

**GEORG SPEYER HAUS**  
CHEMOTHERAPEUTISCHES FORSCHUNGSINSTITUT



# **Selektion und Analyse von Fusionsinhibitor-resistenten HIV-1-Varianten**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15  
Biowissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

von  
**Felix Günter Hermann**  
aus Bad Soden am Taunus

Frankfurt am Main, 2007  
(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften (15) der  
Johann Wolfgang Goethe–Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. R. Wittig

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Zweitgutachter: Prof. Dr. D. von Laer

Datum der Disputation: 18.10.2007

Für meine Eltern

# Danksagungen

Mein Dank gilt all jenen, die durch Ihre Anregungen und Unterstützung zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz danke ich für die schnelle und unkomplizierte Bereitschaft zur Übernahme der Betreuung und Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Frau Prof. Dr. Dorothee von Laer, die mir die Durchführung meiner Dissertation in ihrem Labor ermöglicht hat, danke ich sehr herzlich. Ihrer ständigen Diskussionsbereitschaft und intensiven wissenschaftlichen Betreuung ist es zu verdanken, dass diese Arbeit gelang. Ihr großes Engagement und ihr Arbeitspensum werden für mich auch in Zukunft vorbildlich sein. Für ihre fortwährende persönliche wie berufliche Förderung bin ich ihr zu großem Dank verpflichtet.

Dr. Matthias Dittmar und Dr. Sabine Lohrengel am Universitätsklinikum Heidelberg danke ich für die Bereitstellung der Virusisolate Ba-L\_wt und Ba-L\_sel\_MD und die freundliche Kooperation.

Mein spezieller Dank gilt den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Laer. Die stete Hilfsbereitschaft, die freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre der gesamten Arbeitsgruppe haben von Beginn an bedeutend zum Erfolg meiner Dissertation beigetragen. Für ihre Hilfe und Anregung bei wissenschaftlichen und technischen Fragestellungen bedanke ich mich insbesondere bei: Dr. Roland Zahn, Dr. Tsanan Giroglou, Sebastian Newrzela, Dr. Yvonne Fischer, Frances Brauer und Dr. Ingrid Müller. Für ihre tatkräftige Unterstützung bei molekularbiologischen und Zellkulturexperimenten möchte ich mich bei Tefik Merovci, Patricia Schult-Dietrich, Rosy Seyd und meinem Bruder, Fabian Hermann, bedanken.

Lisa Egerer danke ich besonders für den Rückhalt und das Korrekturlesen der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Georg Speyer Hauses bin ich für ihre Hilfsbereitschaft und das anregende wissenschaftliche Umfeld in Dank verbunden.

Bei meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich herzlich für ihre moralische Unterstützung, die mir immer wieder gezeigt hat, dass es noch eine Welt außerhalb des Labors gibt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Das erworbene Immundefizienzsyndrom (AIDS).....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Das humane Immundefizienzvirus (HIV).....</b>	<b>3</b>
2.2.1	Aufbau des Virus.....	3
2.2.2	Der virale Replikationszyklus .....	5
<b>2.3</b>	<b>Das HIV-1 Hüllprotein .....</b>	<b>6</b>
2.3.1	Die gp120-Untereinheit .....	7
2.3.2	Die gp41-Untereinheit .....	8
<b>2.4</b>	<b>Der HIV-Eintritt .....</b>	<b>9</b>
2.4.1	Rezeptor- und Corezeptorbindung.....	9
2.4.2	Der Fusionsprozess .....	9
<b>2.5</b>	<b>Inhibitoren des Viruseintritts .....</b>	<b>11</b>
2.5.1	Bindungsinhibitoren und Corezeptorantagonisten .....	11
2.5.2	Fusionsinhibitoren.....	12
<b>2.6</b>	<b>HIV-Gentherapie .....</b>	<b>14</b>
2.6.1	Antivirale Gene .....	15
2.6.2	Retrovirale Vektoren in der Gentherapie.....	16
2.6.3	HIV-Gentherapie mit membranständigen Fusionsinhibitoren.....	17
<b>2.7</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Laborchemikalien .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Lösungen, Puffer und Kulturmedien.....</b>	<b>22</b>

<b>3.3</b>	<b>Antikörper .....</b>	<b>25</b>
3.3.1	Primärantikörper .....	25
3.3.2	Sekundärantikörper.....	25
<b>3.4</b>	<b>Material für Zellkulturarbeiten .....</b>	<b>25</b>
3.4.1	Medien und Zusätze .....	25
3.4.2	Zelllinien.....	26
3.4.3	Verwendete HIV-1 Stämme .....	27
3.4.4	HIV-Eintrittsinhibitoren .....	27
<b>3.5</b>	<b>Material für molekularbiologische Arbeiten .....</b>	<b>28</b>
3.5.1	Bakterien.....	28
3.5.2	Plasmide .....	28
3.5.3	Retrovirale Vektoren .....	29
3.5.4	Oligonukleotide .....	29
3.5.4.1	PCR-Oligonukleotide .....	29
3.5.4.2	Sequenzierungsoligonukleotide .....	30
3.5.5	Enzyme und DNA Größenstandards.....	31
<b>3.6</b>	<b>Durchflusszytometrie-Beads .....</b>	<b>31</b>
<b>3.7</b>	<b>Geräte und Labormaterial .....</b>	<b>32</b>
3.7.1	Geräte.....	32
3.7.2	Labormaterial .....	33
3.7.3	Kits.....	34
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>35</b>
4.1.1	Kulturbedingungen von <i>E. coli</i> .....	35
4.1.2	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> .....	35
4.1.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	35
4.1.4	Lagerung von <i>E. coli</i> .....	36
<b>4.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>36</b>
4.2.1	Plasmidpräparationen .....	36

4.2.1.1	Analytische Plasmidpräparation.....	36
4.2.1.2	Großpräparation.....	36
4.2.2	Isolierung von viraler RNA aus Zellkulturüberständen .....	37
4.2.3	Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription.....	37
4.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	37
4.2.4.1	<i>Nested</i> PCR.....	38
4.2.4.2	Gerichtete Mutagenesereaktion .....	39
4.2.5	Restriktionshydrolyse von DNA.....	40
4.2.6	Modifikation von DNA-Enden .....	40
4.2.6.1	Verwendung des Klenow-Fragments .....	40
4.2.6.2	Verwendung der T4-DNA-Polymerase.....	40
4.2.6.3	Synthese von 3'-Adenosinüberhängen an PCR-Produkten .....	41
4.2.6.4	Eliminierung der 5'-Phosphatreste an linearisierter DNA.....	41
4.2.6.5	Phosphorylierung der 5'-DNA-Enden.....	42
4.2.7	Gelelektrophorese von DNA .....	42
4.2.8	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	42
4.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	43
4.2.9.1	Ligation des pCR-XL-TOPO-Vektors mit DNA-Fragmenten .....	43
4.2.9.2	DNA-Ligation mit der T4-DNA-Ligase .....	43
4.2.10	DNA-Sequenzierung .....	43
<b>4.3</b>	<b>Methoden der Zellkultur .....</b>	<b>44</b>
4.3.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen .....	44
4.3.2	Passagieren von Zellen .....	44
4.3.2.1	Passagieren von Suspensionszellen .....	44
4.3.2.2	Passagieren von adhärennten Zellen .....	44
4.3.3	Anlegen von Kryokulturen.....	45
4.3.4	Isolierung von PBMC aus Blut .....	45
4.3.5	Transiente Transfektion .....	45
4.3.5.1	Herstellung von $\gamma$ -retroviralen und lentiviralen Vektoren .....	45
4.3.6	Konzentration lentiviraler Überstände durch Ultrazentrifugieren.....	46
4.3.7	Transduktion von Zelllinien mit retroviralen Vektoren .....	47
4.3.7.1	Titration von lentiviralen Vektoren.....	47
4.3.7.2	Bestimmung der Fusionsgeschwindigkeit lentiviraler Vektoren.....	48
4.3.8	Selektion von transduzierten Zellen .....	48

4.3.9	Bestimmung der Sensibilität der lentiviralen Vektoren gegenüber Eintrittsinhibitoren .....	48
4.3.10	Bestimmung des Corezeptortropismus von lentiviralen Vektoren .....	49
4.3.11	Luminometrie .....	49
4.3.12	Durchflusszytometrie .....	50
4.3.12.1	Durchflusszytometrische Detektion verschiedener zellulärer Marker.....	50
4.3.12.2	Quantifizierung der Expression von Zelloberflächenmolekülen.....	51
4.3.12.3	FACS-Sortierung.....	52
<b>4.4</b>	<b>Virologische Methoden .....</b>	<b>53</b>
4.4.1	Vermehrung von Viren .....	53
4.4.2	HIV-Titerbestimmung .....	53
4.4.3	<i>In vitro</i> Selektion von maC46-resistentem HIV-1 .....	54
4.4.4	<i>In vitro</i> Infektionsversuche mit HIV-1 .....	54
<b>4.5</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>55</b>
4.5.1	p24-Antigen-ELISA .....	55
4.5.2	Konjugation von Antikörpern mit FITC oder Biotin .....	55
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Strategie zur Selektion von maC46-resistentem HIV-1 .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2</b>	<b>Quantifizierung der Oberflächenproteinexpression.....</b>	<b>56</b>
5.2.1	Quantifizierung der CD4-Expression auf peripheren Blutlymphozyten .....	57
5.2.2	Quantifizierung der maC-Peptidexpression auf transduzierten PM-1 Zellen.....	58
<b>5.3</b>	<b>Die antivirale Aktivität des membrangebundenen maC46-Peptids ist proportional zu dessen Expression.....</b>	<b>61</b>
<b>5.4</b>	<b>Selektion von maC46-resistentem HIV-1 .....</b>	<b>63</b>
<b>5.5</b>	<b>Charakterisierung der selektierten HIV-1 Isolate.....</b>	<b>65</b>
5.5.1	Genotypische Analyse der HIV Ba-L_FH1, HIV Ba-L_FH2 und HIV NL4-3_FH Env-Gene .....	65



5.5.2	Phänotypische Analyse des selektierten HIV Ba-L-Isolats.....	68
5.5.2.1	Untersuchung des Isolats HIV Ba-L_FH1 auf maC46-Resistenz .....	68
5.5.2.2	Die Mutationen im HIV Ba-L_FH1-Env-Gen sind verantwortlich für die verminderte maC46-Sensibilität .....	70
5.5.2.3	Die maC46-Resistenz wird hauptsächlich durch zwei Mutation hervorgerufen.....	71
5.5.2.4	Der Corezeptortropismus des HIV Ba-L_FH1 Env ist unverändert .....	73
5.5.2.5	Das Isolat HIV Ba-L_FH1 zeigt eine erhöhte Eintrittskinetik .....	74
5.5.2.6	Die Mutationen des Ba-L_FH1-Hüllproteins erzeugen eine Kreuzresistenz gegenüber dem HIV-neutralisierenden Antikörper 2F5.....	79
5.5.2.7	Die Hüllproteine HIV Ba-L_FH1 und HIV Ba-L_FH2 haben eine reduzierte Corezeptoraffinität.....	81
5.5.2.8	Die T-20-Sensibilität des HIV Ba-L_FH1/2 Env ist durch die Mutationen unbeeinflusst.....	84
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
<b>6.1</b>	<b>maC46-Expression bestimmt die Effizienz der Eintrittshemmung.....</b>	<b>87</b>
<b>6.2</b>	<b>maC46-exprimierende T-Zelllinien als System zur Selektion resistenter Viren.....</b>	<b>88</b>
<b>6.3</b>	<b>Konservierte Aminosäurepositionen sind von den Resistenzmutationen betroffen .....</b>	<b>90</b>
<b>6.4</b>	<b>Der Resistenzmechanismus .....</b>	<b>91</b>
6.4.1	Kompetition zwischen maC46 und dem natürlichen Liganden der HR1 .....	92
6.4.2	Veränderung der Fusionskinetik .....	95
6.4.3	Unterschiedlicher Effekt der Resistenzmutationen auf lösliche und membranständige C-Peptide .....	97
<b>6.5</b>	<b>Corezeptoraffinität und -tropismus der Ba-L-Isolate.....</b>	<b>98</b>
<b>6.6</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>99</b>

<b>7</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>112</b>
<b>8.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>112</b>
<b>8.2</b>	<b>Einbuchstabencode für Aminosäuren .....</b>	<b>114</b>
<b>8.3</b>	<b>Vergleich der Hüllproteinsequenzen.....</b>	<b>115</b>
<b>8.4</b>	<b>Klonierungen .....</b>	<b>118</b>
8.4.1	Klonierung der Expressionsplasmide M749 (Ba-L_wt), M750 (Ba-L_FH1) und M759 (Ba-L_sel_MD) .....	119
8.4.2	Herstellung des Konstrukts Ba-L_MD_C3 (M776) .....	120
8.4.3	Herstellung des Konstrukts Ba-L_MD_579T (M777).....	120
8.4.4	Herstellung des Konstrukts Ba-L_MD_556I (M778).....	121
8.4.5	Herstellung des Konstrukts Ba-L_FH2 (M779).....	121
8.4.6	Herstellung des Konstrukts Ba-L_MD_V2 (M772) .....	122
8.4.7	Herstellung des Konstrukts Ba-L_MD_V3 (M773) .....	123
8.4.8	Herstellung des Konstrukts Ba-L_MD_V2+V3+C3 (M782) .....	124
8.4.9	Herstellung des Konstrukts Ba-L_MD_V2+V3 (M783) .....	125
8.4.10	Herstellung des Konstrukts Ba-L_MD_gp41_N-HR (M789).....	126
8.4.11	Herstellung des Konstrukts Ba-L_MD_V3+556I (M798) .....	127
<b>8.5</b>	<b>Plasmidkarten .....</b>	<b>128</b>
<b>8.6</b>	<b>Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Vorträge .....</b>	<b>137</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>138</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>139</b>

# 1 Zusammenfassung

Seit der Einführung der antiretroviralen Therapie (HAART) ist die Mortalität von HIV-Infizierten in der westlichen Welt zwar deutlich zurückgegangen, die HIV-Infektion ist jedoch bis heute nicht heilbar. Die derzeitige Therapie unterdrückt zwar sehr effektiv die Virusreplikation, kann aber nicht das Virus vollständig eliminieren und somit die Infizierten nicht heilen. Die daher notwendige Langzeitbehandlung wird wiederum durch die relativ hohe Toxizität der Medikamente und durch das Auftreten resistenter Virusvarianten limitiert. Die Suche nach neuen Therapienansätzen und Wirkstoffklassen ist daher immer noch von größter Wichtigkeit.

Die HIV-Gentherapie stellt neben der konventionellen antiretroviralen Therapie eine mögliche zusätzliche Behandlungsform dar. Die Arbeitsgruppe von Laer hat am Georg-Speyer-Haus retrovirale Vektoren entwickelt, die membrangebundene (ma) HIV-Eintrittsinhibitoren, sog. C-Peptide, kodieren. Das durch den Prototyp-Vektor M87 kodierte maC36-Peptid zeigte eine moderate Inhibition des Viruseintritts. In einem Optimierungsprozess wurde der Vektor M87o generiert. M87o kodiert im Vergleich zu M87 ein wirksameres maC-Peptid (maC46) und weist auch eine wesentlich höhere Expressionsstärke und dadurch eine stärkere inhibitorische Wirkung als der Prototypvektor auf.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, HIV-Varianten, die resistent gegenüber dem M87o-Genprodukt maC46 sind, *in vitro* zu generieren und anschließend den Resistenzmechanismus aufzuklären. In einer Kollaboration mit der Gruppe um M. Dittmar aus Heidelberg war durch Passage des HIV-1 Wildtyp (wt) Ba-L-Isolats auf M87-transduzierten Zellen bereits das maC36-resistente Virusisolat Ba-L\_sel\_MD generiert worden. Ba-L\_sel\_MD wies zwei Resistenzmutationen in der gp41-Untereinheit des Hüllproteins auf: I556V (*heptad repeat 1* Region) und N634K (*heptad repeat 2* Region). Für die Mutation 634K war dabei gezeigt worden, dass sie auch zu einer leichten Reduktion der maC46-Sensibilität führt. In der vorliegenden Arbeit diente Ba-L\_sel\_MD als Ausgang für die Selektion einer Virusvariante mit deutlich verminderter Sensibilität gegenüber maC46. Hierfür wurde Ba-L\_sel\_MD über 149 Tage lang auf Zellen mit steigender maC46-Expressionshöhe passagiert und so das Isolat Ba-L\_FH1 generiert. Das Hüllprotein des selektierten Isolats war ausreichend, um einen maC46-resistenten Phänotyp hervorzurufen. Das selektierte Hüllprotein war im Vergleich zu dem Ausgangsisolat ca. fünf- bis zehnfach weniger empfindlich gegenüber maC46. Die Sequenzierung des Ba-L\_FH1 Hüllproteingens zeigte, dass die Aminosäureausprägung an Position 634 des Ausgangsisolats (BaLsel\_MD) konserviert worden war, während die Position 556 zur Wildtypsequenz revertiert war. Darüber hinaus wurden drei Mutationen in der gp120-Untereinheit des Hüllproteins (V2-Region (I187T), V3-Region (N305Y), C3-Region (E352K)), sowie eine Mutation in der *heptad repeat 1* Region (A579T) der gp41-Untereinheit identifiziert.

Für die reduzierte maC46-Empfindlichkeit waren in erster Linie die Mutation N305Y in der V3-Region und die Rückmutation 556I in Zusammenarbeit mit der bereits vorhandenen Mutation 634K verantwortlich. Die verbleibenden Mutationen hatten allenfalls modulierende Wirkung auf die maC46-Sensibilität. Die Resistenz ist vermutlich auf die beobachtete erhöhte Fusionsgeschwindigkeit des Hüllproteins von Ba-L\_FH1 im Vergleich zum Ausgangsisolat zurückzuführen, die interessanterweise mit einer reduzierten Corezeptoraffinität verknüpft war. Die erhöhte Fusionsgeschwindigkeit verkürzt das zeitliche Fenster, in welchem maC46 an seine Zielstruktur innerhalb des gp41 binden kann. Es scheinen zwei unterschiedliche Phasen des Eintrittsprozesses durch die Mutationen verändert worden zu sein. Die Mutation in der V3-Region (N305Y) der gp120-Untereinheit beschleunigt wohl eine frühe Phase. Vermutlich ermöglicht diese Mutation, dass bestimmte Übergangszustände nach der Corezeptorbindung schneller durchlaufen werden können, indem die gp120/Corezeptorbindung destabilisiert wird. Die Rückmutation 556I beschleunigt wahrscheinlich in Zusammenspiel mit der bereits vorhandenen Mutation 634K die Ausbildung des 6-Helixbündels. Diese beiden Mutationen wirken somit auf eine späte Phase der Fusion.

Obwohl bekannt ist, dass natürliche Variationen in gp120 die Sensibilität des HIV-Hüllproteins gegenüber C-Peptiden beeinflussen, konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass solche Mutationen auch *in vitro* selektiert werden, um eine C-Peptidresistenz herbeizuführen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das erworbene Immundefizienzsyndrom (AIDS)

Das erworbene Immunschwächesyndrom (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS) wurde zum ersten Mal 1981 beschrieben: Eine Gruppe von zuvor gesunden homosexuellen Männern war an dem sehr seltenen Kaposi-Sarkom erkrankt. Ferner litten diese Patienten unter opportunistischen Pilzinfektionen, ausgelöst durch *Pneumocystis carinii* (2, 3). Opportunistische Erreger sind im Allgemeinen nicht in der Lage, immunkompetente Menschen zu infizieren, und führen daher nur selten zu Erkrankungen. Bei Menschen mit eingeschränkter Immunfunktion lösen sie jedoch schwere Infektionen aus.

Es zeigte sich recht schnell, dass AIDS die Folge einer Störung der zellulären Immunabwehr ist, die sich durch eine stark verminderte Zahl von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Blut der Betroffenen auszeichnet (60, 108). Als Erreger von AIDS und Ursache für diese Dezimierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde schließlich 1983-1984 durch die Arbeitsgruppen von Luc Montagnier und Robert C. Gallo das Retrovirus HIV-1 (*human immunodeficiency virus type 1*) identifiziert (12).

Die HIV-1-Infektion breitete sich in den letzten zwei Jahrzehnten über den gesamten Globus aus, so dass heute über 40 Millionen Menschen weltweit mit dem Virus infiziert sind. Insbesondere in Ländern der Dritten Welt, allen voran im Süden Afrikas, in Indien, Südostasien und Südamerika hat sich die Infektion zu einer Pandemie entwickelt (163).

### 2.2 Das humane Immundefizienzvirus (HIV)

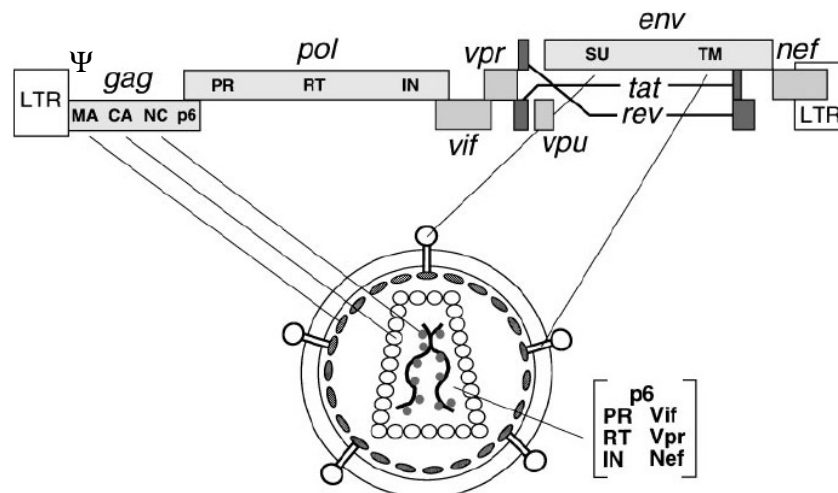
#### 2.2.1 Aufbau des Virus

HIV-1 gehört zur Gruppe der Retroviren und ist der Gattung der Lentiviren zugeordnet. Das Virus hat ein einzelsträngiges lineares ca. 9,8kb großes (+)-Strang-RNA-Genom, das alle Merkmale eukaryotischer mRNA aufweist (5'-Cap, 3'-Polyadenylierung). Insgesamt kodiert das Genom 15 Proteine (50). In drei offenen Leserahmen werden die für alle Retroviren typischen Polyproteine Gag (gruppenspezifische Antigene), Pol (enzymatische Aktivitäten) und Env (Hüllprotein) kodiert. Die Polyproteine werden zu neun funktionellen Proteine prozessiert. Darüber hinaus verfügt HIV über zwei regulatorische Proteine (Tat und Rev), die in jeweils eigenen Leserahmen kodiert werden und die virale Genexpression steuern. Des Weiteren sind vier sog. akzessorische Proteine (Vif, Vpr, Vpu und Nef) im HIV-Genom kodiert.

Diese sind nicht von essentieller Bedeutung für die Replikation des Virus *in vitro*, erhöhen jedoch die Virulenz *in vivo*.

Die kodierenden Bereiche des RNA-Genoms werden von cis-aktiven Regulatorsequenzen flankiert. Diese Elemente steuern zum einen die Reverse Transkription und Integration der viralen Erbinformation in das Genom der Zielzelle. Darüber enthalten diese Bereiche den viralen Promotor und bewirken die Inkorporation des Genoms in den viralen Partikel (**Abbildung 2-1**).

Das Virus hat einen Durchmesser von ca. 100nm und ist von einer Lipidmembran umhüllt. Die Virale Membran leitet sich von der Zellmembran ab und trägt neben zellulären Proteinen auch das trimeren Hüllprotein des Virus (124). Das Hüllprotein besteht aus einer Transmembranuntereinheit (TM, gp41), die nicht kovalent mit einer Oberflächeneinheiten (SU, gp120) verbunden ist. Das Matrixprotein (MA, p17) ist über einen Meristylrest mit der Innenseite der viralen Membran verbunden. Der Kern des Viruspartikels bildet das konisch geformte Kapsid, welches aus durch Zusammenlagerung einer Vielzahl von Kapsidproteinen (CA, p24) aufgebaut wird. Das Kapsid umgibt zwei Kopien des viralen Genoms, welche wiederum mit dem Nukleokapsidprotein (NC, p7) komplexiert vorliegen. Des Weiteren befinden sich auch die viralen Enzyme innerhalb des Kapsids: Reverse Transkriptase (RT, p51/66), Integrase (IN, p32) und Protease (PR, p11) (58). Ferner findet sich das virale p6-Protein, welches die Inkorporation von Vpr in das Partikel ermöglicht, in dem Kapsid.



**Abbildung 2-1 Übersicht der Genom- und Proteinorganisation von HIV-1 (Nach Frankel et al. (50)). Die Beschreibung der Elemente ist im Text zu finden.**

### 2.2.2 Der virale Replikationszyklus

Der HIV-Replikationsprozess (Übersichtsartikel: (50)) beginnt mit dem Eintritt des Virus in die Zelle. Mithilfe seines Hüllproteins Env bindet HIV an die Zielzelle. Konformationelle Veränderungen in Env führen zur Fusion der viralen Lipidhülle mit der Zellmembran. Dadurch gelangt das Viruskapsid in das Zytoplasma. Die virale RNA wird nun mithilfe der Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben. Der Prozess der Reversen Transkription führt zur Duplikation der Regulatorelemente an beiden Enden des viralen Genoms, diese Wiederholungseinheiten werden als LTR bezeichnet (*long terminal repeats*) (27). Die neu generierte DNA wird in den Kern transportiert. Dort inseriert die Intergrase die virale DNA in das Genom der Zielzelle (150). Die Integration ist Voraussetzung für die virale Genexpression. In den frühen Phasen der Genexpression werden zum überwiegenden Teil mehrfach gespleißte mRNA-Moleküle gebildet, die Tat, Rev und Nef kodieren. Der Elongationsfaktor Tat steigert die Transkriptionseffizienz der viralen Gene. Das Rev-Protein ist notwendig, um den Übergang von der frühen zur späten Phase der viralen Genexpression zu steuern. Rev ermöglicht den effizienten Transport von einfach- oder ungespleißten mRNA-Molekülen aus dem Kern, indem es an ein bestimmtes Sequenzelement innerhalb des Env-Gens, das *Rev responsive element* (RRE), bindet (106, 181). Von den einfach gespleißten RNA-Spezies werden Env, Vif, Vpu und Vpr translatiert. Die Synthese des Env-Proteins erfolgt an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Das Protein wird cotranslational in das ER eingeschleust und gelangt letztlich als membranständiges Protein auf die Zellmembran.

Die ungespleißten RNA-Moleküle dienen zum einen als virale RNA-Genome, die in neue Viruspartikel verpackt werden können. Zum anderen werden von ihnen auch die Polyproteine Gag und Gag/Pol translatiert. Für die Translation des Gag/Pol-Polyproteins muss eine Verschiebung des Leserahmens während der ribosomalen Synthese des Gag-Proteins erfolgen. Die mRNA-Sequenz des Gag/Pol-Gens enthält eine uridinreiche Region, die eine ausgeprägte Sekundärstruktur bildet und den Translationsprozess stört. Gelegentlich kommt es dadurch während der Translation zu einem (-1)-Leserasterschub und zum Überlesen des Gag-Stopcodons, wodurch dann ein Gag/Pol-Fusionsprotein entsteht. Die Gag- und Gag/Pol-Proteine werden an die Zellmembran gebracht, wo sie mit dem Env-Protein Komplexe bilden. Hier erfolgt die Morphogenese der infektiösen Virionen.

Die ungespleißte genomische RNA trägt in der *leader*-Region zwischen LTR und den Gag-Gensequenz das sog. Verpackungssignal ( $\Psi$ ). Durch Interaktion von  $\Psi$  mit den Gag- und Gag/Pol-Proteinen wird die virale RNA in das Partikel aufgenommen. Während dieses Prozesses stülpt sich das Partikel nach außen und schnürt sich im Weiteren von der Plasmamembran ab. Im Inneren dieses noch unreifen Viruspartikels erfolgt nun die autokatalytische Prozessierung des Gag/Pol-Proteins, wobei Protease, Reverse Transkriptase

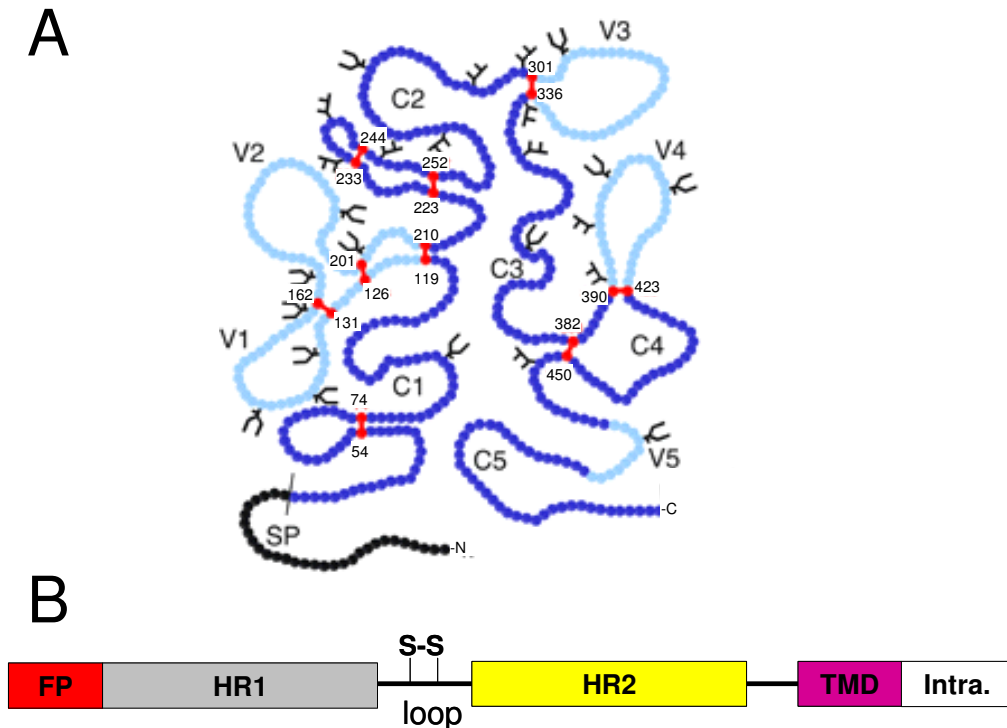
und Integrase entstehen. Die Protease prozessiert ferner die Gag-Proteine und generiert so die Strukturproteine des Virus. Der Vorgang wird als Reifung bezeichnet. Die reifen Partikel sind nun in der Lage erneut den Replikationszyklus zu durchlaufen.

### **2.3 Das HIV-1 Hüllprotein**

In der Lipidhülle des HIV-Partikels befindet sich das Glykoprotein Env. Die Aufgabe des Hüllproteins besteht darin, den ersten Schritt des viralen Replikationszyklus durchzuführen, d.h. Env bewirkt die Bindung des Virus an die Zielzelle über zelluläre Oberflächenrezeptoren (CD4 und ein Chemokinrezeptor) und katalysiert die Verschmelzung der Viruslipidhülle mit der Zellmembran.

Env wird durch die Proteinsynthesemaschinerie der infizierten Zelle als ein unreifes Vorläuferprotein synthetisiert, welches als gp160 bezeichnet wird. Es wird cotranslational mithilfe eines N-terminalen Signalpeptids in das endoplasmatische Retikulum (ER) eingeschleust und durch ein Stop-Transfersignal in der Membran verankert. Während des Transports durch das ER und den Golgi-Apparat wird das Hüllprotein sowohl N- als auch O-glykosyliert, ferner werden intramolekulare Disulfidbrücken ausgebildet und es findet eine Oligomerisierung des Proteins statt (44). Nach Verlassen des Trans-Golgi-Netzwerks (80) spaltet die zelluläre Protease Furin (65) das Hüllprotein in zwei Untereinheiten und überführt es so in seine funktionell aktive Konfiguration. Die äußere Oberflächenuntereinheit (gp120) und die Transmembranuntereinheit (gp41) bleiben jedoch nicht-kovalent verbunden und bilden einen metastabilen Komplex. In der viralen Membran liegt das Hüllprotein als Trimer vor, das aus je drei Oberflächen- und drei Transmembranuntereinheiten besteht (183).





