie 2005 mit Phagenpartikeln im Western Blot. Als Kontrolle wurde sowohl ein Mäuserum einer nicht immunisierten Maus (Neg), als auch ein Prä-Immuneserum verwendet. Die Positivkontrolle ist ein mAK gegen das Phagenhüllprotein p3 (p3).

Die Western Blot Analyse in Abb. 3.20 zeigt, dass alle Mäuse eine gute Immunantwort gegen das große Hüllprotein p8 aufweisen (unterste Bande bei 10/15 kDa). Lediglich die Mäuse 5, 7 und 9 besitzen einen geringeren Antikörpertiter gegen dieses Phagenprotein. Die wichtige Immunantwort gegen das p3 Protein (Vergleiche Streifen p3 als Positivkontrolle), an welches ebenso das fremde Peptid der Phagenbank fusioniert ist, ist nicht bei allen Mäusen deutlich zu erkennen. So besitzen die Mäuse 3 und 6 kaum oder keinen Antikörper gegen p3, die Banden bei Maus 1 und 9 sind sehr schwach. Bei den Mäusen 2, 4, 5, 7 und 8 ist die Bande deutlich zu erkennen. Die Kontrollseren (Neg und Prä) reagieren mit keinem der Proteine. In wieweit diese Mäuse mit deutlicher Immunantwort gegen p3, ebenso eine Immunantwort gegen das fusionierte Peptid aufweisen, kann in der Western Blot Analyse anhand der aufgetragenen Phagenpartikel nicht geklärt werden. Alle Seren werden jedoch auf ihre Neutralisationskapazität hin getestet, so dass die Mäuse mit einer potenten Immunantwort und der Ausbildung neutralisierender Antikörper gegen HIV-1 aufgrund der für die Immunisierung verwendeten Mimotope, auf diese Art und Weise identifiziert werden können.

3.8 Neutralisation (Studie 2005)

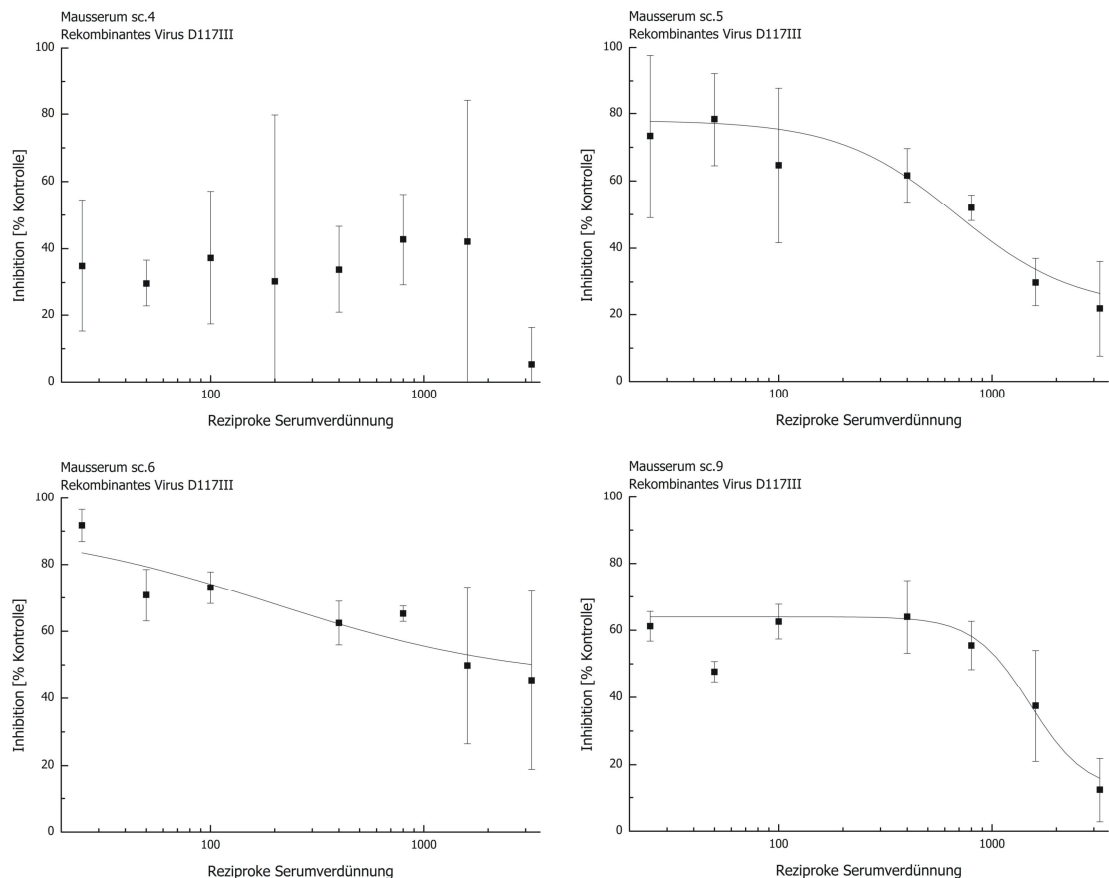


Abbildung 3.21: Neutralisation rekombinanter HIV-1 D117III Viren durch Mäuseseren.

Als Beispiel für die Immunisierung mit Phagengruppen aus der Studie 2005 wurde vier Mimotop-immunisierte Mäuse ausgewählt. Nicht alle Mäuseseren zeigen eine neutralisierende Antikörperaktivität bezogen auf die Kontrolle (nicht immunisierte Maus). Während die Mäuseseren sc.5 und sc.6 eine gute Neutralisationsaktivität aufweisen, zeigt das Mausserum sc.9 nur eine geringe und Mausserum sc.4 keine Aktivität gegen HIV-1 D117III.

Leider konnten nicht alle Phagengruppen auf ihre Fähigkeit hin neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 zu induzieren untersucht werden. Viele Mäuse starben nach der ersten Immunisierung (siehe 3.3.3). Die überlebenden Mäuse wurden im folgenden subkutan immunisiert und anschließend auf neutralisierende Antikörper untersucht (siehe 2.9.8).

Insgesamt überlebten neun Mäuse: sc.1-sc.4 wurden mit Phagengruppe 9 (siehe 3.3.3) immunisiert, sc.5 mit Phagengruppe 4, sc.6-sc.8 mit Gruppe 5 und sc.9 mit Phagengruppe 6. Die Neutralisation von HIV-1 D117III zeigt, dass vor allem die Seren der Mäuse sc.5 und sc.6 neutralisierend wirken. Beide Phagengruppen beinhalten bisher nicht publizierte Motive aus gp41 (siehe 3.3.3). Das Serum der Maus sc.4 zeigt keine neutralisierende Wirkung, bei sc.9 ist nur eine moderate Aktivität zu erkennen. Aufgrund der geringen Anzahl an überlebenden Mäuse soll hier keine Angabe eines IC50 erfolgen, auch wenn diese für die obigen Beispiele hohe Werte ergeben würden. Für eine objektive Aussage der Funktionsfähigkeit der Mimotope sollte die Studie mit neuen Mäusen wiederholt werden.

4 Diskussion

4.1 Patientencharakterisierung

4.1.1 Virale und zelluläre Faktoren

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Analyse der humoralen Immunantwort gegen HIV-1 in einer Gruppe von Patienten, bei denen diese essentiell für einen nicht progressiven Krankheitsverlauf zu sein scheint. Die für diese Studie verwendeten Patienten leben seit mehr als 10 Jahren mit einer HIV-Infektion ohne antivirale Therapie, besitzen jedoch keine typischen AIDS-Symptome. Das Immunsystem der Patienten ist stabil, das Blut enthält eine relativ niedrige Viruslast - teilweise unter der Nachweisgrenze von 50 RNA Kopien pro ml Blut - und die CD4-Zellzahl liegt in einem aus klinischer Sicht normalen Bereich. Neben dem zellulären Arm der Immunantwort, der häufig als viel versprechendste Waffe gegen HIV-1 gesehen wurde und daher im Mittelpunkt der HIV-Forschung stand, wird das Interesse an Antikörpern, die eine HIV-Infektion unter Kontrolle halten können, wieder größer.^{37,183,312} Um die Patienten dieser Arbeit näher zu charakterisieren, wurden zunächst andere, für eine verspätete HIV-Progression verantwortlichen Parameter, ausgeschlossen. Hierzu zählen die bekannte CCR5 Δ 32bp Deletion im CCR5 Korezeptor, sowie virale Faktoren, wie Mutationen oder Deletionen in für das Virus wichtigen Genen. Die Untersuchung des CCR5 Korezeptorgens zeigte, dass lediglich Patient MH12 eine (heterozygote) Deletion in einem der Korezeptorallele trägt (siehe 3.1.2). Alle anderen Patienten, vor allem die Patienten MH01 bis MH08, die für die Phage Display Selektionen herangezogen wurden, sind homozygot wildtyp für den Korezeptor und eine verspätete Progression aufgrund dieser Eigenschaft kann demnach ausgeschlossen werden. Die Patientenviren tragen weiterhin keine Mutationen oder Deletionen in wichtigen viralen Genen, wonach auch eine virale Ursache für den LTNP-Status weitgehend auszuschließen ist. Da diese Ergebnisse jedoch detailliert in einer anderen Arbeit (S. Antoni) vorgestellt werden, soll hier lediglich darauf hingewiesen werden, dass virale und zelluläre Faktoren nicht für den LTNP-Status unserer Patienten verantwortlich zu sein scheinen.

4.1.2 Neutralisationseigenschaften der Patientenserum

Nach Ausschluss der zellulären und viralen Faktoren für den bis heute symptomlosen Verlauf der Krankheit in den ausgewählten Patienten, wurde die Neutralisationskapazität der Patientenantikörper gegen zwei heterologe HIV-1 Isolate bestimmt. Als Isolate wurden HR010 und YU2 verwendet und die aufgereinigten Antikörper der Patienten MH01 und MH02 waren in der Lage, diese Viren *in vitro* zu neutralisieren. Der IC₉₀ lag im Durchschnitt bei einer Verdünnung von 1:223. Mittlerweile wurde für die komplette Studie eine große Anzahl an Virusisolaten getestet, um die breite Neutralisationskapazität als Grundlage für die Immunkompetenz der Patienten zu belegen. Insgesamt wurden acht unterschiedliche HIV-1 Isolate (R5-Viren: YU2, JR-CSF,

D117III, sowie die primären Patientenisolate MH03, MH06 und MH08; X4-Viren: NL4-3; R5X4-Viren: 89.6) verwendet und konnten durch das Serum der Patienten konzentrationsabhängig neutralisiert werden. Somit waren die ausgewählten Patienten ideale Kandidaten, um die Epitope breit neutralisierender Antikörper zu kartieren.

Die Immunantwort der Patienten gegen die einzelnen HIV Proteine ist sehr ausgeprägt. Im Western Blot reagierten alle Patientenserum sehr gut mit den einzelnen HIV-1 Proteinen und vor allem auch mit dem gp160 Vorläufer für die Hüllproteine (siehe 3.1.3). Ebenso zeigte sich die Reaktion im ELISA gegen ein V3 Konsensus-Peptid deutlich positiv (siehe 3.1.4). Alle Patienten besitzen einen hohen Titer gegen V3, nur Patient MH05 zeigt eine wesentlich niedrigere Antikörperreaktion gegen die V3 Region. Zusammenfassend kann jedoch davon ausgegangen werden, dass alle getesteten Patienten eine gute Immunantwort gegen die Hüllproteine besitzen. Die Reaktion der Patientenproben im Western Blot oder im ELISA sagt jedoch nichts darüber aus, ob und in wie weit die Patienten durch ihre Antikörper eine HIV-Infektion verhindern können. Die Neutralisationsaktivität der Patientenantikörper wurde in einem *in vitro* Infektions- und Detektionssystem getestet. Vier Beispiele wurden gezeigt, um die Aktivität der Antikörper gegen HIV zu belegen (siehe 3.1.5). Die Neutralisationskapazität der Patientenantikörper von MH01 und MH02 wurde jeweils gegen die Viren HR010 und YU2 getestet. Beide Viren sind keine autologen Isolate der Patienten, sondern repräsentieren heterologe HIV-1 Isolate, die normalerweise durch Patientenantikörper schwer zu neutralisieren sind. Beide Patientenproben zeigen eine deutliche Neutralisationsaktivität gegen die beiden heterologen Virenstämme. Die 50 %ige Neutralisationsaktivität liegt zwischen 1:850 und 1:2100, eine Inhibition von 90 % wird bei einer Verdünnung von 1:140 bis 1:300 erreicht (siehe 3.1.5, Tabelle 3.2). Der Gesundheitszustand der ausgewählten Patienten unserer LTNP Studie könnte demnach teilweise oder vollständig auf das Vorhandensein neutralisierender Antikörper in den Patientenserum zurückzuführen sein, zumal viele der bekannte viralen und zellulären Faktoren ausgeschlossen wurden. Weiterführende Neutralisationsstudien mit allen Patienten wurden bereits durchgeführt und belegten eine breite Aktivität der Seren gegen bekannte HIV-1 Standardisolate. Diese Studie wird im Detail in einer anderen Doktorarbeit besprochen (S. Antoni).

4.2 Komponenten des antiviralen Immunsystems

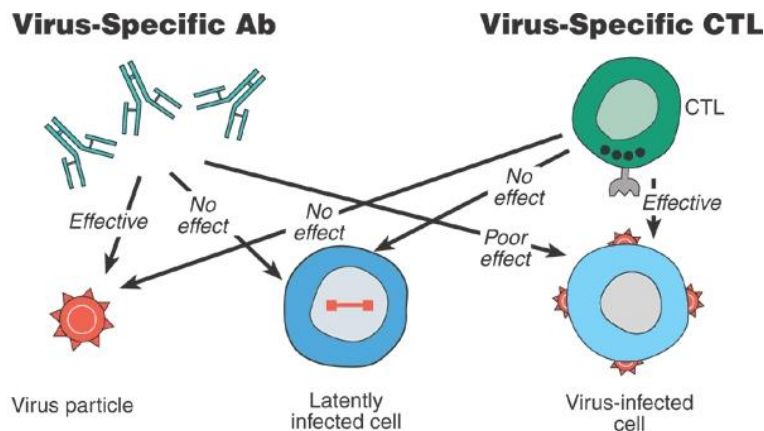


Abbildung 4.1: Komponenten des antiviralen Immunsystems.
Effektivität der einzelnen Immunsystemkomponenten im Kampf gegen freies Virus, latent infizierte Zellen und virusinfizierte Zellen.²¹⁰

Die Abbildung 4.1 zeigt die Effektivität der einzelnen antiviralen Immunsystemkomponenten gegen die verschiedenen im Körper vorkommenden Formen von HIV-1. So sind neutralisierende Antikörper sehr effektiv gegen freies Virus (z.B. bei einer Primärinfektion), jedoch ineffektiv gegen zell-assoziiertes Virus. Zytoto-

xische T-Zellen dagegen sind äußerst effektiv gegen virusinfizierte Zellen, können aber keine freien Viren bekämpfen. Beide Komponenten sind machtlos in der Bekämpfung von latent infizierten Zellen.³⁷ Die adaptive Immunantwort, in Form von neutralisierenden Antikörpern und virusspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, stellt das Prinzip der Immunprotektion für die meisten Infektionen dar. Primär korrelieren neutralisierende Antikörper mit der Protektion vor einer Infektion, die zellvermittelte Immunantwort korreliert mit der Protektion vor der Krankheit. Beide Arten der Immunantwort sind für einen effektiven Schutz vor einer primären Infektion und dem späteren Krankheitsverlauf wichtig.²¹⁰ Der ideale Impfstoff gegen HIV wäre demnach ein Kombinationsimpfstoff, der beide Immunantworten anregt: eine Komponente, die eine zelluläre Immunität auslöst (CTLs) und eine zweite, die die humorale Immunantwort stimuliert, vor allem neutralisierende Antikörper. Viele Anstrengungen der vergangenen Jahren, die zum Ziel hatten die Abwehr von HIV gegen neutralisierende Antikörper zu überlisten, liefen ins Leere.^{39,187} Relativ einfache Ansätze durch Expression des viralen gp120 Hüllproteins als Monomer waren unzureichend, der Schutz gegen eine HIV-Infektion war nicht gewährleistet. Das heutige Wissen lässt vermuten, dass nicht eine einzige Komponente die endgültige Lösung des Impfstoffproblems darstellen wird. Möglicherweise bringen jedoch viele verschiedene Konzepte, die sich später kombinieren lassen, eine befriedigende Lösung für ein geeignetes Immunogen.^{37,41} Der Impfstoff sollte ebenso in der Lage sein, eine lang anhaltende Gedächtnis-T-Zellantwort zu stimulieren, die zudem im Falle von HIV breit genug ist, die Veränderlichkeiten innerhalb der HIV-1 Subtypen zu meistern.^{37,41,97} Eine gute Übersicht über die vergangenen 20 Jahre Impfstoffentwicklung gegen HIV-1 ist in einem Review von A. J. McMichael und T. Hanke zu finden.¹⁷³ Zudem gibt es zwei weitere sehr interessante Reviews über die antivirale Aktivität von Antikörpern *in vitro* und *in vivo* teilweise in Bezug auf die heutige Impfstoffentwicklung bei HIV.^{37,214}

4.3 Mechanismus der Neutralisation

Für die Neutralisation wurden in der Vergangenheit bereits mehrere Mechanismen - auch in Kombination - beschrieben: Aggregation, Inhibition des Viruseintritts durch Bindung und anschließender Inhibition der Fusion, Interferenz mit primären und sekundären Schritten der Freisetzung der genetischen Virusinformation, sowie die einfache Bedeckung des Virus mit Antikörpern, bis diese eine kritische Dichte erreichen und die Interaktion des viruseigenen gp120 mit dem CD4-Rezeptor der Zielzelle verhindern.^{37,214,216} Eine Studie über die Stöchiometrie der HIV-1 Neutralisation zeigte, dass bei einem Bedeckungsgrad von 35 % nahezu 63 % der Viren neutralisiert werden konnten.²⁵⁰ Eine sehr aktuelle Studie der Arbeitsgruppe von *J. Sodroski* widerspricht dieser immer wieder diskutierten Theorie der kritischen Dichte.³⁰³ Die Untersuchungen seiner Arbeitsgruppe zeigten sehr deutlich, dass die Bindung eines einzelnen Antikörpermoleküls die Infektivität eines Trimers inaktivieren kann. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Hauptdeterminante für die Neutralisationspotenz und Neutralisationsempfänglichkeit, die Effizienz ist, mit der ein neutralisierender Antikörper an ein funktionelles Hüllproteintrimer bindet.

Ein immenses Problem für die Neutralisation von HIV-1 stellt jedoch die Defizienz der großen Mehrheit der Virionen nach der Replikation dar, die bis zu 99 % betragen kann.^{28,155} Diese defekten Viren entstehen z.B. durch eine geringe Anzahl intakter Hüllglykoproteintrimere^{22,56,155,173}, durch spontane Dissoziation des gp120 Proteins („shedding“) oder auch durch potentielle Heterogenität unter den HIV-1 Hüllproteincomplexen^{28,37,56,115,121,125,155,189,224,226,249,311}. Die Anzahl der vorhandenen Trimere aus gp120 und gp41 auf der Oberfläche jedes Virions variiert in der Literatur und reicht von 7 bis 72.^{56,155,214,311} Neuere Studien anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen und HPLC-Aufreinigung der HIV-Proteine zeigten, dass die immer wieder beschriebene theoretische Anzahl von etwa 72 Trimeren (bestehend aus 216 gp120 und 216 gp41 Proteinen) definitiv nicht erreicht wird.^{56,311} Im Durchschnitt werden HI-Viren mit etwa 8-10 Trimeren geformt.³¹¹ Die als „shedding“ bekannte spontane Dissoziation des gp120 Proteins vom trimeren Komplex ist nach neueren Untersuchungen ebenfalls umstritten.^{56,311} Multiple Auftau- und Einfrierzyklen führten zu keiner Dissoziation des Hüllkomplexes und zeigten, dass die Assoziation der beiden Proteine in einem gewissen Rahmen sehr stabil ist. Die Inkubation der Viren bei 55°C oder mehr führte dagegen zum fast vollständigen Verlust der gp120 Einheiten und damit auch zum Verlust der Infektivität (dies ist auch die Grundlage der Hitzeinaktivierung von HIV-Proben).⁵⁶ Der detaillierte Mechanismus der Neutralisation ist nach wie vor noch nicht vollständig geklärt und die Diskussion über diese beiden Theorien zeigt, wie viel Arbeit in der Aufklärung dieses Phänomens noch geleistet werden muss.