**Abbildung 2-2 Schematische Darstellung des HIV-Hüllproteins** (A) Die gp120-Untereinheit des Isolats HIV-1 LAI. Das N-terminale Signalpeptid (SP) ist schwarz hervorgehoben. Die variablen Regionen (V1-V5) sind hellblau, die konstanten Regionen (C1-C5) dunkelblau dargestellt. Die Nummerierung bezeichnet Cysteinreste, welche intramolekulare Disulfidbrücken (rot) bilden. N-Glykosylierungsstellen sind als verästelte Struktur hervorgehoben. (B) Die gp41-Untereinheit trägt ein N-Terminales Fusionspeptid (FP), daran schließen sich die beiden heptad repeat-Regionen (HR1 und HR2) an. Das Protein ist durch eine Transmembrandomäne (TMD) in der Lipidmembran des Virus integriert und trägt einen C-Terminalen zytoplasmatischen Schwanz (Intra.). intramolekulare Disulfidbrücke in der immundominanten Schleifenregion (loop) zwischen HR1 und HR2 (S-S).

### 2.3.1 Die gp120-Untereinheit

Mithilfe des Oberflächenproteins gp120 bindet HIV-1 spezifisch an seine Zielzelle. Die Env-Untereinheit gp120 umfasst je nach HIV-Variante ca. 470-500 AS. Durch den Vergleich verschiedener HIV-1 Isolate konnten auf Ebene der Primärstruktur des gp120 fünf konservierte Sequenzbereiche (C1-C5) identifiziert werden, die durch jeweils fünf variable Regionen (V1-V5) voneinander getrennt sind (156). Die variablen Regionen V1-V4 bestehen bilden Schleifen (loops), deren Stämme durch Disulfidbrücken stabilisiert werden (94) (**Abbildung 2-2 A**).

Die Kristallstrukturen, die derzeit für gp120 zur Verfügung stehen, zeigen, dass das Protein in eine sog. innere und eine äußere globuläre Domäne unterteilt ist, die über ein viersträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt (bridging sheet) mit einander verbunden sind. Alle drei Strukturelemente tragen zur CD4- und Corezeptorbindung bei (89, 139). Zur Kristallisation wurden trunkierte und deglykosylierte monomere gp120-Varianten verwendet, so dass keine Informationen zur 3D-Struktur der V1/V2-Region und über den N- und C-Terminus von gp120

vorliegen (75, 89). Antikörperbindungsstudien sprechen jedoch dafür, dass die variablen Schleifen nach außen gerichtet sind und somit einen Kern aus konservierten Regionen umgeben (117).

Die gp120-Untereinheit weist ca. 25 Glykosylierungsstellen auf, wobei die Kohlenhydrat-einheiten fast 50% zu ihrem Molekulargewicht beitragen (94). Besonders die variablen Schleifen, sowie die von außen zugänglichen konservierten Bereiche, sind stark glykosyliert (176). Die Glykosylierungen sind zum Teil während der Reifung des Proteins im ER erforderlich, um eine korrekte Faltung zu ermöglichen (96). Des Weiteren verbergen die Zuckerreste auch mögliche antigene Strukturen des viralen Hüllproteins vor dem Immunsystem des Wirtsorganismus und helfen dem Virus so, einer Immunantwort zu entgehen. Die Oberflächenglykosylierung wird in diesem Falle auch als Glykanschild bezeichnet (168, 176).

### 2.3.2 Die gp41-Untereinheit

Die Aufgabe von gp41 besteht in der Vermittlung der Fusion von viraler Lipidhülle und der Zellmembran. Das Protein ist in seiner Organisation dem Influenza Hüllprotein Hämagglutinin (174); dem Prototyp eines sog. Klasse I Fusionsproteins, sehr ähnlich (45) (**Abbildung 2-2 B**): Am N-Terminus des gp41, in direkter Nähe zur gp160-Spaltstelle, befindet sich ein Fusionspeptid, das aus 23 hydrophoben Aminosäuren besteht. Es interagiert während des Fusionsprozesses mit der Membran der Zielzelle. An das Fusionspeptid schließen sich zwei amphipathische  $\alpha$ -helikale Sequenzbereiche an, die durch eine immundominante Schleife (*loop*) voneinander getrennt sind und als *heptad repeat* Region (HR) 1 und 2 (bzw. N- und C-*heptad repeat*) bezeichnet werden. Die Funktionen der HR1 innerhalb des Hüllproteins sind vielfältiger Natur. So lagern sich HR1- und HR2-Regionen eines Env-Trimers während des Fusionsprozesses zu dem sog. 6-Helixbündel (6-HB) zusammen. Die Ausbildung des 6-HB ist der entscheidende Vorgang, der die Fusion von Virushülle und Zellmembran katalysiert (110). Ferner bewirkt die HR1 auch die Oligomerisierung des HIV-Hüllproteins, indem sich die HR1-Helices von jeweils drei Env-Proteinen zu einer dreisträngigen *coiled coil* zusammenlagern und so den Kern eines Env-Trimers bilden (26, 132, 133). Darüber hinaus wird der Komplex aus gp41 und gp120 mithilfe der HR1 und der immundominanten Schleife (*loop*) stabilisiert (20, 77, 128, 180). Beide gp41-Sequenzbereiche interagieren mit der inneren Domäne der gp120-Untereinheit. Sowohl der N- als auch der C-Terminus von gp120 befinden sich in dieser Domäne und scheinen für die Assoziation mit gp41 essentiell zu sein. (67, 89, 177).

gp41 ist durch eine Transmembrandomäne in der viralen Membran verankert, an welche sich ein ungewöhnlich großer zytoplasmatischer Schwanz anschließt. Dieser interagiert mit dem

HIV-Matrixprotein und ermöglicht dadurch die Inkorporation des Hüllproteins in das Viruspartikel (51).

## 2.4 Der HIV-Eintritt

### 2.4.1 Rezeptor- und Corezeptorbindung

Durch die Bindung von gp120 an den zellulären CD4-Oberflächenrezeptor wird der Eintrittsprozess eingeleitet, der nach mehreren konformationellen Umlagerungen schließlich zur Bildung des 6-HB und zur Fusion der viralen Lipidhülle mit der Zellmembran führt.

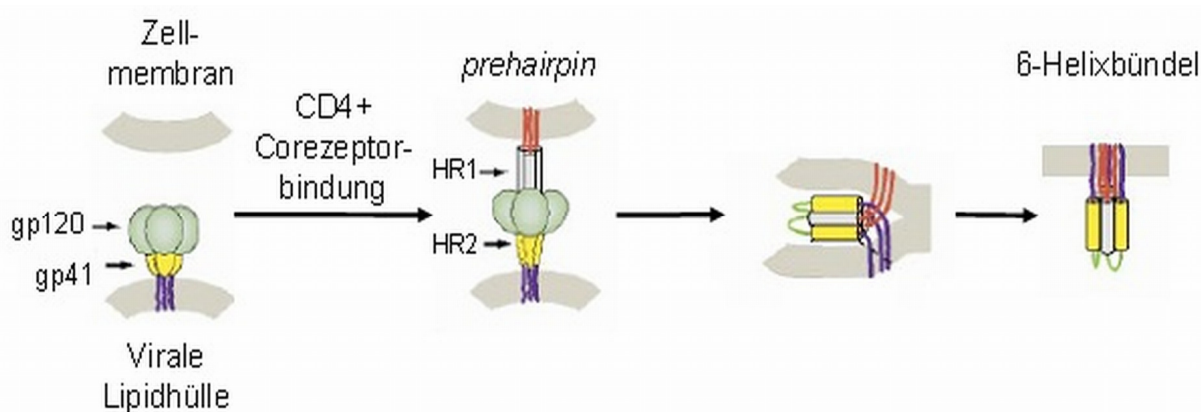
CD4 bindet in einen Bereich zwischen der inneren und der äußeren Domäne der gp120-Untereinheit. Durch die Bindung entsteht eine bei vielen HIV-1 Isolaten konservierte Vertiefung, die keine Glykosylierungen trägt (32, 89, 176). Die V1/V2-Schleife verdeckt im nativen Hüllprotein die konservierten Bereiche des gp120, die sowohl für die CD4- (176) als auch für die Corezeptorbindung (139) wichtig sind. Die CD4-Bindung induziert Umlagerungen in der V1/V2-Schleife und ermöglicht im Folgenden die Bindung an den Corezeptor. Als Corezeptor dienen HIV G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren. Die meisten HIV-1 Isolate verwenden CCR5 (6), CXCR4 (48) oder beide Rezeptoren für den Eintritt in ihre Zielzelle (13). Darüber hinaus sind auch CCR3, CCR2b, STRL33, GPR15, GPR1, CCR8 und US28 als HIV Corezeptoren beschrieben worden (Übersicht in: (15, 40)). Der Corezeptortropismus eines HIV-1 Isolats wird in erster Linie durch die Sequenz der V3-Region bestimmt. Es sind jedoch auch konservierte Reste der äußeren Domäne und des *bridging sheets* an der Corezeptorbindung beteiligt (76, 139, 175). Die Bindung an den Corezeptor schwächt die Interaktion zwischen gp120 und gp41. Dadurch löst sich bei einigen (zellkulturadaptierten) Isolaten während des Fusionsprozesses die gp120-Untereinheit von gp41 (*shedding*) (114).

### 2.4.2 Der Fusionsprozess

gp41 katalysiert die Fusion zwischen der viralen Lipidhülle und der Zellmembran. Es liegt bis heute keine Kristallstruktur der nativen Konfiguration der gp41-Untereinheit vor und auch von der Postfusionsstruktur konnte bisher lediglich ein Fragment, das 6-HB, kristallisiert werden (26, 158, 169). Auf Grundlage des sehr gut untersuchten Influenzavirus Hüllproteins Hämagglutinin konnte jedoch ein tragfähiges Modell des HIV-Eintritts erstellt werden (14, 19, 33). Man geht davon aus, dass gp41 in zwei Konformationen vorliegt: Das gp41-Trimer wird durch die Interaktion mit gp120 zunächst in einem metastabilen Zustand gehalten (native Konformation) (30, 45). In diesem Zustand wird der größte Teil der gp41-Oberfläche durch

gp120 abgeschirmt. Die Bindung von gp120 an CD4 und den Corezeptor induziert jedoch konformationelle Veränderungen in gp41 (144) und ermöglicht gp41 so die thermodynamisch günstigere Konformation des 6-HBs (fusogene Konformation) anzunehmen und die Membranfusion zu bewerkstelligen (110, 112) (**Abbildung 2-3**).

Die Bindung von CD4 und Corezeptor durch gp120 löst konformationelle Änderungen in gp41 aus. Dabei wird das N-terminale Fusionspeptid des gp41-Trimers in die Membran der Zielzelle inseriert. Der N-Terminus von gp41 ist somit ein Bestandteil der zellulären Membran, während der C-Terminus in der viralen Lipidhülle verankert ist. Um eine erfolgreiche Verschmelzung der Membranen zu erreichen, müssen mehrere gp41-Trimere die konformationellen Änderungen durchlaufen. Dabei nimmt gp41 eine Übergangskonfiguration an, die dem 6-HB-Stadium vorausgeht und als *prehairpin* bezeichnet wird. In diesem Zustand werden in gp41 sowohl die HR1 als auch die HR2 von außen zugänglich. Innerhalb dieser *prehairpin*-Struktur sind die  $\alpha$ -helikalen HR1-Regionen des gp41-Trimers zu einer *coiled coil* zusammengelagert. Während der Ausbildung des 6-HB falten sich die drei HR2-Regionen so, dass sie in den Furchen zwischen den HR1-Regionen zu liegen kommen. Die HR1-Regionen bilden somit den Kern des 6-HB, während die HR2s von außen daran binden (26, 158, 169). Der Übergang zum 6-HB bringt die beiden Membranen in räumliche Nähe. Während der Annäherung der Membranen kippt das 6-HB aus sterischen Gründen vermutlich zur Seite und liegt dann parallel zu den Membranen (45). Die Änderung der Freien Energie, die durch den Übergang des metastabilen gp41 in die 6-HB-Konfiguration zustande kommt, ermöglicht schließlich die Fusion der Membranen (107, 110).



**Abbildung 2-3 Schematische Darstellung des HIV-Fusionsprozesses.** Das Hüllprotein liegt zunächst in seiner nativen Konformation vor, dabei verdeckt das gp120-Trimer den Großteil der gp41-Oberfläche. Durch Interaktion der gp120-Untereinheit mit CD4 und einem Corezeptor erfährt gp120 strukturelle Veränderungen, wodurch das zuvor abgeschirmte Fusionspeptid (rot) der gp41-Untereinheit mit der Membran der Zielzelle interagieren kann. gp41 bildet einen Übergangszustand, der als *prehairpin* bezeichnet wird. Im Verlauf des Fusionsprozesses erfolgt nun die Bindung der heptad repeat (HR) 2-Region an die HR1-Region wodurch das 6-Helixbündel gebildet wird und die Fusion der Membranen erfolgt (Abbildung nach Eckert und Kim (45)).

## 2.5 Inhibitoren des Viruseintritts

Seit Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (*highly active antiretroviral therapy*, HAART) vor 17 Jahren konnte ein deutlicher Anstieg der Lebenserwartung bei HIV-Patienten erreicht werden. Eine Heilung ist jedoch immer noch nicht möglich, so dass eine lebenslange Behandlung notwendig ist. 20 der 21 zur Zeit von der FDA zugelassenen HAART-Wirkstoffe (1) hemmen die Funktion von nur zwei viralen Proteinen: Die Zielproteine sind zum einen die Reverse Transkriptase (RT-Inhibitoren), welche das virale RNA-Genom in DNA übersetzt und zum anderen die virale Protease (Protease-Inhibitoren), welche die Gag/Pol- und die Gag-Polyproteine prozessiert.

Die hohe Replikationsrate des Virus (ca.  $1 \cdot 10^9$  Viren werden pro Tag gebildet) (72) verbunden mit der großen Fehlerrate der Reversen Transkription (140) führt häufig zur Entstehung von resistenten Virusvarianten. Dabei wird oft auch eine Kreuzresistenz zu anderen Wirkstoffen aus derselben Klasse beobachtet. Aus diesem Grunde sind neue Wirkstoffklassen, die zusätzliche Schritte des viralen Lebenszyklus hemmen, notwendig. Die Entwicklung von Eintrittsinhibitoren stellt dabei in vielerlei Hinsicht eine besonders attraktive Alternative dar. Kreuzresistenzen mit den bestehenden Wirkstoffklassen der RT- oder Protease-Inhibitoren sind aufgrund des anderen Wirkmechanismus auszuschließen. Ferner sind Fusionsinhibitoren hervorragend zur Postexpositionsprophylaxe geeignet. Da sich Inhibitoren des Viruseintritts häufig gegen virale Oberflächenstrukturen richten, besteht auch die Hoffnung, dass durch eine genaue Analyse der Wirkungsweise von Eintrittsinhibitoren die Impfstoffentwicklung vorangetrieben werden kann.

### 2.5.1 Bindungsinhibitoren und Corezeptorantagonisten

**Bindungsinhibitoren** verhindern die Wechselwirkung von gp120 und CD4-Rezeptor, indem sie die entsprechenden Bindungsstellen eines der beiden Proteine blockieren. Die frühen Versuche den HIV-Eintritt in die Zelle zu verhindern, konzentrierten sich darauf, die Interaktion des Virus mit dem CD4-Rezeptor z.B. durch lösliches CD4 (sCD4) zu stören. Bei zellkulturadaptiertem HIV führt die Interaktion mit sCD4 häufig zur Dissoziation der gp120-Untereinheit von gp41, wodurch eine Bindung an die Zielzelle verhindert wird (115). Es zeigte sich jedoch, dass primäre HIV-1 Isolate sich wesentlich schlechter durch sCD4 hemmen lassen als zellkulturadaptierte Stämme (114).

Ein aussichtsreicher Kandidat ist der anti-CD4 Antikörper TNX-355, der sich in einer Phase II Studie befindet (88). Der Antikörper stört nicht die Bindung des Virus an CD4, sondern blockiert die konformationellen Umlagerungen von gp120, die notwendig sind, um den Corezeptor zu binden (116).

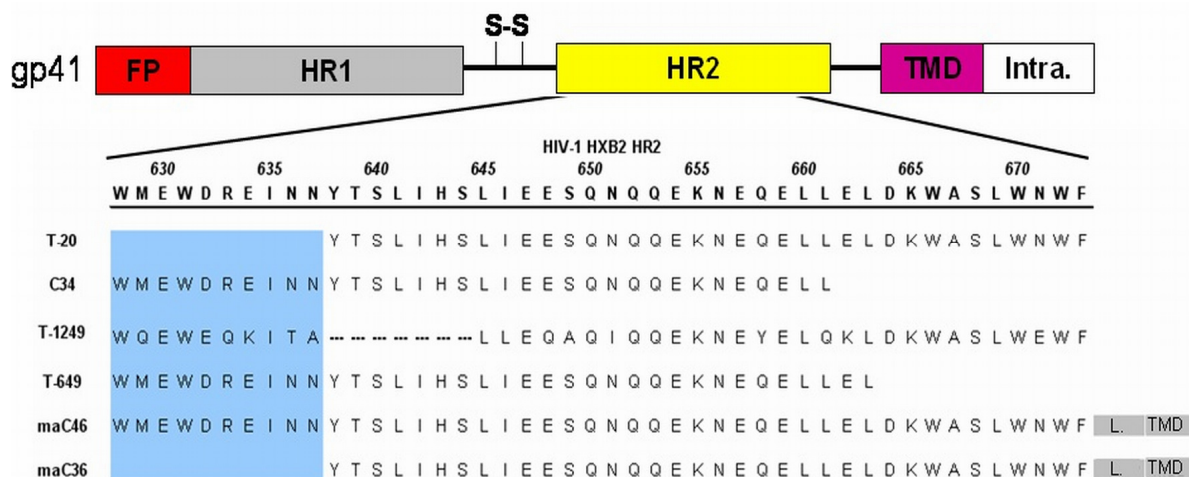
**Corezeptorantagonisten** stören die Interaktion von gp120 und dem Corezeptor CCR5 oder CXCR4, nachdem das Hüllprotein an CD4 gebunden hat. Der CXCR4-Antagonist AMD070 ist ein kleines organisches Molekül mit einer sehr guten oralen Bioverfügbarkeit (34). AMD070 inhibiert HIV-Corezeptorbindung im nanomolaren Bereich (149) und befindet sich in einer Phase I-Studie.

Der Antikörper PRO140 befindet sich in ebenfalls in einer frühen Phase der klinischen Testung. PRO140 bindet den CCR5-Corezeptor und zeigt große Wirksamkeit gegen eine Vielzahl von HIV-1 Isolaten und inhibierte die HIV-Infektion sowohl in PBMC als auch in Makrophagen (160).

## 2.5.2 Fusionsinhibitoren

Seit Anfang 1990 ist bekannt, dass kurze Peptide, die sich von HR1 oder HR2 des gp41 ableiten, den Eintritt des Virus in die Zielzelle hemmen (172, 173). Je nachdem, ob sich dabei die Sequenz des Peptids von der HR1 oder der HR2 ableitet, bezeichnet man sie als N- bzw. C-Peptide.

**C-Peptide** binden während des Fusionsprozesses an die HR1-*coiled coil* der *prehairpin*-Struktur (53, 84). Sie blockieren so die Bindungsstellen für HR2 (**Abbildung 2-5**) und verhindern die Ausbildung des 6-HB. Die Wirkungsweise ist somit dominant-negativ (69). C-Peptide zeigen meist eine hohe Wirksamkeit (in klinischen Studien konnte eine Reduktion der Viruslast von durchschnittlich mehr als einer log-Stufe beobachtet werden) gegenüber vielen unterschiedlichen HIV-1 Isolaten (81, 91) und sogar gegenüber SIV, da die HR1 sehr stark konserviert ist (56). Aufgrund ihrer hohen Spezifität und Effizienz haben sich C-Peptide als wichtiges Werkzeug zur Aufklärung des HIV-Fusionsprozesses etabliert (53, 110). Viele C-Peptide sind mittlerweile beschrieben worden, zu denjenigen mit großer Relevanz für die Forschung gehören: T-20 (173), T-1249 (148), C34 (98) und T-649 (66) (**Abbildung 2-4**). Sie lassen sich in zwei Klassen einteilen, je nachdem, ob sie in der Lage sind mit der konservierten hydrophoben Tasche, die am C-Terminus der HR1 *coiled coil* liegt, zu interagieren. Für die Bindung an diese Tasche sind die Aminosäuren 628W, 631W und 635I verantwortlich (Nummerierung der Aminosäuren beginnend am N-Terminus des HIV-1 HXB2 Env-Proteins) (25, 26). Die Interaktion mit dieser konservierten Tasche erhöht die inhibitorische Aktivität des C-Peptids. (25, 43, 62, 135) und erschwert die Selektion von resistenten Viren (90, 99, 137).

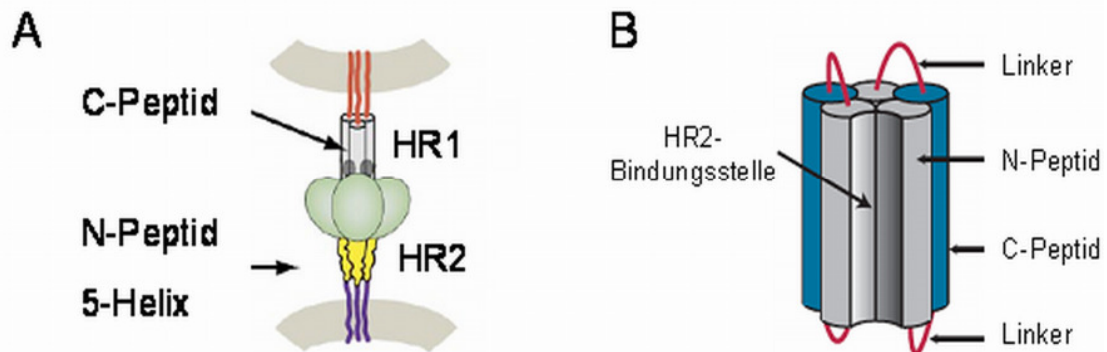


**Abbildung 2-4 Wissenschaftlich relevante C-Peptide.** Die gp41-Untereinheit des HIV-Hüllproteins ist schematisch dargestellt. Dabei sind folgende Elemente hervorgehoben: das Fusionspeptid (FP), heptad repeat 1 (HR1), heptad repeat 2 (HR2), die Transmembrandomäne (TMD) und der zytoplasmatische Schwanz (Intra.). Die AS-Sequenz der HR2 (HIV Isolat HXB2) ist im Einbuchstaben-Code dargestellt. Mehrere lösliche C-Peptide (T-20, C34, T-1249, T649) sind von unterschiedlichen Sequenzbereichen der HR2 abgeleitet. Bei T-1249 wurden einige AS-Positionen verändert oder fehlten komplett (\*\*). Des Weiteren sind die Sequenzen von zwei membrangebundenen C-Peptiden dargestellt (maC46 und maC36). Beide Peptide sind über eine flexible Gelenkregion (L.) mit einer Transmembrandomäne (TMD) in der Zellmembran verankert. Blau unterlegte AS-Reste interagieren mit der konservierten hydrophoben Taschen, die durch die HR1 gebildet wird.

Der einzige Fusionsinhibitor, welcher sich derzeit in der klinischen Anwendung befindet, ist das 36AS-lange C-Peptid T-20 (Enfuvirtide, Fuzeon®). T-20 weist *in vitro* gegen manche laboradaptierten Isolate eine IC<sub>50</sub> (Wirkstoffkonzentration bei der die Infektionsrate *in vitro* um 50% gesenkt wird) von unter 1nM auf. Patienten, die während einer klinischen Studie zweimal täglich mit je 100mg T-20 behandelt wurden, zeigten im Durchschnitt eine Reduktion der Viruslast von fast zwei log-Stufen (81). Aufgrund seiner schlechten oralen Bioverfügbarkeit muss T-20 durch subkutane Injektion appliziert werden. Weitere Nachteile dieses C-Peptids sind seine geringe Halbwertszeit im Serum von knapp zwei Stunden und die damit verbundenen hohen Therapiekosten, die sich pro Patient auf fast 20.000\$ pro Jahr belaufen (85, 91).

**N-Peptide** wurden 1992 zuerst von Wild et al. anhand des Peptids DP106 als Inhibitoren des Viruseintritts beschrieben (172). N-Peptide haben eine schwächere antivirale Wirkung als C-Peptide. Da sie stark hydrophob sind, haben sie die Tendenz zu aggregieren (45, 79). Sie haben deshalb bis heute nicht Eingang in die klinische Anwendung gefunden. Zwei Wirkungsmechanismen sind für N-Peptide beschrieben worden: Analog zu den C-Peptiden hemmen N-Peptide den Viruseintritt, indem sie direkt an die HR2 des *prehairpin* binden (100). Für einige N-Peptide ist jedoch auch gezeigt worden, dass sie in die HR1 *coiled coil* interkalieren und so deren Struktur zerstören (17, 172). Ein weiterer Eintrittsinhibitor, der einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie ein N-Peptid aufweist, ist der Wirkstoff 5-Helix (5H). 5H ist ein kleines rekombinantes Protein, bestehend aus drei N-Peptiden und 2 C-Peptiden, die

jeweils über kurze Gelenkregionen verbunden sind. In der Tertiärstruktur von 5H bilden die drei N-Peptide eine *coiled coil*. Ähnlich wie beim 6-HB lagern sich die beiden C-Peptide des 5H in die Furchen zwischen den N-Peptiden, wobei die dritte Bindungsstelle unbesetzt bleibt. 5H ist in der Lage, mit der dritten C-Peptidbindungsstelle an die HR2 des *prehairpin* anzudocken, und so den Fusionsprozess zu hemmen (**Abbildung 2-5 B**) (141).



**Abbildung 2-5 Der Wirkungsmechanismus von Fusionsinhibitoren.** (A) Das *prehairpin* ist die Zielstruktur für viele Peptidfusionsinhibitoren. Durch die Interaktion verhindern sie die Ausbildung des 6-Helixbündels und somit die Fusion. C-Peptide binden in die Furchen zwischen die *coiled coils* der heptad repeat 1 (HR1), während N-Peptide und 5-Helix an die HR2 binden. (B) Der Fusionsinhibitor 5-Helix (5H) hat die selbe Wirkungsweise wie ein N-Peptid. Der Komplex aus N- und C-Peptiden ermöglicht die Bindung an die HR2 des *prehairpins*.

## 2.6 HIV-Gentherapie

Die Ausbreitung von HIV ist ein ständig wachsendes Problem (163). Seit Einführung der HAART konnte in den Ländern der westlichen Welt die Sterblichkeit von HIV-Patienten stark gesenkt werden. Trotz dieses großen Erfolges bleiben Nachteile bestehen, die die Suche nach zusätzlichen alternativen Therapiestrategien notwendig machen.

HAART unterdrückt zwar effizient die Virusreplikation, integrierte Proviren werden jedoch nicht eliminiert. HIV-Patienten müssen daher dauerhaft eine Vielzahl von antiviralen Wirkstoffen nach einem strikten Behandlungsplan zu sich nehmen, um ein Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern. Sind die Wirkstoffkonzentrationen während der Behandlung unzureichend, kann dies zu einer unvollständigen Unterdrückung der HIV-Replikation führen, in deren Folge resistente Viren selektiert werden. Die Entstehung von resistenten Varianten muss daher fortwährend überwacht werden, was zu den hohen Kosten der Therapie beiträgt. Der Einsatz der Medikamente ist des Weiteren mit starken Nebenwirkungen und Toxizität verbunden (95). Die Anwendbarkeit der Therapie ist aus diesem Grund unter Umständen reduziert und für den Patienten mit einer großen Einschränkung der Lebensqualität verbunden.



Die Gentherapie stellt eine mögliche zusätzlichen Therapieansatz zur HAART dar. Theoretische Überlegungen zeigen, dass die Gentherapie nach nur einer begrenzten Anzahl von Anwendungen einen lang anhaltenden antiviralen Effekt hervorzurufen kann. Durch Verwendung geeigneter antiviraler Gen kann die Rate der Resistenzentstehung stark vermindert werden. Außerdem sollten die toxischen Nebenwirkungen geringer als bei herkömmlichen Medikamenten ausfallen (165).

### 2.6.1 Antivirale Gene

Grundsätzlich werden in der HIV-Gentherapie zwei Strategien verfolgt. Der erste Ansatz zielt auf die spezifische Eliminierung von HIV-infizierten Zellen. So wurden genetische Konstrukte beschrieben, die von einer HIV-Infektion betroffene Zellen in Apoptose treiben. Caruso et al. haben gezeigt, dass die Tat abhängige Induktion der *Herpes simplex* Thymidin-Kinase in Anwesenheit des Pro-Pharmakon Acyclovir die Ausbreitung von HIV in der Zellkultur verhindert (21). Ebenso hemmt ein Caspase-3-Konstrukt, das durch die HIV-Protease aktiviert werden kann, die Ausbreitung des Virus *in vitro* (164). Darüber hinaus wurden auch Ansätze vorgeschlagen, bei denen durch eine genetische Modifikation von T-Zellen eine gezielte Immunantwort gegen HIV-infizierte Zellen erreicht werden soll. Dafür wurde ein HIV-Env spezifischer T-Zellrezeptor (TZR) generiert, indem die extrazelluläre Domäne von CD4 mit der Signaldomäne der TZR-Zeta-Kette (CD4zeta) fusioniert wurde. CD4zeta wird als membranständiges Protein auf der Oberfläche der modifizierten CD8-Zellen exprimiert. Der Rezeptor bindet an infizierte Env-exprimierende Zellen und initiiert deren spezifische Vernichtung (111).

Der zweite gentherapeutische Ansatz beinhaltet die Expression von antiviralen Genen in den HIV-Zielzellen, die bestimmte Schritte des viralen Replikationszyklus inhibieren, ohne jedoch die Zelle abzutöten. Dieser Ansatz wird als intrazelluläre Immunisierung bezeichnet (10). Der Begriff ist jedoch irreführend, da keine Immunreaktion notwendig ist, um die Wirksamkeit dieses Prinzips zu ermöglichen. Gene, die zur intrazellulären Immunisierung verwendet werden, lassen sich in Hinblick auf ihre Wirkung in drei Klassen einteilen (165, 166): Gene der Klasse I inhibieren die frühen Phasen des viralen Lebenszyklus und verhindern die Integration des Provirus in das zelluläre Genom. Beispiele für Klasse I-Gene sind membrangebundene Peptide, die den Viruseintritt verhindern (46, 71) oder intrazelluläre *single-chain* Antikörper, die die Reverse Transkription (151) oder Integration des viralen Genoms verhindern (83). Computermodele sagen voraus, dass Klasse I-Gene zu einer Anreicherung der modifizierten nicht-infizierten Zellen und zu einer Reduktion der Viruslast führen können (165, 166).

Gene der Klasse II und Klasse III interferieren mit der Expression von viralen Genen bzw. mit der Freisetzung von neuen Viruspartikeln, indem sie deren Zusammenbau hemmen. Gene der

Klasse II reduzieren den zytopathischen Effekt der viralen Gene und verringern die Wahrscheinlichkeit, dass die Zelle von zytotoxischen T-Zellen eliminiert wird. Diese Gene führen somit zur Akkumulation von genetisch modifizierten Zellen, die ein integriertes Provirus tragen. Gene der Klasse III führen nicht zu einer Anreicherung der modifizierten Zellen, da diese Zellen sowohl durch das Immunsystem vernichtet werden als auch durch die viralen Genprodukte in Apoptose getrieben werden können. Die Entstehung von Virusvarianten mit einer Resistenz gegen das therapeutische Gen wird sowohl von Klasse II als auch von Klasse III Genen nicht verhindert, da in beiden Fällen Reverse Transkription stattfindet. Aufgrund der Nachteile der therapeutischen Gene der Klasse II und III erscheinen Klasse I-Gene in Hinblick auf klinische Anwendbarkeit im Moment am vielversprechendsten (165, 166).

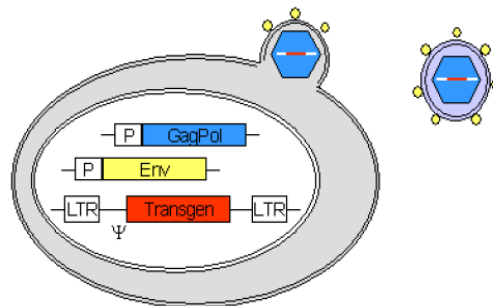
## 2.6.2 Retrovirale Vektoren in der Gentherapie

Retrovirale Vektoren haben sich seit fast 30 Jahren als Gentransfersystem etabliert (31, 126). Sie weisen eine Vielzahl von Eigenschaften auf, die sie attraktiv für gentherapeutische Anwendungen machen: (I) Retrovirale Vektoren haben einen einfachen genetischen Aufbau und sind leicht herzustellen. (II) Da die Vektoren in das Genom der Zielzelle integriert werden, erlauben sie eine lang anhaltende Expression des Transgens. Sie sind daher geeignet einen genetischen Defekt dauerhaft zu korrigieren. (III) Durch Verwendung unterschiedlicher Hüllproteine kann der Tropismus des Vektors variiert werden und ein spezifischer Gentransfer in eine Vielzahl verschiedener Zielzellen durchgeführt werden.

RVs, die sich vom Moloney Murinen Leukämie Virus (MoMLV) ableiten, sind auf dem Gebiet der Gentherapie die am besten etablierten Vektorsysteme. MoMLV-Vektoren sind bisher die einzigen Gentransfersysteme, die mit gutem Ergebnis in klinischen Studien zur Behandlung von angeborenen Immundefekten angewendet werden konnten. Durch die genetische Modifikation von hämatopoetischen Stammzellen gelang die erfolgreiche Behandlung von ADA-SCID (5), *X-linked* SCID (22) und die septische Granulomatose (X-CGD) (125).

Bei MoMLV-Vektoren sind sämtliche Sequenzen, die virale Proteine kodieren, durch das therapeutische Gen ersetzt. Lediglich das Verpackungssignal ( $\Psi$ ) und die LTRs an beiden Enden des Vektors bleiben erhalten. Diese cis-aktiven Elemente ermöglichen die Verpackung des Vektorsgenoms in virale Partikel in der Produzentenzelle und die Reverse Transkription und Insertion in der Zielzelle. Bei klassischen retroviralen Vektoren wird der Promotor in der LTR verwendet, um die Transkription des Transgens zu steuern. Bei Vektoren neuerer Generation ist der Promotor in der LTR deletiert und durch einen internen Promotor, der sich am 3'-Ende des Verpackungssignals befindet, ersetzt. Durch diese Veränderung können solche Vektoren nach Reverser Transkription und Insertion nur noch das Transkript des Transgens produzieren, jedoch keine vollständige genomische RNA, die auch das

Verpackungssignal umfasst. Durch diese Veränderung wird eine Mobilisierung des Vektors verhindert. Solche Vektoren werden als *self-inactivating* (SIN) Vektoren bezeichnet (86). Retrovirale Vektoren werden in Verpackungszellen mithilfe des sog. „Drei Plasmid Systems“ hergestellt (**Abbildung 2-6**). Dazu wird der retrovirale Transfervektor, der das therapeutische Transgen trägt, zusammen mit zwei weiteren Hilfskonstrukten durch Transfektion (transient bzw. stabil) in die Zelle eingebracht. Eines der Hilfsplasmide (GagPol) kodiert sämtliche Strukturgene, die für die Herstellung von retroviralen Partikeln gebraucht werden und liefert darüber hinaus auch die nötigen enzymatischen Funktionen: Dies sind die virale Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase. Das zweite Hilfsplasmid (Env) liefert die genetische Information zur Synthese eines Hüllproteins. Durch das Hüllprotein wird der Tropismus des Vektors definiert. Indem man ein geeignetes Hüllprotein eines anderen Virusstammes auswählt, kann das Transgen in eine Vielzahl von Zielzellen spezifisch eingebracht werden. Dieser Vorgang wird als Pseudotypisierung bezeichnet. In der Produzentenzelle lagern sich die viralen Strukturproteine zusammen, um virale Partikel zu bilden. In diese Partikel wird jedoch nur die RNA des Transfervektors verpackt, da nur diese das notwendige Verpackungssignal ( $\psi$ ) enthält, um mit den Strukturproteinen zu interagieren. Die Vektorpartikel werden in den Zellkulturüberstand abgegeben und können zusammen mit dem Medium geerntet werden.



**Abbildung 2-6 Herstellung von retroviralen Vektoren.** Zur Herstellung von retroviralen Vektoren wird die Verpackungszelllinie mit drei Plasmiden cotransfiziert. Das GagPol-Plasmid liefert die Strukturgene und enzymatischen Funktion für die Produktion der Vektorpartikel. Das Env-Plasmid kodiert das Hüllprotein. Der Transfervektor kodiert das Transgen. Lediglich die RNA des Transfervektors kann in die Vektorpartikel aufgenommen werden, da nur diese das Verpackungssignal ( $\Psi$ ) enthält. Vektoren werden in den Zellkulturüberstand abgegeben und können zusammen mit dem Medium geerntet werden.

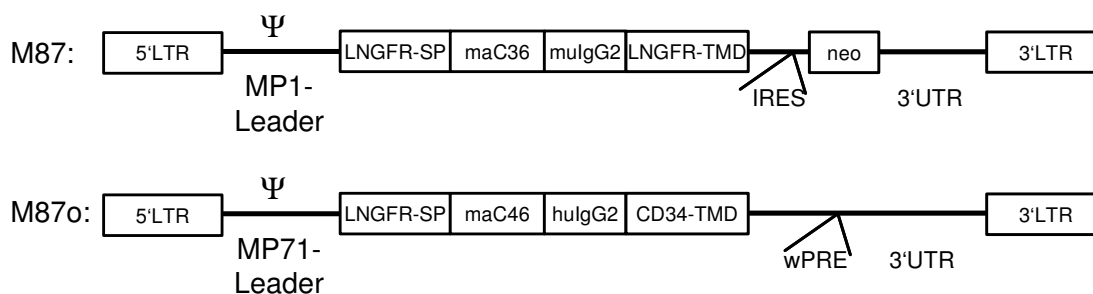
### 2.6.3 HIV-Gentherapie mit membranständigen Fusionsinhibitoren

Zur HIV-Gentherapie wurden in der Gruppe von Laer am Georg-Speyer-Haus retrovirale Vektoren entwickelt. Ziel dieses Ansatzes ist es, mittels Gentransfer T-Lymphozyten vor der HIV-Infektion zu schützen. Die RV tragen antivirale Gene der Klasse I. Die Gene kodieren C-Peptide, welche mithilfe von Gerüstelementen membranständig (ma) auf T-Zellen exprimiert werden. Während des HIV-Eintritts interagieren die membrangebundenen C-Peptide mit der

*prehairpin*-Struktur des gp41 (**Abbildung 2-3**) und verhindern die Fusion von Virus und Zelle. Die Transgene haben einen modularen Aufbau. Sie bestehen aus einem N-terminalen Signalpeptid (SP), an welches sich das inhibitorische C-Peptid anschließt. Das C-Peptid ist über eine flexible Gelenkregion (*linker*, L) mit einer Transmembrandomäne (TMD) verknüpft, die das Protein in der Zellmembran verankert. Im Jahr 2001 beschrieben Hildinger et al. den RV M87. Dieser Vektor diente als Prototyp, um die antivirale Wirksamkeit von membrangebundenen C-Peptiden zu demonstrieren. Das genetische Konstrukt inhibierte sowohl die Replikation von HIV in Kultur als auch den Eintritt von lentiviralen Vektoren, die mit unterschiedlichen HIV-Envs pseudotypisiert worden waren. Das verwendete C-Peptid entsprach in seiner Sequenz T-20 und wurde als membranverankertes (ma) C36 bezeichnet (**Abbildung 2-4**). Als Gerüstmodule dienten das SP des *low-affinity nerve growth factor receptor* (LNGFR), die Gelenkregion des murinen (mu) IgG2-Moleküls und die TMD des LNGFR. Schematisch hatte das Transgen somit folgenden Aufbau: LNGFR-SP~maC36~mulgG2-L~LNGFR-TMD. Das Transgen wurde von einem MoMLV-Vektor zusammen mit einem Neomycinresistenzgen (Neo) coexprimiert (70, 71) (**Abbildung 2-7**).

Der Prototypvektor M87 wurde anschließend einem Optimierungsprozess unterworfen und der RV M87o (o: optimiert) generiert, der für eine klinische Studie geeignet war (46, 68). Dazu wurden die Gerüstelemente des Prototypvektors gegen humane Sequenzen ausgetauscht, um das immunogene Potential des Transgens zu reduzieren. Durch Modifikation des Vektorrückgrats und der Transgensequenz wurde ferner die Expression um mehr als das hundertfache im Vergleich zu M87 gesteigert. Des Weiteren wurde das maC-Peptid N-Terminal um 10AS verlängert. Das resultierende inhibitorische Peptid wird als maC46 bezeichnet. Es ist in der Lage mit der konservierten Tasche am C-Terminus der HR1 des gp41 zu interagieren und hemmt dadurch auch T-20-resistente Virusvarianten (**Abbildung 2-4**). Die Konfiguration des M87o-Transgensprodukts ist: LNGFR-SP~maC46~hulgG2-L~CD34-TMD (**Abbildung 2-7**). M87o hat eine so hohe inhibitorische Wirkung auf zellkulturadaptierte und primäre HIV-1 Isolate, dass M87o-transduzierte T-Zelllinien einen selektiven Vorteil gegenüber nicht-transduzierten Zellen haben. Die transduzierten Zellen sind vor einer HIV-Infektion geschützt, während die nicht-transduzierten Zellen als Folge der Infektion absterben. Geringe Prozentsätze M87o-transduzierte T-Zellen, die in Mischkultur mit untransduzierten Zellen gehalten werden, reichern sich im Verlauf der Infektion bis zu 100% an und führen zur Eliminierung des Virus aus der Kultur (46). Aufgrund dieser ermutigenden Ergebnisse wurde der Vektor M87o im Jahr 2004 für eine klinische Studie der Phase I/II zugelassen. Die Studie wurde in Hamburg am Universitätsklinikum Eppendorf durchgeführt und von der Arbeitsgruppe von Laer am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main wissenschaftlich begleitet. Es wurden zehn HIV-Patienten im weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung gentherapeutisch

behandelt. Dazu wurden aus dem Blut der Patienten T-Lymphozyten isoliert, *ex vivo* mit dem Vektor M87o transduziert und anschließend reinfundiert. Die Therapie war gut verträglich und rief nur sehr milde vorübergehende Nebenwirkungen hervor. Leider konnte kein antiviraler Effekt des Transgens beobachtet werden, was vermutlich auf die geringe Anzahl an genmodifizierten Zellen zurückzuführen war (101).



**Abbildung 2-7 Aufbau der Vektoren M87 und M87o.** Das Transgen des Vektors M87 besteht aus dem Signalpeptid (SP) des low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR), daran schließt sich das inhibitorische C-Peptid maC36 an. maC36 ist über die flexible Gelenkregion des murinen IgG2-Moleküls (mulgG2) mit der Transmembrandomäne (TMD) des LNGFR verbunden. Neben dem Transgen wird auch ein Neomycinresistenzgen (neo) mithilfe einer internal ribosome entry site (IRES) coexprimiert. Das Transgen des Vektors M87o weist im Vergleich zu M87 einige Veränderungen auf: Das inhibitorische C-Peptid ist maC46. Die Gelenkregion wurde durch die des humanen IgG2-Moleküls ersetzt und die TMD leitet sich nun von CD34 ab. Des Weiteren wurde in die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) ein woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (wPRE) eingefügt. Beide Vektoren unterscheiden sich außerdem durch die verwendete Leaderregion. M87 trägt einen MP1- und M87o einen MP71-Leader. Eine detaillierte Beschreibung der Leaderregionen ist in den Arbeiten von Schambach et al. (147) und Hildinger et al. (70) zu finden.

## 2.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Gentherapie stellt neben der herkömmlichen antiviralen Therapie eine mögliche zusätzliche Behandlungsmethode der HIV-Infektion dar. Besonders das durch den retroviralen Vektor M87o kodierte antivirale C-Peptid maC46 weist aufgrund seiner hohen inhibitorischen Wirkung ein großes Potential auf, in zukünftigen klinischen Studien erfolgreich angewendet werden zu können. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Resistenzmechanismus von HIV-1 gegenüber dem membrangebundenen Fusionsinhibitor maC46 zu untersuchen.

Durch serielle Passage von HIV auf maC46-exprimierenden Zellen sollte zunächst ein maC46-resistentes Virusisolat gezüchtet werden. Die so selektierten Resistenzmutationen sollten dann sowohl genotypisch als auch phänotypisch analysiert werden. Dieser Ansatz ist in vielerlei Hinsicht interessant. (I) Die Identifikation von maC46-Resistenzmutationen ermöglicht es, primäre HIV-1 Isolate aus Patienten gezielt auf maC46-Resistenzen hin zu überprüfen, die eventuell schon vor der M87o-Behandlung bestanden. Auch kann der Patient kontinuierlich untersucht werden, ob im Verlauf der Behandlung Resistenzmutationen auftreten, die die Wirkung von maC46 einschränken. (II) Ferner können die maC46-Resistenzmutationen mit

den Mutationen verglichen werden, die zu Resistenz gegenüber nah verwandten löslichen C-Peptiden (z.B. T-20) führen. Durch einen solchen Ansatz lässt sich das Risiko der Entstehung von Kreuzresistenzen einschätzen. (III) Des Weiteren können durch Analyse der phänotypischen Wirkung der Resistenzmutationen Rückschlüsse auf den Ablauf des Fusionsprozess gezogen werden.

### 3 Material

#### 3.1 Laborchemikalien

Substanz	Hersteller
37% Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D-galactopyranoside (x-Gal)	Sigma, Deisenhofen
Aceton	Roth, Karlsruhe
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Butanol	Roth, Karlsruhe
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Chloroquin	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (rein)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (vergällt)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merk, Hohenbrunn
HCl	Merck, Darmstadt
HCl	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kalium-Ferricyanat	Serva, Heidelberg
Kalium-Ferrocyanat	Serva, Heidelberg

---

Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
LE Agarose	Biozyme, Oldendorf
Luziferase Assay System	Promega, Mannheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Merck, Darmstadt
NP40	Sigma, Deisenhofen
Retronectin	TaKaRa Biomedicals, Apen
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
tris(Hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Tween-20	Merck, Hohenbrunn
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zellysepuffer (5x)	Promega, Mannheim

---

### 3.2 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

---

Kulturmedium/Lösung	Bestandteile
Ampilicilin-Lösung	100mg/ml in ddH <sub>2</sub> O Sterilfiltriert
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	2,5M CaCl <sub>2</sub> in ddH <sub>2</sub> O sterilfiltriert
DNA-Probenauftragspuffer (6x)	50% (v/v) Glyzerin 0,2% (v/v) SDS 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol 10mM EDTA
Ethidiumbromidlösung	1% (w/v) in ddH <sub>2</sub> O gelöst



---

FACS-Puffer	2% FCS PBS
Fixierungslösung	2% Formaldehyd (v/v) PBS
G418-Stammlösung	100mg/ml G418 in ddH <sub>2</sub> O sterilfiltriert
GNTE-Puffer	0,2M NaCl 0,02M Tris 1M EDTA 0,2M Glycin pH 7,5, sterilfiltriert
HEPES-Puffer (2x)	100mM HEPES 281mM NaCl 1,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,1 sterilfiltriert und aliquotiert Lagerung bei -20 °C, kurzzeitige Lagerung (bis zu mehreren Wochen) bei 4 °C
Kanamycinlösung	60mg/ml in ddH <sub>2</sub> O sterilfiltriert
Kristallviolettstammlösung	2mg/ml Kristallviolett ddH <sub>2</sub> O
Kryo-Konservierungsmedium	10% DMSO FCS
LB-Agarplatten	LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar
LB-Medium	10g/l Bacto-Trypton 5g/l Hefeextrakt 10g/l NaCl mit 2M NaOH auf pH 7,4 einstellen autoklavieren (121 °C, 20min)
NP40-Lösung	5% (w/v) in ddH <sub>2</sub> O

Penizillin/Streptomycin	10.000Units Penizillin 10mg Streptomycin in 100ml 0,9% NaCl
Retronectin-Lösung	In 1ml H <sub>2</sub> O aufgenommen, dann mit PBS auf 50µg/ml eingestellt sterilfiltriert
Saccharose-Lösung	20% Saccharose PBS sterilfiltriert
TAE-Puffer (50x)	Tris 1.220g Essigsäure 285.5g EDTA (0,5 M) 500ml H <sub>2</sub> O ad 5l auf pH 8,0 einstellen
TE-Puffer	Tris-HCl 10mM EDTA 1mM in ddH <sub>2</sub> O einstellen auf pH 8,0 einstellen
Trypsin/EDTA (10x)	5g Trypsin 2g EDTA in 100ml 0,9% NaCl
X-Gal-Färbereagenz	3mM Kalium-Ferrocyanat 3mM Kalium-Ferricyanat 0,5mM X-Gal 1mM MgCl <sub>2</sub>

---

Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und sterilisiert (20min, 121 °C, 2bar). Falls die Lösung hitzeempfindlich war, wurde sie steril filtriert oder bereits steril bezogen.

### 3.3 Antikörper

#### 3.3.1 Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Spezifität	Hersteller/Bezugsquelle
2F5	Human	IgG2 anti-HIV gp41	Polymun, Wien
2F5-Biotin	Human	IgG2 anti-HIV gp41	Polymun, Wien
2F5-FITC	Human	IgG2 anti-HIV gp41	Polymun, Wien
Q412-PE	Murin	IgG2 anti-human CD4	Sigma, Deisenhofen

#### 3.3.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-human IgG gekoppelt mit Allophycocyanin	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin gekoppelt mit Allophycocyanin	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ziege anti-human IgG (H+L) gekoppelt mit Phycoerythrin	Dianova, Hamburg

### 3.4 Material für Zellkulturarbeiten

#### 3.4.1 Medien und Zusätze

Substanz	Hersteller
0,05% Trypsin/EDTA	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Casyton, Puffer für Zellzahlbestimmung	Schärfe System, Reutlingen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glucose 4,5g/l, ohne L-Glutamin	BioWhittaker Cambrex, Verviers Sprl, Belgien
Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (PBS) ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>	PAA, Paschingen
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach

G418	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin 200mM	PAA, Paschingen
Penicillin / Streptomycin	PAA, Paschingen
RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin	BioWhittaker Cambrex, Verviers Spri, Belgien

Zur Kultivierung von Zellen wurden supplementierte Medien verwendet, die im Folgenden als Standard-Medien bezeichnet werden. Zur Herstellung dieser Medien wurde die Nährlösungen (DMEM oder RPMI1640) mit 5% FCS, 2% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin komplementiert.

### 3.4.2 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Spezies	Referenz / ATCC-Nummer	Zellkultur-medium
293T	Embryonale Nierenzelllinie; Abgeleitet von der Zelllinie HEK293; enthält das SV40 <i>large T</i> Antigen	<i>Homo sapiens</i>	ATCC CRL-11268	Standard-DMEM
PM-1	T-Lymphoblast; Klon der Zelllinie HUT78	<i>Homo sapiens</i>	AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH (102)	Standard-RPMI
TZM-bl	Abgeleitet von der HeLa-Zelllinie, TZM-Zellen exprimieren stabil CD4, CXCR4 und CCR5. Außerdem tragen sie ein Luziferase- und ein $\beta$ -Galaktosidasegen unter Kontrolle einer HIV-LTR	<i>Homo sapiens</i>	AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH (37, 131, 167).	Standard-DMEM
U87 CD4 CCR5	Astroglom, stabile Expression von CD4 und CCR5, abgeleitet von der Zelllinie U87	<i>Homo sapiens</i>	AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH (122)	Standard-DMEM, 1 $\mu$ g/ml Puromycin, 300 $\mu$ g/ml G418,
U87 CD4 CXCR4	Astroglom Zellen, Stabile Expression von CD4 und CXCR4, Abgeleitet von der Zelllinie U87	<i>Homo sapiens</i>	AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH (18)	Standard-DMEM, 1 $\mu$ g/ml Puromycin, 300 $\mu$ g/ml G418

### 3.4.3 Verwendete HIV-1 Stämme

HIV-1 Stamm	Beschreibung	Bezogen von
HIV Ba-L_wt	HIV Ba-L ist ein CCR5-tropes Virus und kann auf normalen peripheren Monozyten/Makrophagen und CD4-positiven T-Zellen propagiert werden (57)	Der Stamm wurde freundlicherweise von M. Dittmar, (Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt.
HIV Ba-L_sel_MD	HIV Ba-L_sel_MD leitet sich von HIV Ba-L_wt ab. Das Virus wurde auf TZM-bl Zellen, die mit dem retroviralen Vektor M87 transduziert waren, passagiert und ist gegen den Fusionsinhibitor maC36-resistent (99).	Der Stamm wurde freundlicherweise von M. Dittmar (Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt.
HIV Ba-L_FH1	HIV Ba-L_FH1 leitet sich von HIV Ba-L_sel_MD ab. Dieses Isolat wurde 149 tagelang auf maC46-exprimierenden PM-1 Zellen passagiert.	Im Rahmen dieser Arbeit selektiert
HIV Ba-L_FH2	HIV Ba-L_FH2 leitet sich von HIV Ba-L_sel_MD ab. Dieses Virus wurde 207 tagelang auf maC46-exprimierenden PM-1 Zellen passagiert.	Im Rahmen dieser Arbeit selektiert
HIV NL4-3	CXCR4-tropes T-zelladaptiertes Virus. (161, 182).	NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH

### 3.4.4 HIV-Eintrittsinhibitoren

HIV-Eintrittsinhibitoren	Beschreibung	Hersteller / Bezogen von
TAK-779	CCR5-Antagonist, kleines organisches Molekül (8)	NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH
Enfuvirtide (T-20, DP178)	Von HIV-gp41 abgeleitetes Peptid, Fusionsinhibitor (78, 154); Sequenz: YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASL	Roche, Welwyn Garden City (UK)

## 3.5 Material für molekularbiologische Arbeiten

### 3.5.1 Bakterien

Stamm	Beschreibung	Hersteller
<i>Escherichia coli</i> , TOP10	F- F' {lacIq Tn10(TetR)} mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen, Heidelberg

### 3.5.2 Plasmide

Laufende Nummer	Name	Beschreibung	Referenz/ Hersteller
---	pCR-XL TOPO	Klonierungsplasmid mit <i>multiple cloning site</i> , (MCS)	Invitrogen, Karlsruhe
M118	HIV JRFL Env	Expressionsplasmid für das Hüllprotein HIV JRFL Env	M. Dittmar, Heidelberg
M288	---	Expressionsplasmid mit CMV-Promotor und $\beta$ -Globulintron, <i>multiple cloning site</i> (MCS)	T. Giroglou, Ag. von Laer
M334	pCMV-dR8.91	Expressionsplasmid für HIV Gagpol, Rev (publizierte Bezeichnung: pCMV-dR8.91)	(120)
M386	---	Lentiviraler Transfervektor mit Luziferase als Markergen. Vektor leitet sich von pHR'SIN-cPPT-SEW ab	(36)
M420	pHR'SIN-cPPT-SEW	Lentiviraler SIN Vektor mit SFFV Promotor und GFP-Markergen (publizierte Bezeichnung: pHR'SIN-cPPT-SEW)	(36)
M421	HIV HXB2 Env	Expressionsplasmid für das Hüllprotein HIV HXB2 Env	G. Melikyan, Chicago, IL, USA
M5	VSV-g	Expressionsplasmid für VSV-g mit CMV-Promotor und $\beta$ -Globulintron	(179)
M57	---	MLV Gagpol Expressionsplasmid mit SV40 Promotor	(147)
M749	HIV Ba-L_wt Env	Expressionsplasmid für das Hüllprotein HIV Ba-L_wt	(99)
M750	HIV Ba-L_FH1 Env	Expressionsplasmid für das Hüllprotein HIV Ba-L_FH1	
M759	HIV Ba-L_sel_MD Env	Expressionsplasmid für das Hüllprotein HIV Ba-L_sel_MD	(99)

### 3.5.3 Retrovirale Vektoren

Die Klonierung der Vektoren ist in anderen Arbeiten beschrieben (46, 68, 71).

Laufende Nummer	Vektorname	Leader*	Triplets optimiert?	C-Peptid	Gelenkregion (Liner)	Transmembran-domäne	Marker-gen	3' UTR
M140	M87/C46-Ineo	1	nein	C46	Murines IgG2	LNGFR	neoR	---
M211	M87/om-Ineo	1	nein	C46	Humanes IgG2	CD34	neoR	---
M212	M87/omc-Ineo	1	ja	C46	Humanes IgG2	CD34	neoR	---
M217	M87o	71	ja	C46	Humanes IgG2	CD34	---	wPRE
M218	M87o-RRE	71	ja	C46	Humanes IgG2	CD34	---	wPRE / RRE
M220	M87/CD34-Ineo	1	nein	C36	Murines IgG2	CD34	neoR	---
M235	M87o-Ineo	71	ja	C46	Humanes IgG2	CD34	neoR	RRE
M345	M87o-dPRE	71	ja	C46	Humanes IgG2	CD34	---	---
M347	M87/C46omc	1	ja	C46	Humanes IgG2	CD34	---	---
M597	M87o-C36-hIgG2-Ineo	71	ja	C36	Humanes IgG2	CD34	neoR	---
M423	M87o/dRRE-Ineo	71	ja	C46	Humanes IgG2	CD34	neoR	---
M87	M87-Ineo	1	nein	C36	Murines IgG2	LNGFR	neoR	---
M51	MP1-neo	1	nein	---	---	---	neoR	---

\*Eine detaillierte Beschreibung der *Leader*-Regionen ist in den Arbeiten von Schambach et al. (147) und Hildinger et al. (70) zu finden.

### 3.5.4 Oligonukleotide

#### 3.5.4.1 PCR-Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5'→3'-Orientierung
N	CTGCCAATCAGGGAAGTAGCCTTGTGT
A	GGCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA
TNE3_fh	CTTATAGCAAATCCTTTCCAAGCCCTGTCTTATTCTTCTAGG
HIVkozakEnv6253f-(2)	GCCACCATGAGAGTGACGGAGATCAGG
HIVnef9047rev	CTGAGGTCTGACTGGAAAACC
BalC3qcforII	CTTTAAATAAGATAGTTATAAAATTAAGAAAACAATTTGGGAATAAAACA ATAGTCTTTAag

BalC3qcrevII	CTTAAAGACTATTGTTTTATTCCCAAATTGTTTTCTTAATTTATAACTAT CTTATTTAAg
NHR_Vtol_forII	CAGAACAATCTGCTGAGGGCTATTGAGGGCGAACAGCATCTG
NHR_Vtol_revII	CAGATGCTGTTGCGCCTCAATAGCCCTCAGCAGATTGTTCTG
NHR_AtoT_forII	CAGCTCCAGGCAAGAGTCCTGACTGTGGAAAGATACCTAAGGG
NHR_AtoT_revII	CCCTTAGGTATCTTTCCACAGTCAGGACTCTTGCCTGGAGCTG
QCM750CTfor2	AAGACAGGGCTTGGAAAGGGCTTTGCTATAAGAAGG
QCM750CTrev2	CCTTCTTATAGCAAAGCCCTTTCCAAGCCCTGTCTT

### 3.5.4.2 Sequenzierungsoligonukleotide

<b>Name</b>	<b>Sequenz in 5' → 3' Orientierung</b>
Env6658r	ATCTCTCCTTTCTCCATTATCATTCTCC
Env6645f	GCACTGATTTGAAGAATGATACTAATACC
Env7187f	CAGGGAGAGCATTGTTACAATAGG
Env7685f	AGTAAAATTGAACCATTAGGAGTAGC
Env8435f	GAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGG
EnvALT6761rev	CTTGGGTGGCATTAAAAGAGC
EnvALT8140for	GAGGGGACCTAGAAATTGTAATGC
EnvALT8483for	GGGAGATATGAGGGACAATTGG
Env6658r	ATCTCTCCTTTCTCCATTATCATTCTCC
M5r	ACACCAGCCACCACCTTCTG
M5f	CAACGTGCTGGTTGTTGTGC
Env8628f	AATATTGGTGGAAATCTCCTACAGTATTGG
Env8205f	ATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGG



### 3.5.5 Enzyme und DNA Größenstandards

Enzyme	Hersteller
100bp-Größenstandard	New England Biolabs, Frankfurt am Main
1Kb-Größenstandard	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Biotherm Polymerase	NatuTec, Frankfurt am Main
Calf Intestine Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Desoxynucleotid-Mischung (dNTP; 10mM je Nucleotid)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNAseI	Invitrogen, Karlsruhe
<i>High Fidelity Plus PCR System</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
<i>Pfx</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Reverse Transkriptase, Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
RNAseinhistor RNAseOUT	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Verschiedene DNA-Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Enzyme in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern und Zusätzen verwendet.

### 3.6 Durchflusszytometrie-Beads

Standardbeads	Hersteller
Quantum Simply cellular Anti-human IgG	Bangs Laboratories, Fishers (IN, USA)
Quantum Simply cellular Anti-mouse IgG	Sigma, Deisenhofen

## 3.7 Geräte und Labormaterial

### 3.7.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegelkammer, SubCell GT	BioRad, München
Analysenwaage	Mettler-Teledo GmbH, Gießen
Brutschrank für Zellkulturen	Heraeus, Hanau
Casy TT, Zellzählsystem	Schärfe System, Reutlingen
Durchflusszytometer FACS-Calibur	BD, Heidelberg
Elektrophorese-Apparatur für Polyacrylamidgele	Biometra, Göttingen
Heizblock DriBlock DB-2D	Techne, Wertheim
Inkubator Cytoperm	Heraeus Instruments, Hanau
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, Krefeld
Lumistar Optima	BMG LABTECH GmbH, Offenburg
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode
Microskope DM IL	Leica, Wetzlar
PCR-Thermocycler T-personal combi	Biometra, Göttingen
Pipetten Pipetman	Gilson, Middleton (USA)
Schüttler Duomax 2030	Heidolph, Kelkheim
Spannungsquelle Power-Pac 1000	BioRad, München
Sterilbank Hera Safe HS12	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge L8-80M	Beckman, Krefeld
Ultrazentrifuge TL-100	Beckman, Krefeld
Ultrazentrifugenrotor SW32-Ti	Beckman, Krefeld
UV-Dokumentationssystem; Gel Doc 2000	BioRad, München
Vortexer, Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich (Schweiz)
Waage 440-41	Kern & Sohn GMBH, Balingen
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Großwedel
Wippschüttler	Bühler GmbH, Hechingen

### 3.7.2 Labormaterial

Material	Hersteller
15ml Röhrchen	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
20ml Einmalspritze	Codan, Lensahn
24-Lochschale Cellstar	Greiner bio-one, Frickenhausen
250ml Vakuumfiltereinheit (0,45�m Porengröße)	Corning, New York (USA)
50ml Röhrchen	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
96-Wellschalen	Corning, New York (USA)
Filterspitzen Biosphere 10�l	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen Biosphere 1000�l	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen Biosphere 20�l	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen Biosphere 200�l	Sarstedt, Nümbrecht
Fixierer (für Hyperfilm)	Kodak, Rochester (USA)
Kryoröhrchen (2ml)	Nalge Europe Neerijse, Belgium
Microlite 96-well Dynex Microplate (Mikrotiterplatten für Luziferase-Versuche)	Thermo Life Science, Dreieich
Mikroreaktionsgefäße (1,5 und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäß 0,2ml	Peq Lab, Erlangen
Petrischalen (10cm �) Cellstar	Greiner bio-one, Frickenhausen
Rundbodenröhrchen, 5 ml (Polystyrol, FACS-Röhrchen)	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzenaufsatzfilter Millex-HA 0,45�m	Millipore, Schwalbach
Sterile Einmalpipetten (gestopft) 10ml	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterile Einmalpipetten (gestopft) 25ml	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterile Einmalpipetten (gestopft) 2ml	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterile Einmalpipetten (gestopft) 5ml	BD Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Ultrazentrifugenröhrchen Polyallomer 25x89mm	Beckman, Krefeld

### 3.7.3 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
ECL-Proteinbiotinylierungsmodul	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Fluorotag™ Kit (FITC-Konjugation)	Sigma, Deisenhofen
Innotest HIV Antigen mAB, p24-Antigen ELISA	Innogenetics, Ghent (Belgien)
E.N.Z.A. Cycle pure Kit	peQLab, Erlangen
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit (DNA-Präparation, analytisch)	Genomed, Löhne
JETquick Gel Extraction Spin Kit (Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen)	Genomed, Löhne
Nucleobond AX Maxiprep Kit (DNA-Präparation)	Machery & Nagel, Düren
Qiamp viral RNA Mini Kit (virale RNA-Isolierung)	Qiagen, Hilden
QuikChange XL Kit (gerichtete Mutagenese)	Stratagene, Heidelberg
TOPO XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

## 4 Methoden

### 4.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

#### 4.1.1 Kulturbedingungen von *E. coli*

Der *E. coli*-Stamm TOP10 wurde in LB-Medium kultiviert. Transformierte Bakterien wurden in Gegenwart von Antibiotikum kultiviert. In Abhängigkeit von dem verwendeten Resistenzgen wurde den Nährmedien bzw. den Agarplatten entweder Ampicillin (100µg/ml) oder Kanamycin (60µg/ml) zugesetzt.