4.3.1 Neutralisierende Antikörper in der HIV-Infektion

Bis heute wird die Rolle der humoralen Immunantwort in der HIV-Infektion kontrovers diskutiert. Ob und in wieweit diese Art der Immunantwort für eine verspätete AIDS-Progression oder womöglich das Ausbleiben einer Infektion verantwortlich gemacht werden kann, ist noch nicht endgültig geklärt. Viele Publikationen weisen jedoch die Anwesenheit potent neutralisierender Antikörper in Patientenseren oder anderen Körperflüssigkeiten nach.^{18,19,32-34,47,48,184,185,223,231,265,279} Sicherlich kann die humorale Immunantwort alleine keinen Schutz liefern und so wird das Zusammenspiel aus zellulärer und humoraler Immunantwort eine wichtige Rolle im Verzögern der Krankheit spielen. In der Tat können partielle oder intakte Viren, sowie virusinfizierte Zellen die Entstehung von neutralisierenden Antikörpern stimulieren.¹¹¹ Der Titer dieser Antikörper korreliert jedoch nicht immer mit einem bestimmten Krankheitsstatus und wurde daher als nicht wichtig für die Progression zu AIDS gesehen. Daher ist der zugrunde liegenden Mechanismus und die Funktion neutralisierender Antikörper Stoff vieler Studien und Diskussionen. Während einige Publikationen zeigten, dass in Langzeitüberlebenden diese Antikörper mit höherer Häufigkeit und Breite vorkommen (wobei die Fähigkeit klinisch relevante primäre oder autologe virale Isolate zu neutralisieren sehr variiert), wurde in anderen Untersuchungen das genaue Gegenteil festgestellt.^{15,110,146,185} NPs im Gegensatz zu RPs wiesen eine eher schwache oder nicht-detektierbare Antikörperantwort auf.^{114,146,161} Nach langer Zeit der Beschränkung auf die CTL Immunantwort wurde in den letzten Jahren das Interesse an HIV neutralisierenden Antikörpern wieder deutlich größer, da viele Studien die Wichtigkeit dieser Immunsystemkomponente im Kampf gegen HIV-1 belegten.⁵¹

Verschiedene Gruppen identifizierten eine Interaktion von Antikörpern mit HIV-assoziierten Hüllproteinen ohne dass jedoch eine Infektion verhindert wurde und obwohl die Antikörper epitope zum großen Teil mit denen neutralisierender Antikörper übereinstimmten.²¹² In neueren Studien wurde gezeigt, dass die Bindung nicht-neutralisierender Antikörper an die Virusoberfläche zwar die Bindung neutralisierender Antikörper behindern kann, jedoch nicht deren Aktivität verringert.^{121,226} Eine mögliche Erklärung wäre die oben bereits angedeutete Heterogenität der Hüllproteine. Beide Arten von Antikörpern (neutralisierend/nicht-neutralisierend) binden Hüllproteinmoleküle, die nicht funktionell sind. Die funktionellen Hüllproteintrimere werden aber nur von neutralisierenden Antikörpern erkannt. Die Natur dieser infunktionellen Hüllproteinkomplexe ist unklar, möglicherweise bestehen diese aber aus Hüllproteinformen, die keine Virus-Zell-Fusion durchführen können.

4.4 Phage Display

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Analyse der humoralen Immunantwort der LTNP Patienten mit Hilfe der Phage Display Technologie. Die Eignung der Phage Display Methode zur Identifikation interessanter Epitope für die Entwicklung eines Impfstoffs wurde bereits in der Einleitung dargestellt (siehe 1.5). Das Potential dieser Technologie im Hinblick auf die HIV-Forschung wurde bereits 1994 durch die Gruppe um *R.N. Perham* veröffentlicht.⁷⁵ Sie inserierten einen Teil des V3 Loops in das große Hüllprotein (p8) des Bakteriophagen und immunisierten damit Mäuse. Es wurde gezeigt, dass das präsentierte Peptid ein wirklich effektives strukturelles Mimotop des natürlichen Epitops darstellte. Das Peptid wurde von menschlichen HIV Antisera erkannt, induzierte aber auch in den Mäusen einen hohen Titer an Antikörpern, die Kreuzreaktivität mit anderen HIV-Isolaten aufwiesen und fähig waren, das HI-Virus zu neutralisieren. In den folgenden Jahren zeigte sich immer mehr, dass die von einer Phagenbank selektierten Peptidsequenzen nicht immer der exakten linearen Sequenz des Originalepitops entsprechen. Solche Peptide ahmen („mimic“) die strukturellen Eigenschaften der Epitope nach und führen nach Injektion in Tieren zur Produktion von Antikörpern, die wiederum fähig sind, das Originalepitop zu erkennen. Aus diesem Grund werden diese Peptide auch Mimotope genannt und bestehen aus diskontinuierlichen Epitopen, die durch die native Faltung des Proteins zusammen ein Epitop für den spezifischen Antikörper bilden.^{20,66,92,178}

4.4.1 3DEX Software

Die Entwicklung der Software 3DEX war ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit und erforderte viel Zeit für die Optimierung und Umsetzung der erforderlichen Parameter, die bei der Suche nach Epitopen auf der Oberfläche von Proteinstrukturen nötig sind.

Viele funktionell wichtige monoklonale Antikörper (mAk) erkennen diskontinuierliche Epitope und wirken dadurch neutralisierend.^{141,191} Die Identifikation solcher Epitope könnte bei der Entwicklung von Molekülen helfen, die mit diesen Domänen interagieren oder interferieren, und kann tiefere Einblicke in die Funktionalität der Domänen geben. Wichtigstes Ziel der Software war die detaillierte Analyse einer Kollektion linearer Peptidsequenzen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, auf publizierten Proteinstrukturen diskontinuierliche Epitope zu repräsentieren. Das sogenannte „mapping“ mAk durch die Verwendung überlappender Peptide ist ein zeitaufwendiges Mittel. Dies gilt ebenso für randomisierte Mutationsanalysen, Massenspektroskopie proteolytisch verdauter durch mAk geschützter Proteinbereiche oder den Austausch homologer Proteindomänen verschiedener Spezies.^{16,26,154,195,213,282} Viele bisher veröffentlichten Programme zur Identifikation solcher konformellen Epitope sind nicht einfach zu handhaben, die zu verwendende Computerausstattung und die Software selbst sind sehr kostspielig. Unsere entwickelte Software ist frei zugänglich und ermöglicht die Analyse vieler Peptidsequenzen innerhalb weniger Stunden auf jedem beliebigen Windows-basierten Computersystem. Die Analyse verläuft in mehreren Schritten. Zunächst werden die eingegebenen Peptidsequenzen in die voreingestellte Größe (Such-

rahmen) zerlegt. Diese kleinen Peptidsequenzen werden sodann in der eingeladenen Proteinstruktur gesucht, Aminosäure für Aminosäure, wobei der vorgegebene Abstand als Suchradius verwendet wird. Ist eine Aminosäure gefunden, geht der Algorithmus zur nächsten Aminosäure des Peptids weiter, bis keine Nachbarn mehr gefunden werden. Zusätzlich kann noch eine Oberflächenfunktion hinzugeschaltet werden, die die Suche lediglich auf exponierte Proteinbereiche beschränkt. In der bereits publizierten Arbeit zu dieser Software konnte in drei Beispielen die Funktionsfähigkeit und Integrität der Software und des Algorithmus bewiesen werden.¹³⁰

4.4.2 Biopanning und Statistik

Die Selektionen bezüglich der Anreicherung HIV-spezifischer Phagen waren insgesamt gesehen sehr erfolgreich. Trotz der Verwendung polyklonaler Patientenproben (es wurden also keine für eine HIV Bindung aufgereinigten Antikörper verwendet) war die Ausbeute HIV-spezifischer Phagenklone sehr groß. Teilweise konnten in den Selektionen bis zu 75 % positive Phagen isoliert werden. Bedenkt man die mögliche Antikörperdiversität in den Seren (beim Menschen $> 10^{10}$), sowie eine hinzukommende strukturelle Antikörperdiversität¹³², so ist diese hohe Ausbeute an isolierten, HIV-spezifischen Klonen beachtlich. Zudem ist zu beachten, dass die Menge an anti-gp160 Antikörpern sehr gering ist. In einem infizierten Menschen, beträgt die Antikörpermenge gegen gp160 nur etwa 2,6 %.¹⁶² Das entspricht bei einer angenommenen totalen IgG-Konzentration von 22 mg/ml¹⁶² etwa 570 µg/ml. Dass die Selektion über verschiedene Anreicherungsschritte mit positiven Patientenproben und der Gegenselektion mit HIV-negativen Patientenproben funktioniert, ist deutlich an den Ergebnissen mit den bekannten immundominanten Domänen von gp160 abzuleiten. Die Isolierung der Mimotope solcher in jedem HIV-Positiven vorkommenden Antikörper ist eine gute positive Kontrolle für die Funktionalität des ausgeführten Protokolls. Nach den drei Runden der Selektion waren genug positive Phagen gegen HIV Antikörper angereichert, um eine gute Ausbeute im ELISA zu erzielen. Auffällig ist die schlechte Ausbeute bei einigen wenigen Patientenproben: MH03, MH05 und MH7. Obwohl in der Wiederholung dieser Selektionen wesentlich mehr Klone isoliert werden konnten (siehe 3.2), war die Ausbeute doch insgesamt deutlich niedriger als bei den anderen Biopannings. Eine mögliche Erklärung dieser schlechten Resultate könnte im Immunstatus dieser Patienten liegen. Betrachtet man die Tabelle mit dem Krankheitsverlauf der Patienten (siehe 2.8), so fällt auf, dass all diese Patienten eine Viruslast unter der Nachweisgrenze besitzen. Möglicherweise haben diese Patienten die HIV-Infektion sehr gut unter Kontrolle und weisen daher nur sehr wenige, aber dafür potente HIV-Antikörper auf. Diese Patienten wären aufgrund der potenten Antikörper natürlich die interessantesten Kandidaten für eine Analyse. Es ist jedoch nach wie vor umstritten und ungeklärt, ob solche Patienten mit entsprechender Viruslast, diesen Status aufgrund einer guten Immunantwort mit einem erhöhten Antikörperspiegel gegen HIV besitzen oder die Kontrolle des Virus durch eine geringe aber potente Immunantwort zustande kommt. Eine resultierende geringe Antigenmenge könnte ebenso für eine weitaus schlechtere Induktion von Antikörpern verantwortlich sein. Eine sehr potente Immunantwort gegen konservierte Bereiche

(z.B. Rezeptorbindungsstellen) von HIV wäre durchaus in der Lage, das Virus trotz Variabilität unter Kontrolle zu halten. Dass gerade bei solchen immunkompetenten Patienten die Selektionen schlechte Ausbeuten liefern, könnte ein Indiz für eine diese Theorie sein.

4.4.3 Die Wahrscheinlichkeit eines beliebigen Mimotops

Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben (siehe 3.2.5) wurden alle Peptidsequenzen auf eine mögliche Homologie zu den HIV-1 Proteinen, vor allen Dingen aber zum Hüllprotein gp120 als Vermittler des Viruseintritts, untersucht. Für die Analyse der konformellen Epitope, die also keinerlei lineare Übereinstimmung mit dem Hüllprotein zeigten, wurde die eigens hierfür entwickelte Software 3DEX verwendet. Ein wichtiger Punkt in der Analyse dieser Sequenzen stellt die Wahrscheinlichkeit p , mit der man eine beliebige Sequenz in einem Protein auffindet, dar. Wie in Kapitel 3.2.5 bereits vorgerechnet, liegt diese Wahrscheinlichkeit bei unter 2 %, wenn man als Motiv eine 4er-Sequenz sucht und alle zur Verfügung stehenden Aminosäuren der HIV-1 Proteine zugrunde legt. Diese Wahrscheinlichkeit wird noch geringer und fällt weit unter 1 %, berücksichtigt man lediglich die Anzahl der Aminosäuren in den zur Analyse verwendeten Hüllproteinen. 15-20 % der Klone aus den ersten beiden Selektionen konnte ein 4er Motiv zugeordnet werden. Diese Häufigkeit liegt demnach weit über dem durch Zufall zu erwartenden Ergebnis. Würde man ein 5mer suchen, liegt diese Wahrscheinlichkeit bei 10^{-3} %. Aber wie groß müsste nun ein Protein sein, um die Wahrscheinlichkeit $p = 1$ anzunehmen, also die 100 %ige Wahrscheinlichkeit in einem Protein der Größe x eine gesuchte Aminosäureabfolge von drei Aminosäuren zu finden:

$$x = \frac{1}{\left(\frac{1}{20}\right)^3} = 8000$$

Die Rechnung entspricht der Formel aus dem Kapitel 3.2.5 durch Umstellen nach der gesuchten Proteingröße. Für ein Triplettr beträgt die Proteingröße somit 8000 Aminosäuren. Würde man eine Abfolge von vier Aminosäuren suchen, beträgt die Größe des Proteins, um diese Abfolge mit 100 %iger Wahrscheinlichkeit zu finden, bereits 160000 Aminosäuren. Und für ein 5mer müsste das Protein ganze 3,2 Millionen Aminosäuren besitzen, damit p einen Wert von 1 annimmt.

Diese stochastische Analyse zeigt, dass die gefunden Peptidsequenzen keinesfalls durch zufällige Übereinstimmung den HIV-1 Proteinen zugeordnet wurden. Gerade Motive mit vier oder mehr aufeinander folgenden Aminosäuren dürften nach diesen Berechnungen eine deutliche Signifikanz aufweisen.

4.4.4 Sequentielles Biopanning

Die ersten beiden Selektionen nach dem Prinzip des „sequential antigen panning“ (SAP)³¹⁰, in dem zur Gegenselektion kein HIV-negatives Plasma, sondern eine ebenfalls HIV-positive Patientenprobe verwendet wurde, dienten dazu, konservierte Epitope zu selektieren, die beispielsweise in beiden Patienten für eine neutralisierende Immunantwort verantwortlich sind. Das Ergebnis dieser Selektionen war jedoch nicht dieser Annahme entsprechend. Obwohl gerade in diesen sequentiellen Biopannings sehr viele positive Phagen isoliert werden konnten (siehe 3.2.2), gab es so gut wie keine konformellen Peptidsequenzen, die von beiden Patientenantikörpern gemeinsam erkannt wurden (diese Daten wurden aufgrund der umfangreichen Anzahl an ELISAs und nur geringen „Ausbeute“ nicht gezeigt). Selbst unter den linearen Sequenzen, die meist immundominante Regionen widerspiegeln, war selten eine Kreuzreaktivität zu beobachten. Die große Mehrheit der isolierten Klone reagierte lediglich mit der Patientenprobe, die für die letzte positive Selektion verwendet wurde. Demnach fungierte diese sequentielle Selektion nicht als Mittel zur Anreicherung konservierter Antikörperpepitope, sondern depletierte eher die bereits selektierten Phagen der ersten Patientenprobe aus der ersten positiven Selektion. Auch die Verwendung eines Pools aus den verschiedenen Patientenseren zur Selektion brachte hierfür keine Verbesserung. Oft werden bei einer solchen Art von Selektion hauptsächlich die immundominanten Epitope isoliert, die für eine neutralisierende Antikörperantwort meist nicht in Frage kommen, gegen die aber jeder HIV Patient eine umfangreiche Immunantwort aufweist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Immunantwort der Patienten trotz solcher gemeinsamen Antigene immer sehr spezifisch ist und jeder Patient demnach auf eine andere Region der Hüllproteine als Antigen anspricht. Diese sehr individuelle Immunantwort führt dann dazu, dass kaum kreuzreaktive Mimotope gefunden werden, da sich die einzelnen Antikörper vielleicht ähnlich sind, aber eben nicht das identische Epitop erkennen. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Isolat-spezifische Immunantwort gerade auch die konformelle Bindungsregion auf gp120 für den Zellrezeptor CD4 betrifft.¹⁷² Eine bessere Strategie zur Isolierung solcher breit reaktiver Antikörper wäre die Verwendung der Hüllproteine selbst. Zunächst könnten die Antikörper der Patienten als Phagenbank exprimiert werden (als Antikörper-Phagenbank oder Fab-Phagenbank) und sodann gegen verschiedene Hüllproteine (z.B. unterschiedliche HIV Subtypen) im Stile des SAP selektiert und angereichert werden. Publierte Protokolle führten bereits zur erfolgreichen Isolierung verschiedener HIV-neutralisierender Fab-Fragmente.³¹⁰

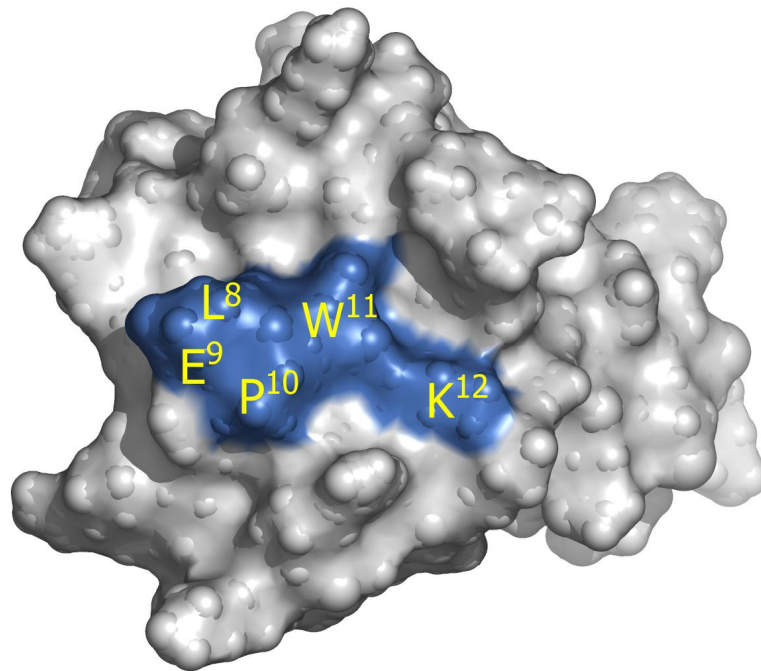


Abbildung 4.2: HIV-1 Tat Protein mit LEPWK-Mimotop.

Ein seltenes Beispiel einer linearen Homologie mit fünf aufeinander folgenden Aminosäuren konnte für das HIV-1 Tat Protein isoliert werden. Das Motiv LEPWK, gefunden in zwei Klonen aus dem BP 2/02, befindet sich auf der Oberfläche des Tat Proteins in einer linearen Abfolge (blau).

Interessanterweise gab es im sequentiellen Biopanning mit MH04/MH01 (siehe 3.2.6) auch zwei Klone mit fünf linear homologen Aminosäuren zum HIV-1 Tat Protein (2-c.9 und 2-c.13; Tat⁸LEPWK¹², siehe Abb. 4.2). Dieses Epitop wurde bereits mehrfach als eines der wichtigsten B-Zell Epitope von Tat beschrieben und wird nach Tat-Vakzinierung von Affen oder Menschen durch die induzierten Antikörper erkannt.²⁵⁹ Das Epitop liegt N-terminal im ersten Exon von Tat und dieser Bereich hat einen nur limitierten antigenen Polymorphismus innerhalb der verschiedenen HIV-1 Isolate.¹⁰⁴

Neben den vielen immundominanten Regionen sind diese Klone mit einer außerordentlich hohen linearen Homologie ein gutes Beispiel für die gute Selektionsstrategie. Trotz der Verwendung von polyklonalen Seren für das Biopanning, konnten teilweise sehr gute Ergebnisse durch die Verwendung verschiedener Protokolle und Selektionsstrategien erzielt werden.

4.4.5 Biopanning einzelner Patientenproben

Wie zu Beginn des Abschnitts bereits erwähnt, waren die Einzelselektionen mitunter sehr erfolgreich. Gerade mit den Patientenproben MH01, MH04 und MH06 konnten sehr viele positive Klone selektiert werden (siehe 3.2.2). Diese Resultate beweisen eine sehr gute Selektionsabfolge, gerade auch durch die Integration einer Gegenselektion mit einem HIV-negativen Plasmapool. Dieses Prinzip ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben.^{12,89} Die Gegenselektion ermöglicht die Anreicherung HIV-spezifischer Phagen und dadurch auch einen überdurchschnittlichen Erfolg an positiv selektierten Phagenklonen. Unspezifisch bindende Phagen werden so frühzeitig

reduziert und sind am Ende des Biopannings durch die immer wieder neuen Runden während der Selektion gegenüber den spezifischen Phagen unterrepräsentiert.

Ebenso ist die Verwendung der magnetischen Beads ein entscheidender Vorteil. Gegenüber den häufig verwendeten Platten (z.B. 96-Loch Platten) besitzen die Beads eine weitaus größere Oberfläche für die Immobilisierung von Liganden. Im Gegensatz zu einer Vertiefung einer ELISA Platte (etwa $0,9 \text{ cm}^2$) besitzt eine für das Biopanning verwendete Menge an Beads eine mehr als 100-fach größere Oberfläche (120 cm^2). Die Verwendung dieser paramagnetischen Beads hat aber noch weitere Vorteile, die gerade bei der Anwendung des Phage Display von großer Bedeutung sind. Neben der größeren Oberfläche sind die Beads auch wesentlich einfacher in der Handhabung bei der Durchführung der Waschschriffe. Durch die paramagnetischen Eigenschaften können die Beads sehr leicht, aber auch sehr gründlich gewaschen werden. Ein weiterer Vorteil liegt in der Orientierung der Bindungsdomänen. Gerade für die Anwendung in der Analyse von Antikörpern ist die Immobilisierung sehr wichtig, damit die Antigen-bindenden Stellen des Antikörpers frei zugänglich sind. Während die Bindung von Proteinen an Plastikoberflächen wie im Falle einer ELISA Platte sehr unspezifisch abläuft, kann die Bindung an die paramagnetischen Beads gerichtet verlaufen, so dass die große Mehrheit der Antikörper mit dem Fc-Teil gebunden werden und die Paratope somit freiliegen.

Die aus den Selektionen isolierten Mengen an Phagenklonen übersteigen weitaus die Möglichkeit, alle selektierten Phagotope im kleinsten Detail zu analysieren. Wichtigster Punkt bei dieser Analyse stellte das entwickelte 3DEX Programm dar. Phagotope, die ein Mimotop auf der Oberfläche von z.B. gp120 bilden, sind die beste Grundlage für die Verwendung in einer Immunisierungsstudie. Die zur Verfügung stehenden Proteinstrukturen des HI-Virus sind jedoch beschränkt, so dass sicherlich einige interessante Phagotope nicht richtig oder unvollständig analysiert wurden. Zum einen, weil nicht alle wichtigen HIV-1 Proteine als Struktur vorliegen, zum anderen aber auch, weil wie in der Einleitung bereits erwähnt, die verwendete Struktur des Hüllproteins gp120 unvollständig ist und zudem auch den Zustand nach Bindung des Liganden CD4 (und des Antikörpers 17b) darstellt, also bereits eine komplexe Konformationsänderung durchgeführt hat (siehe 1.3). Viele natürlich gebildeten Antikörper in den Patienten werden sicherlich das native Protein ohne CD4-Bindung erkennen, also in der Konformation, wie es auf dem Virus präsentiert ist. Die Struktur des Transmembranproteins gp41, ebenfalls wichtig für die Infektion, ist völlig unbekannt. Als Struktur existiert lediglich das 6-Helix-Bündel, welches für die Fusion mit der Zielzellmembran zuständig ist. Die Analyse aller Phagenklone konnte daher nur sehr unvollständig durchgeführt werden, die Ergebnisse beweisen jedoch, dass es durchaus möglich ist, einigen Phagenklonen eine interessante Ähnlichkeit mit den HIV-1 Proteinen zuzuordnen. Inwieweit diese Phagenklone nun wirklich ein Epitop eines neutralisierenden Antikörpers repräsentieren kann lediglich durch eine Immunisierungsstudie geklärt werden. Wären die Phagotope in der Lage, in einem Modellsystem Antikörper zu induzieren, die vor einer HIV-Infektion schützen können, so wäre der Beweis eines protektiven Antikörper-Mimotops erbracht

und diese Mimotope wären interessante Ausgangskandidaten für die Entwicklung eines HIV-1 Impfstoffes, zusammengesetzt aus vielleicht mehreren Mimotopen, die eine breit neutralisierende Immunantwort auslösen. Weiterhin können anhand der selektierten Phagen die Antikörper aus den Patientenseren aufgereinigt werden. Sind die Mimotop-aufgereinigten Antikörper in der Lage HIV-1 *in vitro* zu neutralisieren, wären solche Mimotope ebenfalls gute Kandidaten für Immunisierungsstudien. Problematisch hierbei ist jedoch die zu erwartende Menge an aufgereinigten, neutralisierenden Antikörpern. Die Konzentration ist aufgrund der vorliegenden Menge

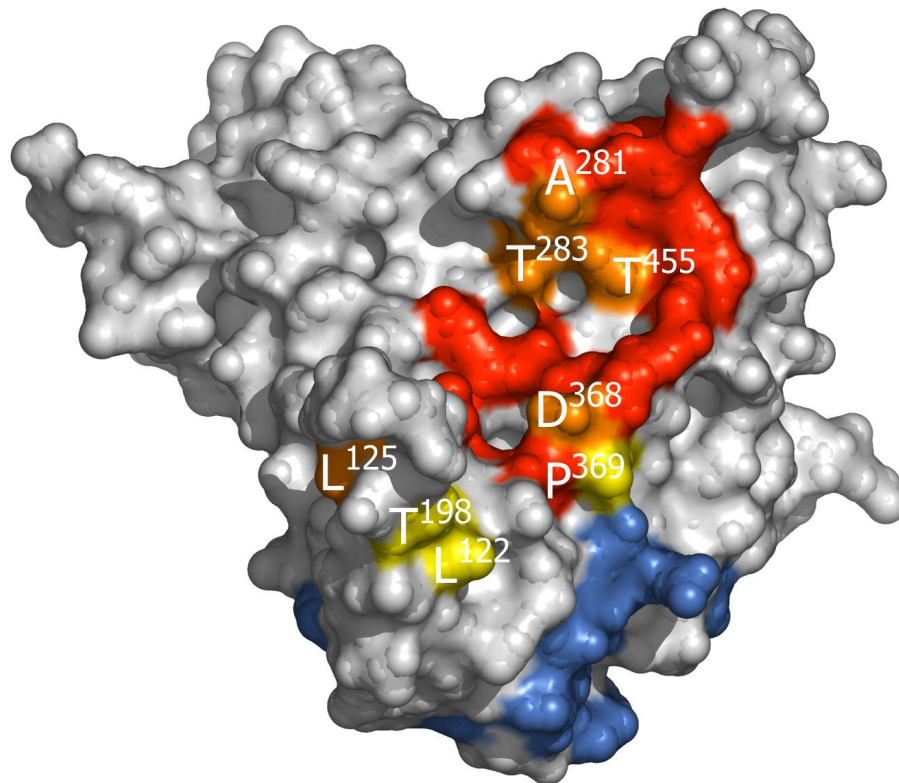


Abbildung 4.3: Phagotop 12-12.9 aus dem Biopanning 12/03.

Dargestellt ist die Struktur des HIV-1 Hüllproteins gp120 mit den CD4- (rot) und CCR5-Bindungsstellen (blau). Das durch die Software 3DEX prognostizierte Epitop besteht aus drei Teilen ($T^{283}A^{281}T^{455}P^{369}D^{368}L^{122}T^{198}L^{125}$) und überlappt teilweise mit der CD4 Bindungsregion (orange). Die restlichen Aminosäuren liegen zwischen den Bindungsstellen für den Rezeptor und Korezeptor (gelb).

im Serum sehr gering und die erforderliche Menge für eine Neutralisationsstudie ist relativ hoch. Ein Kompromiss wäre der Test der Mimotop-aufgereinigten Antikörpern in einem ELISA mit nativem gp160. Durch Konkurrenz mit bekannten neutralisierenden Antikörpern ließe sich so ableiten, ob interessante Impfstoffkandidaten zur Aufreinigung neutralisierender Antikörper verwendet wurden.

Interessante Kandidaten für eine Immunisierung stellen vor allen Dingen Mimotope dar, die mit wichtigen Domänen im gp120 Molekül überlappen. Gerade Regionen, die mit dem Rezeptor CD4 interagieren oder an die der Korezeptor CCR5 bindet, sind wichtige Anhaltspunkte für die Auswahl der Mimotope, die potentiellen neutralisierenden Antikörpern zugeordnet werden können und daher höchste Priorität für eine Immunisierungsstudie besitzen. Im Abschnitt zur entwickelten 3DEX Software im Ergebnisteil (siehe 3.2.4) wurde bereits ein gutes Beispiel für ein solches Mimotop gezeigt. Ein zweites Beispiel soll die schwierige Analyse aller selektierten Phagotope

nochmals verdeutlichen. Während einige Phagotope ein Mimotop aus maximal zwei unterschiedlichen Sequenzabschnitten besitzen, gibt es auch Mimotope, die aus mehreren kleinen Sequenzabfolgen zusammengesetzt sind. Ein solches Mimotop konnte im Phagenklon 12-12.9 gefunden werden (siehe 3.2.15, Tabelle 3.24 und Abb. 4.3).

Das potentielle durch 3DEX identifizierte Mimotop besteht insgesamt aus drei Teilen, die auf der Oberfläche von gp120 kolokalisieren und teilweise mit der Rezeptorbindungsstelle überlappen oder diese umgeben (siehe Abb. 4.3). Fünf der acht Aminosäuren des 12mers überlappen mit der CD4-Bindungsdomäne (T²⁸³A²⁸¹T⁴⁵⁵-D³⁶⁸-L¹²⁵), drei weitere liegen zwischen den Bindungsstellen für CD4 und CCR5 (P³⁶⁹-L¹²²T¹⁹⁸). In wieweit dieses Mimotop für die Induktion einer neutralisierenden Antikörperantwort eingesetzt werden kann, müsste in einer zukünftigen Immunisierungsstudie geklärt werden, da leider keine Maus dieser Mimotopgruppe die Immunisierungsstudie überlebte (siehe 3.3.3).

4.5 Immunisierungsstudien

Das wichtigste Kriterium für einen Impfstoffkandidaten ist die erfolgreiche Induktion protektiver Antikörper, im Falle von HIV-1 neutralisierende Antikörper, die vor einer Infektion schützen können. Die 3DEX-Analyse aller durch die Patientenproben selektierten Mimotope konnte bereits einige interessante Phagotope herausfiltern, die für eine solche Immunisierungsstudie in Frage kommen. Aufgrund der Masse an Sequenzen ist es jedoch nicht möglich, alle isolierten Mimotope in einer Immunisierungsstudie auf ihre Fähigkeit hin, neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 zu induzieren, zu testen. Für die Studien mit Mäusen wurden daher die viel versprechendsten Kandidaten ausgewählt, nach Ähnlichkeit oder Zielregion zusammengefasst und als Pool-Immunogene für die Immunisierung der Mäuse verwendet. Nach der Etablierung der Immunisierungsprotokolle wurden erstmals in der Studie 2004 neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 detektiert. Die anfänglichen Immunisierungen wurden mit Balb/C Mäusen durchgeführt, die neueren Studien mit C57BL/6. Es ist bekannt, dass C57BL/6 Mäuse bei einer Immunisierung mit Phagenpartikeln besser auf das präsentierte Peptid mit spezifischen Antikörpern antworten, als Balb/C Mäuse.^{71,179,308} Die Entwicklung der spezifischen Antikörper in den Mäusen findet bei einem pIII-System nach etwa drei Immunisierungen statt und erreicht nach etwa fünf bis sechs Immunisierungen das Maximum.³⁰⁷ Die Halbwertszeit eines Phagen im Serum ist relativ lang und beträgt in C57BL/6 Mäusen etwa viereinhalb Stunden.¹⁸²

4.5.1 Studie 2004

Die erste erfolgreiche Immunisierung im Jahr 2004 wurde oral durchgeführt, wobei jeder Maus wöchentlich 10¹² Phagenpartikel mit einer Magensonde verabreicht wurden. Als Kontrolle wurden ebenso intraperitoneale (i.p.) Immunisierungen durchgeführt.

Die Analyse der Mäuseseren ergab zunächst im Protein-ELISA eine Bindung der induzierten Antikörper an die als Fusionsprotein exprimierte Peptide, die zur Immunisierung präsentiert auf den Phagen verwendet wurden (siehe 3.4.3). Diese Fusionsproteine wurden zur Analyse der

Immunantwort gegen die präsentierten Peptide verwendet, da eine hohe Immunantwort gegen die Phagenhülle selbst, vor allem gegen das große Hüllprotein p8 zu erwarten ist. Daher ist die spezifische Reaktion gegen die selektierten Peptide nur außerhalb des Phagenrückgrates zu detektieren. Die weitere Analyse in Neutralisationsversuchen, anhand rekombinanter Reporter-viren *in vitro*, bestätigte die erfolgreiche Induktion HIV-1 spezifischer Antikörper, die in der Lage waren, die HIV-1 Infektion von Rezeptorzellen *in vitro* teilweise zu inhibieren. Die beste Neutralisation zeigte sich in der Gruppe der mit V3-Mimotopen immunisierten Mäuse (Nr. 5-8 und 29-32). Je nach Mausserum ergab der Test eine Neutralisationskapazität gegen das HIV-1 Isolat D117III von 70 bis 80 % in der niedrigsten Verdünnung (siehe 3.5, Abb. 3.15). Diese Inhibition ist ebenso gegen den HIV-1 Stamm JR-CSF (siehe 3.5, Abb. 3.17) und in einer geringeren Effizienz gegen das primäre Isolat eines LNTP Patienten (MH08) mit einem anderen Subtyp (HIV-1 Subtyp C) zu beobachten (siehe 3.5, Abb. 3.18). Diese Neutralisation ist insofern interessant, da Antikörper gegen V3 in der Literatur oft als Subtyp-spezifisch beschrieben werden und daher nicht das Kriterium einer breiten Neutralisationseigenschaft erfüllen. In letzter Zeit wurde jedoch diskutiert, ob die Induktion neutralisierender Antikörper anhand des V3-Loops weniger sequenzspezifisch, als vielmehr strukturspezifisch zu sehen ist. Demnach wäre der V3-Loop trotz seiner Variabilität unter den Subtypen ein durchaus interessantes Ziel für einen neutralisierenden Antikörper, solange die Struktur des Loops zwischen den Subtypen konserviert ist. Eine Vermutung hinsichtlich dieser strukturellen Konservierung wurde bereits publiziert.^{266,312} Die Tatsache, dass die selektierten Mimotope teilweise eine Neutralisationskapazität gegen Subtyp C aufweisen, lässt vermuten, dass diese Antikörper aufgrund der Poolimmunisierung nicht unbedingt sequenzspezifisch sind, sondern vielmehr die Struktur des V3-Loops erkennen und binden. Die Antikörperspezifität gegen den V3-Loop wird breiter durch eine häufigere Anigenstimulation.³¹² Dieser Effekt könnte ebenso durch den immunisierten Phagenpool mit ähnlichen, aber nicht identischen Sequenzen, erzeugt werden.

Enttäuschend hingegen fiel die Immunisierung mit den bekannten KLIC-Motiven aus gp41 aus. Keine der Mäuse (Nr. 2 und 3) bildete neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 (siehe 3.5, Abb. 3.14). Ähnliche Mimotope, identifiziert durch die Analyse HIV-positiver Seren, wurden bereits für eine Immunisierung in Mäusen verwendet²⁴⁶, schützten vor einer Infektion mit den HIV-1 Isolaten IIIB, NL4-3 und AD8 (primäres Virus) und führten in Affen - in Kombination mit anderen Mimotopen - zu einer verzögerten Progression⁵⁴. Generell stellt das KLIC-Motiv eine sehr immunogene Region dar, trotzdem wurde bisher nur ein breit neutralisierender Antikörper, der dieses Motiv als Epitop erkennt, identifiziert.^{67,312} Neben dem KLIC-Motiv wurde in der Selektion ebenso ein WxxxW-Motiv identifiziert. Dieses Motiv hat, wie im Ergebnisteil bereits erwähnt (siehe 3.2.6, Tabelle 3.10 und 3.2.8), eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Epitop des breit neutralisierenden mAk 2F5. Die Mäuseseren, die mit diesen Motiven immunisiert wurden (Nr. 9, 10 und 12), zeigen ebenfalls Neutralisationskapazität gegen D117III (siehe 3.5, Abb. 3.16), JR-CSF (siehe 3.5, Abb. 3.17) und MH08 als primäres Virus (siehe 3.5, Abb. 3.18). Dennoch bleibt die breite Wirksamkeit dieser Epitope nach Veröffentlichung einer interessanten Studie, nach der

der 2F5 Antikörper autoreaktiv mit dem Phospholipid Cardiolipin ist, fraglich.¹¹⁷ In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass viele Versuche, das 2F5-Epitop als Immunogen zu nutzen, fehlgeschlagen sind (siehe 1.4.6 und 1.4.7). Diese aktuelle Entdeckung lässt vermuten, dass die durch das Immunsystem verhinderte Ausbildung autoreaktiver Antikörper, der Grund für das Ausbleiben einer potenten Immunantwort gegen dieses Epitop sein könnte.

Die restlichen Phagengruppen, die für eine Immunisierung verwendet wurden, stellten durch das 3DEX Programm identifizierte konformelle Epitope dar. Die Mäuse 13-24 wurden mit Phagotopen immunisiert, die in der CD4bs liegen (Gruppe 4), aus gemischten Motiven bestehen (Gruppe 5) oder unbekannte, aber of selektierte Motive enthalten (Gruppe 6). Einige Mäuseseren dieser Gruppen entwickelten neutralisierende Antikörper und konnten eine Infektion *in vitro* mit den HIV-1 Isolaten D117III (siehe 3.5, Abb. 3.16), JR-CSF (siehe 3.5, Abb. 3.17) und MH08 (siehe 3.5, Abb. 3.18) inhibieren, wenn auch nicht in dem Ausmaß wie die V3-immunisierten Mäuseseren (siehe 3.5, Abb. 3.15).

Die Immunisierung der Phagen in Gruppen führte hier schließlich zum Erfolg in der Studie. Zu vermuten ist, dass durch diese ähnlichen, aber nicht identischen Motive, einer Art „überlappende“ Immunantwort ausgelöst wird, die kooperativ wirkt und ein breites Spektrum an Antikörpern induziert, die gemeinsame Determinanten besitzen aber dennoch nicht nur ein einzelnes Epitop erkennen. Zu bemerken ist, dass für die Phagenimmunisierung kein Adjuvant verwendet wurde, da der Phage selbst als Adjuvant fungiert, die Immunantwort in Mäusen gegen M13 T-Zell abhängig ist und daher die Verwendung einer solchen immunstimulierenden Substanz nicht nötig ist.^{12,205} Trotzdem ist es wichtig zu erwähnen, dass die erreichten Antikörpertiter der Mäuse gegen HIV-1 in der Studie sehr niedrig waren. In allen *in vitro* Neutralisationsversuchen musste eine hohe Serumkonzentration für die erfolgreiche Neutralisation verwendet werden. Um dennoch eine spezifische Reaktion zu identifizieren, wurden alle Versuche auf eine geeignete Kontrolle berechnet, damit serumspezifische Effekte nicht ins Gewicht fallen.

Die Ergebnisse dieser oralen und i.p. durchgeführten Immunisierungsstudie zeigen, dass es in der Tat möglich ist, aus polyklonalen Patientenseren HIV-spezifische Mimotope zu isolieren, die eine neutralisierende Immunantwort gegen HIV-1 in Mäusen auslösen. Diese müssen zudem nicht unbedingt linearer Natur sein, sondern können durch die Verwendung von 3DEX ebenso als konformelles Epitop identifiziert werden.

4.5.2 Studie 2005

Für die zweite Studie im Jahr 2005 wurde, um den Titer an spezifischen Antikörpern zu erhöhen, zusätzlich ein Adjuvant verwendet. Die Immunisierungsstudie mit insgesamt 10 Phagengruppen, sowie zwei Kontrollgruppen wurde zunächst mit i.p.-Injektionen begonnen. Aufgrund der auftretenden hohen Sterblichkeitsrate der immunisierten Mäuse wurde die überlebenden Tiere ab dem ersten Boost subkutan (s.c) gespritzt. Der erste Boost wurde drei Wochen nach der ersten Immunisierung durchgeführt, jeder weitere Boost im Abstand von zwei (Mäuse sc.1 bis sc.4) bzw. einer (Mäuse sc.5 bis sc.9) Woche. Alle Tiere bekamen insgesamt fünf Im-

munisierungen mit jeweils $8 \cdot 10^{12}$ Phagen in 50 μ l isotoner NaCl-Lösung, vor der Injektion vermischt mit 50 μ l Adjuvant. Aufgrund der hohen Sterblichkeitsrate konnten nicht mehr alle Phagengruppen untersucht werden. Es standen für die Analyse lediglich die Mäuse, immunisiert mit den Phagengruppen 9 (sc.1 bis sc.4), 4 (Maus sc.5), 5 (Mäuse sc.6 bis sc.8) und 6 (Maus sc.9), zur Verfügung. Der Grund für die Unverträglichkeit der Immunisierung konnte leider nicht geklärt werden. Da bereits frühere Immunisierungen i.p. durchgeführt wurden, ist ein Problem mit dem Injektionsweg eher auszuschließen. Möglich wäre die Verunreinigung der Phagenpräparationen mit Endotoxinen.

Die verwendeten Phagengruppen zeigten bereits im Phagen-ELISA teilweise eine Kreuzreaktivität mit den nicht zur Selektion verwendeten Patientenseren (siehe 3.6, Abb. 3.18). In dieser Hinsicht sind gerade die Gruppen 3, 6 und 9 interessant. Vor allem auch, weil die Phagenklone der Gruppen 6 und 9 Mimotope beinhalten, die durch 3DEX als konformelle Epitope auf gp120 prognostiziert wurden. Glücklicherweise konnten einige Mäuse der Gruppen 6 und 9 (sc.1-sc.4, sc.9) bis zum Ende der Studie s.c. immunisiert werden und standen für eine anschließende Analyse zur Verfügung. Ebenso noch vier Mäuse aus der gp41-Gruppe (sc.5, sc.6-sc.8).

Die Überprüfung der Immunantwort im Western Blot zeigte zum einen, dass die Verwendung des Adjuvant einen sehr großen Effekt auf die Immunantwort ausübt, zum anderen, dass die Mäuse teilweise eine sehr gute Immunantwort gegen p8, aber auch gegen p3 mit dem fusionierten Peptid besitzen. Der erhöhte Antikörpertiter durch die Verwendung des Adjuvant ist anhand der sehr ausgeprägten Banden gegen p8 und p3 zu erkennen, während die Mäuse ohne Adjuvant so gut wie keine Reaktion mit den Phagenproteinen aufweisen (siehe 3.7, Abb. 3.19). Die einzelnen Analysen der Immunantwort der subkutan immunisierten Mäuse zeigt, dass fünf Mäuse eine gute Immunantwort gegen p3 besitzen, während vier Mäuse schwache Banden oder kaum Antikörper aufweisen.