#### 4.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*

Hierzu wurden Bakterien auf einer LB-Agarplatte vereinzelt und bei 37°C inkubiert (15h). Mit einem Einzelklon wurden 4ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler über Nacht inkubiert. Mit 1ml dieser Lösung wurden dann 400ml LB-Medium inokuliert und solange bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert (ca. 3-4h), bis die optische Dichte des Mediums bei 600nm zwischen 0,4 und 0,6 lag. Anschließend wurde das Wachstum der Bakterien gestoppt, indem die Suspension auf Eis gekühlt wurde.

Im nächsten Schritt wurden die Bakterien durch Zentrifugieren sedimentiert (10.000g; 10min). Anschließend wurden sie in 100ml eiskaltem 50mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und auf Eis inkubiert (15min). Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben erneut sedimentiert und in 20ml 50mM CaCl<sub>2</sub> / 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Nach einer Inkubation (4h) bei 4°C wurden die Bakterien à 200µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### 4.1.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Für einen Transformationsansatz wurden 50µl chemisch kompetenter Bakterien verwendet. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und dann mit der DNA eines Ligationsansatzes (10-50µl) oder mit *supercoiled* Plasmid-DNA (10ng) versetzt. Nachdem die Bakterien auf Eis inkubiert wurden (20min), erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C (120sec). Anschließend wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt (5min). Danach wurden sie in 500 µl LB-Medium aufgenommen, bei 37°C unter Schütteln inkubiert (1h), anschließend auf antibiotikumhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C wachsen lassen. Nach dieser Zeit wurden

mehrere Einzelkolonien für die weitere Analyse ausgewählt und mit ihnen 2ml einer Flüssigkultur angeimpft, die für eine Plasmid-Minipräparation geeignet war.

#### **4.1.4 Lagerung von *E. coli***

Um die Bakterien dauerhaft zu lagern wurden DMSO-haltige Kulturen von transformierten Bakterien angelegt. Hierfür wurden die Zellen in antibiotikumhaltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Das Kulturvolumen wurde mit der selben Menge von 7%iger DMSO/PBS-Lösung gemischt und bei -80°C gelagert.

Lagerung von Bakterienkolonien auf Agarplatten oder von Flüssigkulturen war im Kühlschrank bei 4°C über mehrere Wochen möglich, ohne dass die Bakterien ihre Teilungsfähigkeit verloren.

## **4.2 Molekularbiologische Methoden**

### **4.2.1 Plasmidpräparationen**

#### **4.2.1.1 Analytische Plasmidpräparation**

Plasmidpräparation im analytischen Maßstab erfolgte mithilfe des JETquick *plasmid miniprep spin* Kit nach der Anleitung des Herstellers.

#### **4.2.1.2 Großpräparation**

Plasmidpräparation im präparativen Maßstab erfolgte mithilfe des Nucleobond AX Maxiprep Kits nach der Anleitung des Herstellers.

#### 4.2.2 Isolierung von viraler RNA aus Zellkulturüberständen

Zur Isolierung viraler RNA wurde zunächst 1.000µl des virushaltigen Überstandes durch Ultrazentrifugieren (Beckman TL100) bei 25.000rpm sedimentiert (2,5h, 4°C). Anschließend wurde der Überstand bis auf 140µl verworfen und das Sediment in diesem Volumen resuspendiert. Das gesamte Volumen wurde dann für die RNA-Isolierung mithilfe des Qiagen QiaAmp Viral RNA Kits verwendet. Die Präparation wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

#### 4.2.3 Herstellung von cDNA durch Reverse Transkription

Zur Reversen Transkription wurden 10µl RNA verwendet. Der RNA wurden zunächst 1µl dNTPs (10mM) und 1µl Primer N (ca. 100ng) zugesetzt und die Mischung bei 65°C inkubiert (5min), um evtl. Sekundärstrukturen in Primer und RNA aufzulösen. Anschließend wurden dem Ansatz 4µl First-Strand-Puffer (5x), 1µl RNase-Inhibitor RNaseOUT, 2µl DTT (0,1M) und 1µl Superscript II Reverse Transkriptase hinzugefügt. Zur cDNA-Synthese wurde der Ansatz zunächst bei RT (10min) und dann bei 42°C inkubiert (120min), anschließend die Reverse Transkriptase durch Erhitzen der Probe auf 70°C inaktiviert (10min).

#### 4.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt eine sehr schnelle Methode zur *in vitro* Amplifikation und/oder Mutagenese von DNA-Sequenzen dar.

Mithilfe von zwei Oligonukleotiden, die jeweils am Sense- und Anti-Sense-Strang der DNA binden, kann die dazwischen liegende Zielsequenz amplifiziert werden. Durch die Verwendung von Oligonukleotiden, die keine vollkommene Komplementarität zum Gegenstrang aufweisen, ist das Einfügen von Punktmutationen in beliebig wählbare Zielsequenzen möglich. Dieser Vorgang wird als gerichtete Mutagenese bezeichnet.

Die Polymerisation der gewünschten DNA-Sequenz erfolgt mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Die Synthesereaktion verläuft zyklisch und ist in Intervalle unterschiedlicher Reaktionstemperatur unterteilt. Ein Zyklus umfasst typischerweise drei Temperaturstufen: Er beginnt mit dem Aufschmelzen, d.h. der Trennung des DNA-Doppelstranges bei hoher Temperatur. Anschließend erfolgt die Anlagerung der Primer (niedrige Temperatur) und danach die Polymerisationsreaktion (mittlere Temperatur), bei der das DNA-Stück zwischen den Anlagerungsorten der Primer amplifiziert wird.

#### 4.2.4.1 *Nested* PCR

Um eine höhere Empfindlichkeit und stärkere Amplifikation der Zielsequenz zu erreichen, wurde eine *nested* PCR durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Zielsequenz zunächst in einer Standard-PCR („äußere“ PCR) amplifiziert. Anschließend wird ein Teil dieser Reaktion als Matrize für eine weitere PCR („innere“ PCR) verwendet. Bei dieser PCR werden jedoch nicht dieselben Oligonukleotide verwendet wie bei der ersten PCR, sondern Primer, die weiter innerhalb der Zielsequenz binden. Durch die Verwendung dieses zweiten Oligonukleotidpaares kann auch die Spezifität erhöht werden, da falsche Nebenprodukte aus der ersten PCR nicht amplifiziert werden können.

Zur Amplifikation der HIV Ba-L Env-Gene wurde eine *nested* PCR mit dem High Fidelity Plus PCR System durchgeführt. Als Matrize diente in der ersten (äußeren) PCR 10µl Env cDNA. Das Env-Gen wurde hierbei mit den beiden Primern A und TNE3\_fh amplifiziert. In der zweiten PCR wurden 2µl des Reaktionsvolumens der ersten PCR als Matrize verwendet und die Primer HIVkozakEnv6253f-(2) und HIVnef9047rev benutzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches war in beiden PCR dieselbe und ist in **Tabelle 4-1** dargestellt.

**Tabelle 4-1: Zusammensetzung der PCR-Ansätze für *nested* PCR**

	äußere PCR, Volumen [µl]	innere PCR Volumen [µl]
5x Amplifikationspuffer 2 (mit MgCl <sub>2</sub> )	10	10
dNTP-Lösung (10mM ATP, GTP, CTP, TTP)	1,5	1,5
Primer 1 (10µM)	1,5	1,5
Primer 2 (10µM)	1,5	1,5
High Fidelity Plus Enzymmix	0,8	0,8
Matrize	10	2
Ad 50µl mit H <sub>2</sub> O	24,7	32,7
Gesamtvolumen	50	50

Die Amplifikation erfolgte für beide PCRs mit dem in **Tabelle 4-2** dargestellten Cycling-Programms.



Tabelle 4-2: Programmierung des PCR-Gerätes

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min / sec]	Inkrement [+ sec / Zyklus]	Wiederholungen
1	94	2 / 0		
2	94	0 / 10		10
3	59	0 / 30		
4	68	3 / 20		
5	94	0 / 10		
6	59	0 / 30		25
7	68	3 / 0	20	
8	68	7 / 0		

#### 4.2.4.2 Gerichtete Mutagenesereaktion

Um Punktmutationen in Plasmide einzufügen, wurde das „QuikChange XL *site directed mutagenesis* Kit“ von Stratagene nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Die Methode basiert auf PCR und soll an dieser Stelle in Kürze dargestellt werden. Der Basenaustausch wird durch zwei Oligonukleotide (Primer) von ca. 30-45bp-Länge in das Plasmid eingefügt. Die Primer sind bis auf die gewünschten Basenänderung komplementär zu den beiden DNA-Strängen der Zielsequenz. Der 1. Primer enthält somit die gewünschte Mutation für den Plus-Strang, der 2. Primer die entsprechende Mutation für den Gegenstrang.

Mit beiden Primern wird nun eine PCR durchgeführt. Die Elongationsphase ist dabei so lang, dass ausgehend von beiden Primern sowohl der Plus- als auch der Minus-Strang komplett amplifiziert werden können. Nach der PCR liegt somit eine Mischung aus Plasmid-DNA vor, welche die gewünschte Mutation enthält (PCR-Produkt), und solcher, die noch die Ursprungssequenz trägt (Matrize). Die unerwünschte Matrizen-DNA wird nach der PCR durch eine vom Restriktionsenzym *DpnI* katalysierte Hydrolysereaktion zerstört. Das Restriktionsenzym *DpnI* ist nur aktiv, wenn seine DNA-Zielsequenz methyliert ist. Methylierungen finden sich jedoch nur in der Matrizen-DNA und nicht in dem neu synthetisierten PCR-Produkt. Dieses kann dann für eine Transformationsreaktion eingesetzt werden.

## 4.2.5 Restriktionshydrolyse von DNA

DNA-Restriktionsenzyme wurden für die Generierung von spezifischen DNA-Fragmenten verwendet. Dabei wird der Umstand ausgenutzt, dass Restriktionsenzyme die DNA nur an bestimmten kurzen Zielsequenzen schneiden. Die Herstellung von genetischen Konstrukten ist nur möglich, wenn spezifische DNA-Fragmente hergestellt werden können. Des Weiteren wurden Restriktionen auch durchgeführt, um die Identität und Orientierung eines DNA-Inserts innerhalb eines Plasmids anhand der entstehenden Fragmente zu überprüfen.

Für einen analytischen Ansatz wurden 300-600ng Plasmid-DNA mit 1-3Units des jeweiligen Enzyms verdaut. Bei präparativen Restriktionsreaktionen wurden ca. 5-6µg DNA verwendet, die mit 10Units des Enzyms behandelt wurden (Unitdefinition des Herstellers). Die Wahl des Puffers und der Inkubationstemperatur erfolgten nach den Vorgaben des Herstellers. Das Gesamtvolumen des jeweiligen Restriktionsansatzes betrug entweder 30µl (Analyse) oder 70µl (Präparation). Die Differenz zum Endvolumen wurde mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Inkubationszeit der Proben betrug von 30min bis zu 4h.

## 4.2.6 Modifikation von DNA-Enden

### 4.2.6.1 Verwendung des Klenow-Fragments

Der Restriktionsverdau von DNA mit bestimmten Restriktionsenzymen führt zur Bildung von 5'-Einzelstrangüberhängen. Bei einigen Klonierungsarbeiten mussten diese Überhänge entfernt werden, um eine Ligation von ansonsten nicht kompatiblen Strangenden zu ermöglichen. In diesen Fällen wurden mithilfe des Klenow-Fragments das rezessive 3'-Ende durch die DNA-Polymeraseaktivität des Klenow-Fragments vervollständigt, um glatte Enden herzustellen. Dazu wurde 1Unit des Enzyms in dem vom Hersteller mitgelieferten 10x Puffer, 1µl dNTP-Mix (je 1mM dCTP, dATP, dGTP und dTTP) mit 1µg DNA vereinigt. Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert (15min) und das Klenow-Fragment anschließend bei 75°C hitzeinaktiviert (20min). Die DNA wurde dann direkt für die folgenden Reaktionen verwendet.

### 4.2.6.2 Verwendung der T4-DNA-Polymerase

Die Aktivität einiger Restriktionsenzyme führt während des DNA-Restriktionsverdaus zur Bildung von 3'-Einzelstrangüberhängen. Bei manchen Klonierungsarbeiten wurden diese Überhänge entfernt, um eine Ligation der Strangenden, die ansonsten nicht komplementär

gewesen wären, zu ermöglichen. Hierbei wurde die Exonukleaseaktivität der T4-Polymerase verwendet, um das überhängende 3'-Ende zu entfernen und so glatte Enden herzustellen. Dazu wurden dem Restriktionsansatz 3 Units des Enzyms T4-DNA-Polymerase zusammen mit 1µl dNTP-Mix (je 1mM dCTP, dATP, dGTP und dTTP) zugesetzt. Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert (15 min). T4-DNA-Polymerase wurde bei 75°C hitzeinaktiviert (20min) und die DNA konnte anschließend für die weitere Klonierung verwendet werden.

#### 4.2.6.3 Synthese von 3'-Adenosinüberhängen an PCR-Produkten

Das High Fidelity Plus PCR System enthält eine Mischung von DNA-Polymerasen, bestehend aus der Taq-Polymerase und einer *proof-reading* Polymerase. Die Taq-Polymerase hat die Eigenschaft, die 3'-Enden der PCR-Produkte um einen einzelnen überhängenden Adenosinrest zu verlängern. Der *proof-reading* Polymerase fehlt diese Eigenschaft, so dass sie nur glatte DNA-Enden synthetisiert. Nach einer PCR-Reaktion, die mit dem High Fidelity Plus PCR System durchgeführt wurde, liegt folglich eine Mischung von DNA-Fragmenten mit und ohne Adenosinüberhänge vor. Da für die Ligation der PCR-Produkte mit dem pCR-XL-TOPO Vektor nur Produkte mit 3'-Adenosinüberhang verwendet werden konnten, wurden PCR-Ansätze nach der Reaktion zusätzlich mit Taq-Polymerase (Biotherm-Polymerase) behandelt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 30µl mit 20µl des gereinigten PCR-Produktes durchgeführt. Der Ansatz wurde mit dem Puffer des Herstellers, dNTPs (Stammlösung 10mM je Nukleotid) und 1µl Biotherm-Polymerase supplementiert. Die Reaktion erfolgte 10 Minuten lang bei 72°C und wurde anschließend das PCR-Produkt gereinigt.

#### 4.2.6.4 Eliminierung der 5'-Phosphatreste an linearisierter DNA

Bei der Herstellung von neuen Plasmidvarianten ist ein direkter Ringschluss zwischen den Enden eines linearisierten Plasmids eine unerwünschte Nebenreaktion. Um die Wahrscheinlichkeit der Inkorporation des gewünschten DNA-Fragments in die Plasmid-DNA während der Ligationsreaktion zu erhöhen, wurden die 5'-Phosphatreste an den terminalen Nukleotidbasen der Vektor-DNA entfernt. Für die Dephosphorylierung wurde der Restriktionsansatz mit 10 Reaktionseinheiten alkalische Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase, New England Biolabs) versetzt und bei 37°C inkubiert (1h). Das Enzym wurde bei 65°C hitzeinaktiviert (20min). Die so erhaltene DNA konnte sofort für Ligationsreaktionen eingesetzt werden.

#### 4.2.6.5 Phosphorylierung der 5'-DNA-Enden

Da Primer synthetisch hergestellt werden, tragen sie an ihrem 5'-Ende kein Phosphat. Daher müssen PCR-Produkte phosphoryliert werden, um mit dephosphorylierten Vektoren ligiert werden zu können. Für diese Reaktion wurde die T4-Polynukleotidkinase (PNK, siehe Abschnitt 3.5.5) verwendet. Für ein Reaktionsvolumen von 70µl wurden ca. 8µg DNA mit 1/10 des Volumens PNK-Puffer und 3µl 10mM ATP versetzt. Der Ansatz wurde dann mit ddH<sub>2</sub>O auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei 37°C durchgeführt (1h).

#### 4.2.7 Gelelektrophorese von DNA

Zur Überprüfung von Restriktionen und zur Präparation von DNA-Fragmenten wurden diese auf 0,8-2%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in TAE-Puffer gelöst und in einem Mikrowellenofen erhitzt. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde sie in eine Flachbettform gegossen. Die DNA wurde durch zwei unterschiedliche Chemikalien sichtbar gemacht. Durch Entweder durch die Zugabe von Ethidiumbromid (2µl EthBr-Stammlösung pro 50ml Gel) oder von Kristallviolett (50µl Stammlösung pro 50ml Gel). Beide Chemikalien interkalieren in die DNA. Der Kristallviolett-DNA-Komplex ist bei normalem Weißlicht sichtbar, während der Ethidiumbromid-DNA-Komplex nur bei UV-Bestrahlung aufleuchtet.

#### 4.2.8 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Während der Klonierungen mussten die Vektor- und Insert-DNA zuweilen umgepuffert werden. Dies war notwendig, um sicherzustellen, dass die Enzyme zur Restriktion und Modifikation jeweils die richtige pH- und Salzumgebung für optimale Aktivität hatten. Falls vom Hersteller nicht angegeben wurde, dass zwei Enzyme in Hinblick auf ihren verwendeten Puffer kompatibel waren, wurde die DNA mithilfe des „E.N.Z.A. *Cycle pure Kit*“ über eine Silicagelmatrix nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt und in 50µl 70°C-warmen TE-Puffer eluiert.

Um spezifische DNA-Fragmente zu isolieren und für nachfolgende Reaktionen zu verwenden, wurde der jeweilige Restriktionsverdau oder PCR-Ansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der Bereich des Agarosegels, welcher das gewünschte Fragment enthielt, wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA mithilfe des „JETquick *Gel Extraction Spin Kits*“.

## 4.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

### 4.2.9.1 Ligation des pCR-XL-TOPO-Vektors mit DNA-Fragmenten

PCR-Produkte der HIV Env-Gene, die mit dem „High Fidelity Plus PCR System“ synthetisiert wurden, wurden in den „pCR-XL-TOPO“ Vektor ligiert. Dieser Vektor wird vom Hersteller bereits linearisiert vertrieben und trägt an beiden Enden das Enzym Topoisomerase, das eine effiziente und schnelle Insertion des PCR-Produktes in den Vektor gewährleistet. Da der pCR-XL-TOPO Vektor nur mit Fragmenten, die einen einzelnen 3'-A-Überhang aufweisen, ligiert werden kann, wurden die PCR-Produkte zuvor mit Taq-Polymerase (4.2.6.3) behandelt. Die Ligation erfolgte nach der Anweisung des Herstellers. Die kompletten Ligationsansätze wurden für die Transformation von *E. coli* Bakterien verwendet und auf einer LB-Agarplatte, versetzt mit Kanamycin, ausplattiert. Nach 12-14h waren die Bakterienkolonien sichtbar und konnten für das Animpfen von Minikulturen mit je 2ml kanamycinhaltigem LB-Medium eingesetzt werden.

### 4.2.9.2 DNA-Ligation mit der T4-DNA-Ligase

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde mit der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Die Ligation erfolgte über Nacht (16°C) einem Gesamtvolumen von 25µl mit 2,5µl des 10x Ligase-Puffers und 1µl T4 DNA-Ligase. Für die Ligation wurden etwa 200ng des geschnittenen Plasmids und ein etwa dreifacher Überschuss des Inserts eingesetzt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet.

## 4.2.10 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Service-Abteilung des „Georg Speyer Hauses“ (Margot Landersz, Dr. Ursula Dietrich) mit einem 3100 Avant *Genetic Analyzer* durchgeführt. Die erfolgten mit dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (143). Zur Sequenzierung von Minipräparationen wurden 10µl DNA-Lösung verwendet und mit 1µl 10µM Primerlösung versetzt. Bei Maxipräparationen wurden 0,5µg Plasmid-DNA bei der Sequenzierreaktion eingesetzt. Zur direkten Sequenzierung von PCR-Produkten wurden 10µl (~0,5µg) des gereinigten PCR-Ansatzes mit 1µl einer 10µM Primerlösung versetzt.

## 4.3 Methoden der Zellkultur

### 4.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen innerhalb einer – vor Arbeitsbeginn mit 70% Ethanol gereinigten – Sterilbank der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Alle Zelllinien wurden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten, 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Alle Materialien (Plastikmaterial, Medien, Zusätze etc.) für Zellkulturarbeiten wurden vorher auf geeignete Weise sterilisiert oder direkt steril bezogen.

### 4.3.2 Passagieren von Zellen

#### 4.3.2.1 Passagieren von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden mit einer Zelldichte von ca.  $5 \cdot 10^4$ – $2 \cdot 10^5$  Zellen ausgesät und bei einer Dichte von ca.  $1$ – $2 \cdot 10^6$  umgesetzt. Um die Kulturbedingungen für die Zelllinien optimal zu halten, wurde, in einem Abstand von 3-4 Tagen ein Teil der Zellen verworfen und die verbliebenen Zellen in frischem Medium aufgenommen.

#### 4.3.2.2 Passagieren von adhärennten Zellen

Adhärennte Zelllinien wurden subkonfluent gehalten und maximal bis zu einer Dichte von ca. 70-80% wachsen lassen, bevor sie passagiert wurden. Dabei wurde zunächst das verbrauchte Medium entfernt. Der Zellrasen wurde mit sterilem PBS gewaschen, um das Trypsin blockierende FCS komplett zu entfernen. Danach wurde eine möglichst kleine Menge Trypsin-EDTA-Mix (den Flaschenboden vollständig bedeckend) zugegeben. Durch die Trypsinbehandlung werden die Adhäsionsmoleküle der Zellen vom Boden der Flasche getrennt. Das ebenfalls in der Lösung enthaltene EDTA, chelatierte Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen. Die für das Anheften der Zellen notwendigen Ionen stehen somit nicht mehr zur Verfügung. Die Inkubation dauerte ca. 45sec; durch leichtes Klopfen an die Flasche konnten die Zellen so dann komplett von dieser gelöst werden. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt. Danach wurden die Zellen in frischem Medium verdünnt (je nach Wachstumsgeschwindigkeit 1:4-1:10) und in neue Kulturflaschen überführt.

### 4.3.3 Anlegen von Kryokulturen

Dauerkulturen von Zelllinien wurden in einem Stickstoffgasphasenlagersystem bei -145°C gelagert. Dazu wurden je Probe 5-10•10<sup>6</sup> Zellen in 1ml Kryokonservierungsmedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde dann 24 Stunden lang bei -80°C eingelagert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen in das Stickstofflagersystem eingebracht.

### 4.3.4 Isolierung von PBMC aus Blut

Buffy Coat-Blut wurde 1:2 mit PBS verdünnt. 25ml Ficoll wurden vorsichtig mit 25ml Blut überschichtet und anschließend 30min mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert (1.500rpm, RT). Anschließend wurde die Interphase, welche die PBMC enthält vorsichtig abgesaugt und die Interphasezellen wurden sodann zweimal in PBS gewaschen.

### 4.3.5 Transiente Transfektion

Durch Transfektion mithilfe der Calcium-Phosphat-Methode (61, 170) wurde Plasmid-DNA zur transienten Genexpression in 293T-Zellen eingebracht. Bei dieser Methode wird die DNA zusammen mit Calcium-Phosphat-Kristallen komplexiert und in die Zellen endozytotisch aufgenommen.

#### 4.3.5.1 Herstellung von $\gamma$ -retroviralen und lentiviralen Vektoren

Replikationsinkompetente virale Vektoren wurden mithilfe des sog. Drei-Plasmid-Systems hergestellt. Hierbei ist die genetische Information des Virus auf ein lenti- oder  $\gamma$ -retroviralen Transfervektorplasmid und zwei entsprechende Hilfsplasmide verteilt. Wegen der räumlichen Separation wird die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von replikationskompetenten Retroviren durch homologe Rekombination zwischen den drei Plasmiden stark vermindert. Das Transfervektorplasmid enthält das Transgen, das virales Verpackungssignal ( $\psi$ ) und LTRs, jedoch keine genetische Information zur Generierung viraler Proteine. Die beiden Hilfsplasmide komplettieren die fehlenden viralen Genfunktionen *in trans*. Sie liefern die Information für Strukturproteine und virale Enzymfunktionen (Hilfsplasmid GagPol), sowie das Gen für das Hüllprotein (Hilfsplasmid Env). Die so produzierten viralen Vektorpartikel tragen als einzige genetische Information den Transfervektor, da nur dieser Vektor in das Partikel aufgenommen werden kann. Die so gewonnenen Vektoren sind daher auf einen einzigen Infektionszyklus beschränkt.

Zur Herstellung der Vektoren wurden 24h vor der Transfektion  $6 \cdot 10^6$  293T Zellen in eine 10cm-Schale in einem Volumen von 8ml Standard-DMEM ausgesät. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium gegen frisches Transfektionsmedium ausgetauscht. Für  $\gamma$ -retrovirale Verpackungen wurde Standard-DMEM mit Chloroquin ( $25\mu\text{M}$  Endkonzentration) und für lentivirale Verpackungen DMEM-Medium verwendet, welches nur mit 2% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und Chloroquin ( $25\mu\text{M}$  Endkonzentration) supplementiert war. Der DNA-Transfektionsansatz für je eine 10cm-Schale wurde folgendermaßen in einem 1,5ml Röhrchen vorbereitet:

**Tabelle 4-3: Zusammensetzung des Transfektionsansatzes**

	lentivirale Vektoren	$\gamma$ -retrovirale Vektoren	DNA-Menge [ $\mu\text{l}$ ]
Gagpol-Expressionsplasmid [ $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	M334	M57	12,5
Transfektorplasmid [ $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	M420 oder M386*	C-Peptid-Vektoren*	7,5
Env-Expressionsplasmid [ $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	HIV-Env, VSV-g*	GALV-Env	1
H <sub>2</sub> O			ad 450
CaCl <sub>2</sub> [2,5M]			50

\*Das jeweils verwendete Plasmid ist im Ergebnisteil beschrieben.

Die DNA-Mischung wurde anschließend langsam zu  $500\mu\text{l}$  2xHEPES-Puffer unter ständigem Vortexen tropfenweise zugesetzt und bei RT inkubiert (20min). In dieser Zeit bildeten sich die DNA-haltigen Calciumphosphatpräzipitate. Die Komplexe wurden dann auf die Zellen gegeben. Nach 5-6h wurde das Transfektionsmedium durch frisches Standard-DMEM ersetzt. Vektorhaltiger Überstand wurde 24h und 48h nach Transfektion gesammelt und durch einen  $0,45\mu\text{m}$  Filter filtriert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde entweder direkt aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  für spätere Anwendung gelagert oder zuvor durch Ultrazentrifugieren konzentriert.

#### 4.3.6 Konzentration lentiviraler Überstände durch Ultrazentrifugieren

Je 30ml des vektorhaltigen Überstandes wurden in ein UZ-Röhrchen gefüllt und vorsichtig mit 5ml einer 20%igen Saccharose/PBS-Lösung unterschichtet. Das Zentrifugieren erfolgte bei 25.000rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 2h. Anschließend wurde der Überstand durch Abgießen verworfen. Das Vektorsediment wurde dann in GNT-E-Puffer aufgenommen und auf einem Schüttler (4h) oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  resuspendiert. Danach wurde der Überstand aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.



### 4.3.7 Transduktion von Zelllinien mit retroviralen Vektoren

Bei  $\gamma$ -retroviraler Transduktion wurden  $1\text{-}2\cdot 10^5$  PM-1 Zellen pro Vertiefung in eine 24-Lochschale ausgesät (500 $\mu$ l Gesamtvolumen mit Standard-RPMI1640-Medium). Lentivirale Transduktion wurde hingegen in einer 96-Lochplatte durchgeführt. Hierbei wurden je Vertiefung  $1\text{-}5\cdot 10^4$  Zellen ausgesät. Anschließend wurde der vektorhaltige Überstand auf die Zellen gegeben. Es erfolgte dann ein einstündiger Zentrifugationsschritt bei 31 °C und entweder 650g ( $\gamma$ -retrovirale Transduktion) oder 1.500g (lentivirale Transduktion), um eine bessere Inokulierung der Zellen mit den Vektorpartikeln zu gewährleisten. Die Zellen wurden dann bis zu sechs Tagen weiterkultiviert, bis die Expression des Transgens analysiert werden konnte. Die Analyse erfolgte entweder durchflusszytometrisch (bei GFP-Markergen oder maC46-Gen) oder mithilfe des Luminometers (bei Luziferase-Markergen). In einigen Fällen wurde der vektorhaltige Überstand nach 24h durch frisches Standard-Medium ersetzt.

Um eine höhere Transduktionseffizienz zu erzielen, wurde für einige lentivirale Transduktionen die 96-Wellenschale vor Aussat der Zellen mit 50 $\mu$ l Retronectinlösung beschichtet und bei RT inkubiert (3h). Anschließend wurde das Retronectin abgenommen und die Platte mit 2%BSA/PBS geblockt (30min, RT).

#### 4.3.7.1 Titration von lentiviralen Vektoren

Für die Titerbestimmung lentiviraler Überstände wurde die Transduktion durchgeführt wie unter 4.3.7 beschrieben. Für eine Titrationsreihe wurden Mehrfachansätze mit unterschiedlichen Vektorüberstandsmengen verwendet. Vektoren mit GFP-Transgen wurden in Duplikaten titriert, Vektoren mit Luziferasetransgen hingegen in Triplikaten. Die verwendeten Überstandsmengen reichten von 200 $\mu$ l bis 0,01 $\mu$ l.

Bei Verwendung von GFP-Vektoren wurde die Transduktionseffizienz nach 5-7 Tagen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Nur Ansätze, in denen die Transduktionsrate unter 20% lag, wurden für die Berechnung des Titers herangezogen. Bei dieser Transduktionseffizienz ist der Anteil an Zellen, die mehrfach transduziert sind, noch relativ gering (47). Ein großer Anteil an Zellen, die Mehrfachintegrationen tragen, führt zur Unterschätzung des Titers. Die Berechnung des Titers erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Infektiöse Partikel}}{\text{ml}} = \text{Verdünnungsf.} \times \text{Anzahl der ausgesäten Zellen} \times \left( \frac{\% \text{ positive Zellen}}{100} \right)$$

Die Transduktionseffizienz der Luziferase-Vektoren wurden nach 5-7 Tagen anhand der Luziferaseaktivität in den Zielzellen bestimmt. Zur Berechnung des Titers wurden nur die Verdünnungen herangezogen, bei denen ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetztem Volumen und Luziferaseaktivität erkennbar war. Die Berechnung der Luziferaseaktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Luziferaseaktivität}}{\text{ml}} = \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{relative Light Units}$$

#### 4.3.7.2 Bestimmung der Fusionsgeschwindigkeit lentiviraler Vektoren

Für die Analyse der Fusionskinetik wurden  $1 \cdot 10^4$  PM-1 Zellen je Ansatz mit lentiviralen Vektoren versetzt. Zellen und Medium waren auf  $4^\circ\text{C}$  vorgekühlt worden, um eine vorzeitige Fusion zu verhindern. Die Zellen wurden anschließend in Triplikatansätzen in eine 96-Lochplatte ausgesät ( $100\mu\text{l}$ ) und zentrifugiert ( $4^\circ\text{C}$ ,  $1.500\text{g}$ ,  $1\text{h}$ ). Die Platte wurde dann auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt. Nun wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (Minute 0 bis 420 nach Erwärmung) der Fusionsinhibitor T-20 (Endkonzentration:  $5\mu\text{M}$ ) zu den Ansätzen ( $100\mu\text{l}$ ) hinzugegeben, um das Fortschreiten der Fusion zu inhibieren. Zur Kontrolle wurden Ansätze mitgeführt, denen kein Fusionsinhibitor zugesetzt wurde und Zellen, die nicht transduziert worden waren. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen 5-6 Tage weiter kultiviert. Anschließend wurde die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt. Die Transduktionseffizienz der Proben wurde auf die Transduktionseffizienz der Kontrollansätze (ohne T-20) normiert.

#### 4.3.8 Selektion von transduzierten Zellen

Zum Erhalt von reinen transgenpositiven Zellkulturen wurde eine Selektion mit G418 durchgeführt, falls der verwendete retrovirale Vektor ein Neomycinresistenzgen kodierte. Transduzierte PM-1 Zellen wurden für 2 Wochen mit G148 selektiert, wobei die Konzentration im Medium  $0,8\text{mg/ml}$  betrug. Der Erfolg der Selektion wurde durchflusszytometrisch überprüft.

#### 4.3.9 Bestimmung der Sensibilität der lentiviralen Vektoren gegenüber Eintrittsinhibitoren

Zellen (entweder  $2 \cdot 10^4$  U87 CD4 CCR5 oder  $1 \cdot 10^4$  PM-1 je Ansatz) wurden bei RT mit lentiviralen Vektoren versetzt. Der verwendete Vektortiter war für alle Ansätze einheitlich und recht niedrig, um Mehrfachintegrationen zu vermeiden. Die Zellen wurden in  $100\mu\text{l}$  Medium in Triplikatansätzen in eine 96-Lochplatte ausgesät. Zu den Ansätzen wurden dann  $100\mu\text{l}$

Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von T-20 (Endkonzentration: 0,1–500nM), TAK-779 (Endkonzentration: 0,005–25µM) oder mab2F5 (Endkonzentration: 0,5 - 500nM) zugesetzt. Als Kontrolle wurden Ansätze mitgeführt, denen kein Fusionsinhibitor zugesetzt war und Zellen, die nicht transduziert worden waren. Die Platte wurde zentrifugiert (31 °C, 1h, 1.500g). Die Zellen wurden anschließend unter Standardbedingungen weiter kultiviert. Trugen die lentiviralen Vektoren das GFP-Markergen, erfolgte eine Inkubation über einen Zeitraum von 5-6 Tagen, bevor die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt wurde. War hingegen Luziferase als Markergen verwendet worden, so wurden die Zellen nur 2 tagelang bei 31 °C weiter kultiviert und anschließend die Luziferaseaktivität der Zellen gemessen.

#### **4.3.10 Bestimmung des Corezeptortropismus von lentiviralen Vektoren**

HIV benutzt für den Eintritt in Zielzellen zwei unterschiedliche Rezeptoren: die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4. HIV lässt sich anhand seines Corezeptortropismus in drei verschiedene Klassen unterteilen. So benutzen einige Stämme ausschließlich CCR5 oder CXCR4 (Das Virus wird dem entsprechend als M-trop bzw. T-trop bezeichnet), wohingegen andere Stämme sowohl den einen als auch den anderen Rezeptor verwenden können (dualotrope Stämme).

Um den Corezeptortropismus zu bestimmen, wurden zwei Indikatorzelllinien verwendet (U87 CD4 CCR5 (122) bzw. U87 CD4 CXCR4 (18)). Für den Versuch wurden von den U87 CD4 CXCR4 und U87 CD4 CCR5 je  $2 \cdot 10^4$  Zellen pro Vertiefung in einer 96-Lochplatte ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit lentiviralen Überständen, die mit HIV-Env pseudotypisiert waren und einen Transfektor mit Luziferase trugen, transduziert. Die Transduktion wurde in Doppelansätzen durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert (36h). Anschließend wurde die Luziferaseaktivität in den Zellen bestimmt.

#### **4.3.11 Luminometrie**

Für einige Versuche waren lentivirale Vektoren verwendet worden, die als Markergen Luziferase trugen. In diesen Fällen wurde die Luziferaseaktivität in den Zellen als Maß für die Transduktionseffizienz verwendet. Die chemische Umsetzung geeigneter Substrate durch das Enzym Luziferase führt zur Freisetzung von Photonen. Diese Lichtentwicklung kann luminometrisch detektiert werden. Es wird dabei angenommen, dass die sich Lichtmenge proportional zu Transduktionseffizienz verhält.

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden die transduzierten Zellen zunächst mit 200µl PBS gewaschen und anschließend mit 100µl 1x Lysepuffer versetzt. Zur Lyse wurden die Zellen bei RT inkubiert (30min) und anschließend bei –80 °C eingefroren. 40µl des Lysats

wurden in eine 96-Loch-Luziferaseplatte überführt. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte in einem Luminometer, wobei während der Messung zu jeder Probe automatisch 85µl des Luziferasesubstrats (Promega) zugesetzt wurden.

Die Einstellungen des Luminometers waren wie folgt:

*Gain:* 255

*Reading direction:* horizontal

*Meas. interval time [sec]:* 0,25

*Delay [sec]:* 0,1

*Test type:* Well Mode

*No. of intervals:* 30

*Tot. integ. Time/well [sec]:* 7,5

*Evaluation type:* Average, starting with cycle 10

### 4.3.12 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS) ermöglicht die simultane Analyse verschiedener optischer Eigenschaften von Zellen. Die vereinzelt Zellen wandern hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Messküvette. In der Küvette passieren die Zellen einen Laserstrahl, wobei die Absorption und Streuung des Lichts durch die Zellen bestimmt werden. Diese beiden Parameter spiegeln die Größe bzw. die Granularität der Zelle wider und werden bei der Messung jeder Zelle als relative Größen zugewiesen.

Durch Immunofärbung mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper oder durch Expression fluoreszierender Proteine (z.B. GFP) können die Zellen mit dem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der Fluorophormoleküle.

#### 4.3.12.1 Durchflusszytometrische Detektion verschiedener zellulärer Marker

Für jede Probe wurden  $2 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und pelletiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 2ml FACS-Puffer gewaschen und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (1.500rpm, 5min). Der Überstand wurde verworfen. Falls nur die Fluoreszenz eines intrazellulären Fluorophors (z.B. GFP) bestimmt werden sollte, wurden die Zellen unverzüglich in 100-300µl Fixierungslösung aufgenommen und analysiert.

Falls Immunofärbungen notwendig waren, wurde das Sediment der Zellen in 20µl der Primärantikörperlösung resuspendiert und bei 4°C inkubiert (30min). Die verwendeten Primärantikörpermengen sind in **Tabelle 4-4** aufgelistet.

**Tabelle 4-4 Aufstellung der verwendeten Primärantikörper und der für einen Ansatz eingesetzten Mengen.**

Antikörper	Informationen zum Epitop	AK-Menge je Färbeansatz (1·10 <sup>6</sup> Zellen)
2F5	lineares Peptidepitop: HIV Glykoproteinuntereinheit gp41, aa 151-156 ELDKWA	1µg
2F5-Biotin	lineares Peptidepitop: HIV Glykoproteinuntereinheit gp41, aa 151-156 ELDKWA	2µl
2F5-FITC	lineares Peptidepitop: HIV Glykoproteinuntereinheit gp41, aa 151-156 ELDKWA	5µl
Q412-PE	Liegt in den CD4-Domänen 1 + 2 (AS1-183)	10µl

Um den überschüssigen und ungebundenen Antikörper wieder zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit je 2ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (5min, 1.200rpm). Der Überstand wurde verworfen, anschließend wurden die Zellen (falls notwendig) in 20µl der Sekundärantikörper- bzw. Ligandenlösung aufgenommen. Die verwendeten Sekundärantikörper bzw. Liganden sind in **Tabelle 4-5** aufgeführt.

**Tabelle 4-5 Aufstellung der Sekundärantikörper**

Antikörper / Ligand	Menge je Färbeansatz (1·10 <sup>6</sup> Zellen)
Ziege anti-human IgG-PE	1ug
Streptavidin-APC	2µl
Kaninchen anti-Maus IgG-PE	5µl

Nach Inkubation (30min) bei 4°C wurden die Zellen zweimal mit 2ml FACS-Puffer gewaschen. Vor der Analyse mit dem Durchflusszytometer wurden die Zellen in 100-300µl Fixierlösung aufgenommen.

#### 4.3.12.2 Quantifizierung der Expression von Zelloberflächenmolekülen

Um die Oberflächenexpression von C-Peptiden oder bestimmten Markermolekülen auf Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen einer quantitativen FACS-Analyse unterworfen (92). Hierfür wurden je Probe 1·10<sup>6</sup> Zellen mit einem oberflächenepitopspezifischen Antikörper, der direkt mit einem Fluorophor gekoppelt war, wie unter 4.3.12.1 beschrieben, für eine durchflusszytometrische Untersuchung vorbereitet. Parallel dazu wurde ein Tropfen (ca. 1·10<sup>6</sup>) der Quantum *Simply Cellular* Beads auf dieselbe Weise vorbereitet. Die Beads bestehen aus einer Mischung von fünf verschiedenen Populationen, die unterschiedliche, jeweils genau definierte Anzahl von Antikörperbindestellen (ABC) aufweisen. So gibt es eine

Population, die keine Antikörper bindet und als Kontrolle dient. Daneben enthält die Mischung noch 4 weitere Populationen, deren Anzahl an Antikörperbindestellen (je nach Charge) von ca. 5.000 bis ca. 150.000 reicht und exakt definiert ist.

Das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität der Zellen und Beads wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der einzelnen Beadpopulationen gegen entsprechende ABC aufgetragen und so eine Standardkurve generiert. Mithilfe dieser Kurve wurde dann die Fluoreszenzintensität der Zelllinien in die Anzahl an Antikörperbindestellen (ABC) je Zelle konvertiert und als Maß für die Oberflächenexpression verwendet.

#### 4.3.12.3 FACS-Sortierung

Das FACS-Calibur-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) kann zur Sortierung und Anreicherung von Zellen nach unterschiedlichen Fluoreszenzkriterien verwendet werden. Es diente zur Isolierung von maC46-positiven Zellen, die keine selektierbare Antibiotikumsresistenz coexprimierten, aus Massenkulturen. In ein steriles FACS-Röhrchen wurden etwa  $1 \cdot 10^7$  Zellen überführt und auf Expression von maC46 gefärbt wie, unter 4.3.12.1 beschrieben. Dabei wurden der Primärantikörper 2F5 und der Sekundärantikörper Ziege-anti-human-PE benutzt. Anschließend wurden die Zellen in 2ml sterilem FACS-Puffer aufgenommen.

Die Leitungen des FACS-Calibur Geräts wurden durch 30minütiges Spülen mit 70% Ethanol sterilisiert und anschließend mit sterilem PBS gespült. Während des Sortiervorgangs wurde die Frequenz unter 1.000 Zellen pro Sekunde belassen. Das Gerät war so eingestellt, dass Zellen, die das maC46-Peptid extrem stark exprimierten, von der Sortierung ausgeschlossen waren. Die sortierte Zellpopulation sollte dadurch die durchschnittliche Expressionsstärke des verwendeten Transgenkonstrukts widerspiegeln. Direkt nach dem Sortieren wurde ein Teil der Zellen für die Reanalyse verwendet, um die Effizienz der Sortierung zu überprüfen. In der Regel betrug die Reinheit der sortierten Zellen >95 %.

## 4.4 Virologische Methoden

### 4.4.1 Vermehrung von Viren

Um eine Stammlösung von HIV herzustellen, wurde die T-Zelllinie PM-1 mit dem zu vermehrenden Virusstamm infiziert. In Abhängigkeit von dem verwendeten Virus wurden native PM-1 oder PM-1 Zellen, die C-Peptide auf der Oberfläche trugen, verwendet. In **Tabelle 4-6** sind die verschiedenen Virus-Zellkombination dargestellt.

*Tabelle 4-6 Verwendete Zellen zum Anlegen von Virusstammlösung*

Virus	Zur Virusanzucht verwendete Zellen	Transduziert mit	Art des exprimierten C-Peptids
HIV Ba-L_wt	PM-1	---	---
HIV Ba-L MD	PM-1	M87	maC36
HIV Ba-L FH	PM-1	M347	maC46
HIV NL4-3	PM-1	---	---

Zur Virusvermehrung wurden  $6 \cdot 10^6$  Zellen in 1-2ml Standard-RPMI1640-Medium aufgenommen und mit 1ml Virussuspension inokuliert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C inkubiert (4h). Nach dieser Zeit wurden die Zellen in 40ml Medium aufgenommen und bis zu 2 Wochen kultiviert. Die Virus Vermehrung wurde regelmäßig mikroskopisch und durch p24-Antigen-Elisa überprüft. Der Kultur wurde möglichst wenig frisches Medium zugesetzt, um die Viruskonzentration nicht zu verdünnen. Innerhalb der Kultivierungsphase wurde das Medium 1-2mal komplett gesammelt, filtriert (Ausschlussgröße 0,45µm) und zur Lagerung bei -80°C aliquotiert.

### 4.4.2 HIV-Titerbestimmung

Zur Titrierung von HIV-Suspensionen wurde die Zelllinie TZM-bl verwendet. Diese Zellen exprimieren die HIV-Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 stabil. Des Weiteren tragen sie das  $\beta$ -Galaktosidasegen unter Kontrolle einer HIV-LTR. Werden die Zellen nun mit HIV infiziert, kann in einem einfachen Versuch die Galaktosidaseaktivität bestimmt und als Maß für den Virustiter verwendet werden.

Es wurden  $5 \cdot 10^3$  TZM-bl Zellen je Vertiefung in eine 96-Lochplatte in 100µl Standard-DMEM ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen virushaltigen

Überstandes inkubiert. Die Volumen reichten von 100-0,01µl je Vertiefung. Die Verdünnungsreihen wurden in Duplikaten angesetzt. 48h nach Infektion wurden die Zellen mit 200µl PBS gewaschen und anschließend fixiert. Hierfür wurden die Zellen mit 200µl einer – 20°C kalten Methanol-Aceton-Mischung inkubiert (2min). Daraufhin wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 200µl X-Gal-Färbereagenz versetzt und bei 37°C inkubiert (1h). Anschließend wurden die Zellen, die eine Blaufärbung aufwiesen, mikroskopisch ausgezählt (Das Maximum der gezählten Zellen lag bei 200) und der Virustiter folgendermaßen bestimmt:

$$\frac{\text{Infektiöse Partikel}}{\text{ml}} = \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Anzahl der blauen Zellen pro Vertiefung}$$

#### 4.4.3 *In vitro* Selektion von maC46-resistentem HIV-1

Die Selektion wurde auf PM-1 Zellen durchgeführt, die maC46 in unterschiedlicher Konzentration auf der Oberfläche trugen. Es wurden 6•10<sup>6</sup> Zellen ausgesät und mit HIV in einer niedrigen MOI infiziert. Anschließend wurde die Virusreplikation anhand der p24-Konzentration im Überstand verfolgt, indem im Abstand von 2-4 Tagen 200µl Proben abgenommen wurden. In regelmäßigen Abständen (4-5 Tagen) wurden auch einige Milliliter des virushaltigen Überstandes zur Lagerung bei –80°C eingefroren. Hatte die p24-Konzentration einen Wert von 35.000pg/ml im Medium überschritten, wurden frische Zellen mit dem Überstand infiziert, die entweder dieselbe oder eine größere Anzahl maC46-Molekülen auf der Oberfläche trugen.

#### 4.4.4 *In vitro* Infektionsversuche mit HIV-1

Für die Infektionsversuche mit Zellkulturen wurden native PM-1 Zellen oder PM-1, die unterschiedliche Mengen von maC46 auf der Oberfläche trugen verwendet. Wenn mehrere Virusisolate verglichen werden sollten, wurde die eingesetzte Virusmenge zuvor so titriert, dass bei allen Isolaten eine vergleichbare Replikationsgeschwindigkeit (d.h. vergleichbare p24-Produktion in der Kultur) auf nativen PM-1 Zellen festzustellen war. Für die Infektion wurden die Zellen mit dem zu testenden HIV-1 Isolat so gemischt, dass anschließend 2•10<sup>5</sup> Zellen in einem Gesamtvolumen von 500µl RPMI-Medium je Vertiefung in eine 24-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät werden konnten. Alle Infektionsversuche wurden in Triplikatansetzten durchgeführt. 12h nach Infektion wurden die Zellen zweimal mit 2ml PBS gewaschen und in frischem RPMI-Medium aufgenommen. Anschließend wurde sofort ein Aliquot des Überstandes abgenommen. Dieser diente zur Nullwertbestimmung der p24-Konzentration. Im



Verlauf der Infektion wurde in einem Rhythmus von 3-5 Tagen Überstand zur p24-Antigenkonzentrationsbestimmung gesammelt. Falls nötig wurden die Zellen 1:2 gesplittet.

## **4.5 Proteinbiochemische Methoden**

### **4.5.1 p24-Antigen-ELISA**

Zur Bestimmung der p24-Antigenkonzentration in Zellkulturüberständen wurden zunächst 200µl des entsprechenden Überstands mit 20µl 5%iger NP40-Lösung gemischt, um HIV zu inaktivieren. Anschließend wurde der p24-Antigen-ELISA von Innogenetics nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

### **4.5.2 Konjugation von Antikörpern mit FITC oder Biotin**

Für einige Versuche wurden direkt konjugierte Versionen des 2F5-Antikörpers benötigt. Diese Konjugate wurden mit dem Fluorotag<sup>TM</sup>-Kit oder dem ECL-Proteinbiotinylierungs-Modul nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers hergestellt. Die Antikörper wurden anschließend für FACS-Färbungen verwendet, um ihre Funktionalität zu prüfen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Strategie zur Selektion von maC46-resistentem HIV-1

Für alle antiviralen Wirkstoffe, die sich in klinischer Anwendung befinden, konnten *in vitro* resistente HIV-1 Isolate selektiert werden. Hierzu wird HIV in steigenden Konzentrationen des jeweiligen Wirkstoffes auf suszeptiblen Wirtszellen passagiert. Dadurch werden Viren, die sich durch den Wirkstoff hemmen lassen, nach und nach von resistenten Mutanten aus der Kultur verdrängt und resistente Varianten angereichert.

Ein solches Verfahren kann jedoch nicht ohne weiteres auf antivirale gentherapeutische Ansätze übertragen werden. So exprimiert der antivirale Vektor M87o ein membranständiges (ma) C-Peptid (Wirkstoff) auf der Oberfläche von transduzierten Zielzellen. Die Menge des in der Kultur vorhandenen Wirkstoffes kann daher nicht so flexibel eingestellt werden wie bei einem löslichen Wirkstoff. Des Weiteren führt der Vektor M87o aufgrund seiner hohen Expressionsrate in der Kultur zu einer vollständigen Unterdrückung der Virusreplikation, so dass keine resistenten Viren selektiert werden können (46, 99). Um dieses Problem zu umgehen, wurden Zelllinien hergestellt, die das maC-Peptid verschieden stark exprimierten. Die Expression des maC46 auf der jeweiligen Zelllinie wurde quantitativ erfasst. Die Selektion des Virus wurde zunächst auf Zellen begonnen, die ein niedriges Expressionsniveau des maC-Peptids aufwiesen. Im Verlaufe der Passage wurde das Virus auf Zelllinien gezüchtet, die immer größere Mengen des inhibitorischen Peptids auf der Oberfläche trugen. Durch dieses Vorgehen sollte der Selektionsdruck kontinuierlich erhöht werden, um so maC46-resistente Viren in der Kultur zu akkumulieren. Im Folgenden wird zunächst die Herstellung von maC-Peptid exprimierenden Zelllinien und die Quantifizierung der maC-Peptidexpression auf den Zelllinien beschrieben.

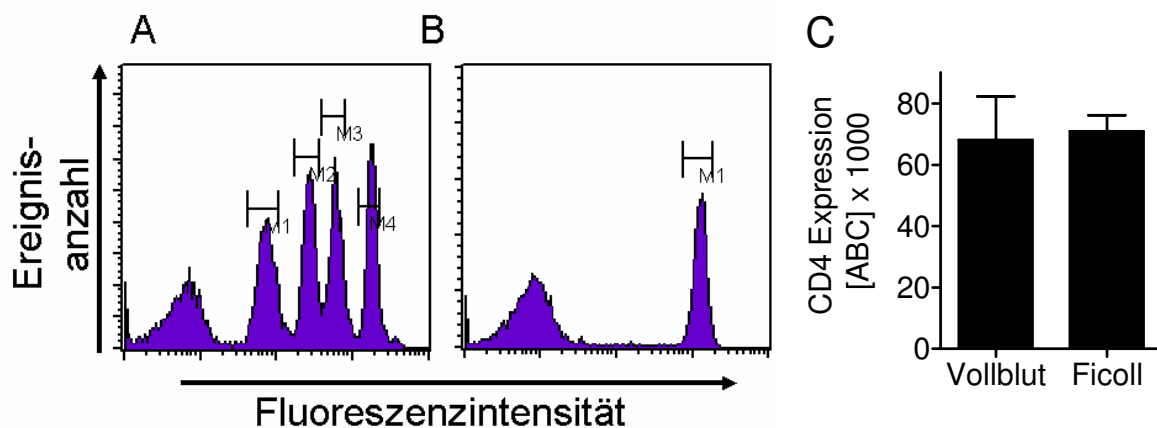
### 5.2 Quantifizierung der Oberflächenproteinexpression

Zur Quantifizierung des Expressionsniveaus von maC-Peptiden wurde im Rahmen dieser Arbeit eine durchflusszytometrische Methode (FACS-Quantifizierung) (92) verwendet. Zunächst wurden dabei Zellen, die das Oberflächenantigen der Wahl tragen, einer Immunfärbung mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper unterzogen. Standardbeads, die in der Lage sind eine genau definierte Anzahl des verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörpers zu binden, wurden parallel zu den Zellen gefärbt. Die Fluoreszenzintensität der Zellen und der Standardbeads wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Die

Stärke des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Zelllinie korreliert dabei mit der Menge des auf der Oberfläche exprimierten Antigens. Die Fluoreszenzintensität wurde im nächsten Schritt einer absoluten Anzahl an Oberflächenantigenen bzw. an Antikörperbindestellen (ABC: *antibody binding capacity*) zugeordnet. Hierzu wurde aus der Fluoreszenzintensität der Standardbeads eine Standardgerade erstellt, in der Antikörperbindestellen (ABC) gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen wurden. Mithilfe dieser Geraden konnte dann die unbekannte Anzahl der Oberflächenepitope bzw. Antikörperbindestellen auf der Zielzelle abgeschätzt werden.

### 5.2.1 Quantifizierung der CD4-Expression auf peripheren Blutlymphozyten

Die Gruppe um Doms (92) hat mit der oben beschriebenen FACS-Quantifizierung die Expression des Oberflächenmarkers CD4 auf primären Blutlymphozyten (PBL) unter Verwendung des CD4-Mausantikörpers Q4120 quantifiziert und eine durchschnittliche Expression von 60.000 ABC pro Lymphozyt (Schwankungsbreite von 45.000-85.000ABC) bestimmt. Mit der FACS-Quantifizierungsmethode wurden zunächst die Ergebnisse der Gruppe um Doms reproduziert, um sicherzustellen, dass die Methode auch in der vorliegenden Arbeit vergleichbare Ergebnisse liefert. Die CD4-Expression auf PBL aus Buffycoat-Blutkonserven wurde auf zwei Arten bestimmt: Entweder wurde die Immunfärbung direkt im Vollblut mit anschließender Erythrozytenlyse durchgeführt oder die PBL wurden vor der Färbung über ein Ficollkissen isoliert.



**Abbildung 5-1 Bestimmung der CD4-Oberflächenexpression auf primären Blutlymphozyten.** (A) Eine Mischung aus fünf Standardbead-Populationen mit verschiedenen bekannten ABC wurden mit mabQ4120-PE gefärbt und deren Durchschnittsfluoreszenz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (B) PBL wurden wie (A) behandelt. Für die Färbung wurden die PBL entweder zuvor über einen Ficollgradienten isoliert oder direkt Vollblut gefärbt mit anschließender Erythrozytenlyse. Der linke Peak entspricht den CD4-negativen Lymphozyten, während rechts die CD4-positiven Lymphozyten zu sehen sind. (C) Der ABC-Wert der PBL wurde durch den Vergleich mit den Standardbeads ermittelt.

Parallel wurden die Standardbeads mit dem CD4 Antikörper behandelt. Sowohl bei den gefärbten Zellen als auch bei den Standardbeads wurden danach die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt und die CD4-ABC der T-Helferzellpopulation der PBL berechnet (**Abbildung 5-1 C**). (In **Abbildung 5-1 A und B** sind beispielhaft die Ergebnisse einer solchen Färbung aufgeführt.)

Die hierbei für die primären Zellen ermittelten CD4-ABC-Werte (ca. 65.000ABC) stimmen gut mit den veröffentlichten Werten überein. Die Expression liegt lediglich leicht über den Literaturwerten, wobei kein Unterschied in der CD4-Expression zwischen den Ficoll-isolierten und den direkt gefärbten PBL festzustellen war. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit der Methode reproduzierbar Oberflächenantigene quantifiziert werden können.

### 5.2.2 Quantifizierung der maC-Peptidexpression auf transduzierten PM-1 Zellen

Bevor mit der Selektion von maC46-resistenten Viren begonnen werden konnte, mussten zunächst Zelllinien etabliert werden, die verschiedene Expressionsniveaus des maC-Peptids aufwiesen. Diese wurden durch Transduktion mit  $\gamma$ -retroviralen Vektoren hergestellt. Durch Modifikationen im Aufbau des retroviralen Vektors kann die Expression des Transgens (in diesem Falle des maC-Peptids) variiert werden (68):

- Die Effizienz der Translationsinitiation hängt von der retroviralen Leader-Region ab (70).
- Durch RNA-Elemente (wie z.B. dem „*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*“, wPRE (146, 184)) im 3'-untranslatierten Bereich der Transgen-mRNA kann der Export des viralen Transgens aus dem Zellkern variiert werden (184).
- Die Nukleotidtriplets (*Codon usage*), welche zur Kodierung des Transgens verwendet werden, beeinflussen die Transgenexpression, da die tRNA-Moleküle, die an synonyme Codons binden, nicht alle mit der gleichen Häufigkeit vorhanden sind. Durch Anpassung der Triplets an die Häufigkeit des entsprechenden tRNA-Moleküls kann die Transgenexpression erhöht werden (74, 103).
- Die biscistronische Expression des Transgens in Verbindung mit einer IRES (*internal ribosome entry site*) und einem Neomycinresistenzgen (neo) kann die Expression des Transgens reduzieren, da das neo-Gen als *Silencer* wirkt (7).

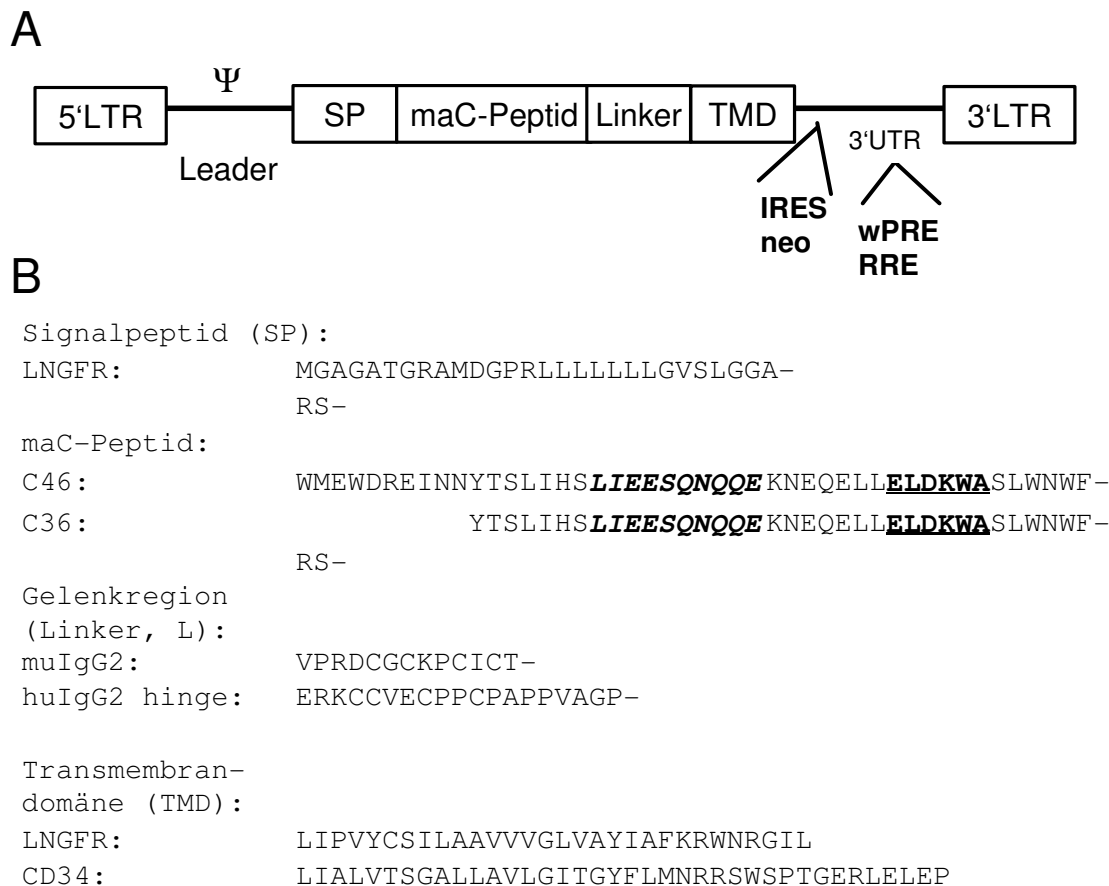
Die T-Zelllinie PM-1 wurde mit zehn unterschiedlichen  $\gamma$ -retroviralen Vektoren transduziert, die membranständige Varianten von maC36 oder maC46 kodierten. Eine detaillierte Tabelle mit dem Aufbau aller verwendeten Vektoren findet sich im Abschnitt 3.5.3. Bei allen diesen Konstrukten ist das C-Peptid von mehreren Gerüstelemente umgeben: Am N-Terminus der Konstrukte befindet sich ein Signalpeptid, woran sich das jeweilige C-Peptid anschließt. Eine flexible Gelenkdomäne (Linker), die sich von einem IgG-Molekül ableitet, verbindet das

C-Peptid mit der C-terminalen Transmembranregion (**Abbildung 5-2**, die Nomenklatur der Konstruktelemente ist dort beschrieben). Acht der verwendeten Konstrukte (M423, M235, M211, M212, M347, M217, M218 und M345) kodierten das maC46-Peptid mit der folgenden identischen Transgenkonfiguration: LNGFR-SP~maC46~mulgG2-L~CD34-TMD. Um verschiedene Expressionsstärken des Transgens zu erreichen, unterschieden sich die Vektoren jedoch im Aufbau ihres Vektorrückgrats (siehe Abschnitt 3.5.3).

Der Vektor M140 kodierte zwar ebenfalls ein maC46-Peptid hatte jedoch im Vergleich zu den ersten acht Konstrukten veränderte Gerüstelemente. Das Transgen umfasste hier eine murine Gelenkregion und eine andere Transmembrandomäne. Schematisch hatte das Transgen folgenden Aufbau: LNGFR-SP~maC46~mulgG2-L~LNGFR-TMD.

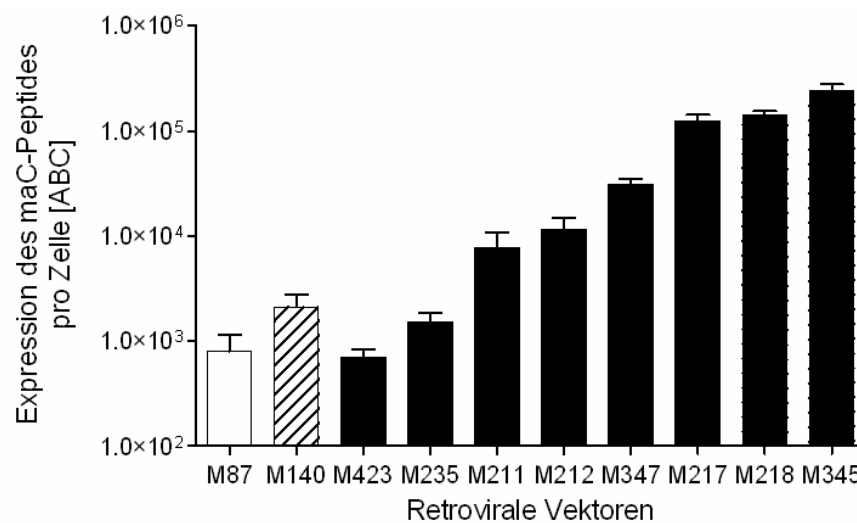
Das Konstrukt M87 ist mit M140 nahezu identisch. Lediglich das membrangebundene C-Peptid ist durch maC36 ersetzt. Das Transgen hatte somit den Aufbau: LNGFR-SP~maC36~mulgG2-L~LNGFR-TMD.