Die Neutralisationsaktivität der Mäuseseren war sehr unterschiedlich. Gegen das getestete Virusolat D117III konnte lediglich bei den beiden Mäuseseren sc.5 und sc.6 aus den Phagengruppen, die ein gp41-Mimotop repräsentieren (Gruppe 4 und 5), eine neutralisierende Aktivität festgestellt werden. Aus der kreuzreaktiven Gruppe 9 mit den Mäuseseren sc.1 bis sc.4 wurde keine größere Aktivität gegen HIV-1 detektiert. Das Serum der Maus sc.9, welche mit der interessanten Phagengruppe 6 immunisiert wurde, die Mimotope potentiell gegen die CD4bs repräsentiert, zeigt lediglich eine moderate Aktivität. Aufgrund der hohen Sterberate in dieser letzten Studie kann jedoch keine ausreichende Aussage über die Mimotop-Immungene getroffen werden. Eine weitere Studie mit der Analyse aller Mäuse aus jeder Gruppe ist nötig, um die wirklich interessanten Impfstoffkandidaten herauszufiltern. Die sehr gute Immunantwort der Mäuse sc.5 und sc.6 mit bisher nicht publizierten Mimotopsequenzen zeigt jedoch, dass der Ansatz Mimotope protektiver HIV-Antikörper als Immungene einzusetzen sehr viel versprechend ist.

4.6 Ausblick für die Immuntherapie gegen HIV-1

Die erfolgreiche Verwendung der Phage Display Methode zur Identifizierung von impfstoffrelevanten Mimotopen, wurde bereits mehrfach gezeigt.^{54,86,179,228,246} Nach wie vor stellt die Generierung eines HIV-1 Impfstoffes das wichtigste Ziel im Kampf gegen die weltweit vorherrschende Krankheit AIDS dar, gerade da die Infektionszahlen auch in der westlichen Welt wieder ansteigen. Nach jahrelanger Beschränkung auf die Untersuchung der zellvermittelten Immunantwort ist die humorale Immunantwort wieder mehr in den Mittelpunkt der Forschung gerückt.^{37,183} Die Identifizierung konservierter Epitope auf dem HIV-1 Hüllproteine gilt als viel versprechender Ansatz zur Induktion protektiver Antikörper, die eine HIV-1 Infektion verhindern können.^{54,312} Der Transfer bereits bekannter neutralisierender monoklonaler Antikörper gegen HIV-1 zeigte gewisse Wirksamkeit sowohl in Affen²⁰², als auch in Menschen²⁷². Neutralisierende Antikörper könnten demnach als passive Immuntherapie verwendet werden und ihre entsprechenden Mimotope zur aktiven Immuntherapie, indem diese als Immunogen eingesetzt werden und die Entwicklung protektiver Antikörper gegen HIV-1 auslösen.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Identifizierung solcher protektiven Mimotope HIV-1 neutralisierender Antikörper aus Langzeitinfizierten mit erhöhten neutralisierenden Antikörperspiegel durch die Phage Display Methode. Die identifizierten Mimotope induzierten als Immunogene in Mäusen eine HIV-1 neutralisierende Immunantwort, die fähig war, *in vitro* eine HIV-1 Infektion teilweise zu inhibieren. Aufgrund der großen Anzahl selektierter Mimotope, konnten nicht alle interessanten Kandidaten auf ihre Fähigkeit hin, neutralisierende Antikörper zu induzieren, untersucht werden. Die Weiterführung des Projektes lässt dahingehend noch viele Möglichkeiten, weitere interessante Impfstoffkandidaten zu identifizieren. Weiterhin kann das Projekt ebenso auf eine passive Immuntherapie ausgedehnt werden. Die Aktivität der Patientenserum mit breiten Neutralisationseigenschaften lässt neben der Identifikation der dafür verantwortlichen Mimotope für Impfstoffkandidaten, ebenso die Verwendung der dafür verantwortlichen Antikörper als passive Immununterstützung zu. Die Herstellung monoklonaler Antikörper aus den Patientenzellen²⁷¹, sowie aus dem immunisierten Mäusen²¹⁸ ist viel versprechend. Ebenso die Herstellung von Antikörpern oder Antikörperfragmenten auf Phagenbanken, die anschließend wieder aufgrund ihrer Neutralisationseigenschaften selektiert werden können. Auf diese Art und Weise kann die Immunantwort auf zwei unterschiedlichen Wegen unterstützt werden - passiv und aktiv - und die isolierten Antikörper können für weitere detaillierte Studien verwendet werden, um dem Ziel eines Impfstoffes noch näher zu kommen. Die vorliegende Gruppe an langzeitinfizierten HIV-1 Patienten ist eine ideale Grundlage für weiterführende Studien zur Identifizierung des immunologischen Spektrums, welches für das stabile Immunsystem trotz HIV-Infektion verantwortlich ist. Neben der hier vorgestellten Isolierung HIV-spezifischer protektiver Antikörper epitope, stellt die Isolierung der Antikörper selbst und die Optimierung der durch die Immunisierung mit Mimotopen erzeugten Antikörpertiter das weiterführende Ziel der Studie dar.

5 Literaturverzeichnis

5.1 Referenzen

1. Aasa-Chapman, M. M., Hayman, A., Newton, P., Cornforth, D., Williams, I., Borrow, P., Balfe, P. & McKnight, A. Development of the antibody response in acute HIV-1 infection. *Aids* **18**, 371-81 (2004).
2. Adey, N. B., Mataragnon, A. H., Rider, J. E., Carter, J. M. & Kay, B. K. Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries. *Gene* **156**, 27-31. (1995).
3. Albert, J., Abrahamsson, B., Nagy, K., Aurelius, E., Gaines, H., Nystrom, G. & Fenyo, E. M. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *Aids* **4**, 107-12. (1990).
4. Al-bukhari, T. A., Tighe, P. & Todd, I. An immuno-precipitation assay for determining specific interactions between antibodies and phage selected from random peptide expression libraries. *J Immunol Methods* **264**, 163-71 (2002).
5. Alexander, L., Weiskopf, E., Greenough, T. C., Gaddis, N. C., Auerbach, M. R., Malim, M. H., O'Brien, S. J., Walker, B. D., Sullivan, J. L. & Desrosiers, R. C. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* **74**, 4361-76 (2000).
6. Amara, R. R., Smith, J. M., Staprans, S. I., Montefiori, D. C., Villinger, F., Altman, J. D., O'Neil, S. P., Kozyr, N. L., Xu, Y., Wyatt, L. S., Earl, P. L., Herndon, J. G., McNicholl, J. M., McClure, H. M., Moss, B. & Robinson, H. L. Critical role for Env as well as Gag-Pol in control of a simian-human immunodeficiency virus 89.6P challenge by a DNA prime/recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine. *J Virol* **76**, 6138-46 (2002).
7. Arendrup, M., Nielsen, C., Hansen, J. E., Pedersen, C., Mathiesen, L. & Nielsen, J. O. Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. *J Acquir Immune Defic Syndr* **5**, 303-7 (1992).
8. Ariyoshi, K., Harwood, E., Chiengsong-Popov, R. & Weber, J. Is clearance of HIV-1 viraemia at seroconversion mediated by neutralising antibodies? *Lancet* **340**, 1257-8. (1992).
9. Arold, S. T. & Baur, A. S. Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends Biochem Sci* **26**, 356-63. (2001).
10. Arthur, L. O., Bess, J. W., Jr., Sowder, R. C., 2nd, Benveniste, R. E., Mann, D. L., Chermann, J. C. & Henderson, L. E. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* **258**, 1935-8 (1992).
11. Aslanidis, C. & de Jong, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* **18**, 6069-74 (1990).
12. Azzazy, H. M. & Highsmith, W. E., Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* **35**, 425-45 (2002).
13. Barbato, G., Bianchi, E., Ingallinella, P., Hurni, W. H., Miller, M. D., Ciliberto, G., Cortese, R., Bazzo, R., Shiver, J. W. & Pessi, A. Structural analysis of the epitope of the anti-HIV antibody 2F5 sheds light into its mechanism of neutralization and HIV fusion. *J Mol Biol* **330**, 1101-15 (2003).
14. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-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* **220**, 868-71. (1983).
15. Baum, L. L., Cassutt, K. J., Knigge, K., Khattri, R., Margolick, J., Rinaldo, C., Kleeberger, C. A., Nishanian, P., Henrard, D. R. & Phair, J. HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression. *J Immunol* **157**, 2168-73 (1996).

16. Beattie, J., Shand, J. H. & Flint, D. J. An immobilised peptide array identifies antibodies to a discontinuous epitope in the extracellular domain of the bovine growth hormone receptor. *Eur J Biochem* **239**, 479-86 (1996).
17. Beck, Z. Q., Hervio, L., Dawson, P. E., Elder, J. H. & Madison, E. L. Identification of efficiently cleaved substrates for HIV-1 protease using a phage display library and use in inhibitor development. *Virology* **274**, 391-401. (2000).
18. Beirnaert, E., De Zutter, S., Janssens, W. & van der Groen, G. Potent broad cross-neutralizing sera inhibit attachment of primary HIV- 1 isolates (groups M and O) to peripheral blood mononuclear cells. *Virology* **281**, 305-14. (2001).
19. Beirnaert, E., Nyambi, P., Willems, B., Heyndrickx, L., Colebunders, R., Janssens, W. & van der Groen, G. Identification and characterization of sera from HIV-infected individuals with broad cross-neutralizing activity against group M (env clade A-H) and group O primary HIV-1 isolates. *J Med Virol* **62**, 14-24. (2000).
20. Benhar, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv* **19**, 1-33 (2001).
21. Bessette, P. H., Rice, J. J. & Daugherty, P. S. Rapid isolation of high-affinity protein binding peptides using bacterial display. *Protein Eng Des Sel* **17**, 731-9 (2004).
22. Binley, J. M., Ditzel, H. J., Barbas, C. F., 3rd, Sullivan, N., Sodroski, J., Parren, P. W. & Burton, D. R. Human antibody responses to HIV type 1 glycoprotein 41 cloned in phage display libraries suggest three major epitopes are recognized and give evidence for conserved antibody motifs in antigen binding. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**, 911-24. (1996).
23. Binley, J. M., Wrin, T., Korber, B., Zwick, M. B., Wang, M., Chappey, C., Stiegler, G., Kunert, R., Zolla-Pazner, S., Katinger, H., Petropoulos, C. J. & Burton, D. R. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* **78**, 13232-52 (2004).
24. Biorn, A. C., Cocklin, S., Madani, N., Si, Z., Ivanovic, T., Samanen, J., Van Ryk, D. I., Pantophlet, R., Burton, D. R., Freire, E., Sodroski, J. & Chaiken, I. M. Mode of action for linear peptide inhibitors of HIV-1 gp120 interactions. *Biochemistry* **43**, 1928-38 (2004).
25. Bjorling, E., von Garrelts, E., Morner, A., Ehnlund, M. & Persson, M. A. Human neutralizing human immunodeficiency virus type 2-specific Fab molecules generated by phage display. *J Gen Virol* **80**, 1987-93. (1999).
26. Blanpain, C., Vanderwinden, J. M., Cihak, J., Wittamer, V., Le Poul, E., Issafras, H., Stangassinger, M., Vassart, G., Marullo, S., Schlindorff, D., Parmentier, M. & Mack, M. Multiple active states and oligomerization of CCR5 revealed by functional properties of monoclonal antibodies. *Mol Biol Cell* **13**, 723-37 (2002).
27. Bonnycastle, L. L., Mehroke, J. S., Rashed, M., Gong, X. & Scott, J. K. Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *J Mol Biol* **258**, 747-62 (1996).
28. Bourinbaiar, A. S. The ratio of defective HIV-1 particles to replication-competent infectious virions. *Acta Virol* **38**, 59-61 (1994).
29. Bower, J. F., Yang, X., Sodroski, J. & Ross, T. M. Elicitation of neutralizing antibodies with DNA vaccines expressing soluble stabilized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers conjugated to C3d. *J Virol* **78**, 4710-9 (2004).
30. Bradney, C. P., Sempowski, G. D., Liao, H. X., Haynes, B. F. & Staats, H. F. Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization. *J Virol* **76**, 517-24 (2002).
31. Broder, C. C., Earl, P. L., Long, D., Abedon, S. T., Moss, B. & Doms, R. W. Antigenic implications of human immunodeficiency virus type 1 envelope quaternary structure: oligomer-specific and -sensitive monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11699-703 (1994).
32. Broliden, K., Hinkula, J., Devito, C., Kiama, P., Kimani, J., Trabattoni, D., Bwayo, J. J., Clerici, M., Plummer, F. & Kaul, R. Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed, persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol Lett* **79**, 29-36 (2001).
33. Brown, L., Souberbielle, B. E., Marriott, J. B., Westby, M., Desselberger, U., Kaye, T., Gougeon, M. L. & Dalgleish, A. The conserved carboxy terminal region of HIV-1 gp120 is recognized by seronegative HIV-exposed people. *Aids* **13**, 2515-21. (1999).

34. Buchacz, K., Parekh, B. S., Padian, N. S., van der Straten, A., Phillips, S., Jonte, J. & Holmberg, S. D. HIV-specific IgG in cervicovaginal secretions of exposed HIV-uninfected female sexual partners of HIV-infected men. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 1689-93. (2001).
35. Buchwald, U. K., Lees, A., Steinitz, M. & Pirofski, L. A. A peptide mimotope of type 8 pneumococcal capsular polysaccharide induces a protective immune response in mice. *Infect Immun* **73**, 325-33 (2005).
36. Burgoon, M. P., Owens, G. P., Carlson, S., Maybach, A. L. & Gilden, D. H. Antigen discovery in chronic human inflammatory central nervous system disease: panning phage-displayed antigen libraries identifies the targets of central nervous system-derived IgG in subacute sclerosing panencephalitis. *J Immunol* **167**, 6009-14. (2001).
37. Burton, D. R. Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol* **2**, 706-13 (2002).
38. Burton, D. R. A vaccine for HIV type 1: the antibody perspective. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10018-23. (1997).
39. Burton, D. R., Desrosiers, R. C., Doms, R. W., Koff, W. C., Kwong, P. D., Moore, J. P., Nabel, G. J., Sodroski, J., Wilson, I. A. & Wyatt, R. T. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* **5**, 233-6 (2004).
40. Burton, D. R. & Montefiori, D. C. The antibody response in HIV-1 infection. *Aids* **11**, S87-98. (1997).
41. Burton, D. R. & Parren, P. W. Vaccines and the induction of functional antibodies: time to look beyond the molecules of natural infection? *Nat Med* **6**, 123-5 (2000).
42. Burton, D. R., Pyati, J., Koduri, R., Sharp, S. J., Thornton, G. B., Parren, P. W., Sawyer, L. S., Hendry, R. M., Dunlop, N., Nara, P. L. & et al. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* **266**, 1024-7 (1994).
43. Burton, D. R., Williamson, R. A. & Parren, P. W. Antibody and virus: binding and neutralization. *Virology* **270**, 1-3 (2000).
44. Calarese, D. A., Scanlan, C. N., Zwick, M. B., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert, R., Zhu, P., Wormald, M. R., Stanfield, R. L., Roux, K. H., Kelly, J. W., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Katinger, H., Burton, D. R. & Wilson, I. A. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* **300**, 2065-71 (2003).
45. Candotti, D., Costagliola, D., Joberty, C., Bonduelle, O., Rouzioux, C., Autran, B. & Agut, H. Status of long-term asymptomatic HIV-1 infection correlates with viral load but not with virus replication properties and cell tropism. French ALT Study Group. *J Med Virol* **58**, 256-63. (1999).
46. Cavacini, L. A., Duval, M., Robinson, J. & Posner, M. R. Interactions of human antibodies, epitope exposure, antibody binding and neutralization of primary isolate HIV-1 virions. *Aids* **16**, 2409-17 (2002).
47. Cavacini, L. A., Kuhrt, D., Duval, M., Mayer, K. & Posner, M. R. Binding and neutralization activity of human IgG1 and IgG3 from serum of HIV-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**, 785-92 (2003).
48. Cavacini, L. A., Peterson, J. E., Nappi, E., Duval, M., Goldstein, R., Mayer, K. & Posner, M. R. Minimal incidence of serum antibodies reactive with intact primary isolate virions in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **73**, 9638-41. (1999).
49. Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P. S. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-73. (1997).
50. Chan, D. C. & Kim, P. S. HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-4. (1998).
51. Check, E. AIDS vaccines: back to 'plan A'. *Nature* **423**, 912-4 (2003).
52. Chen, B., Vogan, E. M., Gong, H., Skehel, J. J., Wiley, D. C. & Harrison, S. C. Determining the structure of an unliganded and fully glycosylated SIV gp120 envelope glycoprotein. *Structure (Camb)* **13**, 197-211 (2005).
53. Chen, B., Vogan, E. M., Gong, H., Skehel, J. J., Wiley, D. C. & Harrison, S. C. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* **433**, 834-41 (2005).
54. Chen, X., Scala, G., Quinto, I., Liu, W., Chun, T. W., Justement, J. S., Cohen, O. J., vanCott, T. C., Iwanicki, M., Lewis, M. G., Greenhouse, J., Barry, T., Venzon, D. & Fauci, A. S. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic

- SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes. *Nat Med* **7**, 1225-31. (2001).
55. Chen, Y. H., Xiao, Y., Yu, T. & Dierich, M. P. Epitope vaccine: a new strategy against HIV-1. *Immunol Today* **20**, 588-9 (1999).
 56. Chertova, E., Bess Jr, J. W., Jr., Crise, B. J., Sowder, I. R., Schaden, T. M., Hilburn, J. M., Hoxie, J. A., Benveniste, R. E., Lifson, J. D., Henderson, L. E. & Arthur, L. O. Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* **76**, 5315-25 (2002).
 57. Chinen, J. & Shearer, W. T. Molecular virology and immunology of HIV infection. *J Allergy Clin Immunol* **110**, 189-98 (2002).
 58. Chun, T. W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J. A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T. C., Kuo, Y. H., Brookmeyer, R., Zeiger, M. A., Barditch-Crovo, P. & Siliciano, R. F. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183-8. (1997).
 59. Clegg, A. O., Ashton, L. J., Biti, R. A., Badhwar, P., Williamson, P., Kaldor, J. M. & Stewart, G. J. CCR5 promoter polymorphisms, CCR5 59029A and CCR5 59353C, are under represented in HIV-1-infected long-term non-progressors. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *Aids* **14**, 103-8. (2000).
 60. Coeffier, E., Clement, J. M., Cussac, V., Khodaei-Boorane, N., Jehanno, M., Rojas, M., Dridi, A., Latour, M., El Habib, R., Barre-Sinoussi, F., Hofnung, M. & Leclerc, C. Antigenicity and immunogenicity of the HIV-1 gp41 epitope ELDKWA inserted into permissive sites of the MalE protein. *Vaccine* **19**, 684-93 (2000).
 61. Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. & et al. Human immunodeficiency viruses. *Science* **232**, 697. (1986).
 62. Cohen, J. HIV. Escape artist par excellence. *Science* **299**, 1505-8 (2003).
 63. Cole, K. S., Rowles, J. L., Jagerski, B. A., Murphey-Corb, M., Unangst, T., Clements, J. E., Robinson, J., Wyand, M. S., Desrosiers, R. C. & Montelaro, R. C. Evolution of envelope-specific antibody responses in monkeys experimentally infected or immunized with simian immunodeficiency virus and its association with the development of protective immunity. *J Virol* **71**, 5069-79. (1997).
 64. Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S. & Landau, N. R. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* **185**, 621-8. (1997).
 65. Cormier, E. G., Tran, D. N., Yukhayeva, L., Olson, W. C. & Dragic, T. Mapping the determinants of the CCR5 amino-terminal sulfopeptide interaction with soluble human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 complexes. *J Virol* **75**, 5541-9. (2001).
 66. Cortese, R., Felici, F., Galfre, G., Luzzago, A., Monaci, P. & Nicosia, A. Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage. *Trends Biotechnol* **12**, 262-7. (1994).
 67. Cotropia, J., Ugen, K. E., Kliks, S., Broliden, K., Broliden, P. A., Hoxie, J. A., Srikantan, V., Williams, W. V. & Weiner, D. B. A human monoclonal antibody to HIV-1 gp41 with neutralizing activity against diverse laboratory isolates. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **12**, 221-32. (1996).
 68. Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barrett, R. W. & Dower, W. J. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6378-82. (1990).
 69. Daniels, D. A. & Lane, D. P. Phage Peptide Libraries. *Methods* **9**, 494-507. (1996).
 70. De Berardinis, P., Sartorius, R., Fanutti, C., Perham, R. N., Del Pozzo, G. & Guardiola, J. Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nat Biotechnol* **18**, 873-6. (2000).
 71. de la Cruz, V. F., Lal, A. A. & McCutchan, T. F. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J Biol Chem* **263**, 4318-22 (1988).
 72. Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., McPhee, D. A., Greenway, A. L., Ellett, A., Chatfield, C. & et al. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**, 988-91. (1995).
 73. Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G. A., Smith, M. W., Allikmets, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S. P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kas-