Zur Etablierung der maC-peptidexprimierenden Zelllinien wurden native PM-1 Zellen nur zu geringen Prozentsätzen transduziert; die eingesetzte Multiplizität der Infektion (MOI) lag zwischen 0,05 und 0,2. Bei so niedrigen Transduktionseffizienzen trägt ein Großteil der veränderten Zellen nur eine Vektorkopie und der Anteil an mehrfach transduzierten Zellen ist zu vernachlässigen (47). Das Expressionsniveau der einzelnen Zelllinien sollte somit unbeeinflusst von der Vektordosis sein und nur von der Expressionsstärke des verwendeten Vektors abhängen. Um reine C-peptidexprimierende Massenkulturen zu erhalten, wurden die transduzierten Zellen entweder mit G418 selektiert (falls ein Neomycinresistenzgen in dem Vektor vorhanden war) oder durch FACS-Sortierung angereichert.



**Abbildung 5-2 Schematischer Aufbau der verwendeten retroviralen Vektoren.** (A) Retrovirale Vektoren werden von sog. Long Terminal Repeats (LTR) flankiert. Innerhalb der Leaderregion befindet sich das Verpackungssignal ( $\Psi$ ). Die in dieser Arbeit untersuchten maC-Peptide haben einen modularen Aufbau: Neben dem membranständigen C-Peptid (maC-Peptid) bestehen sie aus einem Signalpeptid (SP), einer flexiblen Gelenkregion (Linker, L) und einer Transmembrandomäne (TMD). In einigen Fällen wurde das maC-Peptidtransgen bicistronisch in Kombination mit einem Neomycinresistenzgen (IRES neo) exprimiert. Auch tragen manche Vektoren in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) cis-aktive Elemente wie das „woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element“ (wPRE) oder das „Rev responsiv element“ (RRE). (B) Aminosäuresequenz der Module der maC46-Peptide. Das Signalpeptid stammte vom Low affinity nerve growth factor receptor (LNGFR), die Gelenkregionen waren entweder vom human (hulgG2) oder dem murinen Immunglobulin G2 (mulgG2) abgeleitet. Das Epitop des monoklonalen Antikörpers (mab) 2F5 innerhalb der C-Peptidsequenz ist unterstrichen.

Nach der Anreicherung wurde die maC-Peptidexpression der so vorbereiteten Massenkulturen quantifiziert. Dazu wurden die hergestellten Zelllinien und die *Quantum Simply Cellular*-Standardbeads mit dem FITC-konjugierten mab2F5 gefärbt. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität sowohl der Zellen als auch der Standardbeads durchflusszytometrisch bestimmt und daraus der ABC der Zellen berechnet (**Abbildung 5-3**).



**Abbildung 5-3 Quantifizierung der maC-Peptidexpression der hergestellten Zelllinien.** PM-1 Zellen wurden mit den angegebenen retroviralen Vektoren transduziert. Transgenpositive Zellen wurden entweder durch FACS-Sortierung oder G418-Selektion (falls neo-Gen vorhanden) angereichert. Anschließend wurde der ABC-Wert jeder Zelllinie in einem FACS-Assay mithilfe von Standardbeads bestimmt. Die Transgenkonfiguration der Vektoren ist durch die Balkenfarbe angedeutet: LNGFR-SP~maC46~hulG2-L~CD34-TMD (schwarze Balken), LNGFR-SP~maC46~mulgG2-L~LNGFR-TMD (schraffierter Balken) und LNGFR-SP~maC36~mulgG2-L~LNGFR-TMD (weißer Balken). Die Standardabweichung für Triplikatanalysen ist angegeben.

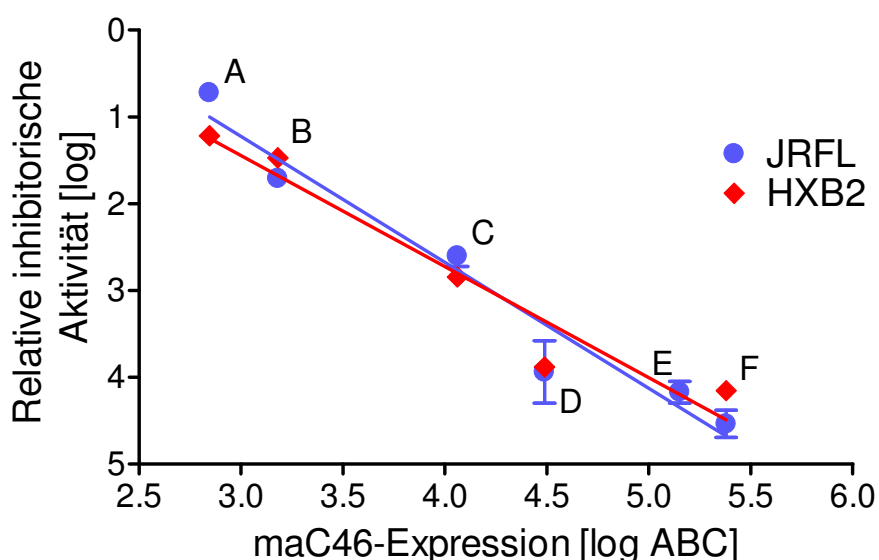
Durch die Verwendung der unterschiedlichen retroviralen Vektoren konnte eine Reihe von PM-1 Zelllinien etabliert werden, deren maC-Peptidexpressionsprofil einen Bereich von mehr als 2 log-Stufen umfasste. Die Expression reichte von ca. 700 ABC pro Zelle für das Konstrukt M423 bis ca. 130.000 ABC pro Zelle für M345. Die Konstrukte lassen sich in drei Expressionsklassen einteilen. Schwach exprimierende Konstrukte mit ca. 1.000 ABC pro Zelle, mittelstark exprimierende Konstrukte mit ca. 10.000 ABC pro Zelle und stark exprimierende Konstrukte mit über 130.000 ABC pro Zelle.

### 5.3 Die antivirale Aktivität des membrangebundenen maC46-Peptids ist proportional zu dessen Expression

Wie bereits dargelegt, ist die Selektion von maC46-resistentem HIV nur möglich, wenn der Selektionsdruck auf das Virus während der Passagen kontinuierlich erhöht wird. Für die vorliegende Arbeit war es daher wichtig zu überprüfen, ob die inhibitorische Aktivität der generierten PM-1 Zelllinien mit der Stärke ihrer maC-Peptidexpression korreliert.

Dieser Dosis-Wirkungszusammenhang zwischen der maC46-Expression und der inhibitorischen Aktivität wurde anhand der Zelllinien PM-1 M423, PM-1 M235, PM-1 M212, PM-1 M347, PM-1 M218 und PM-1 M345 untersucht. Diese sechs Zelllinien exprimierten dasselbe maC46-Transgen; unterschieden sich jedoch hinsichtlich der Höhe der Expression

(**Abbildung 5-3**). Als Kontrolle dienten PM-1 Zellen, die mit dem Kontrollvektor MP1-neo transduziert worden waren und kein C-Peptid exprimierten. Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der einzelnen Zelllinien wurden replikationsinkompetente Vektoren verwendet, die entweder mit dem CCR5-tropen HIV-1 JRFL-Env oder dem CXCR4-tropen HIV-1 HXB2-Env umhüllt waren und das Markergen GFP trugen. Die Vektorpräparationen wurden sowohl auf den maC46-exprimierenden Zellen als auch auf der Kontrollzelllinie titriert und die Transduktionseffizienz am Durchflusszytometer bestimmt. Der auf den maC46-positiven Zellen erreichte Titer wurde relativ zu dem Titer der Kontrollzelllinie normiert und als „relative inhibitorische Aktivität“ definiert. Die inhibitorische Aktivität der jeweiligen Zelllinie wurde anschließend gegen ihren ABC-Wert aufgetragen (**Abbildung 5-4**).



**Abbildung 5-4 Die antivirale Aktivität des maC46-Peptids korreliert mit seiner Expressionshöhe.** PM-1 Zellen wurden mit den unterschiedlichen retroviralen Vektoren transduziert, die maC46 in verschiedener Stärke exprimierten (A: M423, B: M235, C: M212, D: M347, E: M218, F: M345). Der ABC-Wert jeder Zelllinie wurde mithilfe eines quantitativen FACS-Assays bestimmt. Lentivirale Vektoren, die ein GFP-Markergen trugen und entweder mit dem CCR5-tropen HIV-1 JRFL Env (●) oder dem CXCR4-tropen HIV-1 HXB2 Env (◆) umhüllt waren, wurden auf den verschiedenen Zelllinien titriert. Die Transduktionseffizienz wurde mithilfe des Durchflusszytometers gemessen und relativ zu dem auf den Kontrollzellen erzielten Titer normiert. Der reziproke Wert des Titers wurde als relative inhibitorischen Aktivität definiert. Die inhibitorische Aktivität jeder Zelllinie wurde gegen ihre maC-Peptid-expression aufgetragen. Die Standardabweichung für Triplikationsansätze ist angegeben.

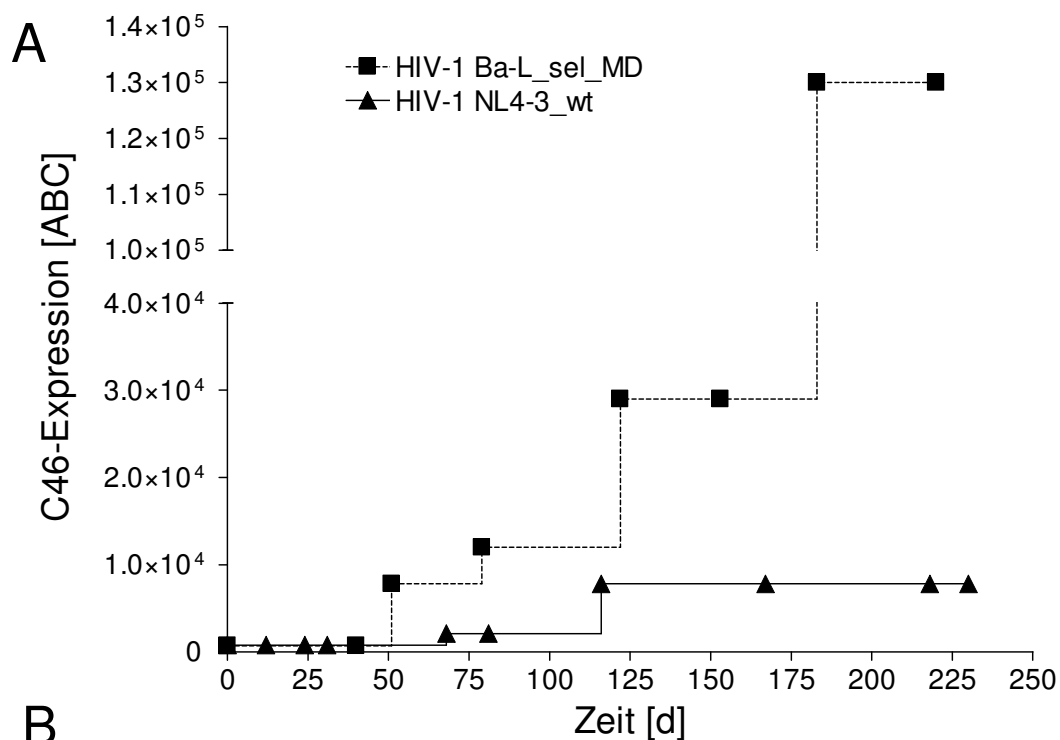
Es zeigte sich eine proportionale Korrelation zwischen der Expression des maC46-Peptids und seiner antiviralen Wirkung, sowohl auf das JRFL-Env ( $r^2 = 0.927$ ) als auch auf das HXB2-Env ( $r^2 = 0.940$ ). Jede der getesteten maC46-exprimierenden Zelllinien war dabei in der Lage, die Fusion sowohl der CCR5-tropen HIV-1 JRFL- als auch der CXCR4-tropen HIV-1 HXB2-Env-umhüllten Vektoren mit vergleichbarer Effektivität zu hemmen. Das am stärksten exprimierte Konstrukt M345 zeigte erwartungsgemäß mit einer relativen inhibitorischen Aktivität von ca. 10.000 die stärkste Hemmung. Wurden die Vektoren auf der am schwächsten



exprimierenden Zelllinie PM-1 M423 titriert, so war immerhin noch eine zehnfache Reduktion des Titers im Vergleich zur Kontrollzelllinie feststellbar. Es konnte somit gezeigt werden, dass die HIV-1 Eintrittshemmung durch maC46 strikt dosisabhängig verläuft. Für die Selektion von maC46-resistentem HIV konnte dieser Dosis-Wirkungszusammenhang genutzt werden, um den Selektionsdruck fortwährend zu erhöhen.

#### 5.4 Selektion von maC46-resistentem HIV-1

Die oben beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass die etablierten maC-peptid-exprimierenden Zelllinien ein geeignetes System zur Selektion von maC46-resistentem HIV-1 darstellten. Die Selektion wurde sowohl mit dem CXCR4-tropen Stamm HIV-1 NL4-3 als auch mit dem CCR5-tropen Stamm HIV-1 Ba-L\_sel\_MD (99) durchgeführt (**Abbildung 5-5**). In Vorarbeiten war der Virusstamm Ba-L\_sel\_MD durch Passage auf maC36-exprimierenden Zellen generiert worden. Er weist daher im Vergleich zum Wildtyp-Isolat (Ba-L\_wt) zwei Mutationen im gp41-Gen auf, die zu einer Resistenz gegenüber maC36 führen. Dieses Isolat zeigte auch bereits eine leicht reduzierte Sensibilität gegenüber maC46 (99) und stellte somit einen gute Grundlage für die Selektion eines maC46-resistenten Virus dar. Das Virus wurde für 211 Tage auf maC46-exprimierenden Zellen kultiviert. In dieser Zeit wurden acht Passagezyklen durchlaufen und es gelang, das Virus auf PM-1 Zellen zu vermehren, deren maC46-Expressionsniveau einen ABC von 130.000 aufwies.

**B**

Virus	Passage- nummer	Dauer der Einzel- passagen [Tage]	Summe der Selektionszeit [Tage]	PM-1 Zellen transduziert mit Vektor	exprimiertes maC-Peptid	ABC pro Zelle
Ba-L_ sel_MD	1	40	40	M423	maC46	800
	2	11	51	M423	maC46	800
	3	28	79	M211	maC46	7.800
	4	43	122	M212	maC46	12.000
	5	31	153	M347	maC46	29.000
	6	30	183	M347	maC46	29.000
	7	28	211	M217	maC46	130.000
NL4-3_wt	1	12	12	M87	maC36	800
	2	12	24	M87	maC36	800
	3	7	31	M87	maC36	800
	4	37	68	M140	maC46	2.100
	5	13	81	M140	maC46	2.100
	6	35	116	M211	maC46	7.800
	7	51	167	M211	maC46	7.800
	8	51	218	M211	maC46	7.800
	9	12	230	M211	maC46	7.800

**Abbildung 5-5 Verlauf der maC46-Resistenzselektion.** (A) Zeigt die Zelllinie mit der maximalen maC46-Expression, die noch eine Vermehrung des Virus bei der angegebenen Passage zuließ. Die Symbole markieren die Zeitpunkte an denen frische Zellen infiziert wurden. (B) Tabellarische Zusammenfassung der Daten aus (A)

Die Kultivierung des NL4-3-Isolats erfolgte für 230 Tage auf maC-peptidexprimierenden Zellen und das Virus wurde dabei 9-mal passagiert. Anders als bei der Selektion des Ba-L Isolats wurden die ersten drei Selektionsrunden auf maC36-exprimierenden Zellen durchgeführt, bevor das Virus auf maC46-exprimierenden Zellen weiter passagiert wurde. Durch diese Selektionsstrategie sollten, ähnlich wie bei dem Ba-L\_sel\_MD Isolat, zunächst maC36-Resistenzmutationen angehäuft werden, die im Folgenden eine Selektion von maC46-Resistenzen erleichtern sollten. Die Selektion war jedoch nicht erfolgreich. Das Wachstum des Virus wurde auch nach einer Passagezeit von mehr als 200 Tagen immer noch vollständig gehemmt, wenn die maC46-Expression der Zielzellen einen ABC-Wert von mehr als 7.800 aufwies.

## 5.5 Charakterisierung der selektierten HIV-1 Isolate

### 5.5.1 Genotypische Analyse der HIV Ba-L\_FH1, HIV Ba-L\_FH2 und HIV NL4-3\_FH Env-Gene

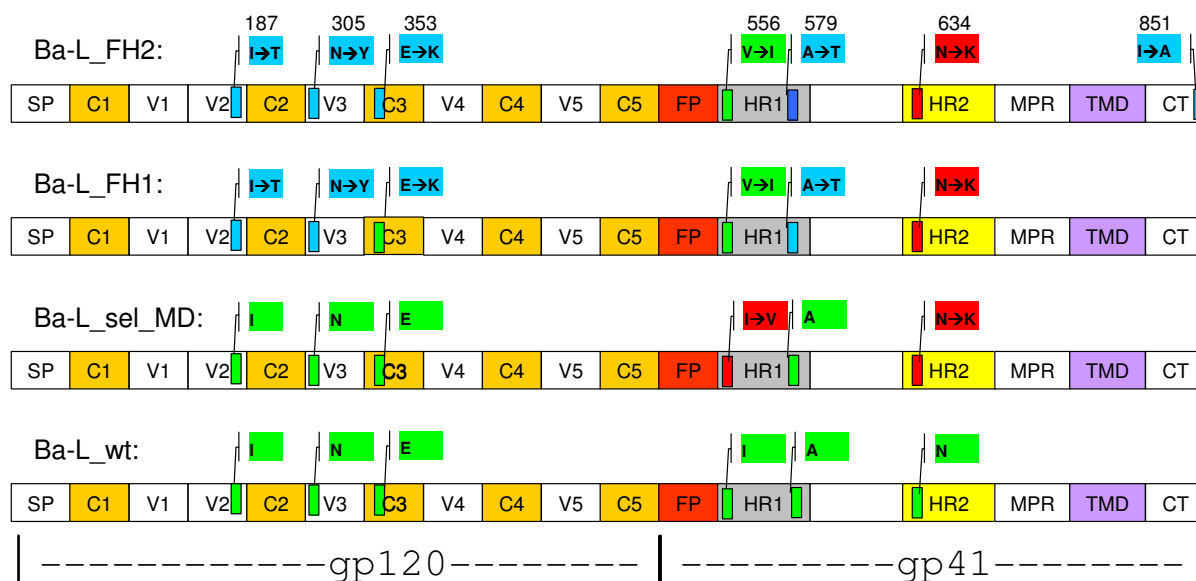
Während des Selektionsprozesses sollten Viren in der Kultur angehäuft werden, die eine reduzierte Sensibilität gegenüber maC46 haben. Die Wirkstoffgruppe der C-Peptid-Fusionsinhibitoren, zu welcher auch maC46 gehört, entfaltet ihre inhibitorische Wirkung während des Fusionsprozesses durch Bindung an das virale gp41-Protein. Es war daher zu erwarten, dass sich im Laufe der Selektion Viren mit veränderten Hüllproteinen anreichern würden. Denn durch Mutationen im Hüllprotein kann die Bindung des maC-Peptids erschwert und somit eine Resistenz vermittelt werden. Um dies zu überprüfen, wurden das Env-Gen der selektierten Viren sequenziert und durch Vergleich dieser Sequenz mit der des Ausgangsisolats mögliche Resistenzmutationen identifiziert. Zur Gensequenzierung wurde die virale RNA präpariert und anschließend das gesamte Env-Gen folgender Isolate mittels RT-PCR amplifiziert:

- Wildtyp Ba-L-Isolat (Ba-L\_wt)
- maC36-resistentes Ba-L-Isolat (Ba-L\_sel\_MD, Ausgangsisolat der maC46-Resistenzselektion)
- Ba-L-Virusisolat der Selektionsrunde 5, Tag 149 (Ba-L\_FH1)
- Ba-L-Virusisolat der Selektionsrunde 7, Tag 207 (Ba-L\_FH2)
- Wildtyp NL4-3-Isolat (NL4-3\_wt, Ausgangsisolat der maC46-Resistenzselektion)
- NL4-3-Virusisolat der Selektionsrunde 9, Tag 230 (NL4-3\_FH)

Bei der Sequenzanalyse von HIV-1 Isolaten muss beachtet werden, dass HIV als RNA-Virus eine sehr große Mutationsrate aufweist. So entwickeln sich *in vivo* aus einem Ausgangsisolat im Verlauf der Infektion in jedem Patienten extrem heterogene Viruspopulationen, die als Quasispezies bezeichnet werden (29, 59, 123). Für die genetische Analyse der selektierten Viren wurde daher eine Methode ausgewählt, welche es erlaubt, die Env-Gensequenzvariante mit der größten Verbreitung innerhalb der Kultur zu bestimmen. Es wurde vermutet, dass es sich bei dieser Sequenz, um die maC46-resistente Genvariante handeln müsste. In der vorliegenden Arbeit wurde der Genotyp mit der häufigsten Frequenz (Konsensussequenz) durch direkte Sequenzierung des gereinigten PCR-Produkts ermittelt. Bei der Sequenzanalyse wurden nur Mutationen, welche zu einem Aminosäureaustausch führten, als relevant betrachtet.

Die Sequenzierung des Isolats HIV NL4-3\_FH ergab keine Unterschiede zu HIV NL4-3\_wt. Durch diese genetische Untersuchung wurde somit festgestellt, dass bei diesem Isolat keine resistenten Varianten selektiert wurden. Das Isolat wurde daher im Folgenden nicht weiter analysiert.

Dagegen konnten in den selektierten Ba-L Isolaten mehrere Punktmutationen identifiziert werden. Erwartungsgemäß zeigte die HIV Ba-L\_sel\_MD Env-Sequenz im Vergleich zu HIV Ba-L\_wt die zwei zuvor beschriebenen – eine Resistenz gegen maC36 vermittelnden – Punktmutationen I556V und N579K (Nummerierung der Aminosäuren (AS) beginnend am N-Terminus des Proteins) (99).



**Abbildung 5-6 Übersicht der gefundenen Mutationen der drei Ba-L-Isolate.** gp120 trägt N-terminal ein Signalpeptid (SP) und ist in konstante (C1-C5) und variable (V1-V5) Regionen unterteilt. Am N-Terminus der gp41-Untereinheit befindet sich ein Fusionspeptid (FP). Daran schließen sich die heptad repeat-Region 1 und 2 (HR1 und HR2), die membranproximale Region (MPR), die Transmembrandomäne und der zytoplasmatische C-Terminus (CT) an. Aminosäurepositionen, die im Vergleich zum Wildtypisolat Ba-L\_wt mutiert sind, sind farblich hervorgehoben. Die Wildtypkonfiguration der entsprechenden AS-Position ist grün markiert. Die rote Färbung zeigt Mutationen an, die durch die Passage des Wildtypisolats auf maC36-Zellen selektiert wurden (99). Blau markierte Aminosäuremutationen wurden durch die Selektion auf maC46-Zellen angereichert. Die Zahlen geben die Aminosäureposition relativ zum N-Terminus des Ba-L Hüllproteins an.

Bei Analyse des Isolats HIV Ba-L\_FH1 wurden festgestellt, dass die in der HR2 des Ausgangsisolats vorhandene Mutation N634K konserviert worden war. An der Position 556 in der HR1-Region war hingegen eine Reversion zur Wildtypkonfiguration (Isoleucin) zu verzeichnen. Darüber hinaus wurden drei neue Punktmutationen in der gp120-Untereinheit des Isolats Ba-L\_FH1 festgestellt: Diese lagen in der V2-Region (I187T), V3-Region (N305Y) und C3-Region (E352K). Des Weiteren wurde ein neuer Aminosäureaustausch im C-terminalen Bereich der heptad repeat 1-Region der gp41-Untereinheit (A579T) gefunden. Im Hüllprotein HIV Ba-L\_FH2 wurde neben den bereits für Ba-L\_FH1 beschriebenen Mutationen ein zusätzlicher Aminosäureaustausch im C-Terminus des Env-Gens (I851A) identifiziert (Abbildung 5-6; Anhang 8.3).

Zur genaueren Untersuchung des Einflusses der oben beschriebenen Mutationen auf den maC46-resistenten Phänotyp wurden die Env-Gene der Virusisolate Ba-L\_wt, Ba-L\_sel\_MD, Ba-L\_FH1 und Ba-L\_FH2 zunächst in den Klonierungsvektor pCR-XL-TOPO zwischenkloniert und anschließend in ein eukaryotisches Expressionsplasmid (M288) ligiert. Ferner wurden Expressionsplasmide mit Varianten des Ba-L\_sel\_MD-Envs hergestellt, die entweder eine oder mehrere der im Ba-L\_FH1-Env-Gen gefundenen Punktmutationen (im Folgenden als Einzel- oder Mehrfachmutanten bezeichnet) trugen (**Tabelle 5-1**). Die Herstellung der

Hüllproteinvarianten ist im Anhang, Abschnitt 8.4, beschrieben. Damit sich der Leser zu jeder Zeit während der Besprechung der einzelnen Konstrukte eine Übersicht über ihren Aufbau verschaffen kann, befindet sich auf der letzten Seite dieser Arbeit eine herausklappbare Aufstellung der Konstrukte.

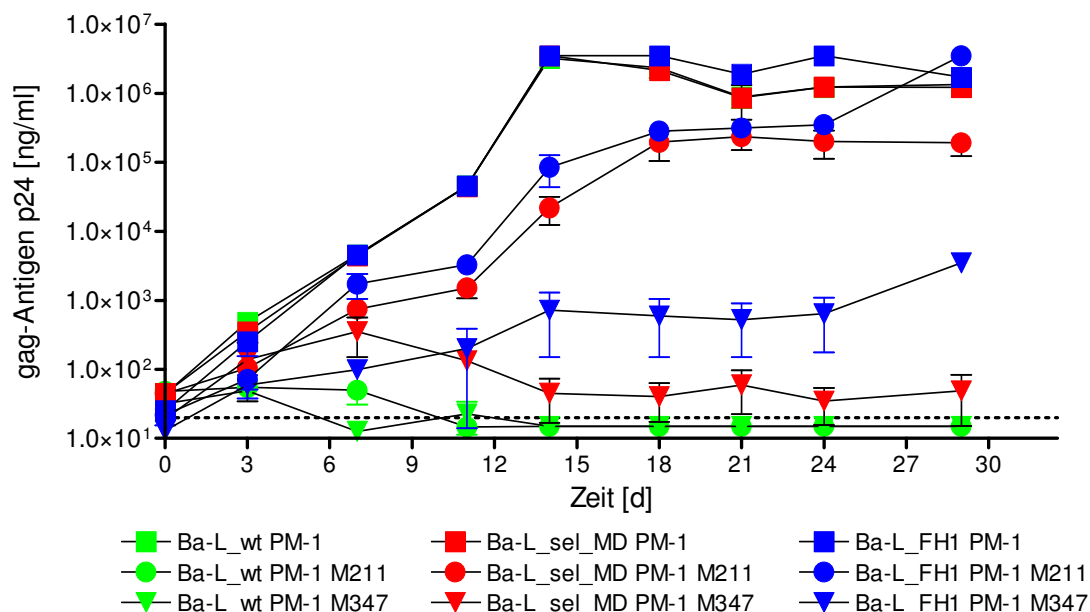
**Tabelle 5-1 Hergestellte HIV-1 Ba-L Env-Genvarianten.** Die Env-Gene wurden in ein eukaryotisches Expressionsplasmid kloniert. Dargestellt sind die Aminosäurepositionen in verschiedenen Bereichen des Env-Gens (V2/3: Variable Region 2/3; C3: konstante Region 3; HR1/2: heptad repeat 1/2, CT: C-terminale Domäne), welche sich im Verlaufe der Selektion verändert haben (Vergleiche Abbildung 5-6). Das Vorhandensein einzelner Mutationen im jeweiligen Konstrukt ist durch ein Kreuz (x) markiert.

Plasmidname Ba-L	Laufende Nummer	Mutation im Env-Gen (Bereich des Gens)						
		I187T (V2)	N305Y (V3)	E353K (C3)	I556V (HR1)	A579T (HR1)	N634K (HR2)	I851A (CT)
wt	M749							
sel_MD	M759				X		X	
FH1	M750	X	X	X		X	X	
FH2	M779	X	X	X		X	X	X
MD_V2	M772	X			X		X	
MD_V3	M773		X		X		X	
MD_C3	M776			X	X		X	
MD_556I	M778						X	
MD_579T	M777				X	X	X	
MD_V2+V3+C3	M782	X	X	X	X		X	
MD_V2+V3	M783	X	X		X		X	
MD_gp41_N-HR	M789					X	X	
MD_V3+556I	M798		X				X	

## 5.5.2 Phänotypische Analyse des selektierten HIV Ba-L-Isolats

### 5.5.2.1 Untersuchung des Isolats HIV Ba-L\_FH1 auf maC46-Resistenz

Es wurde zunächst untersucht, ob das selektierte Isolat Ba-L\_FH1 tatsächlich eine reduzierte Sensibilität gegenüber maC46 aufweist, wie es sich bereits während der Selektion angedeutet hatte. Dazu wurde ein Infektionsassay mit den Isolaten Ba-L\_FH1 und dem Ausgangsisolat Ba-L\_sel\_MD durchgeführt. Das Isolat HIV Ba-L\_wt wurde in die Versuchsreihe mit eingeschlossen, da dieses Isolat eine höhere maC46-Sensibilität als Ba-L\_sel\_MD aufweist (99); es diente deshalb als Kontrolle. Die Zelllinien PM-1 (nativ), PM-1 M211 (maC46-Expression: ca. 8.000ABC) und PM-1 M347 (maC46-Expression: ca. 30.000ABC) wurden mit jeweils einem der drei HIV-1 Isolate infiziert und der Infektionsverlauf anhand der p24-Konzentration im Medium verfolgt (**Abbildung 5-7**).



**Abbildung 5-7 Das Isolat Ba-L\_FH1 ist maC46-resistent.** PM-1 Zellen, die maC46 entweder schwach (●, M211; ca. 8.000ABC) oder mittelstark (▼, M347; ca. 30.000ABC) exprimierten, wurden mit den Virusisolaten Ba-L\_wt (grüne Symbole), Ba-L\_sel\_MD (rote Symbole) oder Ba-L\_FH1 (blaue Symbole) infiziert. Als Infektionskontrolle dienten native PM-1 Zellen (■). Der Infektionsverlauf wurde anhand der p24-Antigenkonzentration im Überstand verfolgt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von Triplikaten dar. Die gestrichelte Linie markiert die Nachweisgrenze.

Der Infektionsverlauf aller drei Virusisolate war auf den nativen PM-1-Zellen annähernd identisch; die verwendete Virusmenge in den Testkulturen war somit vergleichbar. Das Isolat Ba-L\_wt replizierte auf keiner der maC46-exprimierenden Zelllinien. Die p24-Konzentration ging bei diesen Ansätzen kontinuierlich zurück und lag ab Tag 14 unterhalb der Nachweisgrenze. Demgegenüber konnten sich sowohl Ba-L\_FH1 als auch Ba-L\_sel\_MD in Gegenwart von maC46 vermehren. Das Isolat Ba-L\_FH1 war im Vergleich zu Ba-L\_sel\_MD deutlich weniger empfindlich gegenüber maC46. Der Replikationsvorteil von Ba-L\_FH1 auf den PM-1 M211-Zellen, welche maC46 nur schwach exprimieren, war nur gering ausgeprägt. Die Replikation von Ba-L\_FH1 und Ba-L\_sel\_MD verlief auf dieser Zelllinie nahezu parallel, wobei das Isolat Ba-L\_FH1 zu jedem Zeitpunkt eine etwas höhere Replikation aufwies. Wurde das Isolat Ba-L\_FH1 jedoch auf den stark maC46-positiven PM-1 M347-Zellen kultiviert, trat die im Vergleich zu Ba-L\_sel\_MD erhöhte maC46-Resistenz prägnanter hervor. Die Virusproduktion des Isolats Ba-L\_sel\_MD lag hier nur knapp über der Nachweisgrenze, während das Isolat Ba-FH1 ca. zehnfach stärker replizierte.

Im Allgemeinen spricht man von Resistenz, wenn ein Virus sich so verändert, dass es bei normalen therapeutischen Konzentrationen eines Wirkstoffs im Vergleich zum Ausgangsisolat nicht mehr gehemmt wird. Das Ba-L\_FH1-Isolat wird jedoch trotz der Selektion immer noch durch maC46 inhibiert; es ist aber offensichtlich weniger sensibel als das Ursprungsisolat

Ba-L\_sel\_MD. Die Selektion war somit erfolgreich. Der Ausdruck „Resistenz“ bezeichnet daher im Folgenden eine reduzierte Sensibilität des Virus gegenüber maC46.