- low, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R. & O'Brien, S. J. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* **273**, 1856-62. (1996).
74. Deroo, S. & Muller, C. P. Antigenic and immunogenic phage displayed mimotopes as substitute antigens: applications and limitations. *Comb Chem High Throughput Screen* **4**, 75-110 (2001).
 75. di Marzo Veronese, F., Willis, A. E., Boyer-Thompson, C., Appella, E. & Perham, R. N. Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V3 loop of HIV-1 gp120. *J Mol Biol* **243**, 167-72 (1994).
 76. Dieckman, L., Gu, M., Stols, L., Donnelly, M. I. & Collart, F. R. High throughput methods for gene cloning and expression. *Protein Expr Purif* **25**, 1-7 (2002).
 77. Ditzel, H. J., Parren, P. W., Binley, J. M., Sodroski, J., Moore, J. P., Barbas, C. F., 3rd & Burton, D. R. Mapping the protein surface of human immunodeficiency virus type 1 gp120 using human monoclonal antibodies from phage display libraries. *J Mol Biol* **267**, 684-95. (1997).
 78. Doms, R. W. & Trono, D. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev* **14**, 2677-88. (2000).
 79. Dong, M., Zhang, P. F., Grieder, F., Lee, J., Krishnamurthy, G., VanCott, T., Broder, C., Polonis, V. R., Yu, X. F., Shao, Y., Faix, D., Valente, P. & Quinnan, G. V., Jr. Induction of primary virus-cross-reactive human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibodies in small animals by using an alphavirus-derived in vivo expression system. *J Virol* **77**, 3119-30 (2003).
 80. Dong, X. N., Xiao, Y. & Chen, Y. H. ELNKWA-epitope specific antibodies induced by epitope-vaccine recognize ELDKWA- and other two neutralizing-resistant mutated epitopes on HIV-1 gp41. *Immunol Lett* **75**, 149-52 (2001).
 81. Dorgham, K., Dogan, I., Bitton, N., Parizot, C., Cardona, V., Debre, P., Hartley, O. & Gorochov, G. Immunogenicity of HIV type 1 gp120 CD4 binding site phage mimotopes. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 82-92 (2005).
 82. Earl, P. L., Broder, C. C., Doms, R. W. & Moss, B. Epitope map of human immunodeficiency virus type 1 gp41 derived from 47 monoclonal antibodies produced by immunization with oligomeric envelope protein. *J Virol* **71**, 2674-84. (1997).
 83. Eckert, D. M. & Kim, P. S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* **70**, 777-810 (2001).
 84. Emini, E. A., Schleif, W. A., Nunberg, J. H., Conley, A. J., Eda, Y., Tokiyoshi, S., Putney, S. D., Matsushita, S., Cobb, K. E., Jett, C. M. & et al. Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature* **355**, 728-30. (1992).
 85. Enshell-Seijffers, D., Denisov, D., Groisman, B., Smelyanski, L., Meyuhass, R., Gross, G., Denisova, G. & Gershoni, J. M. The mapping and reconstitution of a conformational discontinuous B-cell epitope of HIV-1. *J Mol Biol* **334**, 87-101 (2003).
 86. Enshell-Seijffers, D., Smelyanski, L., Vardinon, N., Yust, I. & Gershoni, J. M. Dissection of the humoral immune response toward an immunodominant epitope of HIV: a model for the analysis of antibody diversity in HIV+ individuals. *Faseb J* **15**, 2112-20. (2001).
 87. Eugen-Olsen, J., Iversen, A. K., Garred, P., Koppelhus, U., Pedersen, C., Benfield, T. L., Sorensen, A. M., Katzenstein, T., Dickmeiss, E., Gerstoft, J., Skinhoj, P., Svejgaard, A., Nielsen, J. O. & Hofmann, B. Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *Aids* **11**, 305-10. (1997).
 88. Evans, D. J., McKeating, J., Meredith, J. M., Burke, K. L., Katrak, K., John, A., Ferguson, M., Minor, P. D., Weiss, R. A. & Almond, J. W. An engineered poliovirus chimaera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Nature* **339**, 385-8, 340. (1989).
 89. Felici, F., Galfre, G., Luzzago, A., Monaci, P., Nicosia, A. & Cortese, R. Phage-displayed peptides as tools for characterization of human sera. *Methods Enzymol* **267**, 116-29 (1996).
 90. Ferrer, M. & Harrison, S. C. Peptide ligands to human immunodeficiency virus type 1 gp120 identified from phage display libraries. *J Virol* **73**, 5795-802. (1999).
 91. Finzi, D. & Silliciano, R. F. Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell* **93**, 665-71. (1998).

92. Folgori, A., Tafi, R., Meola, A., Felici, F., Galfre, G., Cortese, R., Monaci, P. & Nicosia, A. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *Embo J* **13**, 2236-43. (1994).
93. Fouts, T. R., Binley, J. M., Trkola, A., Robinson, J. E. & Moore, J. P. Neutralization of the human immunodeficiency virus type 1 primary isolate JR-FL by human monoclonal antibodies correlates with antibody binding to the oligomeric form of the envelope glycoprotein complex. *J Virol* **71**, 2779-85 (1997).
94. Frankel, A. D. & Young, J. A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**, 1-25 (1998).
95. Galfre, G., Monaci, P., Nicosia, A., Luzzago, A., Felici, F. & Cortese, R. Immunization with phage-displayed mimotopes. *Methods Enzymol* **267**, 109-15 (1996).
96. Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., 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* **224**, 500-3. (1984).
97. Gaschen, B., Taylor, J., Yusim, K., Foley, B., Gao, F., Lang, D., Novitsky, V., Haynes, B., Hahn, B. H., Bhattacharya, T. & Korber, B. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science* **296**, 2354-60 (2002).
98. Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G. & van Kooyk, Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587-97 (2000).
99. Geyer, M., Fackler, O. T. & Peterlin, B. M. Structure-function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep* **2**, 580-5. (2001).
100. Geysen, H. M., Rodda, S. J. & Mason, T. J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol Immunol* **23**, 709-15 (1986).
101. Giebel, L. B., Cass, R. T., Milligan, D. L., Young, D. C., Arze, R. & Johnson, C. R. Screening of cyclic peptide phage libraries identifies ligands that bind streptavidin with high affinities. *Biochemistry* **34**, 15430-5 (1995).
102. Giordano, R. J., Cardo-Vila, M., Lahdenranta, J., Pasqualini, R. & Arap, W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med* **7**, 1249-53. (2001).
103. Girard, M., Kieny, M. P., Pinter, A., Barre-Sinoussi, F., Nara, P., Kolbe, H., Kusumi, K., Chaput, A., Reinhart, T., Muchmore, E. & et al. Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 542-6. (1991).
104. Goldstein, G., Tribbick, G. & Manson, K. Two B cell epitopes of HIV-1 Tat protein have limited antigenic polymorphism in geographically diverse HIV-1 strains. *Vaccine* **19**, 1738-46 (2001).
105. Gomez-Roman, V. R., Cao, C., Bai, Y., Santamaria, H., Acero, G., Manoutcharian, K., Weiner, D. B., Ugen, K. E. & Gevorkian, G. Phage-displayed mimotopes recognizing a biologically active anti-HIV-1 gp120 murine monoclonal antibody. *J Acquir Immune Defic Syndr* **31**, 147-53 (2002).
106. Gorny, M. K., Revesz, K., Williams, C., Volsky, B., Louder, M. K., Anyangwe, C. A., Krachmarov, C., Kayman, S. C., Pinter, A., Nadas, A., Nyambi, P. N., Mascola, J. R. & Zolla-Pazner, S. The v3 loop is accessible on the surface of most human immunodeficiency virus type 1 primary isolates and serves as a neutralization epitope. *J Virol* **78**, 2394-404 (2004).
107. Gorny, M. K., Williams, C., Volsky, B., Revesz, K., Cohen, S., Polonis, V. R., Honnen, W. J., Kayman, S. C., Krachmarov, C., Pinter, A. & Zolla-Pazner, S. Human monoclonal antibodies specific for conformation-sensitive epitopes of V3 neutralize human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from various clades. *J Virol* **76**, 9035-45 (2002).
108. Gorry, P. R., Zhang, C., Wu, S., Kunstman, K., Trachtenberg, E., Phair, J., Wolinsky, S. & Gabuzda, D. Persistence of dual-tropic HIV-1 in an individual homozygous for the CCR5 Delta 32 allele. *Lancet* **359**, 1832-4. (2002).
109. Greene, W. C. & Peterlin, B. M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* **8**, 673-80 (2002).
110. Groopman, J. E., Benz, P. M., Ferriani, R., Mayer, K., Allan, J. D. & Weymouth, L. A. Characterization of serum neutralization response to the human immunodeficiency virus (HIV). *AIDS Res Hum Retroviruses* **3**, 71-85 (1987).

111. Haigwood, N. L. & Zolla-Pazner, S. Humoral immunity to HIV, SIV, and SHIV. *Aids* **12**, S121-32. (1998).
112. Han, Z., Karatan, E., Scholle, M. D., McCafferty, J. & Kay, B. K. Accelerated screening of phage-display output with alkaline phosphatase fusions. *Comb Chem High Throughput Screen* **7**, 55-62 (2004).
113. Hansen, J. E., Lund, O., Nielsen, J. O. & Brunak, S. Prediction of the secondary structure of HIV-1 gp120. *Proteins* **25**, 1-11. (1996).
114. Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S. A., Barbosa, P., Trocha, A., Johnson, R. P., Elbeik, T., Feinberg, M. B., Buchbinder, S. P. & Walker, B. D. Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load. *J Immunol* **156**, 2616-23 (1996).
115. Hart, T. K., Klinkner, A. M., Ventre, J. & Bugelski, P. J. Morphometric analysis of envelope glycoprotein gp120 distribution on HIV-1 virions. *J Histochem Cytochem* **41**, 265-71 (1993).
116. Hartley, O., Dorgham, K., Perez-Bercoff, D., Cerini, F., Heimann, A., Gaertner, H., Oford, R. E., Pancino, G., Debre, P. & Gorochov, G. Human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors selected on living cells from a library of phage chemokines. *J Virol* **77**, 6637-44 (2003).
117. Haynes, B. F., Fleming, J., St Clair, E. W., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R., Robinson, J., Scarce, R. M., Plonk, K., Staats, H. F., Ortel, T. L., Liao, H. X. & Alam, S. M. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* **308**, 1906-8 (2005).
118. Haynes, B. F., Pantaleo, G. & Fauci, A. S. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science* **271**, 324-8. (1996).
119. He, Y., D'Agostino, P. & Pinter, A. Analysis of the immunogenic properties of a single-chain polypeptide analogue of the HIV-1 gp120-CD4 complex in transgenic mice that produce human immunoglobulins. *Vaccine* **21**, 4421-9 (2003).
120. He, Y., Honnen, W. J., Krachmarov, C. P., Burkhart, M., Kayman, S. C., Corvalan, J. & Pinter, A. Efficient isolation of novel human monoclonal antibodies with neutralizing activity against HIV-1 from transgenic mice expressing human Ig loci. *J Immunol* **169**, 595-605. (2002).
121. Herrera, C., Spenlehauer, C., Fung, M. S., Burton, D. R., Beddows, S. & Moore, J. P. Nonneutralizing antibodies to the CD4-binding site on the gp120 subunit of human immunodeficiency virus type 1 do not interfere with the activity of a neutralizing antibody against the same site. *J Virol* **77**, 1084-91 (2003).
122. Hewer, R. & Meyer, D. Peptide immunogens based on the envelope region of HIV-1 are recognized by HIV/AIDS patient polyclonal antibodies and induce strong humoral immune responses in mice and rabbits. *Mol Immunol* **40**, 327-35 (2003).
123. Hiipakka, M., Poikonen, K. & Saksela, K. SH3 domains with high affinity and engineered ligand specificities targeted to HIV-1 Nef. *J Mol Biol* **293**, 1097-106. (1999).
124. Ho, D. D. Viral counts count in HIV infection. *Science* **272**, 1124-5. (1996).
125. Ho, D. D., Sarngadharan, M. G., Hirsch, M. S., Schooley, R. T., Rota, T. R., Kennedy, R. C., Chanh, T. C. & Sato, V. L. Human immunodeficiency virus neutralizing antibodies recognize several conserved domains on the envelope glycoproteins. *J Virol* **61**, 2024-8 (1987).
126. Hoess, R. H. Protein design and phage display. *Chem Rev* **101**, 3205-18. (2001).
127. Horal, P., Svennerholm, B., Jeansson, S., Rymo, L., Hall, W. W. & Vahlne, A. Continuous epitopes of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates. *J Virol* **65**, 2718-23. (1991).
128. Hou, Y. & Gu, X. X. Development of peptide mimotopes of lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* as vaccine candidates. *J Immunol* **170**, 4373-9 (2003).
129. Humbert, M. *Bestimmung von Mimotopen HIV spezifischer Antikörper aus neutralisierenden Patientenseren durch Phage Display*. Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main (2001)

130. Humbert, M., Schreiber, A., Benz, A. & Dietrich, U. 3D-Epitope-Explorer (3DEX): Localization of conformational epitopes within three-dimensional structures of proteins. *J Comput Chem* **26**, 879-887 (2005).
131. Hust, M. & Dubel, S. Mating antibody phage display with proteomics. *Trends Biotechnol* **22**, 8-14 (2004).
132. James, L. C., Roversi, P. & Tawfik, D. S. Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science* **299**, 1362-7 (2003).
133. Jardetzky, T. HIV: conformational camouflage. *Nature* **420**, 623-4 (2002).
134. Johnson, W. E. & Desrosiers, R. C. Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu Rev Med* **53**, 499-518 (2002).
135. Johnson, W. E., Lifson, J. D., Lang, S. M., Johnson, R. P. & Desrosiers, R. C. Importance of B-cell responses for immunological control of variant strains of simian immunodeficiency virus. *J Virol* **77**, 375-81 (2003).
136. Jordan, A., Defechereux, P. & Verdin, E. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *Embo J* **20**, 1726-38 (2001).
137. Kay, B. K., Kasanov, J. & Yamabhai, M. Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods* **24**, 240-6. (2001).
138. Keller, P. M., Arnold, B. A., Shaw, A. R., Tolman, R. L., Van Middlesworth, F., Bondy, S., Rusiecki, V. K., Koenig, S., Zolla-Pazner, S., Conard, P. & et al. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. *Virology* **193**, 709-16. (1993).
139. Koch, M., Pancera, M., Kwong, P. D., Kolchinsky, P., Grundner, C., Wang, L., Hendrickson, W. A., Sodroski, J. & Wyatt, R. Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology* **313**, 387-400 (2003).
140. Koefoed, K., Farnaes, L., Wang, M., Svejgaard, A., Burton, D. R. & Ditzel, H. J. Molecular characterization of the circulating anti-HIV-1 gp120-specific B cell repertoire using antibody phage display libraries generated from pre-selected HIV-1 gp120 binding PBLs. *J Immunol Methods* **297**, 187-201 (2005).
141. Königs, C., Rowley, M. J., Thompson, P., Myers, M. A., Scealy, M., Davies, J. M., Wu, L., Dietrich, U., Mackay, C. R. & Mackay, I. R. Monoclonal antibody screening of a phage-displayed random peptide library reveals mimotopes of chemokine receptor CCR5: implications for the tertiary structure of the receptor and for an N-terminal binding site for HIV-1 gp120. *Eur J Immunol* **30**, 1162-71. (2000).
142. Kostrikis, L. G., Cao, Y., Ngai, H., Moore, J. P. & Ho, D. D. Quantitative analysis of serum neutralization of human immunodeficiency virus type 1 from subtypes A, B, C, D, E, F, and I: lack of direct correlation between neutralization serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum-dependent infectivity enhancement. *J Virol* **70**, 445-58 (1996).
143. Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C. & Ho, D. D. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* **68**, 4650-5. (1994).
144. Krachmarov, C., Pinter, A., Honnen, W. J., Gorny, M. K., Nyambi, P. N., Zolla-Pazner, S. & Kayman, S. C. Antibodies that are cross-reactive for human immunodeficiency virus type 1 clade A and clade B v3 domains are common in patient sera from Cameroon, but their neutralization activity is usually restricted by epitope masking. *J Virol* **79**, 780-90 (2005).
145. Krykbaev, R., McKeating, J. & Jones, I. Mutant CD4 molecules with improved binding to HIV envelope protein gp120 selected by phage display. *Virology* **234**, 196-202. (1997).
146. Kulkarni, P. S., Butera, S. T. & Duerr, A. C. Resistance to HIV-1 infection: lessons learned from studies of highly exposed persistently seronegative (HEPS) individuals. *AIDS Rev* **5**, 87-103 (2003).
147. Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A. & Littman, D. R. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* **16**, 135-44 (2002).
148. Kwong, P. D. Human immunodeficiency virus: refolding the envelope. *Nature* **433**, 815-6 (2005).

149. Kwong, P. D., Doyle, M. L., Casper, D. J., Cicala, C., Leavitt, S. A., Majeed, S., Steenbeke, T. D., Venturi, M., Chaiken, I., Fung, M., Katinger, H., Parren, P. W., Robinson, J., Van Ryk, D., Wang, L., Burton, D. R., Freire, E., Wyatt, R., Sodroski, J., Hendrickson, W. A. & Arthos, J. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**, 678-82 (2002).
150. Kwong, P. D., Wyatt, R., Majeed, S., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. & Hendrickson, W. A. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure Fold Des* **8**, 1329-39. (2000).
151. Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. & Hendrickson, W. A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648-59. (1998).
152. Kwong, P. D., Wyatt, R., Sattentau, Q. J., Sodroski, J. & Hendrickson, W. A. Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol* **74**, 1961-72 (2000).
153. Labrijn, A. F., Poignard, P., Raja, A., Zwick, M. B., Delgado, K., Franti, M., Binley, J., Vivona, V., Grundner, C., Huang, C. C., Venturi, M., Petropoulos, C. J., Wrin, T., Dimitrov, D. S., Robinson, J., Kwong, P. D., Wyatt, R. T., Sodroski, J. & Burton, D. R. Access of antibody molecules to the conserved coreceptor binding site on glycoprotein gp120 is sterically restricted on primary human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**, 10557-65 (2003).
154. Lang, S., Xu, J., Stuart, F., Thomas, R. M., Vrijbloed, J. W. & Robinson, J. A. Analysis of antibody A6 binding to the extracellular interferon gamma receptor alpha-chain by alanine-scanning mutagenesis and random mutagenesis with phage display. *Biochemistry* **39**, 15674-85 (2000).
155. Layne, S. P., Merges, M. J., Dembo, M., Spouge, J. L., Conley, S. R., Moore, J. P., Raina, J. L., Renz, H., Gelderblom, H. R. & Nara, P. L. Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology* **189**, 695-714 (1992).
156. Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N. & Gregory, T. J. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **265**, 10373-82. (1990).
157. Levy, J. A. *HIV and the pathogenesis of AIDS* (ASM Press, Washington, D.C., 1998).
158. Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M. & Oshiro, L. S. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**, 840-2. (1984).
159. Lewis, A. D., Chen, R., Montefiori, D. C., Johnson, P. R. & Clark, K. R. Generation of neutralizing activity against human immunodeficiency virus type 1 in serum by antibody gene transfer. *J Virol* **76**, 8769-75 (2002).
160. Llorente, M., Sanchez-Palomino, S., Manes, S., Lucas, P., Kremer, L., De Alboran, I. M., Toran, J. L., Alcami, J., Del Real, G. & Martinez, A. C. Natural human antibodies retrieved by phage display libraries from healthy donors: polyreactivity and recognition of human immunodeficiency virus type 1gp120 epitopes. *Scand J Immunol* **50**, 270-9. (1999).
161. Loomis-Price, L. D., Cox, J. H., Mascola, J. R., VanCott, T. C., Michael, N. L., Fouts, T. R., Redfield, R. R., Robb, M. L., Wahren, B., Sheppard, H. W. & Birx, D. L. Correlation between humoral responses to human immunodeficiency virus type 1 envelope and disease progression in early-stage infection. *J Infect Dis* **178**, 1306-16 (1998).
162. Lu, F. X. New method for quantifying anti-HIV1-gp160 antibodies in saliva, cervicovaginal secretions, and serum of infected women. *J Clin Lab Anal* **14**, 188-92 (2000).
163. Lu, Y., Xiao, Y., Ding, J., Dierich, M. & Chen, Y. H. Immunogenicity of neutralizing epitopes on multiple-epitope vaccines against HIV-1. *Int Arch Allergy Immunol* **121**, 80-4 (2000).
164. Mackewicz, C. E., Yang, L. C., Lifson, J. D. & Levy, J. A. Non-cytolytic CD8 T-cell anti-HIV responses in primary HIV-1 infection. *Lancet* **344**, 1671-3. (1994).
165. Marvin, D. A. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 150-8 (1998).
166. Masciotra, S., Owen, S. M., Rudolph, D., Yang, C., Wang, B., Saksena, N., Spira, T., Dhawan, S. & Lal, R. B. Temporal relationship between V1V2 variation, macrophage

- replication, and coreceptor adaptation during HIV-1 disease progression. *Aids* **16**, 1887-98 (2002).
167. Mascola, J. R., Lewis, M. G., Stiegler, G., Harris, D., VanCott, T. C., Hayes, D., Louder, M. K., Brown, C. R., Sapan, C. V., Frankel, S. S., Lu, Y., Robb, M. L., Katinger, H. & Birx, D. L. Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol* **73**, 4009-18 (1999).
 168. Matoba, N., Magerus, A., Geyer, B. C., Zhang, Y., Muralidharan, M., Alfsen, A., Arntzen, C. J., Bomsel, M. & Mor, T. S. A mucosally targeted subunit vaccine candidate eliciting HIV-1 transcytosis-blocking Abs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13584-9 (2004).
 169. Matthews, D. J. & Wells, J. A. Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science* **260**, 1113-7 (1993).
 170. McGaughey, G. B., Citron, M., Danzeisen, R. C., Freidinger, R. M., Garsky, V. M., Hurni, W. M., Joyce, J. G., Liang, X., Miller, M., Shiver, J. & Bogusky, M. J. HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb. *Biochemistry* **42**, 3214-23 (2003).
 171. McKeating, J. A., Shotton, C., Cordell, J., Graham, S., Balfe, P., Sullivan, N., Charles, M., Page, M., Bolmstedt, A., Olofsson, S. & et al. Characterization of neutralizing monoclonal antibodies to linear and conformation-dependent epitopes within the first and second variable domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* **67**, 4932-44 (1993).
 172. McKnight, A., Clapham, P. R., Goudsmit, J., Cheingsong-Popov, R., Weber, J. N. & Weiss, R. A. Development of HIV-1 group-specific neutralizing antibodies after seroconversion. *Aids* **6**, 799-802 (1992).
 173. McMichael, A. J. & Hanke, T. HIV vaccines 1983-2003. *Nat Med* **9**, 874-80 (2003).
 174. Mellors, J. W., Rinaldo, C. R., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A. & Kingsley, L. A. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**, 1167-70. (1996).
 175. Melzer, H., Baier, K., Felici, F., von Specht, B. U., Wiedermann, G., Kollaritsch, H., Wiedermann, U. & Duchene, M. Humoral immune response against proteophosphoglycan surface antigens of *Entamoeba histolytica* elicited by immunization with synthetic mimotope peptides. *FEMS Immunol Med Microbiol* **37**, 179-83 (2003).
 176. Melzer, H., Fortugno, P., Mansouri, E., Felici, F., Marinets, A., Wiedermann, G., Kollaritsch, H., Von Specht, B. U. & Duchene, M. Antigenicity and immunogenicity of phage library-selected peptide mimics of the major surface proteophosphoglycan antigens of *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* **24**, 321-8 (2002).
 177. Menendez, A., Chow, K. C., Pan, O. C. & Scott, J. K. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibody 2F5 is multispecific for sequences flanking the DKW core epitope. *J Mol Biol* **338**, 311-27 (2004).
 178. Mennuni, C., Santini, C., Dotta, F., Farilla, L., Di Mario, U., Fierabracci, A., Bottazzo, G., Cortese, R. & Luzzago, A. Selection of phage-displayed peptides mimicking type 1 diabetes-specific epitopes. *J Autoimmun* **9**, 431-6. (1996).
 179. Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., Cortese, R. & Galfre, G. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J Immunol* **154**, 3162-72. (1995).
 180. Mikhail, M., Wang, B. & Saksena, N. K. Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev* **5**, 230-44 (2003).
 181. Mizuochi, T., Matthews, T. J., 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 Biol Chem* **265**, 8519-24. (1990).
 182. Molenaar, T. J., Michon, I., de Haas, S. A., van Berkel, T. J., Kuiper, J. & Biessen, E. A. Uptake and processing of modified bacteriophage M13 in mice: implications for phage display. *Virology* **293**, 182-91. (2002).
 183. Montefiori, D. C. Neutralizing antibodies take a swipe at HIV in vivo. *Nat Med* **11**, 593-4 (2005).
 184. Montefiori, D. C., Collman, R. G., Fouts, T. R., Zhou, J. Y., Bilaska, M., Hoxie, J. A., Moore, J. P. & Bolognesi, D. P. Evidence that antibody-mediated neutralization of human

- immunodeficiency virus type 1 by sera from infected individuals is independent of coreceptor usage. *J Virol* **72**, 1886-93. (1998).
185. Montefiori, D. C., Pantaleo, G., Fink, L. M., Zhou, J. T., Zhou, J. Y., Bilska, M., Miralles, G. D. & Fauci, A. S. Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors. *J Infect Dis* **173**, 60-7. (1996).
 186. Moog, C., Fleury, H. J., Pellegrin, I., Kirn, A. & Aubertin, A. M. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **71**, 3734-41. (1997).
 187. Moore, J. P. & Burton, D. R. Urgently needed: a filter for the HIV-1 vaccine pipeline. *Nat Med* **10**, 769-71 (2004).
 188. Moore, J. P., Cao, Y., Qing, L., Sattentau, Q. J., Pyati, J., Koduri, R., Robinson, J., Barbas, C. F., 3rd, Burton, D. R. & Ho, D. D. Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120. *J Virol* **69**, 101-9 (1995).
 189. Moore, J. P., McKeating, J. A., Weiss, R. A. & Sattentau, Q. J. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* **250**, 1139-42 (1990).
 190. Moore, J. P., Parren, P. W. & Burton, D. R. Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development. *J Virol* **75**, 5721-9 (2001).
 191. Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Wyatt, R. & Sodroski, J. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J Virol* **68**, 469-84 (1994).
 192. Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Yoshiyama, H., Thali, M., Charles, M., Sullivan, N., Poon, S. W., Fung, M. S., Traincard, F., Pinkus, M. & et al. Probing the structure of the V2 domain of human immunodeficiency virus type 1 surface glycoprotein gp120 with a panel of eight monoclonal antibodies: human immune response to the V1 and V2 domains. *J Virol* **67**, 6136-51 (1993).
 193. Moore, J. P. & Sodroski, J. Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *J Virol* **70**, 1863-72 (1996).
 194. Moore, J. P., Thali, M., Jameson, B. A., Vignaux, F., Lewis, G. K., Poon, S. W., Charles, M., Fung, M. S., Sun, B., Durda, P. J. & et al. Immunochemical analysis of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: probing the structure of the C4 and V4 domains and the interaction of the C4 domain with the V3 loop. *J Virol* **67**, 4785-96 (1993).
 195. Morishita, E., Narita, H., Nishida, M., Kawashima, N., Yamagishi, K., Masuda, S., Nagao, M., Hatta, H. & Sasaki, R. Anti-erythropoietin receptor monoclonal antibody: epitope mapping, quantification of the soluble receptor, and detection of the solubilized transmembrane receptor and the receptor-expressing cells. *Blood* **88**, 465-71 (1996).
 196. Moulard, M., Phogat, S. K., Shu, Y., Labrijn, A. F., Xiao, X., Binley, J. M., Zhang, M. Y., Sidorov, I. A., Broder, C. C., Robinson, J., Parren, P. W., Burton, D. R. & Dimitrov, D. S. Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6913-8. (2002).
 197. Murray, A., Smith, R. G., Brady, K., Williams, S., Badley, R. A. & Price, M. R. Generation and refinement of peptide mimetic ligands for paratope-specific purification of monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **296**, 9-17. (2001).
 198. Musey, L., Hughes, J., Schacker, T., Shea, T., Corey, L. & McElrath, M. J. Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **337**, 1267-74. (1997).
 199. Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., Rucker, F. & Katinger, H. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **67**, 6642-7 (1993).
 200. Myers, G., Korbers, B., Wain-Hobson, S., Jeang, K. T., Henderson, L. E. & Pavlakis, G. N. *Human retroviruses and AIDS. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences* (Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, 1994).
 201. Myers, G. & Pavlakis, G. N. in *The retroviridae* (ed. Levy, J. A.) 51-105. (Plenum Press, New York, 1992).

202. Nishimura, Y., Igarashi, T., Haigwood, N. L., Sadjadpour, R., Donau, O. K., Buckler, C., Plishka, R. J., Buckler-White, A. & Martin, M. A. Transfer of neutralizing IgG to macaques 6 h but not 24 h after SHIV infection confers sterilizing protection: implications for HIV-1 vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15131-6 (2003).
203. Nyambi, P. N., Gorny, M. K., Bastiani, L., van der Groen, G., Williams, C. & Zolla-Pazner, S. Mapping of epitopes exposed on intact human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) virions: a new strategy for studying the immunologic relatedness of HIV-1. *J Virol* **72**, 9384-91 (1998).
204. Nyambi, P. N., Mbah, H. A., Burda, S., Williams, C., Gorny, M. K., Nadas, A. & Zolla-Pazner, S. Conserved and exposed epitopes on intact, native, primary human immunodeficiency virus type 1 virions of group M. *J Virol* **74**, 7096-107. (2000).
205. Nygren, H. Experimental demonstration of lateral cohesion in a layer of adsorbed protein and in layers of gold-antibody complexes bound to surface immobilised antigen. *J Immunol Methods* **114**, 107-14 (1988).
206. O'Connor K, H., Konigs, C., Rowley, M. J., Irving, J. A., Wijeyewickrema, L. C., Pustowska, A., Dietrich, U. & Mackay, I. R. Requirement of multiple phage displayed peptide libraries for optimal mapping of a conformational antibody epitope on CCR5. *J Immunol Methods* **299**, 21-35 (2005).
207. Ohba, H., Soga, T., Tomozawa, T., Nishikawa, Y., Yasuda, A., Kojima, A., Kurata, T. & Chiba, J. An immunodominant neutralization epitope on the 'thumb' subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase revealed by phage display antibodies. *J Gen Virol* **82**, 813-20. (2001).
208. Oldenburg, K. R., Loganathan, D., Goldstein, I. J., Schultz, P. G. & Gallop, M. A. Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5393-7. (1992).
209. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Cohen, O. J., Vaccarezza, M., Gantt, K., Muro-Cacho, C. & Fauci, A. S. Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol Rev* **140**, 105-30 (1994).
210. Pantaleo, G. & Koup, R. A. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat Med* **10**, 806-10 (2004).
211. Pantaleo, G., Menzo, S., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Cohen, O. J., Demarest, J. F., Montefiori, D., Orenstein, J. M., Fox, C., Schragger, L. K. & et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **332**, 209-16 (1995).
212. Pantophlet, R., Ollmann Saphire, E., Poignard, P., Parren, P. W., Wilson, I. A. & Burton, D. R. Fine mapping of the interaction of neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies with the CD4 binding site of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* **77**, 642-58. (2003).
213. Parker, C. E., Deterding, L. J., Hager-Braun, C., Binley, J. M., Schulke, N., Katinger, H., Moore, J. P. & Tomer, K. B. Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 for the neutralizing monoclonal antibody 2F5. *J Virol* **75**, 10906-11. (2001).
214. Parren, P. W. & Burton, D. R. The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv Immunol* **77**, 195-262 (2001).
215. Parren, P. W., Marx, P. A., Hessel, A. J., Luckay, A., Harouse, J., Cheng-Mayer, C., Moore, J. P. & Burton, D. R. Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro. *J Virol* **75**, 8340-7 (2001).
216. Parren, P. W., Mondor, I., Nanche, D., Ditzel, H. J., Klasse, P. J., Burton, D. R. & Sattentau, Q. J. Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by antibody to gp120 is determined primarily by occupancy of sites on the virion irrespective of epitope specificity. *J Virol* **72**, 3512-9 (1998).
217. Parren, P. W., Moore, J. P., Burton, D. R. & Sattentau, Q. J. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *Aids* **13 Suppl A**, S137-62 (1999).
218. Pasqualini, R. & Arap, W. Hybridoma-free generation of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 257-9 (2004).
219. Pellegrin, I., Legrand, E., Neau, D., Bonot, P., Masquelier, B., Pellegrin, J. L., Ragnaud, J. M., Bernard, N. & Fleury, H. J. Kinetics of appearance of neutralizing antibodies in 12

- patients with primary or recent HIV-1 infection and relationship with plasma and cellular viral loads. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **11**, 438-47 (1996).
220. Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. & Ho, D. D. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**, 1582-6. (1996).
 221. Peterlin, B. M. & Trono, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* **3**, 97-107 (2003).
 222. Pilgrim, A. K., Pantaleo, G., Cohen, O. J., Fink, L. M., Zhou, J. Y., Zhou, J. T., Bolognesi, D. P., Fauci, A. S. & Montefiori, D. C. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* **176**, 924-32 (1997).
 223. Pinter, A., Honnen, W. J., He, Y., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S. & Kayman, S. C. The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J Virol* **78**, 5205-15 (2004).
 224. Poignard, P., Fouts, T., Nanche, D., Moore, J. P. & Sattentau, Q. J. Neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type-1 gp120 induce envelope glycoprotein subunit dissociation. *J Exp Med* **183**, 473-84 (1996).
 225. Poignard, P., Klasse, P. J. & Sattentau, Q. J. Antibody neutralization of HIV-1. *Immunol Today* **17**, 239-46. (1996).
 226. Poignard, P., Moulard, M., Golez, E., Vivona, V., Franti, M., Venturini, S., Wang, M., Parren, P. W. & Burton, D. R. Heterogeneity of envelope molecules expressed on primary human immunodeficiency virus type 1 particles as probed by the binding of neutralizing and nonneutralizing antibodies. *J Virol* **77**, 353-65 (2003).
 227. Poignard, P., Saphire, E. O., Parren, P. W. & Burton, D. R. gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol* **19**, 253-74 (2001).
 228. Prezzi, C., Nuzzo, M., Meola, A., Delmastro, P., Galfre, G., Cortese, R., Nicosia, A. & Monaci, P. Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J Immunol* **156**, 4504-13. (1996).
 229. Rabson, A. B. & Martin, M. A. Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell* **40**, 477-80. (1985).
 230. Rich, R. L. & Myszka, D. G. Spying on HIV with SPR. *Trends Microbiol* **11**, 124-33 (2003).
 231. Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J. & Petropoulos, C. J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4144-9 (2003).
 232. Rizzuto, C. & Sodroski, J. Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 741-9 (2000).
 233. Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. & Sodroski, J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**, 1949-53. (1998).
 234. Robbins, J. B., Schneerson, R. & Szu, S. C. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. *J Infect Dis* **171**, 1387-98 (1995).
 235. Roccasecca, R., Folgori, A., Ercole, B. B., Puntoriero, G., Lahm, A., Zucchelli, S., Tafi, R., Pezzanera, M., Galfre, G., Tramontano, A., Mondelli, M. U., Pessi, A., Nicosia, A., Cortese, R. & Meola, A. Mimotopes of the hyper variable region 1 of the hepatitis C virus induce cross-reactive antibodies directed against discontinuous epitopes. *Mol Immunol* **38**, 485-92 (2001).
 236. Rodes, B., Toro, C., Paxinos, E., Poveda, E., Martinez-Padial, M., Benito, J. M., Jimenez, V., Wrin, T., Bassani, S. & Soriano, V. Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *Aids* **18**, 1109-16 (2004).
 237. Roux, K. H., Zhu, P., Seavy, M., Katinger, H., Kunert, R. & Seamon, V. Electron microscopic and immunochemical analysis of the broadly neutralizing HIV-1-specific, anti-carbohydrate antibody, 2G12. *Mol Immunol* **41**, 1001-11 (2004).
 238. Rowland-Jones, S. L. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol* **3**, 343-8 (2003).

239. Ruppach, H., Nara, P., Raudonat, I., Elanjikal, Z., Rubsamen-Waigmann, H. & Dietrich, U. Human immunodeficiency virus (HIV)-positive sera obtained shortly after seroconversion neutralize autologous HIV type 1 isolates on primary macrophages but not on lymphocytes. *J Virol* **74**, 5403-11. (2000).
240. Saksena, N. K., Wang, B. & Dyer, W. B. Biological and Molecular Mechanisms in Progression and non-Progression of HIV Disease. *Aids Rev* **3**, 133-144. (2001).
241. Sanders, R. W., Venturi, M., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Katinger, H., Lloyd, K. O., Kwong, P. D. & Moore, J. P. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol* **76**, 7293-305 (2002).
242. Saphire, E. O., Parren, P. W., Pantophlet, R., Zwick, M. B., Morris, G. M., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Stanfield, R. L., Burton, D. R. & Wilson, I. A. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* **293**, 1155-9. (2001).
243. Sattentau, Q. J. & Moore, J. P. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer. *J Exp Med* **182**, 185-96 (1995).
244. Sattentau, Q. J., Zolla-Pazner, S. & Pognard, P. Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. *Virology* **206**, 713-7. (1995).
245. Sawyer, C., Embleton, J. & Dean, C. Methodology for selection of human antibodies to membrane proteins from a phage-display library. *J Immunol Methods* **204**, 193-203. (1997).
246. Scala, G., Chen, X., Liu, W., Telles, J. N., Cohen, O. J., Vaccarezza, M., Igarashi, T. & Fauci, A. S. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J Immunol* **162**, 6155-61. (1999).
247. Scanlan, C. N., Pantophlet, R., Wormald, M. R., Saphire, E. O., Calarese, D., Stanfield, R., Wilson, I. A., Katinger, H., Dwek, R. A., Burton, D. R. & Rudd, P. M. The carbohydrate epitope of the neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12. *Adv Exp Med Biol* **535**, 205-18 (2003).
248. Schmitz, J. E., Kuroda, M. J., Santra, S., Simon, M. A., Lifton, M. A., Lin, W., Khunkhun, R., Piatak, M., Lifson, J. D., Grosschupff, G., Gelman, R. S., Racz, P., Tenner-Racz, K., Mansfield, K. A., Letvin, N. L., Montefiori, D. C. & Reimann, K. A. Effect of humoral immune responses on controlling viremia during primary infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J Virol* **77**, 2165-73 (2003).
249. Schneider, J., Kaaden, O., Copeland, T. D., Oroszlan, S. & Hunsmann, G. Shedding and interspecies type sero-reactivity of the envelope glycopolyptide gp120 of the human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* **67 (Pt 11)**, 2533-8 (1986).
250. Schonning, K., Lund, O., Lund, O. S. & Hansen, J. E. Stoichiometry of monoclonal antibody neutralization of T-cell line-adapted human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **73**, 8364-70 (1999).
251. Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R. & Bushman, F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521-9 (2002).
252. Scott, J. K. Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends Biochem Sci* **17**, 241-5. (1992).
253. Scott, J. K. & Smith, G. P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**, 386-90. (1990).
254. Sharon, M., Kessler, N., Levy, R., Zolla-Pazner, S., Gorlach, M. & Anglister, J. Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic beta hairpins in chemokines, suggesting a mechanism for coreceptor selectivity. *Structure (Camb)* **11**, 225-36 (2003).
255. Shibata, R., Igarashi, T., Haigwood, N., Buckler-White, A., Ogert, R., Ross, W., Willey, R., Cho, M. W. & Martin, M. A. Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat Med* **5**, 204-10. (1999).
256. Shotton, C., Arnold, C., Sattentau, Q., Sodroski, J. & McKeating, J. A. Identification and characterization of monoclonal antibodies specific for polymorphic antigenic determinants within the V2 region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* **69**, 222-30 (1995).

257. Sidhu, S. S., Fairbrother, W. J. & Deshayes, K. Exploring protein-protein interactions with phage display. *Chembiochem* **4**, 14-25 (2003).
258. Siegel, D. L., Chang, T. Y., Russell, S. L. & Bunya, V. Y. Isolation of cell surface-specific human monoclonal antibodies using phage display and magnetically-activated cell sorting: applications in immunohematology. *J Immunol Methods* **206**, 73-85. (1997).
259. Silvera, P., Richardson, M. W., Greenhouse, J., Yalley-Ogunro, J., Shaw, N., Mirchandani, J., Khalili, K., Zagury, J. F., Lewis, M. G. & Rappaport, J. Outcome of simian-human immunodeficiency virus strain 89.6p challenge following vaccination of rhesus macaques with human immunodeficiency virus Tat protein. *J Virol* **76**, 3800-9 (2002).
260. Simon, F., Mauciere, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barre-Sinoussi, F. & Brun-Vezinet, F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* **4**, 1032-7. (1998).
261. Sioud, M. & Hansen, M. H. Profiling the immune response in patients with breast cancer by phage- displayed cDNA libraries. *Eur J Immunol* **31**, 716-25. (2001).
262. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-7 (1985).
263. Smith, G. P. & Pentrenko, V. A. Phage Display. *Chem Rev* **97**, 391-410. (1997).
264. Somasundaran, M., Sharkey, M., Brichacek, B., Luzuriaga, K., Emerman, M., Sullivan, J. L. & Stevenson, M. Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9503-8 (2002).
265. Spenlehauer, C., Kirn, A., Aubertin, A. M. & Moog, C. Antibody-mediated neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates: investigation of the mechanism of inhibition. *J Virol* **75**, 2235-45. (2001).
266. Stanfield, R. L., Gorny, M. K., Williams, C., Zolla-Pazner, S. & Wilson, I. A. Structural rationale for the broad neutralization of HIV-1 by human monoclonal antibody 447-52D. *Structure (Camb)* **12**, 193-204 (2004).
267. Sugiura, W., Broder, C. C., Moss, B. & Earl, P. L. Characterization of conformation-dependent anti-gp120 murine monoclonal antibodies produced by immunization with monomeric and oligomeric human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins. *Virology* **254**, 257-67 (1999).
268. Szardenings, M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res* **23**, 307-49 (2003).
269. Thali, M., Moore, J. P., Furman, C., Charles, M., Ho, D. D., Robinson, J. & Sodroski, J. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol* **67**, 3978-88. (1993).
270. Toran, J. L., Kremer, L., Sanchez-Pulido, L., de Alboran, I. M., del Real, G., Llorente, M., Valencia, A., de Mon, M. A. & Martinez, A. C. Molecular analysis of HIV-1 gp120 antibody response using isotype IgM and IgG phage display libraries from a long-term non-progressor HIV-1- infected individual. *Eur J Immunol* **29**, 2666-75. (1999).
271. Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M. R., Murphy, B. R., Rappuoli, R. & Lanzavecchia, A. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med* **10**, 871-5 (2004).
272. Trkola, A., Kuster, H., Rusert, P., Joos, B., Fischer, M., Leemann, C., Manrique, A., Huber, M., Rehr, M., Oxenius, A., Weber, R., Stiegler, G., Vcelar, B., Katinger, H., Aceto, L. & Gunthard, H. F. Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat Med* **11**, 615-22 (2005).
273. Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J. P. & Katinger, H. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**, 1100-8 (1996).
274. Tsang, M. L., Evans, L. A., McQueen, P., Hurren, L., Byrne, C., Penny, R., Tindall, B. & Cooper, D. A. Neutralizing antibodies against sequential autologous human immunodeficiency virus type 1 isolates after seroconversion. *J Infect Dis* **170**, 1141-7. (1994).
275. Tumanova, O., Kuvshinov, V. N., Azaev, M., Masharskii, A. E., Klimov, N. A., Kozlov, A. P., Il'ichev, A. A. & Sandakhchiev, L. S. [Construction of peptide mimetics of an epitope of the human immunodeficiency virus (HIV-1) gp41 protein, recognized by virus-neutralizing antibodies 2F5]. *Mol Biol (Mosk)* **35**, 146-51 (2001).