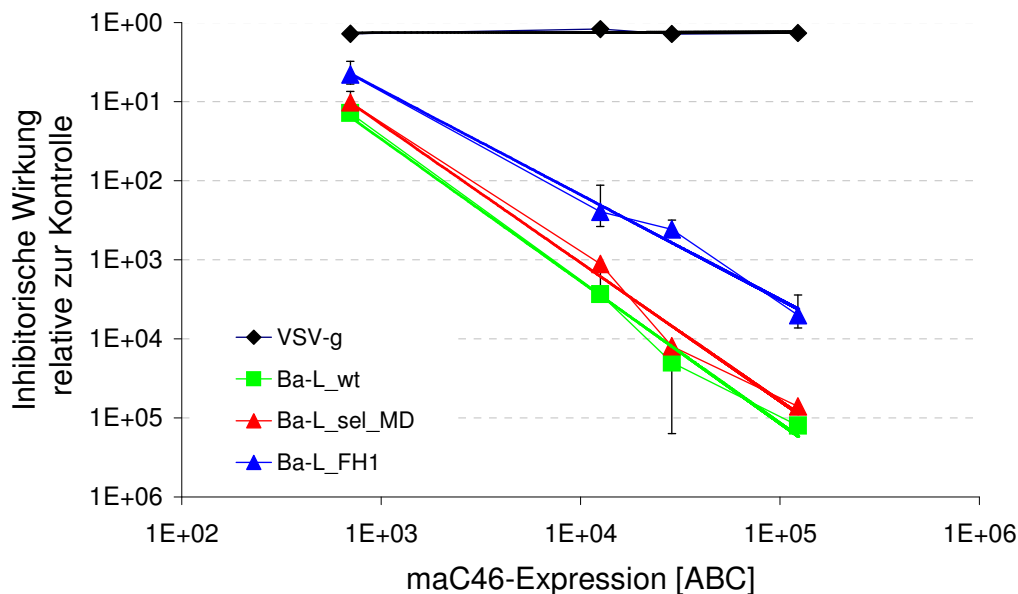
#### 5.5.2.2 Die Mutationen im HIV Ba-L\_FH1-Env-Gen sind verantwortlich für die verminderte maC46-Sensibilität

Da maC46 den Fusionsprozess stört, ist es naheliegend anzunehmen, dass Mutationen im Env-Gen für die Resistenz verantwortlich sind. Es ist auch vorstellbar, dass die in HIV Ba-L\_FH1 gefundenen Env-Genmutationen für die verminderte maC46-Sensitivität unerheblich und stattdessen andere Mutationen, die in einem nicht-untersuchten Bereich des viralen Genoms liegen, von entscheidender Bedeutung sind. Um solche anderen Mutationen als Ursache für die maC46-Resistenz auszuschließen, wurden replikationsinkompetente lentivirale Vektoren hergestellt, die das zu testende Hüllprotein und als Markergen das grünfluoreszierende Protein (GFP) trugen. Hierbei wurden die Envs der Isolate Ba-L\_wt, Ba-L\_sel\_MD und Ba-L\_FH1 und das Hüllprotein des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-g) verwendet. Die produzierten Pseudoviren waren bis auf das verwendete Hüllprotein identisch. Die Auswirkung eines bestimmten Hüllproteins auf die maC46-Sensitivität des Vektors konnte auf diese Weise direkt bestimmt werden. Nach der bereits oben beschriebenen Methode (Abschnitt 5.3) wurden die Vektoren verwendet, um einen Dosis-Wirkungs-Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke des maC46-Peptids verschiedener Zelllinien und ihrer inhibitorischen Wirkung auf die mit den Env-Varianten pseudotypisierten Vektoren zu bestimmen (**Abbildung 5-8**).

Die Expressionsstärke der vier für die Analyse verwendeten Zelllinien überspannte einen Bereich von mehr als zwei log-Stufen und reichte von ca. 800 ABC (M423) bis ca. 130.000 ABC (M217). Wie erwartet, war keine inhibitorische Wirkung von maC46 auf das VSV-g-Kontrollhüllprotein festzustellen. Demgegenüber stieg die inhibitorische Aktivität, welche die Zelllinien auf die drei untersuchten Ba-L Hüllproteine ausübten, proportional zur Expression des maC46-Peptids an (vgl. auch **Abbildung 5-4**). Das Hüllprotein Ba-L\_wt hatte auf allen untersuchten Zelllinien die größte Sensibilität gegenüber maC46. Im Vergleich dazu zeigte Ba-L\_sel\_MD eine leicht reduzierte maC46-Empfänglichkeit, die in Einklang mit früheren Untersuchungen steht (99) und auch im oben beschriebenen Infektionsversuch (**Abbildung 5-7**) sichtbar war. Das Hüllprotein Ba-L\_FH1 vermittelte eine deutliche maC46-Resistenz. Auf allen untersuchten Zelllinien war die Sensibilität im Vergleich zu Ba-L\_sel\_MD jeweils das Fünf- bis Zehnfache reduziert. Die im Ba-L\_FH1-Hüllprotein gefundenen Mutationen haben somit einen deutlichen Einfluss auf die reduzierte maC46-Sensibilität. Wie schon zuvor festgestellt (**Abbildung 5-7**), ist diese Resistenz jedoch nur relativ schwach ausgebildet. In



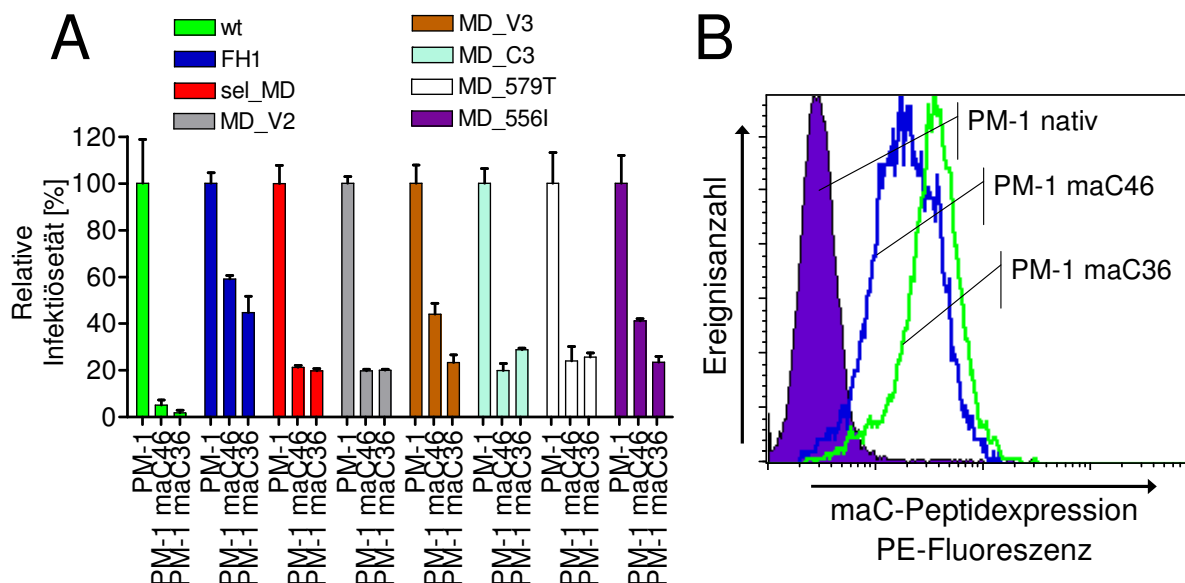
wieweit andere Bereiche des viralen Genoms evtl. weiteren Einfluss auf die Resistenz haben, ließ sich anhand dieses Assays nicht bestimmen.



**Abbildung 5-8 Das Hüllprotein Ba-L\_FH1 hat eine reduzierte maC46-Sensibilität.** PM-1 Zellen wurden mit den unterschiedlichen retroviralen Vektoren transduziert, die maC46 in verschiedener Stärke exprimierten (A: M423, B: M212, C: M347, D: M217). Der ABC-Wert jeder Zelllinie wurde, wie oben beschrieben, mithilfe eines quantitativen FACS-Versuches bestimmt. Lentivirale Vektoren, die ein GFP-Markergen trugen und entweder mit dem Env Ba-L\_wt (▲), Ba-L\_sel\_MD (▲), Ba-L\_FH1 (▲) oder VSV-g (◆) umhüllt waren, wurden auf den verschiedenen Zelllinien titriert. Die Transduktionseffizienz wurde mithilfe des Durchflussszytometers gemessen und relativ zu dem auf den Kontrollzellen erzielten Titer normiert. Der reziproke Wert des Titers wurde als der Faktor der relativen inhibitorischen Aktivität definiert und für die einzelnen Zelllinien berechnet. Die Hemmung jeder Zelllinie wurde gegen ihre maC-Peptidexpression aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von Triplikaten dar.

### 5.5.2.3 Die maC46-Resistenz wird hauptsächlich durch zwei Mutation hervorgerufen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Mutationen im Hüllprotein für die Resistenz verantwortlich sind, stellte sich die Frage, welche der fünf Mutationen für die Ausbildung des maC46-resistenten Phänotyps notwendig sind. Um dies zu untersuchen, wurde die maC46- bzw. maC36-Sensibilität verschiedener Ba-L\_sel\_MD Varianten, die zusätzlich eine der fünf gefundenen Mutationen (Einzelmutanten, **Tabelle 5-1**) trugen, bestimmt. Für den Versuch wurden die lentiviralen Vektoren, die die verschiedenen Hüllproteine trugen, auf den Zelllinien PM-1 M423 (maC46) und PM-1 M597 (maC36) titriert und anschließend die Transduktionseffizienzen mittels FACS bestimmt. Als Kontrolle diente die unveränderte Zelllinie (PM-1 nativ) (**Abbildung 5-9 A**). Die C-Peptidexpression war sowohl für maC36 als auch für maC46 relativ niedrig, wobei das maC36-Peptid etwas stärker exprimiert wurde als maC46 (**Abbildung 5-9 B**).



**Abbildung 5-9 Untersuchung der maC36/C46-Sensibilität unterschiedlicher Hüllproteinvarianten.** (A) Lentivirale Vektoren, die mit verschiedenen Hüllproteinmutanten (Tabelle 5-1) pseudotypisiert wurden und ein GFP-Markergen trugen, wurden sowohl auf maC46- als auch maC36-exprimierenden PM-1 Zellen titriert. Als Negativkontrolle dienten native PM-1 Zellen. Der auf der jeweiligen Zelllinie erreichte Titer wurde gegen den auf nativen PM-1 Zellen erreichten Titer normiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von Triplikaten dar. (B) Expression der maC-Peptide. Die Zelllinien PM-1 M423 (maC46), PM-1 M597 (maC36) und PM-1 nativ wurden mit dem mab2F5 und einem PE-markierten Sekundärantikörper gefärbt und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch vermessen. Die Hüllproteinmutanten sind in Tabelle 5-1 im Detail dargestellt.

Bei dem Hüllprotein Ba-L\_sel\_MD konnte die bereits beschriebene maC36-Resistenz und die reduzierte Sensibilität gegenüber maC46 beobachtet werden. Im Vergleich dazu war die Resistenz des Hüllproteins Ba-L\_FH1 sowohl gegenüber maC46 als auch gegenüber maC36 deutlich erhöht. Vektoren, die das Wildtyp-Env trugen, wurden hingegen sowohl durch maC46 als auch durch maC36 fast komplett inhibiert. Diese Ergebnisse stimmen somit mit dem in **Abbildung 5-6** dargestellten Versuch überein. Die Einzelmutationen Ba-L\_MD\_V2, MD\_C3 und MD\_579T zeigten den selben Phänotyp wie Ba-L\_sel\_MD. Diese Mutationen scheinen also keinen Einfluss auf die maC46-Resistenz zu haben, oder der Einfluss war so gering, dass dieser mit dem hier verwendeten Assay nicht detektiert werden konnte. Die Einzelmutationen Ba-L\_MD\_V3 und 556I hingegen reduzierten die maC46-Sensitivität der Hüllproteine jeweils leicht. Bei keiner der beiden Einzelmutanten wurde jedoch das volle Ausmaß der Resistenz von Ba-L\_FH1 erreicht. Auch zeigten die beiden Mutanten keinen Einfluss auf die maC36-Sensibilität.

Es ist dabei zu beachten, dass sich die Ba-L\_MD\_556I-Mutante vom der Wildtyp-Sequenz nur durch die Aminosäureausprägung an Position 634 (N→K) in der HR2 unterscheidet (vgl. **Abbildung 5-6** und **Tabelle 5-1**). Vorarbeiten hatten gezeigt, dass die reduzierte maC46-Sensibilität des Isolats Ba-L\_sel\_MD in erster Linie durch die Mutation 634K hervorgerufen wird. In den Untersuchungen von Lohreggel et al. trat deren Einfluss jedoch deutlich stärker

hervor, wenn sich an der Position 556 ein Isoleucin- statt eines Valinrestes befand (99). Es ist daher verständlich, dass 634K im Isolat Ba-L\_FH1 konserviert wurde, während an Position 556 der Valinrest wieder durch Isoleucin ersetzt wurde.

Des Weiteren wird durch die Mutation in V3 die maC46-Sensibilität reduziert. Der komplette im Hüllprotein FH1 verwirklichte Resistenzphänotyp, der eine erhöhte maC46 und C36-Resistenz umfasst, wird vermutlich durch eine Kombination sowohl der V3-Mutation als auch der Rückmutation (Isoleucin) an Position 556 in Verbindung mit dem Lysinrest an Position 634 hervorgerufen.

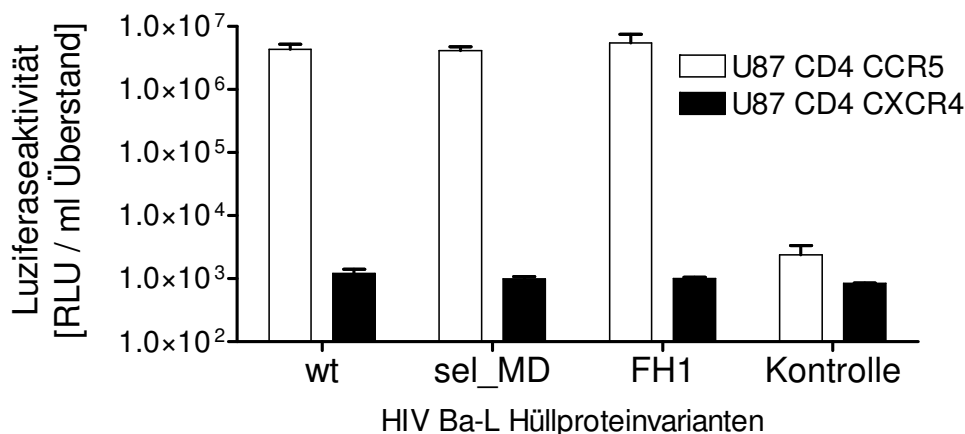
#### 5.5.2.4 Der Corezeptortropismus des HIV Ba-L\_FH1 Env ist unverändert

Die beiden Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 sind die am häufigsten genutzten Corezeptoren für HIV-1 (93). Der Corezeptortropismus eines HIV-Hüllproteins und die Affinität der Bindung wird in erster Linie durch die Sequenz der variablen Region 3 (V3) (76, 152, 153, 175) und in geringerem Maße auch durch den Stamm der V1/2-Schleife (138) und konservierten Bereichen in gp120 bestimmt. Die durch die Bindung an CD4 eingeleiteten konformationellen Änderungen in gp120 werden durch V1/2 moduliert und ermöglichen den direkten Kontakt zwischen der V3-Region und einem der Corezeptoren.

Das Isolat Ba-L\_wt benutzt für den Eintritt in Zielzellen normalerweise ausschließlich den Corezeptor CCR5 (16, 142). Durch die Sequenzierung des Ba-L\_FH1-Env-Gens waren Mutationen in den für den Corezeptortropismus wichtigen Regionen V3 und V2 (**Abbildung 5-6**) identifiziert worden. Die in der maC46-Resistenzselektion verwendete T-Zelllinie PM-1 exprimiert neben dem Chemokinrezeptor CCR5 auch CXCR4. Um eine mögliche Corezeptortropismusänderung des Isolats Ba-L\_FH1 gegenüber dem Ausgangsisolat Ba-L\_sel\_MD festzustellen, wurde der Corezeptortropismus der Hüllproteine Ba-L\_FH1, Ba-L\_sel\_MD und Ba-L\_wt bestimmt.

Hierfür wurden replikationsinkompetente lentivirale Vektoren hergestellt, die das Luziferase-markergen trugen und mit jeweils einem der drei Hüllproteinen pseudotypisiert waren. Anschließend wurden die drei Vektortypen auf U87 CD4-Indikatorzellen, welche entweder CXCR4 oder CCR5 exprimierten, titriert (**Abbildung 5-10**). Der Titer des jeweiligen Vektors wurde anhand der intrazellulären Luziferaseaktivität bestimmt.

Die Titration ergab, dass die im FH1-Hüllprotein gefundenen Mutationen keine Veränderung hin zu einem CXCR4-Corezeptortropismus herbeigeführt hatten. Dieses Hüllprotein nutzte für den Eintrittsprozess, genauso wie die Hüllproteine der Isolate Ba-L\_wt und Ba-L\_sel\_MD, ausschließlich den Corezeptor CCR5. Es ermöglichte keine Transduktion von Zellen, die CXCR4 auf der Oberfläche präsentieren.

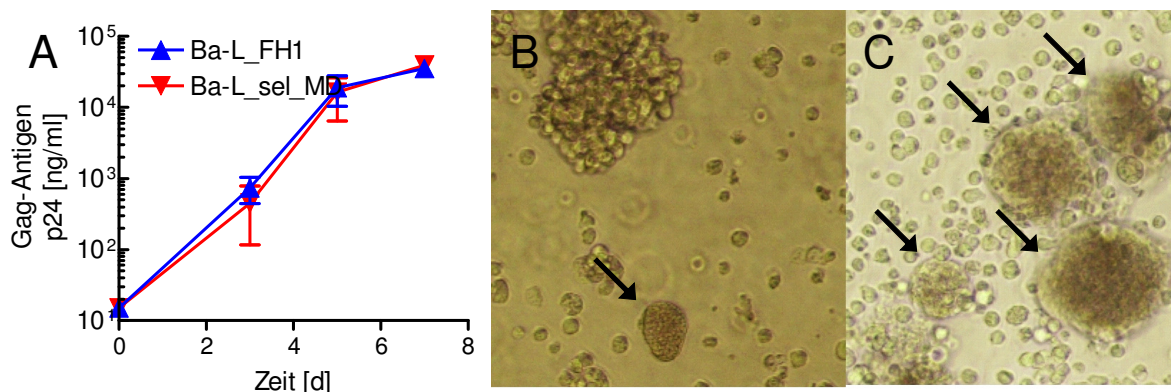


**Abbildung 5-10 Corezeptortropismus des selektierten HIV Ba-L\_FH1 Hüllproteins.** Die Infektiosität replikationsinkompetenter lentiviraler Vektoren, die unterschiedliche Hüllproteine und Luziferase als Markergen trugen, wurde auf U87 CD4 Zellen bestimmt. Die Zellen trugen entweder den Corezeptor CXCR4 oder CCR5. Die Transduktionseffizienz der Vektoren auf den beiden Zelllinien wurde anhand der intrazellulären Luziferaseaktivität (relative light units, RLU) bestimmt. Untransduzierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von Triplikaten dar.

#### 5.5.2.5 Das Isolat HIV Ba-L\_FH1 zeigt eine erhöhte Eintrittskinetik

Während der Selektion des maC46-resistenten Ba-L Isolats und auch in den vergleichenden Infektionsversuchen mit Ba-L\_FH1 und Ba-L\_sel\_MD wurde beobachtet, dass das Isolat Ba-L\_FH1 im Unterschied zum Ausgangsstamm zur Bildung wesentlich größerer Synzytien führte. Um diesen Effekt deutlich zu zeigen, wurden native PM-1 Zellen entweder mit dem Isolat Ba-L\_sel\_MD oder mit Ba-L\_FH1 infiziert und auf Synzytien hin untersucht (**Abbildung 5-11 A**). In der Kultur, die mit Ba-L\_FH1 infiziert worden war, wurden zahlreiche große Synzytien detektiert (**Abbildung 5-11 C**), während der Ba-L\_sel\_MD-infizierte Vergleichsansatz, bei gleichem Infektionsverlauf, nahezu keine fusionierten Zellen aufwies (**Abbildung 5-11 B**).

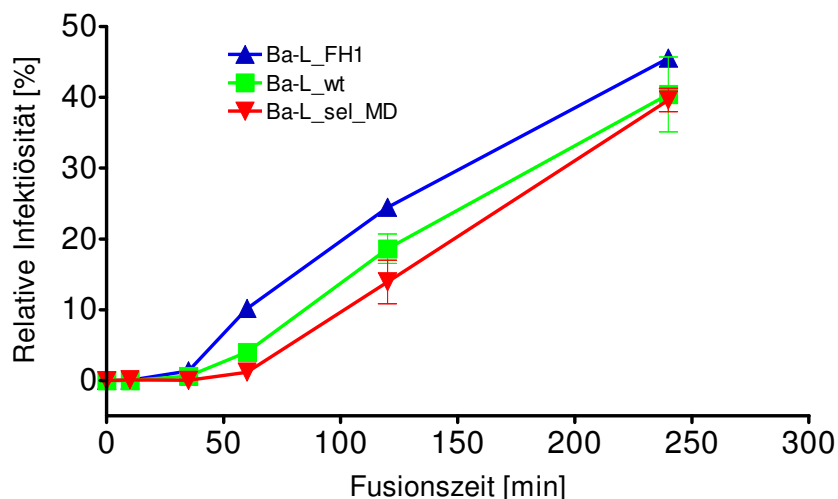
Dieser qualitative Befund gab den ersten Hinweis darauf, dass das selektierte Isolat Ba-L\_FH1 fusogener als Ba-L\_sel\_MD ist. Diese Beobachtung ließ den Schluss zu, dass die maC46-Resistenz möglicherweise zum Teil durch eine Beschleunigung des Fusionsprozesses getragen wird. Die Geschwindigkeit, mit der die für den Viruseintritt notwendigen konformationellen Änderungen im Hüllprotein ablaufen, bestimmt die Größe des Zeitfensters, in dem maC46 seine antivirale Wirkung entfalten kann. Eine Beschleunigung des Fusionsprozesses verringert die Chance des inhibitorischen C-Peptids, die Ausbildung des 6-Helixbündels zu unterbinden und die Membranfusion zu verhindern.



**Abbildung 5-11 Das selektierte HIV-1 Isolat Ba-L\_FH1 induziert Synzytien.** (A) PM-1 Zellen wurden sowohl mit Ba-L\_FH1 (▲) als auch mit dem Ausgangsisolat Ba-L\_sel\_MD (▼) infiziert. Die Virusreplikation wurde anhand der p24-Antigenkonzentration im Kulturüberstand verfolgt. An Tag 7 nach Infektion wurden die Kulturen mikroskopisch auf das Vorhandensein von Synzytien untersucht. (B) Die Ba-L\_sel\_MD-infizierten Zellen zeigten keine oder nur sehr kleine Synzytien. (Pfeil) (C) In der Ba-L\_FH1-infizierten Kultur hatte hingegen in großem Ausmaß Zell-Zellfusion stattgefunden (Pfeile).

Unterschiede in der Fusionsgeschwindigkeit der drei HIV-Hüllproteine Ba-L\_wt, Ba-L\_sel\_MD und Ba-L\_FH1 wurden mithilfe eines Fusionsversuches im Detail analysiert. Hierzu wurden erneut lentivirale Vektoren, die als Markergen GFP und das zu testende Hüllprotein trugen, verwendet. Native PM-1 Zellen wurden mit den Vektorpräparationen inokuliert und der Fusionsprozess wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe einer T-20-Menge, die die Fusion zu 100% inhibiert, gestoppt. Das Fortschreiten der Fusion spiegelt sich in der steigenden Unempfindlichkeit der einzelnen Ansätze gegenüber des zugesetzten T-20 wider (**Abbildung 5-12**).

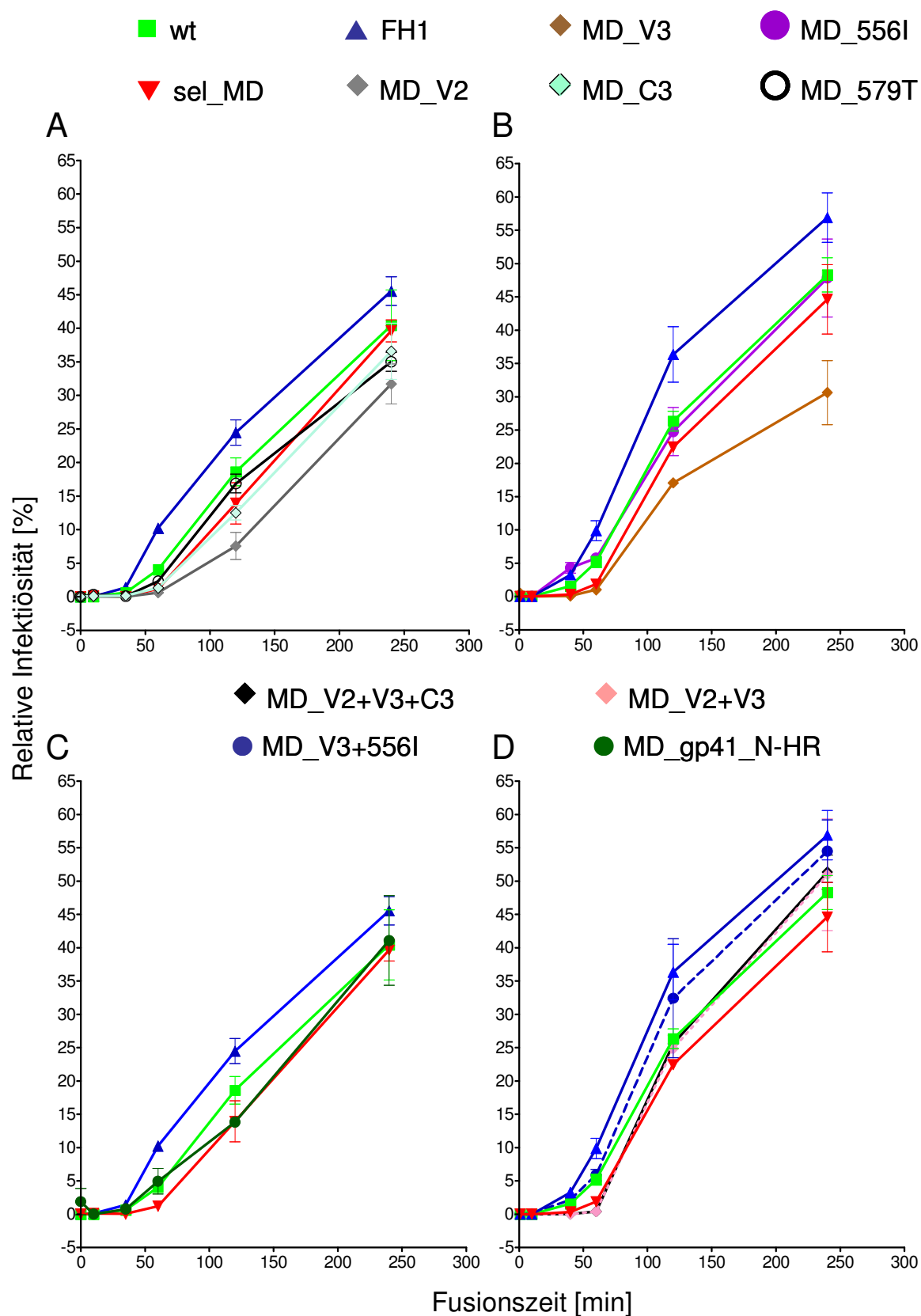
Die Fusionskinetiken der drei getesteten Ba-L-Hüllproteine (Ba-L\_FH1, Ba-L\_wt und Ba-L\_sel\_MD) zeigten einen typischen Verlauf. Die Fusion begann erst nach einer gewissen zeitlichen Verzögerung (*lag*-Phase). Es zeigte sich, dass das selektierte Ba-L\_FH1-Env im Vergleich zu dem Ausgangshüllprotein Ba-L\_sel\_MD eine deutlich erhöhte Fusionskinetik aufwies. Vor allem in der frühen Phase der Fusion (Zeitpunkte 30 bis 60min) trat der Unterschied in der Fusionsgeschwindigkeit deutlich hervor. Die *lag*-Phase der Vektoren, die das selektierte Ba-L\_FH1 Hüllprotein trugen, war deutlich verkürzt; sie erreichten 10% ihrer Infektiosität bereits nach 60min, während Ba-L\_sel\_MD-pseudotypisierte HIV-Partikel diese Infektionsrate erst nach über 100min erreichten. Die Fusionsgeschwindigkeit, die durch das Ba-L\_wt-Hüllprotein erreicht wurde, lag zwischen der der beiden Hüllproteine Ba-L\_sel\_MD und Ba-L\_FH1. Zu den frühen Zeitpunkten der Fusion ist eine schnellere Kinetik des Wildtyps gegenüber dem maC36-resistenten Ba-L\_sel\_MD-Env festzustellen; die Fusionsgeschwindigkeiten der beiden Hüllproteine glichen sich jedoch im Verlauf mehr und mehr an.



**Abbildung 5-12 Fusionskinetikanalyse des selektierten Hüllproteins Ba-L\_FH1.** Native PM-1 Zellen wurden mit lentiviralen Vektoren transduziert, die mit unterschiedlichen Ba-L-Hüllproteinvarianten (wt (■), sel\_MD (▼) oder FH1 (▲)) pseudotypisiert waren. Als Markergen diente GFP. Die Fusion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch die Zugabe von T-20 [5 µM] gestoppt. Die zum jeweiligen Zeitpunkt erreichten Transduktionseffizienzen wurden anhand der GFP-Expression bestimmt und relativ zur Transduktionseffizienz des Kontrollansatzes (ohne T-20) normiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von Triplikaten dar.

Die erhöhte Fusionsgeschwindigkeit, die durch das Hüllprotein Ba-L\_FH1 katalysiert wird, trägt vermutlich zur Resistenz gegenüber dem maC46-Peptid bei. Es sollten nun diejenigen Resistenzmutationen in Ba-L\_FH1 identifiziert werden, welche für die erhöhte Fusionskinetik verantwortlich sind. Dazu wurden erneut Fusionsversuche durchgeführt, wobei die verwendeten Vektoren mit verschiedenen Ba-L\_sel\_MD-Env-Varianten (**Tabelle 5-1**) pseudotypisiert wurden (**Abbildung 5-13**).

Fast alle untersuchten Einzelmutanten (Ba-L\_MD\_V2, \_V3, \_C3, \_579T) wiesen in den ersten 60min der Fusion den für das Ausgangshüllprotein Ba-L\_sel\_MD typischen langsamen Fusionsverlauf auf (**Abbildung 5-13 A+B**). Die Fusionsgeschwindigkeit der Einzelmutanten Ba-L\_MD\_C3 und \_579T war zu den nachfolgenden Zeitpunkten (ab Minute 60) vergleichbar mit Ba-L\_sel\_MD. Bei den Konstrukten Ba-L\_MD\_V3 und \_V2 war jedoch sogar ein noch langsamerer Eintritt als bei dem Ausgangsisolat Ba-L\_sel\_MD zu verzeichnen. Die einzige Ausnahme bildete die Einzelmutante Ba-L\_MD\_556I. Hier zeigte sich in den frühen Phasen der Fusion eine deutlich erhöhte Geschwindigkeit, die mit der des Hüllproteins Ba-L\_FH1 vergleichbar war. Zu den späteren Zeitpunkten glich sich die Geschwindigkeit der des Wildtyp-Hüllproteins an (**Abbildung 5-13 B**).



**Abbildung 5-13 Die Env-Mutanten beeinflussen die Fusionskinetik.** Versuch wurde, wie in Abbildung 5-12 beschrieben, durchgeführt. Die verwendeten Hüllproteinmutanten sind in Tabelle 5-1 im Detail dargestellt. (A) Die selben Ba-L-Envs wie in Abbildung 5-12, zusätzlich MD\_V2 (◆), MD\_C3 (◇) und MD\_579T (○). (B) Die selben Ba-L-Envs wie in Abbildung 5-12, zusätzlich MD\_V3 (◆) und MD\_556I (●). (C) Die selben Ba-L-Envs wie in Abbildung 5-12, zusätzlich MD\_gp41\_N-HR (●). (D) Die selben Ba-L-Envs wie in Abbildung 5-12, zusätzlich MD\_V3+556I (●), MD\_V2+V3+C3 (◆), MD\_V2+V3 (◇).