276. Turner, B. G. & Summers, M. F. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**, 1-32 (1999).
277. Ugen, K. E., Goedert, J. J., Boyer, J., Refaeli, Y., Frank, I., Williams, W. V., Willoughby, A., Landesman, S., Mendez, H., Rubinstein, A. & et al. Vertical transmission of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Reactivity of maternal sera with glycoprotein 120 and 41 peptides from HIV type 1. *J Clin Invest* **89**, 1923-30. (1992).
278. v. Briesen, H., Becker, W. B., Helm, E. B., Enzensberger, W., Fischer, P. A., Brede, H. D. & Rübnsamen-Waigmann, H. *Isolierung von AIDS-assoziierten Retroviren (AAV) aus Blut und Liquor cerebrospinalis von AIDS- und LAS-Patienten mit neurologischer Symptomatik* (ed. Helm, E. B., Stille, W., Vanek, E.) (Zuckerschwerdt Verlag, München, 1986).
279. Vincent, N., Malvoisin, E., Pozzetto, B., F., L. & Genin, C. Detection of IgA inhibiting the interaction between gp120 and soluble CD4 receptor in serum and saliva of HIV-1-infected patients. *AIDS* **18**, 37-43 (2004).
280. Wagner, S., Hafner, C., Allwardt, D., Jasinska, J., Ferrone, S., Zielinski, C. C., Scheiner, O., Wiedermann, U., Pehamberger, H. & Breiteneder, H. Vaccination with a human high molecular weight melanoma-associated antigen mimotope induces a humoral response inhibiting melanoma cell growth in vitro. *J Immunol* **174**, 976-82 (2005).
281. Wain-Hobson, S. Down or out in blood and lymph? *Nature* **387**, 123-4. (1997).
282. Wan, Y., Zheng, Y. Z., Harris, J. M., Brown, R. & Waters, M. J. Epitope map for a growth hormone receptor agonist monoclonal antibody, MAb 263. *Mol Endocrinol* **17**, 2240-50 (2003).
283. Wang, B., Spira, T. J., Owen, S., Lal, R. B. & Saksena, N. K. HIV-1 strains from a cohort of American subjects reveal the presence of a V2 region extension unique to slow progressors and non-progressors. *Aids* **14**, 213-23 (2000).
284. Wang, C. Y., Sawyer, L. S., Murthy, K. K., Fang, X., Walfield, A. M., Ye, J., Wang, J. J., Chen, P. D., Li, M. L., Salas, M. T., Shen, M., Gauduin, M. C., Boyle, R. W., Koup, R. A., Montefiori, D. C., Mascola, J. R., Koff, W. C. & Hanson, C. V. Postexposure immunoprophylaxis of primary isolates by an antibody to HIV receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10367-72. (1999).
285. Wang, L. F. & Yu, M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. *Curr Drug Targets* **5**, 1-15 (2004).
286. Watkins, J. D., Beuerlein, G., Wu, H., McFadden, P. R., Pancook, J. D. & Huse, W. D. Discovery of human antibodies to cell surface antigens by capture lift screening of phage-expressed antibody libraries. *Anal Biochem* **256**, 169-77. (1998).
287. Watters, J. M., Telleman, P. & Junghans, R. P. An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology* **3**, 21-9. (1997).
288. Wei, X., Decker, J. M., Liu, H., Zhang, Z., Arani, R. B., Kilby, J. M., Saag, M. S., Wu, X., Shaw, G. M. & Kappes, J. C. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1896-905 (2002).
289. Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D. & Shaw, G. M. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**, 307-12 (2003).
290. Wild, C. T., Shugars, D. C., Greenwell, T. K., McDanal, C. B. & Matthews, T. J. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9770-4. (1994).
291. Willats, W. G. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* **50**, 837-54 (2002).
292. Willis, A. E., Perham, R. N. & Wraith, D. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* **128**, 79-83 (1993).
293. Wilson, D. R. & Finlay, B. B. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can J Microbiol* **44**, 313-29. (1998).
294. Wit, F. W., van Rij, R. P., Weverling, G. J., Lange, J. M. & Schuitemaker, H. CC chemokine receptor 5 delta32 and CC chemokine receptor 2 64I polymorphisms do not influence the virologic and immunologic response to antiretroviral combination therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Infect Dis* **186**, 1726-32 (2002).

295. Wu, Z., Kayman, S. C., Honnen, W., Revesz, K., Chen, H., Vijn-Warrier, S., Tilley, S. A., McKeating, J., Shotton, C. & Pinter, A. Characterization of neutralization epitopes in the V2 region of human immunodeficiency virus type 1 gp120: role of glycosylation in the correct folding of the V1/V2 domain. *J Virol* **69**, 2271-8 (1995).
296. Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A. & Sodroski, J. G. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705-11. (1998).
297. Wyatt, R. & Sodroski, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-8. (1998).
298. Xiang, S. H., Doka, N., Choudhary, R. K., Sodroski, J. & Robinson, J. E. Characterization of CD4-induced epitopes on the HIV type 1 gp120 envelope glycoprotein recognized by neutralizing human monoclonal antibodies. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**, 1207-17 (2002).
299. Xiang, S. H., Wang, L., Abreu, M., Huang, C. C., Kwong, P. D., Rosenberg, E., Robinson, J. E. & Sodroski, J. Epitope mapping and characterization of a novel CD4-induced human monoclonal antibody capable of neutralizing primary HIV-1 strains. *Virology* **315**, 124-34 (2003).
300. Xiao, L., Owen, S. M., Goldman, I., Lal, A. A., deJong, J. J., Goudsmit, J. & Lal, R. B. CCR5 coreceptor usage of non-syncytium-inducing primary HIV-1 is independent of phylogenetically distinct global HIV-1 isolates: delineation of consensus motif in the V3 domain that predicts CCR-5 usage. *Virology* **240**, 83-92 (1998).
301. Xiao, L., Rudolph, D. L., Owen, S. M., Spira, T. J. & Lal, R. B. Adaptation to promiscuous usage of CC and CXC-chemokine coreceptors in vivo correlates with HIV-1 disease progression. *Aids* **12**, F137-43 (1998).
302. Yang, B., Gao, L., Li, L., Lu, Z., Fan, X., Patel, C. A., Pomerantz, R. J., DuBois, G. C. & Zhang, H. Potent suppression of viral infectivity by the peptides that inhibit multimerization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vif proteins. *J Biol Chem* **278**, 6596-602 (2003).
303. Yang, X., Kurteva, S., Lee, S. & Sodroski, J. Stoichiometry of antibody neutralization of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **79**, 3500-8 (2005).
304. Yang, X., Tomov, V., Kurteva, S., Wang, L., Ren, X., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S. & Sodroski, J. Characterization of the outer domain of the gp120 glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **78**, 12975-86 (2004).
305. Yang, X., Wyatt, R. & Sodroski, J. Improved elicitation of neutralizing antibodies against primary human immunodeficiency viruses by soluble stabilized envelope glycoprotein trimers. *J Virol* **75**, 1165-71. (2001).
306. Yayon, A., Aviezer, D., Safran, M., Gross, J. L., Heldman, Y., Cabilly, S., Givol, D. & Katchalski-Katzir, E. Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage-epitope library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10643-7. (1993).
307. Yip, Y. L., Smith, G. & Ward, R. L. Comparison of phage pIII, pVIII and GST as carrier proteins for peptide immunisation in Balb/c mice. *Immunol Lett* **79**, 197-202 (2001).
308. Yu, M. W., Scott, J. K., Fournier, A. & Talbot, P. J. Characterization of murine coronavirus neutralization epitopes with phage-displayed peptides. *Virology* **271**, 182-96 (2000).
309. Zhang, H., Huang, Y., Fayad, R., Spear, G. T. & Qiao, L. Induction of mucosal and systemic neutralizing antibodies against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by oral immunization with bovine Papillomavirus-HIV-1 gp41 chimeric virus-like particles. *J Virol* **78**, 8342-8 (2004).
310. Zhang, M. Y., Shu, Y., Rudolph, D., Prabakaran, P., Labrijn, A. F., Zwick, M. B., Lal, R. B. & Dimitrov, D. S. Improved breadth and potency of an HIV-1-neutralizing human single-chain antibody by random mutagenesis and sequential antigen panning. *J Mol Biol* **335**, 209-19 (2004).
311. Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J., Taylor, K. A. & Roux, K. H. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15812-7 (2003).
312. Zolla-Pazner, S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol* **4**, 199-210 (2004).

313. Zwart, G., van der Hoek, L., Valk, M., Cornelissen, M. T., Baan, E., Dekker, J., Koot, M., Kuiken, C. L. & Goudsmit, J. Antibody responses to HIV-1 envelope and gag epitopes in HIV-1 seroconverters with rapid versus slow disease progression. *Virology* **201**, 285-93. (1994).
314. Zwick, M. B., Jensen, R., Church, S., Wang, M., Stiegler, G., Kunert, R., Katinger, H. & Burton, D. R. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J Virol* **79**, 1252-61 (2005).
315. Zwick, M. B., Labrijn, A. F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E. O., Binley, J. M., Moore, J. P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D. R. & Parren, P. W. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* **75**, 10892-905. (2001).

5.2 Eigene Veröffentlichungen

5.2.1 Publikationen

Humbert, M., Schreiber, A., Benz, A. & Dietrich, U. 3D-Epitope-Explorer (3DEX): Localization of conformational epitopes within three-dimensional structures of proteins. *J Comput Chem* **26**, 879-887 (2005).

Sticht, J., Humbert, M., Findlow, S., Bodem, J., Müller, B., Dietrich, U., Werner, J., Kräusslich, HG. A Peptide Inhibitor of HIV-1 Assembly in vitro. *Nat Struct Mol Biol* **12** (2005).

Advance Online Publication, DOI: 10.1038/nsmb964

Humbert, M., Landersz, M., Brill, B., Antoni, S., Rodes, B., Soriano, V., Königs, C., Dietrich, U. Mimotopes selected with plasma from long-term non-progressing HIV-positive patients induce neutralizing antibodies in mice. *Manuskript in Vorbereitung*.

Antoni, S., Humbert, M., Landersz, M., Dittmar, M., Rodes, B., Soriano, V., Wintergerst, U., Knechten, H., Chandra, A., Dietrich, U. Virological and immunological characterization of HIV-infected long-term non-progressing individuals. *Manuskript in Vorbereitung*.

5.2.2 Poster Präsentationen

8th German AIDS Conference (DAIG) 2001, Berlin, Germany

Michael Humbert, Christoph Königs, Margot Landersz, Ursula Dietrich

Identification of HIV specific mimotopes from HIV positive sera by Phage Display

Annual Meeting of the Society of Virology GfV 2002, Erlangen, Germany

Michael Humbert, Christoph Königs, Margot Landersz, Daniela Mooser, Ursula Dietrich

Dissection of the humoral immune response of HIV positive individuals by phage display

XIV International AIDS Conference 2002, Barcelona, Spain

Michael Humbert, Christoph Königs, Margot Landersz, Daniela Mooser, Ursula Dietrich

Identification of HIV specific mimotopes from HIV positive sera by phage display

Annual Meeting of the Society of Virology GfV 2003, Berlin, Germany

Michael Humbert, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Ursula Dietrich

Identification of HIV specific mimotopes from HIV-1 positive LTNP sera by phage display

9th German and 14th Austrian AIDS Conference 2003, Hamburg, Germany

Michael Humbert, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Ursula Dietrich

Biopanning of LTNP sera to identify HIV specific mimtopes relevant for vaccine development

XV International AIDS Conference 2004, Bangkok, Thailand

Michael Humbert, Sascha Antoni, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Uwe Wintergerst, Ursula Dietrich

Biopanning of LTNP sera to detect HIV specific conserved mimotopes for vaccine development

Annual Meeting of the Society of Virology GfV/SIV 2004, Tübingen, Germany

Michael Humbert, Sascha Antoni, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Uwe Wintergerst, Ursula Dietrich

Biopanning of LTNP sera to detect HIV specific conserved mimotopes for vaccine development

CHI's 6th Annual Phage Display Technologies 2004, Cambridge, U.S.A.

Michael Humbert, Sascha Antoni, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Uwe Wintergerst, Ursula Dietrich

Identification of protective epitopes for HIV-1 from long-term non-progressor sera

Annual Meeting of the Society of Virology GfV 2005, Hannover, Germany

Michael Humbert, Sascha Antoni, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Uwe Wintergerst, Ursula Dietrich

Biopanning of LTNP plasma to detect HIV specific conserved mimotopes for vaccine development

PEGS: The Protein Engineering Summit 2005, Cambridge, U.S.A.

Michael Humbert, Sascha Antoni, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Uwe Wintergerst, Ursula Dietrich

Biopanning of LTNP plasma to detect HIV specific conserved mimotopes for vaccine development

5.2.3 Vorträge**Promega GmbH, 2004**

Ort: Universitätsklinikum Frankfurt/Main

Anwendung eines Luciferaseassays zur Detektion neutralisierender HIV-1 Antikörper in Patientenserum

Dana-Farber Cancer Institute, Boston MA, USA, 2005

Ort: Labor von Ruth M. Ruprecht, M.D., Ph.D.

Identification of HIV-1 mimotopes for protective antibodies in LTNP plasma using phage display

6 Anhang

6.1 Tabellen der Phagotope

TABELLE 6.1

Phagotope Biopanning 01/02 (Patient MH01/MH04)																
Name Klon	Anzahl	Sequenz Insert										Alignment 3D gp120 a-Atom_7A_4er_20 %	Alignment 3D ohne Oberfläche gp 120, Tat, p24, RT, IN, PR, Nef			
Motive ähnlich zu BPs 02/02 mit MH04/MH01																
1-7.1	> BP02	L	R	T	T	A	K	L					= 2-7.15	(R469) T283 T455 A281 K282	LRTT 454 469 455 283	
1-7.14		L	L	T	T	A	K	P						T283 T455 A281 K282		
1-7.4	2	L	K	T	T	H	K	Y						max. 3	KTT 282 283 455	
1-7.9		L	K	T	T	L	K	L						max. 3	KTTL 282 283 454 455 TTLK 198 123 122 121	
1-7.11		L	H	T	T	M	K	S						max. 3	MKS > siehe SKM 1-7.12	
1-7.12		L	L	T	T	S	K	M						T415 T413 S334 K337	SKM > siehe MKS 1-7.11	
1-7.8		L	L	T	T	S	R	M						T415 T413 S334 R335	LTTS 122 123 198 199 (125 198 123 199)	
1-7.18		L	L	V	T	S	K	P						L122 V200 T198 S199		
1-7.20		L	K	T	T	I	K	M						T202 I201 K121 M434	KTTI 357 358 463 359 (282 283 455 284)	
1-7.7		L	S	L	V	P	P	A						L122 S199 L125 V127 L125 S199 L122 V120 L125 S199 L122 V200		
1-7.17		R	R	T	T	E	K	P						max. 3	RRTT 456 469 455 283	
1-7.21		M	R	T	T	E	K	Y						max. 3		
1-7.23		M	R	T	T	D	K	T						T278 D279 K282 T283 T278 D279 K282 T455	RIT 456 455 283 DKT 461 460 462	
1-7.28		F	Y	S	T	T	K	L						max. 3		
1-7.16		F	F	S	T	A	K	S						max. 3		
1-7.6		F	R	E	P	P	P	E						max. 3	p24 EPPP 128 125 123 122	
1-7.10		F	R	E	P	P	P	L						max. 3		
1-7.19		F	R	E	P	G	T	Y						E91 P238 G237 T236		
1-7.22		F	R	S	P	P	P	E						max. 3	FRSP 361 469 364 363/470	
1-7.25		F	R	T	P	P	M	D						---		
Motive ähnlich zu BPs 02/02 mit MH04/MH01, 03/02 mit MH01 und 04/02 mit MH04																
1-c.18		S	N	N	A	L	P	S						---	SNNA 274 276 279 281	
1-c.22		Y	N	N	A	L	P	E						max. 3		
1-c.23		V	N	N	A	L	P	M						max. 3	VNN 101 98 94	
1-c.25		M	N	N	A	L	P	M						max. 3	MNN 95 94 92 NNA 280/276 279 281	
1-7.2		N	P	V	E	H	M	M						---	VEHM 101 102/106 105 104	
1-12.1		N	P	D	R	S	L	M	P	L	N	L	L	max. 3	PLN 124 125 197	
1-12.9		F	R	N	P	D	L	K	V	P	L	R	V	max. 3	FRNP 361 469 362 363 LKV/P 122 121 120 118	
1-c.10		S	P	T	S	G	S	H						max. 3	SPTS GS 365 363 388 387 366 364	
1-c.20		T	H	P	W	G	T	A						max. 3	= 3-12.12 = 3-c.17	
Einzelne Motive																
1-7.3		F	A	P	L	L	M	R						max. 3		
1-7.15		H	L	R	R	N	L	K						---	LRRN 454 469 456 280	
1-c.19		S	L	S	A	K	L	F						max. 3		
1-c.28		T	P	P	L	F	L	N						---	TPPL 388 363 470 453	
1-c.13		T	P	P	P	L	M	L						---	TPP 388/293 363 470	
1-12.3		V	T	P	T	R	I	L	S	S	S	F	T	V89 T90 P238 T240 V200 T198 P124 I201 L122 S199	VTPT 430 123 124 198 ILS 109 111 110	
1-12.7	6	H	K	Y	P	C	S	T	T	N	C	S	P	S334/411 T413 T415 N332 T198 N197 C126 S195 T297 N295 C445 S446	STTNCS 199 123 198 197 126 195 // 411 413 415 332 296 446 QTYP - STTNC 258 373 384 369 - 364 392 388 386 385	
1-12.16		T	E	H	P	H	Y	P	V	W	A	T	S	---	Motive liegen innen	
1-12.18		S	S	L	H	I	P	T	W	P	V	Q	P	max. 3	SSLHIP(T) 375 256 259 374 371 369 (373) liegt im innern p24 PTWPVQ 123 119 117 125 126 114 gp41 SSLHI 644 640 641 643 642 RT TWPVQ 497 535 537 536 258 SSLHI 105 191 193 198 195	
V3 MH01		G	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	I
V3 MH04		G	I	H	M	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	D
1-c.1		L	G	P	P	R	A	F								
1-c.3		Q	G	P	G	R	A	M								
1-c.4	18	L	G	P	G	R	A	F								
1-c.12		I	G	P	G	A	A	Y								
1-c.31		R	G	P	G	R	A	F								
1-c.34		I	G	P	G	R	G	F								
1-7.5		A	I	G	T	A	F	L						max. 3	= 3-7.7	
V3 MH01		T	R	P	N	N	N	T	R	R	G	I	H	I	G	P
V3 MH04		T	R	P	N	N	N	T	R	K	G	I	H	M	G	P
1-c.5	3	N	L	N	T	S	K	E								
KLIC MH01		W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	A	V	P	W
KLIC MH04		W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	A	V	P	W
1-12.2	7	H	A	C	T	G	K	L	R	C	T	T	T			
1-12.4		L	P	C	Q	G	K	S	A	C	S	T	T			
1-12.5	2	M	C	Q	G	K	N	I	C	T	T	I	Q			
1-12.10	5	T	P	C	L	G	K	L	P	C	S	T	T			
1-12.15	2	T	N	C	V	G	K	D	R	C	L	T	L			
1-12.17	> BP03	H	P	S	P	G	K	A	N	N	A	L	P			
														K337 A336 N339 N340		

TABELLE 6.3

Phagotope Biopanning 03/02 (Patient MH01)															
Name	Anzahl	Sequenz Insert										Alignment 3D gp120	Alignment 3D ohne Oberfläche		
Klon												a-Atom_7A_4er_20 %	gp 120, Tat, p24, RT, IN, PR, Nef		
Motive ähnlich zu BPs 02/02 mit MH04/MH01, 01/02 mit MH01/MH04 und 04/02 mit MH04															
3-7.3	4													max. 3	NNA 280 279 281
3-7.4														L125 P124 N197 (V2) P238 N92 N94 N280 N279 A281 (1G9N)	
3-7.5	2													N339 N340 A336	
3-7.6	3													max. 3	WNW 96 94 98 NNA 276 279 281
3-7.8														max. 3	NALPTT 21 22 20 17 58 54 p24 NALPTT 21 22 20 17 58 54
3-(7)-10	c7c													max. 3	
3-7.11	2													max. 3	
3-7.27														N276 N279 N280 A281 (1G9N)	LPT 125 124 123
3-7.29														max. 3	
3-7.33														max. 3	
3-7.14														---	IAL 423 424 433 122
3-c-2														max. 3	
3-c-4														K337/343 N339 N340 A336 (Rückseite)	
3-c-5	3													max. 3	
3-c-6														max. 3	
3-c-9														max. 3	
3-c-10														max. 3	
3-c-11														max. 3	TNNA 276 276 279 281
3-c-16														max. 3	
3-c-19														max. 3	NNA 280 279 281 VPI 372 369 371
3-c-22														max. 3	
3-c-26														max. 3	
3-c-29														max. 3	
3-c-34														max. 3	
3-c-38														max. 3	
3-c-40														max. 3	
3-c-42														max. 3	
3-c-44														max. 3	
3-c-46														max. 3	
3-(12)-52	7mer													N339 N340 A336 S334 (Rückseite)	
3-(12)-13	7mer													S334/411 T413 N332 N295 (nahe CCR5b)	
3-12.15														max. 3	
3-12.24														S199 P124 L122 -N280 A281 T283	NNATLT 276 279 281 283 453 455
3-12.38														H330 N332 N295 S446 (Rückseite)	
3-12.51														max. 3	
3-12.49														Q344 N340 N339 A336 V200 S199 P124 L122 (V2/V3)	
3-12.7														max. 3	max. 4er
3-c-37														N339 N340 A336 S334 (Rückseite)	
3-c-31														max. 3	
3-c-8														max. 3	
3-c-50														max. 3	
3-7.26														P369 D368 V372 T373 (CD4bs)	
3-(c)-32	7mer													---	
3-(c)-39	7mer													D412 R335 K337 A336 (V4)	
3-12.19														max. 3	
3-c-1														max. 3	
3-c-17	4													= 1-c.20	
3-c-7	3													max. 3	
3-c-3														max. 3	
3-c-13														max. 3	
3-12.12														> 1-c.10	SGGRLP 461 459 458 456 454 470 p24 MSPTS 144 146 147 148 149
Einzelne Motive															
3-c-25														---	---
3-c-28														---	---
3-c-30														---	---
3-12.1														T283 K282 T455 A281 D279	p24 TADLT 48 47 51 52 54
3-12.37														T283 K282 T455 A281 D279	ITKTAD 285 283 282 455 281 279 TDITK(T) 396 395 359 358 357 (465) TDITK(T) 455 457 467 465 357 (358)
3-12.2														G222 K490 F223 P220 (non-neutralizing)	NRINLHP 339 335 414 332 416 330 417 gp41 NRINLH 636 633 635 637 641 643
3-12.5														---	---
3-12.6	2													T415 T413 R335 A336	gp41 NNSLL 636 637 640 641 645
3-12.16														max. 3	RT KSHNT 512 513 361 363 362 RT NTINY 460 439 495 494 532 gp41 NTINY 636 639 635 637 638
3-12.26														L122 S199 N197 T198 (V2/V3) N332 T413 D412 S411 (Rückseite)	SALLSN 264 266 265 288 291 289
3-12.4														max. 3	Tat HGPSCT 13 15 14 16 22 20
3-12.11	5													---	---
3-12.20														T415 H417 P330 T297 T413	---
3-12.21														N262 G263 S264 L265 T290 (Rückseite)	RT YDVTQK 188 186 108 107 223 222 Tat DVTQK 80 36 24 19 17
3-12.25														A204 Q203 V120 T202 (V2)	p24 TADMLA 48 47 51 55 20 22
3-12.47														max. 3	---
3-12.31														max. 3	---
3-12.40														max. 3	TLKAYM 123 122 121 433 435 434 V 120 Tat HTLKAY 13 39 43 12 42 47
3-12.45														max. 3	RT FSPSWG 160 157 156 150 153 152
3-12.53														---	---
V3 MH01 G I H I G P G R A F Y A T G I															
3-7.1	5													max. 3	
3-7.28														max. 3	
3-12.22														max. 3	
3-12.23														max. 3	
3-12.36														max. 3	
3-12.30														max. 3	
3-c-15														max. 3	
3-7.7	6													= 1-7.5	
3-12.17														max. 3	p24 LL TASS 56 52 48 47 44 41 RT LGSALF 210 213 117 114 116 149
KLIC MH01 W G C S G K L I C T T A V P W															
3-12.8														max. 3	
3-12.9	2													max. 3	
3-12.18														A436 C119 T202 - V120 V200 T198	TFKNVV 232 233 231 229 243 87 p24 KNVVT 25 21 24 59 58 54 IN FKNVVT 181 185 184 180 176 174
3-12.10	3													max. 3	
3-12.41														max. 3	
3-12.3														N-term KLIC	Tat QHTQV 63 65 64 66 67
3-12.28														K121 L122 V120 M434	
3-12.50														C-term KLIC	

TABELLE 6.5

Phagotope Biopanning 05/02 (Patient MH02)																			
Name	Anzahl	Sequenz Insert											Alignment 3D gp120 a-Atom 7A_4er 20 %	Alignment 3D ohne Oberfläche gp 120, Tat, p24, RT, IN, PR, Nef					
Klon																			
Einzelne Klone																			
5-7.1		W	V	S	L	D	E	W						S110 L111 D107 E106 (non-neutralizing)	RT VSLDE 108 105 193 192 194 RT VSLDE 179 191 193 192 194 / 552 553 551 549 546				
5-7.2	2	G	T	S	P	T	H	R						max. 3	max. 3 GTSPT 431 123 199 124 498 Tat GTSPTH 15 23 16 14 39 13				
5-7.6	> BP 10 > BP 12	S	T	S	P	T	H	R						S334 T413 S411 - P417 T415 H330 (silent)	STSPTH 256 257 375 369 373 374				
5-7.3	> BP 18	?	T	S	P	T	H	R						----					
5-12.24		T	H	R	T	S	T	L	D	Y	F	V	I	max. 3					
5-12.32		S	P	R	T	D	Y	Q	L	H	L	W		max. 3	gp41 QLLHLW 562 565 566 564 568 571 (N36)				
KLIC	MH02	L	G	I	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	V	P	W	
5-c.1	7					A	C	T	G	R	L	I							
5-c.6	5					S	C	A	G	R	L	L							
5-c.10						A	C	H	G	R	L	V							
5-c.13						A	C	T	G	R	L	M							
5-12.1	8					F	C	A	G	A	L	T	C	T	T	L	P		
5-12.3	5		H	T	P	L	C	E	G	R	L	V	C	R					
5-12.4	4		L	H	R	S	C	A	G	Q	L	L	C	T					
5-12.5						E	G	V	C	I	G	R	L	S	C	I	Y		
5-12.10						F	G	C	L	G	K	L	V	C	D	Y	P		
5-12.18						S	S	C	M	G	R	L	S	C	I	A	L		
5-12.19	4					Q	V	N	T	C	L	G	R	M	I	C	T		
5-12.28						S	F	T	C	Y	G	R	L	T	C	A	P		
5-12.33		N	H	L	I	Q	C	T	G	R	L	T	C						

TABELLE 6.6

Phagotope Biopanning 17/03 (Patient MH02)																			
Name	Anzahl	Sequenz Insert											Alignment 3D gp120 a-Atom 7A_4er 20 %	Alignment 3D ohne Oberfläche gp 120, Tat, p24, RT, IN, PR, Nef					
Klon																			
Einzelne Klone																			
17-c.3								S	G	R	V	M	L	C					
17-c.4	Bx					A	C			S	G	R	L	T					
17-c.10										Y	G	R	L	M	C	S			
17-c.12										S	G	R	L	S	C	A			
17-c.14										T	G	R	L	L	C	V			
17-12.1								S	S	C	M	G	R	L	S	C	I	A	L
17-12.2								T	S	G	Q	G	R	L	H	C	S	V	M
17-12.4		Q	E	M	R	C	T	N	G	R	L	I	C						
KLIC	MH02	L	G	I	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	V	P	W	
17-c.1								T	D	F	S	R	L	M					max. 3
17-c.2	> BP05							S	P	T	H	V	L	A					max. 3
17-c.11								S	P	T	H	Q	L	M					max. 3
17-12.3			S	V	L	N	D	T	Q	L	L	A	L	W					max. 3

TABELLE 6.7

Phagotope Biopanning 10/03 (Patienten MH03)																			
Klon	Anzahl	Sequenz Insert											Alignment 3D gp120 a-Atom 7A_4er 20 %	Alignment 3D ohne Oberfläche gp 120, Tat, p24, RT, IN, PR, Nef					
Einzelne Klone																			
10-12.1	> BP5	L	S	P	Q	F	L	S	P	T	H	W	P						L122/125 S199 P124 T198 (V2)
10-c.2								L	S	P	T	L	H	F					L122/125 S199 P124 T198 (V2)
10-12.5					F	Q	R	S	P	T	H	W	Y	T	P				----
10-12.3	2							F	R	S	P	T	H	F	S	F	H	N	A
10-12.2					A	S	S	H	R	S	P	I	W	D	S	I			----
10-12.8		M	N	N	F	Q	Y	S	S	P	T	H	F						max. 3
10-7.5								K	G	I	Y	S	P	A					max. 3
10-7.4								T	S	Y	I	S	T	M					max. 3
10-7.2					A	A	L	A	R	P	D								----
10-c.1					E	P	L	R	N	Y	D								----
10-c.4					I	I	T	L	D	V	Q								max. 3
10-c.3					S	S	L	L	Y	H	K								max. 3
10-7.1					S	S	L	L	S	V	P								max. 3
10-7.3																			max. 3
KLIC	MH03	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	A	V	P	W	N	A	
10-7.6													T	S	A	V	P	A	
V3	MH03	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	K	A	F				
10-12.4						S	K	T	I	M	A	G	P	E	L	R	L		max. 3
10-12.6						W	I	Y	T	L	P	A	G	P	G	M			max. 3
10-12.7						M	E	Y	P	L	P	A	M	G	P	K	F		max. 3
10-12.0													G	F	G	N	M	P	A
10-c.5												S	Y	G	L	G	S	L	

TABELLE 6.11

Phagotope Biopanning 13/03, 14/03 und 20/04 (Patient MH07)																	
Name Klon	Anzahl	Sequenz Insert										Alignment 3D gp120 a-Atom 7A 4er 20 %	Alignment 3D ohne Oberfläche gp 120, Tat, p24, RT, IN, PR, Nef				
20-7.1	3	L	E	R	N	A	F	P	S	A	T	P	V	P	max. 3		
20-12.1		R	L	I	E	K	T	T	P	W	G	P		E267/268 K231 T232 - T240 T90 P238 (non-neutr.)			
20-12.8		G	A	T	P	W	N	A	T	P	M	S	L	max. 3			
13-12.6	2	G	H	L	E	E	W	R	L	M	M	G	A				
13-12.8		S	T	T	H	Y	T	A	W	H	M	L					
14-12.4		S	H	W	L	T	V	?	P	R	P	T	L				
V3	MH07	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G
20-12.2	3	K	S	L	H	Y	G	P	Y	R	T	S	L				
20-12.6		S	L	I	N	Y	T	T	G	P	W	P	E				
20-12.3		A	S	Q	H	I	P	L	D	L	A	F	P	max. 3			
20-12.4		N	K	T	I	H	T	G	S	T	A	F	F				
13-12.1		T	N	S	H	H	L	A	W	I	E	L	L				
13-12.2		T	I	P	W	H	V	G	P	G	R	L	Y	Q			
13-12.3	3	K	L	I	N	F	G	P	M	R	S	L	P				
13-12.5	4	N	K	M	I	H	T	G	P	T	R	A	W				
14-12.1	10	K	S	L	H	Y	G	P	Y	R	T	S	L				

TABELLE 6.12

Phagotope Biopanning 16/03 (Patient MH08)																			
Name Klon	Anzahl	Sequenz Insert										Alignment 3D gp120 a-Atom 7A 4er 20 %	Alignment 3D ohne Oberfläche gp 120, Tat, p24, RT, IN, PR, Nef						
KLIC	MH08	L	G	I	W	G	C	S	G	K	R	I	C	T	T	D	V	P	
16-12.1	16					M	C	Q	G	K	N	I	C	T	T	I	Q		
16-12.7	2				Y	S	C	T	G	K	T	I	C	Y	L	L			
16-12.16	2	Q	H	S	W	S	C	S	G	K	L	L	C						
Einzelne Klone																			
16-12.14	2	R	T	F	H	M	E	E	E	W	M	Y	I	max. 3					
16-12.23		W	H	H	V	E	E	E	W	M	Y	D	S	max. 3					
16-12.19		S	K	T	I	W	K	E	W	P	T	L	L	max. 3					

TABELLE 6.13

Phagotope Biopanning 12/03 (Patienten MH01-MH05)																			
Klon	Anzahl	Sequenz Insert										Alignment 3D gp120 a-Atom 7A 4er 20 %	Alignment 3D ohne Oberfläche gp 120, Tat, p24, RT, IN, PR, Nef						
12-c.1	> BP05 > BP10							S	P	T	H	A	P	M	P417 T415 H330 A299 (silent)				
12-c.2								P	G	P	V	P	P	M	max. 3				
12-12.1	> BP04					T	S	V	H	A	P	P	W	D	H	T	W	---	
12-12.11						A	T	S	Q	P	P	W	D	S	A	W	S	max. 3	
12-12.7		L	F	R	P	S	A	I	L	P	P	W	N	max. 3					
12-12.6		D	Y	F	P	R	S	Y	S	A	S	N	T	A129 S195 N197 T198					
12-12.9		T	A	T	P	D	L	T	L	Y	M	P	G	T283 A281 T455 - P369 D368 - L122 T198 L125					
12-12.2	> BP02 > BP03 > BP04	S	E	S	R	P	D	Y	S	P	P	W	L	max. 3					
12-12.3		A	R	S	P	D	Y	F	P	P	L	L	Q	max. 3					
12-12.4		D	Y	F	P	R	S	Y	D	P	P	L	L	F	Y	H	---		
V3	MH03	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I					
12-12.12					T	L	N	S	N	T	T	K	P	L	A	N460 S461 - N280 T455 T283 K282 N262 S447 N295 T297 (silent)			
12-12.10	> BP02 > BP04	A	N	P	F	N	N	N	A	I	P	W	S	max. 3					
12-12.5		K	T	Q	N	N	I	N	T	W	R	D	L	max. 3					

6.2 Abkürzungsverzeichnis

∞	unendlich
(d)dH ₂ O	(doppelt)-destilliertes Wasser
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
A	Absorption
Abb.	Abbildung
AIDS	Erworbene Immunschwäche (acquired immunodeficiency syndrome)
AP	Alkaline Phosphatase
bp	Basenpaare (base pairs)
BP	Biopanning
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cystein
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	Zähler pro Minute (counts per minute)
CXCR	CX-Chemokinrezeptor
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
dTMP	Desoxynukleotid-5'-Monophosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunosorbent-Assay (enzyme-linked immunosorbent assay)
F	Phenylalanin
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
G	Glycin
g	Gramm Zentrifugalkraft
gp120	Glycoprotein 120
gp41	Glycoprotein 41
H	Histidin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase (horse raddish peroxidase)
I	Isoleucin
IC	Inhibitionskonzentration (inhibition of concentration)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IgA	Immunglobulin A
IL	Interleukin
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl-Thio-β-D-Galaktopyranosid
IU	Internationale Einheiten (international units) Infektiöse Einheiten (infectious units)

K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Leucin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LIC	Ligase-unabhängige Klonierung (ligation independent cloning)
LTR	long terminal repeat
M	Methionin
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	Minimum essential Medium
mg	Mikrogramm
ml	Milliliter
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
MWCO	Ausschluss-Molekulargewicht (molecular weight cut off)
N	Asparagin
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OPD	<i>o</i> -Phenylendiamin-Dihydrochlorid
P	Prolin
p	Plasmid Wahrscheinlichkeit
PBMC	Periphere mononukleare Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
pfu	Plaque-formende Einheiten (plaque forming units)
PHA	Phytohämagglutinin
pmol	Picomol
PR	Protease
Q	Glutamin
R	Arginin
rLU	relative Lichteinheiten (relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Reverse Transkriptase
S	Serin
s	Sekunde(n)
ssDNA	Einzelstrang-DNA (single stranded DNA)
StAw	Standardabweichung
T	Threonin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Saline (tris buffered saline)
U	Einheiten (units)
UV	Ultraviolett
V	Valin Volt
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
Xgal	5-Brom-4-Chlor-Indolyl- β -D-Galaktosid
Y	Tyrosin

DANKSAGUNG

Der Beginn meiner Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Ursula Dietrich und die darauf folgende Doktorarbeit waren der Start in ein interessantes und abwechslungsreiches Thema: die Phage Display Methode, das menschliche Immunsystem und seine Antikörper, das HI Virus und die Suche nach geeigneten Impfstoffkomponenten. Die Arbeit im Georg-Speyer-Haus hat mir über all die Jahre sehr viel Spaß bereitet und Abwechslung gebracht. Für die fachliche Unterstützung, das tolle Projekt und die allseits gute Atmosphäre möchte ich mich ganz herzlich bei ihr bedanken.

Für die interne Betreuung meiner Doktorarbeit am Georg-Speyer-Haus möchte ich mich bei PD Dr. Hagen von Briesen und Prof. Dr. Winfried Wels bedanken. Ebenso bei Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Übernahme der Betreuung seitens der Fakultät.

Ein großes Dankeschön gilt auch allen (ehemaligen) Mitgliedern des Georg-Speyer-Hauses, sowie der Arbeitsgruppe Dietrich im besonderen. Die Arbeitsatmosphäre im Institut ist einmalig und jeder einzelne trägt zu einem schönen Alltag bei. Einen besonderen Dank richte ich an Margot Landersz für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe bei Problemen, sowie an Anette Pustowka für die gemeinsame Zeit im Labor und die Kaffeepausen außerhalb des GSH. Bei Sascha Antoni möchte ich mich für die Zusammenarbeit und die Fortführung des Projekts bedanken, bei Julia Dietz für die spaßige Zeit im Labor und bei Boris Brill, sowie Sabrina Kraemer für die große Unterstützung bei den Mäuseversuchen. Danke auch an Inka Seil für die ablenkende Unterhaltung während der langen Abende des Schreibens.

Ein herzliches Dankeschön an Alexander Koglin für den fachlichen Rat, die technische Unterstützung und die kompetente Hilfestellung bei Computerproblemen.

Die Zeit meiner Doktorarbeit mit den typischen, immer wieder auftretenden Problemen wäre ohne meine Familie nicht möglich gewesen. Daher geht der größte Dank an meine Eltern, meine Schwester und meine Oma: für die langjährige Hilfe, die moralische Unterstützung und dafür, dass mir immer wieder Mut gemacht wurde, wenn es mal nicht so gut lief. Für die abwechslungsreiche Auszeit in den USA ebenso vielen Dank.

LEBENS LAUF

Name: Humbert
Vorname: Michael
Adresse: Westring 26
76829 Landau in der Pfalz
Deutschland
eMail: mhumbi@gmx.de
Nationalität: Deutsch
Geburtsdatum: 30. Oktober 1975
Geburtsort: Landau in der Pfalz, Deutschland

Ausbildung

1982 - 1886 Grundschule Landau-Mitte (Landau/Pfalz)
1986 - 1995 Otto-Hahn-Gymnasium (Landau/Pfalz)
1996 - 2001 Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main, Deutschland
Diplomarbeit: „Bestimmung von Mimotopen HIV spezifischer Antikörper aus neutralisierenden Patientenseren durch Phage Display“
(Dr. Ursula Dietrich, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main, Deutschland)
2001 Abschluss: Dipl. Biochemiker (Note: sehr gut)
2001 - 2005 Doktorarbeit: „Identifizierung protektiver Antikörper-Mimotope aus Plasma gesunder HIV-Langzeitinfizierter durch Phage Display“
(Dr. Ursula Dietrich, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main, Deutschland)

Stipendien

2005 GlaxoSmithKline, Reisestipendium
Sanofi-Aventis, i[lab] award, Reisestipendium

Zivildienst

1995 - 1996 Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz (Landau/Pfalz)

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, 15.09.2005

M. Humbert

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Identifizierung protektiver Antikörper-Mimotope aus Plasma gesunder HIV-Langzeitinfizierter durch Phage Display“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, 15.09.2005

M. Humbert

Alltag ist nur durch Wunder erträglich.

Max Frisch (1911-1991)

Tagebuch 1946-1949, 1950