Wie bereits oben festgestellt, unterscheidet sich die Aminosäuresequenz der Mutante Ba-L\_MD\_556I nur an Position 634 (HR2) vom Wildtyp. Der Vergleich der Fusionsgeschwindigkeiten zwischen Konstrukt Ba-L\_MD\_556I, Ba-L\_sel\_MD und Ba-L\_wt lässt nur den Schluss zu, dass in erster Linie der Valinrest an Position 556 für die langsame Fusionskinetik des Isolats Ba-L\_sel\_MD verantwortlich ist (vgl. **Abbildung 5-6** und **Tabelle 5-1**). Daher liegt die Vermutung nahe, dass dieser „störende“ Valinrest, der in allen Einzelmutanten (bis auf Ba-L\_MD\_556I) vorhanden ist, auch dort zu einer Reduktion der Fusionskinetik führt.

Die Fusionsgeschwindigkeit der Hüllproteinvarianten, die mehrere Mutationen im gp41 oder gp120 trugen (**Abbildung 5-13 C+D**), wurde ebenfalls durch die AS-Ausprägung an Position 556 stark beeinflusst. Die beiden Konstrukte, die an Position 556 den „störenden“ Valinrest (Ba-L\_MD\_V2+V3, V2+V3+C3) trugen, zeigten in den ersten 60min den bereits bei Isolat Ba-L\_sel\_MD beobachteten langsamen Eintrittsverlauf, der jedoch interessanterweise deutlich über der Kinetik der Einzelmutanten lag (vgl. Ba-L\_MD\_V2 und Ba-L\_MD\_V3). Zu späteren Zeitpunkten konnte eine geringe Zunahme der Geschwindigkeit festgestellt werden, die sich der des Wildtyps annäherte. Wurde hingegen die AS-Position 556 durch einen Isoleucinrest ersetzt, wie es in der Variante Ba-L\_MD\_gp41\_N-HR der Fall war, so war eine Beschleunigung der Geschwindigkeit im frühen Stadium der Fusion (bis min60, **Abbildung 5-13 C**) zu verzeichnen.

Am deutlichsten zeigte sich der positive Effekt des Isoleucinrests in dem Konstrukt Ba-L\_MD\_V3+556I: Das Hüllprotein dieses Konstrukts weicht nur an Position 556 von der Sequenz der Einzelmutante Ba-L\_MD\_V3 (vgl. **Tabelle 5-1**) ab, welches die langsamste Fusionsgeschwindigkeit aller untersuchten Konstrukte zeigt (**Abbildung 5-13 B**). Wird jedoch im Konstrukt Ba-L\_MD\_V3 der Valinrest an Position 556 durch Isoleucin ersetzt, wie es bei dem Hüllprotein Ba-L\_MD\_V3+556I der Fall ist, so entspricht die Fusionsgeschwindigkeit nahezu der des Hüllproteins Ba-L\_FH1.

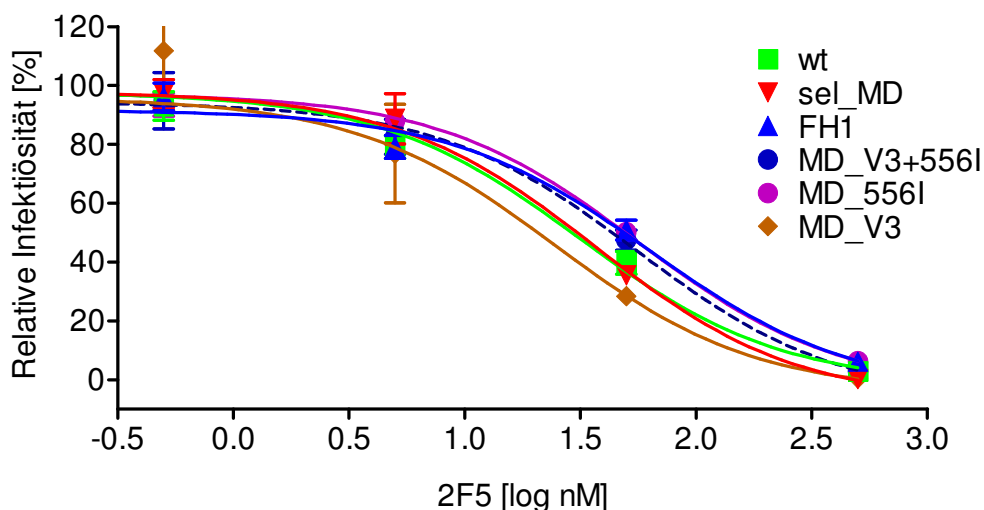
Abschließend lässt sich feststellen, dass die erhöhte Fusionsgeschwindigkeit des Envs Ba-L\_FH1 mit der maC46-Resistenz korreliert. Es hat eine stark erhöhte Fusionsgeschwindigkeit im Vergleich zum Ausgangsisolat Ba-L\_sel\_MD und zeigt auch eine deutliche Reduktion der maC46-Sensibilität. Interessanterweise, offenbart die Kombination der beiden Punktmutationen 556I und 305Y (Hüllprotein Ba-L\_MD\_V3+556I), welche zuvor bereits mit einer reduzierten maC46-Sensibilität assoziiert waren (**Abbildung 5-9**), eine nahezu identische Fusionsgeschwindigkeit wie Ba-L\_FH1. Hierdurch wird erneut die Bedeutung der beiden Mutationen für die maC46-Resistenz unterstrichen.



### 5.5.2.6 Die Mutationen des Ba-L\_FH1-Hüllproteins erzeugen eine Kreuzresistenz gegenüber dem HIV-neutralisierenden Antikörper 2F5

Die Wirksamkeit von Eintrittsinhibitoren wird stark durch Veränderungen der viralen Eintrittskinetik beeinflusst, da sich hierbei die Zeitspanne, während der die Zielstruktur zugänglich ist, verändert (4, 134). So wird durch eine Erhöhung der Fusionsgeschwindigkeit die Wahrscheinlichkeit verringert, dass der Wirkstoff vor Vollendung des Fusionsprozesses in ausreichender Menge gebunden werden kann, um seine Aufgabe zu erfüllen. Aus diesem Grund sind für die Hemmung von Viren mit schneller Eintrittskinetik größere Konzentrationen des jeweiligen Fusionsinhibitors notwendig als für Viren, deren Eintrittsprozess langsam abläuft. Dieser Zusammenhang zwischen Fusionsgeschwindigkeit und der Sensibilität gegenüber Eintrittsinhibitoren ist ausführlich anhand des C-Peptids T-20 untersucht worden (37, 129, 130, 134).

Die erhöhte Fusionskinetik des selektierten Hüllproteins Ba-L\_FH1 stellt also einen relativ unspezifischen Resistenzmechanismus dar. Das Hüllprotein müsste demnach auch eine reduzierte Sensibilität gegenüber anderen Fusionsinhibitoren, die keine Verwandtschaft mit C-Peptiden aufweisen, haben. Diese Hypothese sollte am Beispiel des neutralisierenden monoklonalen Antikörpers 2F5 näher untersucht werden. Der mab2F5 bindet ein lineares hochkonserviertes Epitop innerhalb der *C-heptad repeat*-Region in gp41, welches die Aminosäuren 659-664 (ELDKWA-Motiv, die Nummerierung bezieht sich auf das Ba-L Env) (118, 185) umfasst (**Abbildung 5-2**). Der Antikörper stört durch die Bindung den viralen Fusionsprozess (11, 35, 49, 145), verhindert jedoch nicht die Bindung des Virus an die Zelle (162). Da alle in dieser Arbeit verwendeten Varianten des Ba-L Hüllproteins ein unverändertes mab2F5-Epitop tragen, kann angenommen werden, dass Unterschiede in der mab2F5-Sensibilität wahrscheinlich durch unterschiedliche Fusionsgeschwindigkeiten der Envs bedingt sind.



**Abbildung 5-14 2F5-Sensibilität der Ba-L Env-Varianten.** Native PM-1 Zellen wurden in Anwesenheit steigender Konzentrationen des mab2F5 mit lentiviralen Vektoren transduziert. Die verwendeten Vektoren waren mit folgenden Ba-L-Hüllproteinvarianten umhüllt: wt (■), sel\_MD (▼), FH1 (▲), MD\_V3 (◆), MD\_556I (●) oder MD\_V3+556I (●). Die Transduktionseffizienz wurde anhand der Markergenexpression (GFP) im FACS bestimmt und auf einen Kontrollansatz ohne 2F5 normiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von Triplikaten dar.

Die oben beschriebenen lentiviralen GFP-Reportervektoren wurden einem mab2F5-Neutralisationstest unterworfen. Die Vektoren waren entweder mit den Hüllproteinen Ba-L\_FH1, Ba-L\_sel\_MD, Ba-L\_wt, Ba-L\_MD\_V3, Ba-L\_MD\_556I oder Ba-L\_MD\_V3+556I pseudotypisiert (**Abbildung 5-14**). Die Sensibilität der Hüllproteine gegenüber mab2F5-Neutralisation korreliert weitgehend mit ihrer Fusionskinetik (vgl. **Abbildung 5-13**). Die Hüllproteine Ba-L\_FH1, Ba-L\_MD\_556I und Ba-L\_MD\_V3+556I, die im Vergleich zu Ba-L\_sel\_MD eine (zumindest teilweise) erhöhte Fusionsgeschwindigkeit gezeigt hatten, wiesen nun auch die höchste Resistenz gegenüber 2F5-Neutralisation auf. Die Antikörperkonzentration, die jeweils notwendig war, um die Transduktionseffizienz dieser drei Hüllproteine auf 50% zu reduzieren ( $IC_{50}$ ), war ungefähr doppelt so hoch wie die  $IC_{50}$  des Ausgangsisolats. Demgegenüber war das Hüllprotein Ba-L\_MD\_V3, entsprechend seiner extrem langsamen Fusionskinetik, am empfänglichsten gegenüber der Neutralisation durch 2F5. Die Sensibilität des Hüllproteins Ba-L\_sel\_MD und Ba-L\_wt war intermediär im Vergleich zu den anderen Envs und entsprach somit ihrer mittleren Fusionsgeschwindigkeit.

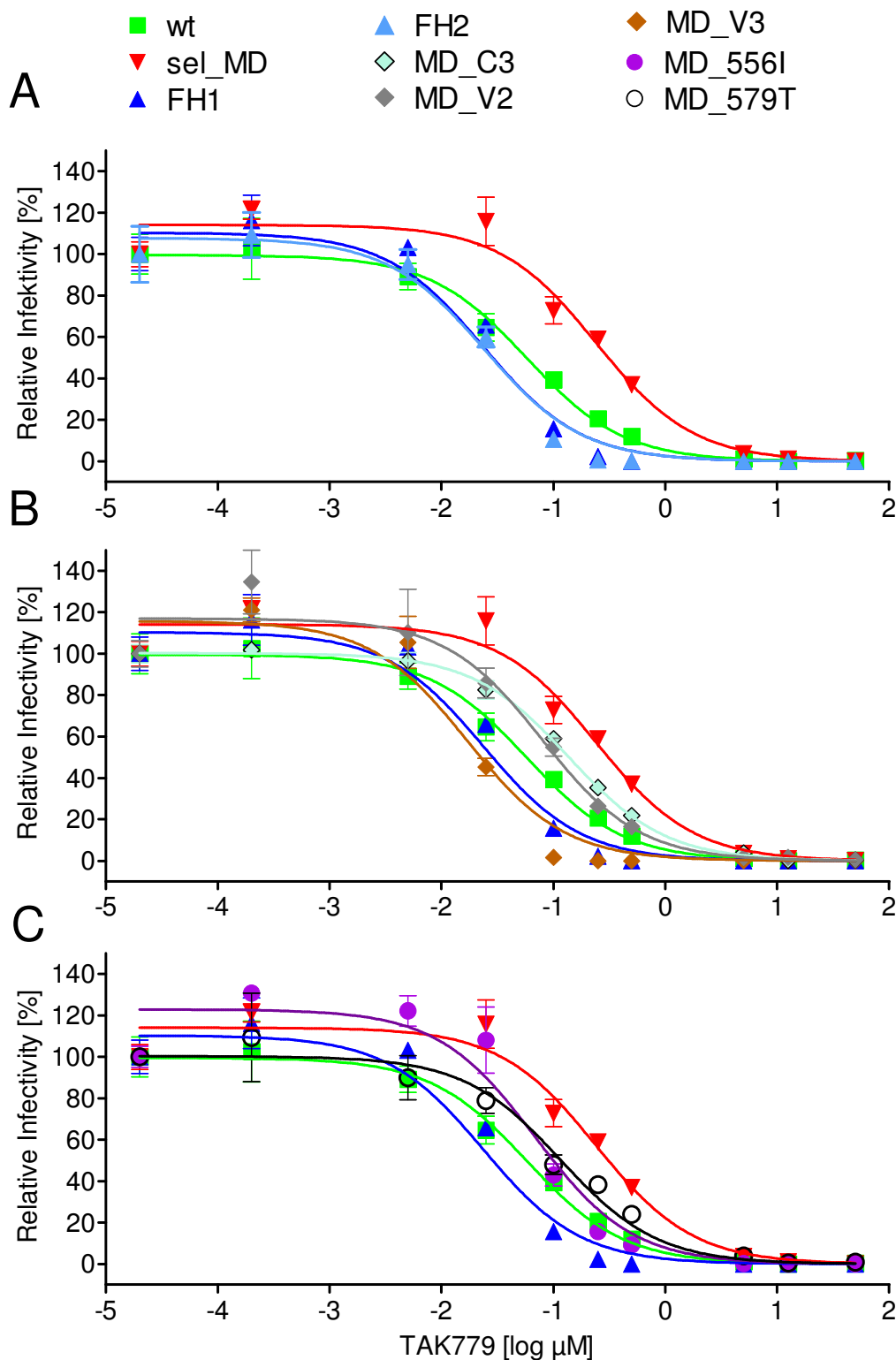
Es lässt sich somit feststellen, dass die relative 2F5-Sensibilität der getesteten Hüllproteine, von geringfügigen Abweichungen abgesehen, gut mit den bestimmten Fusionsgeschwindigkeiten korreliert. Es erscheint daher plausibel, dass der mit C-Peptiden nicht verwandte Eintrittsinhibitor mab2F5 aufgrund der erhöhten Fusionskinetik des selektierten Hüllproteins Ba-L\_FH1 weniger wirksam ist.

### 5.5.2.7 Die Hüllproteine HIV Ba-L\_FH1 und HIV Ba-L\_FH2 haben eine reduzierte Corezeptoraffinität

Die im vorangehenden Abschnitt dargestellte Versuchsreihe hatte gezeigt, dass große Unterschiede in der Fusionskinetik zwischen dem selektierten Hüllprotein Ba-L\_FH1 und dem Glykoprotein des Ausgangsisolats existieren. Wie bereits oben beschrieben, weist das Hüllprotein Ba-L\_FH1 in den gp120-Bereichen V1/2 und V3 Mutationen auf. Von diesen beiden Regionen ist bekannt, dass sie die Corezeptoraffinität des Hüllproteins beeinflussen. Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Corezeptoraffinität als mögliche Ursache für die beschleunigte Fusionskinetik infrage kommt, wurde die Sensibilität des Isolats gegenüber dem CCR5-Antagonisten TAK-779 bestimmt. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Corezeptoraffinität negativ mit der Empfindlichkeit des Hüllproteins gegenüber TAK-779 korreliert ist (129, 134, 135). Eine große Corezeptoraffinität führt zu einer beschleunigten Eintrittskinetik, da sich der Anteil der Viren erhöht, die zu jedem beliebigen Zeitpunkt in einem fusionskompetenten Zustand vorliegen, d.h. Viren, die sowohl CD4 als auch den Corezeptor gebunden haben. Dementsprechend steigt die Anzahl der Fusionsvorgänge (129).

Bei dem Wirkstoff TAK-779 handelt es sich um ein kleines nicht-peptidisches organisches Molekül, das sehr spezifisch an den Corezeptor CCR5 bindet und eine Interaktion mit HIV-Env verhindert (8, 42). Durch Zugabe des Wirkstoffes TAK-779 kann die Anzahl an freiem Corezeptoren, welche für den viralen Fusionsprozess zur Verfügung steht, reduziert werden (129). Demzufolge sollten bei hohen Konzentrationen des Inhibitors nur Viren den Eintrittsprozess durchlaufen können, die eine sehr große Corezeptoraffinität aufweisen.

Für die Bestimmung der TAK-779-Sensibilität wurden U87 CD4 CCR5 Zellen mit lentiviralen Vektoren, die Luziferase als Markergen trugen und entweder mit dem Hüllprotein Ba-L\_wt, Ba-L\_sel\_MD oder Ba-L\_FH1 umhüllt waren, transduziert. Den Ansätzen wurden unterschiedliche Mengen des Corezeptorantagonisten hinzugefügt. Die Transduktionseffizienz wurde anschließend anhand der Luziferaseaktivität bestimmt (**Abbildung 5-15 A**). Um die Corezeptoraffinität quantitativ zu bestimmen, wurde für jedes Hüllprotein die TAK-779-Konzentration ermittelt, bei der die Luziferaseaktivität ihren halbmaximalen Wert ( $IC_{50}$ ) erreichte (**Tabelle 5-2**).



**Abbildung 5-15 TAK-779 Sensibilität der Ba-L Glykoproteinvarianten.** Die Transduktionseffizienz von replikationsinkompetenten lentiviralen Vektoren in Anwesenheit von TAK-779 wurde anhand des Markergens Luziferase bestimmt und auf eine inhibitorfreie Kontrollprobe normiert. Um die  $IC_{50}$  der Hüllproteine zu ermitteln, wurde mithilfe des Programms Graphpad Prism 4.0 (Version 4.03) eine Nicht-lineare Regression durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von Triplikaten dar. (A) TAK-779 Sensibilität der Ba-L Hüllproteine wt (■), sel\_MD (▼), FH1 (▲) und FH2 (▲). (B) wie (A) einschließlich der Ba-L Env-Konstrukte MD\_V2 (◆), MD\_C3 (◆), und MD\_V3 (◆) (C) wie (A) einschließlich der Ba-L Env-Konstrukte MD\_556I (●), MD\_579T (○).

**Tabelle 5-2 TAK-779-Sensibilität der untersuchten Ba-L Hüllproteinvarianten**

Vektorname Ba-L	IC <sub>50</sub> TAK-779 [nM]
sel_MD	241
MD_C3	137
MD_579T	116
MD_V2	79
MD_556I	68
wt	58
FH1	24
FH2	24
MD_V3	17

Die geringste Sensibilität gegenüber TAK-779 zeigt das Glykoprotein des Isolats Ba-L\_sel\_MD. Dieses Hüllprotein hat eine IC<sub>50</sub> von 241nM TAK-779. Ba-L\_sel\_MD hat somit eine vierfach geringere IC<sub>50</sub> als das Hüllprotein des Isolats Ba-L\_wt (58nM). Es ist zu beachten, dass die Hüllproteine Ba-L\_FH1 und Ba-L\_FH2 sogar eine noch größere Sensibilität gegenüber TAK-779 aufweisen als das Wildtyp-Env. Für beide liegt die IC<sub>50</sub> bei 24nM. Sie sind somit zehnmal sensibler gegenüber TAK-779 als das Glykoprotein des Ausgangsisolats Ba-L\_sel\_MD (**Abbildung 5-15 A, Tabelle 5-2**).

Welche der in Ba-L\_FH1 und Ba-L\_FH2 gefundenen Punktmutationen führen zu der im Vergleich zu Ba-L\_sel\_MD stark erhöhten TAK-779-Sensibilität? Da die TAK-779-Sensibilität von Ba-L\_FH1 und Ba-L\_FH2 identisch war, kann davon ausgegangen werden, dass die im C-Terminus von Ba-L\_FH2 gefundene Punktmutation (I851A, **Tabelle 5-1**) keinen messbaren Einfluss auf die Corezeptoraffinität hatte. Zur Untersuchung des Einflusses der verbleibenden fünf Punktmutationen wurden die bereits beschriebenen Einzelmutanten verwendet, um replikationsinkompetente lentivirale Vektoren herzustellen. Mithilfe der Konstrukte Ba-L\_MD\_V2, Ba-L\_MD\_C3 und Ba-L\_MD\_V3 wurden die Auswirkungen der einzelnen in gp120 enthaltenen Mutationen untersucht (**Abbildung 5-15 B**). Der Einfluss der in gp41 befindlichen Mutationen wurden mithilfe der Konstrukte Ba-L\_MD\_556I und Ba-L\_MD\_579T analysiert (**Abbildung 5-15 C**). Die beiden gp41-Punktmutanten hatten nur wenig Einfluss auf die TAK-779-Sensibilität der Envs. Die IC<sub>50</sub> der Konstrukte Ba-L\_MD\_556I und Ba-L\_MD\_579T betrug 68nM bzw. 116nM und näherte sich somit der IC<sub>50</sub> des Wildtyps an. Dasselbe traf für die beiden gp120-Mutanten Ba-L\_MD\_V2 und Ba-L\_MD\_C3 zu. Auch hier war die IC<sub>50</sub> mit 79nM bzw. 137nM im Vergleich zum Wildtyp nur gering erhöht. Demgegenüber hatte die Mutation in der V3-Region (Ba-L\_MD\_V3) einen drastischen Einfluss auf die TAK-779-Sensibilität des Hüllproteins. Durch das Einfügen dieser Punktmutation in das Ba-L\_sel\_MD-Hüllprotein wurde die IC<sub>50</sub> auf 17nM reduziert und spiegelte so die TAK-779-Sensibilität von Ba-L\_FH1 bzw. Ba-L\_FH2 wider.

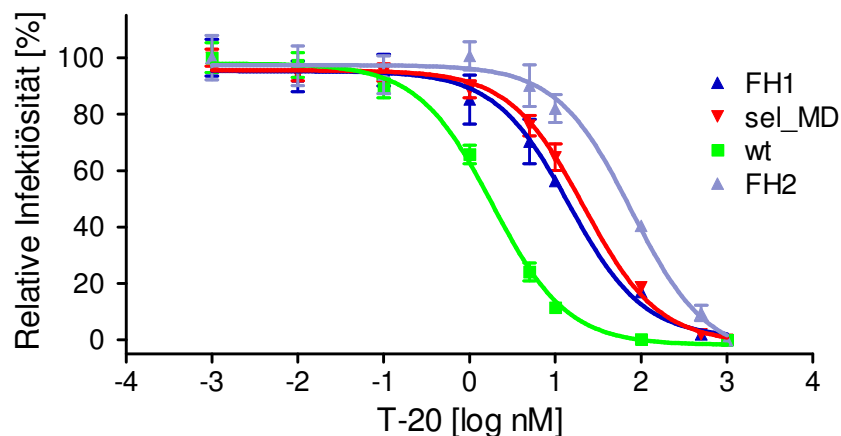
Eine erhöhte Corezeptoraffinität scheidet somit als Grund für die beschleunigte Fusionskinetik des Hüllproteins Ba-L\_FH1 aus. Offensichtlich wird die Corezeptoraffinität der Hüllproteine Ba-L\_FH1 und Ba-L\_FH2 nahezu ausschließlich, durch die Mutation in der V3-Region (305Y) definiert. Wie bereits angedeutet, wurden in Arbeiten anderer Gruppen in erster Linie hohe Corezeptoraffinitäten mit schnellen Fusionskinetiken assoziiert (129, 134, 135). Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, dass die Fusionsgeschwindigkeit des Isolats Ba-L\_FH1 insgesamt erhöht war, obwohl die Mutation in der V3-Region (305Y, Mutante Ba-L\_MD\_V3) die Corezeptoraffinität so drastisch reduzierte.

#### 5.5.2.8 Die T-20-Sensibilität des HIV Ba-L\_FH1/2 Env ist durch die Mutationen unbeeinflusst

Der Fusionsinhibitor maC36 ist eine membrangebundene Variante des C-Peptids T-20. Beide Peptide sollten sich in ihrer inhibitorischen Wirkung recht ähnlich sein. Daher sollten auch Resistenzmutationen, die gegen das eine C-Peptid gerichtet sind, zu einer Kreuzresistenz gegenüber dem anderen führen. Dieses Phänomen wurde bereits bei dem auf maC36-Resistenz selektierten Isolat Ba-L\_sel\_MD festgestellt. Im Vergleich zum Wildtypisolat war die Sensibilität des Isolats Ba-L\_sel\_MD gegenüber beiden Fusionsinhibitoren ca. zehnfach reduziert. (99). Das Isolat Ba-L\_FH1 zeigte im Vergleich zu Ba-L\_sel\_MD nicht nur eine maC46-Resistenz, sondern zugleich auch eine reduzierte Sensibilität gegenüber maC36 (**Abbildung 5-9**). Hier sollte nun untersucht werden, ob mit der erhöhten maC36-Resistenz auch eine Verstärkung der Kreuzresistenz gegenüber T-20 einhergeht.

Um dies zu untersuchen, wurden native PM-1-Zellen mit den oben beschriebenen replikationsinkompetenten lentiviralen Vektoren, die das GFP-Markergen trugen, in Anwesenheit von unterschiedlichen T-20 Konzentrationen transduziert. Anschließend wurde die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt (**Abbildung 5-16**). Das Hüllprotein Ba-L\_wt hatte die höchste T-20-Sensibilität aller untersuchten Envs. Seine  $IC_{50}$  lag bei ca. 1,7nM. Wie bereits von Lohrengel et al. beschrieben, ist demgegenüber die  $IC_{50}$  des Hüllproteins Ba-L\_sel\_MD deutlich erhöht (99) und lag bei ca. 20nM. Die Hüllproteinen Ba-L\_FH1 und Ba-L\_sel\_MD hatten dieselbe Sensibilität gegenüber dem löslichen Peptid T-20.

Verglichen mit Ba-L\_FH1 und Ba-L\_sel\_MD hatte das Hüllprotein Ba-L\_FH2 die größte T-20-Resistenz. Die  $IC_{50}$  lag hier bei ca. 80nM. Ba-L\_sel\_MD unterscheidet sich von Ba-L\_FH1 nur durch eine zusätzliche Mutation im C-Terminus (I851A). Erstaunlicherweise vervierfachte diese Veränderung die T-20-Resistenz in Ba-L\_FH2. Die erhöhte T-20-Resistenz des Hüllproteins Ba-L\_FH2 ist schwierig einzuschätzen, da für diese Mutation keine Daten über die maC46-oder maC36-Sensibilität erhoben wurden.



**Abbildung 5-16 T-20-Sensitivität der unterschiedlichen HIV Ba-L Glykoproteine.** PM-1 Zellen wurden in Anwesenheit unterschiedlicher T-20 Konzentrationen inkubiert und anschließend mit lentiviralen Vektoren transduziert, die mit unterschiedlichen Ba-L-Glykoproteinen (wt (■), sel\_MD (▼), FH1 (▲) und FH2 (▲)) umhüllt waren. Die Transduktionseffizienz der Proben wurde mittels FACS bestimmt relativ zu der jeweiligen Kontrollprobe ohne T-20 normalisiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von Triplikaten dar. Die nicht-lineare Regression wurde mithilfe des Programms Graphpad Prism 4.0 (Version 4.03) durchgeführt.

## 6 Diskussion

Der retrovirale Vektor M87o kodiert ein membranständiges C-Peptid (maC46), welches ein effizienter Inhibitor des HIV-Eintritts in Zielzellen ist. In dieser Arbeit wurde durch Passage auf maC46-exprimierenden Zelllinien HIV-1 mit einer Resistenz gegen maC46 selektiert. Anschließend wurde die maC46-Sensibilität der passagierten Virusisolate bestimmt und der mögliche Resistenzmechanismus untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die antivirale Wirkung maC46-exprimierender Zelllinien verhält sich proportional zur Expressionshöhe des maC-Peptids.
- Durch Passage des HIV-1 Isolats Ba-L\_sel\_MD auf maC46-exprimierenden Zellen konnte das Isolat Ba-L\_FH1 selektiert werden, welches eine deutlich reduzierte maC46-Sensibilität aufweist.
- Wichtige Determinanten für die maC46-Resistenz des Isolats Ba-L\_FH1 befinden sich im Hüllprotein.
- Die maC46-Resistenz des Isolats Ba-L\_FH1 wird vermutlich durch eine beschleunigte Eintrittskinetik hervorgerufen, die in erster Linie auf der Mutation in der V3-Region (305Y) und der Mutation 556I in Verbindung mit 634K beruht.
- Die Fusionsgeschwindigkeit des Isolats Ba-L\_FH1 ist erhöht, obwohl die Corezeptoraffinität erniedrigt ist.
- Die Sensibilität des Ba-L FH1-Env gegenüber dem membranständigen T-20 (maC36) ist reduziert; die Empfindlichkeit gegenüber dem löslichen T-20 ist jedoch im Vergleich zum Ausgangsisolat unverändert.

Der Einfluss der einzelnen Punktmutationen auf alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten phänotypischen Eigenschaften ist in Tabelle 6-1 wiedergegeben. Eine Kopie dieser Tabelle befindet sich auf der letzten Seite dieser Arbeit. Sie kann herausgeklappt werden und ermöglicht einen ständigen Überblick über die Konstrukte, welche in der Diskussion besprochen werden.



**Tabelle 6-1 Zusammenfassung der Ergebnisse.** Dargestellt sind die Aminosäurepositionen in verschiedenen Bereichen des Env-Gens (V2/3: Variable Region 2/3; C3: konstante Region3; HR1/2: heptad repeat 1/2, CT: C-terminale Domäne), welche sich im Verlaufe der maC46-Resistenzselektion verändert haben (Vergleiche Abbildung 5-6). Das Vorhandensein einzelner Mutationen in einem Konstrukt ist durch ein Kreuz (x) markiert. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten phänotypischen Eigenschaften sind ebenfalls dargestellt. Eigenschaften, die nicht untersucht wurden, sind durch (nd) markiert.

Nr.	Vektorname Ba-L	Mutation in env							Phänotyp					
		I 187	N 305	E 353	I 556	A 579	N 634	I 851	Empfindlichkeit <sup>†</sup> gegenüber					Fusions- kinetik <sup>†</sup>
		T V2	Y V3	K C3	V HR1	T HR1	K HR2	A CT	maC46	maC36	T-20	2F5	TAK- 779	
M749	wt								++++	++++	++++	++	+++	+++
M759	sel_MD				X		X		+++	+++	++	++	+	++
M750	FH1	X	X	X		X	X		+	+	++	+	++++	++++
M779	FH2	X	X	X		X	X	X	nd	nd	+	nd	++++	nd
M772	MD_V2	X			X		X		+++	+++	nd	nd	++	+
M773	MD_V3		X		X		X		++	+++	nd	++++	++++	+
M776	MD_C3			X	X		X		+++	+++	nd	nd	++	++
M778	MD_556I						X		++	+++	nd	+	++	+++
M777	MD_579T				X	X	X		+++	+++	nd	nd	++	++
M782	MD_V2+V3+C3	X	X	X	X		X		nd	nd	nd	nd	nd	++
M783	MD_V2+V3	X	X		X		X		nd	nd	nd	nd	nd	++
M789	MD_gp41_N-HR					X	X		nd	nd	nd	nd	nd	+++
M798	MD_V3+556I		X				X		nd	nd	nd	+	nd	++++

†: Die Fusionsgeschwindigkeit bzw. die Empfindlichkeit des Hüllproteins gegenüber dem jeweiligen Inhibitor ist durch die Anzahl der +-Symbole dargestellt: +++++ = hohe Empfindlichkeit/Fusionskinetik, + = geringe Empfindlichkeit/Fusionskinetik.

## 6.1 maC46-Expression bestimmt die Effizienz der Eintrittshemmung

Durch retrovirale Transduktion mit verschiedenen Vektoren konnten PM-1 Zelllinien etabliert werden, die sich in Ihrer maC46-Oberflächenexpression unterschieden. In maC46-exprimierenden Zelllinien wurde der Eintritt lentiviraler Pseudotypen, unabhängig von deren Corezeptortropismus, gehemmt. Diese Beobachtungen bestätigen das große Wirkungsspektrum des Fusionsinhibitors maC46 (46). Ferner wurde mit den etablierten PM-1-Zelllinien gezeigt, dass die Hemmung des Viruseintritts sich proportional zur maC46-Expression verhält. Dieses Ergebnis ist ein Novum in der Gentherapie; maC46 ist das erste therapeutische Gen, für welches ein quantitativer Dosis-Wirkungszusammenhang aufgestellt werden konnte (68).

Bei konventionellen Wirkstoffen gehören Dosis-Wirkungsuntersuchungen zu den Standardverfahren, um Dosisfindung und Effizienzuntersuchungen durchführen zu können. Durch die Einführung dieser Methode in die Gentherapie ist der erste Schritt getan, die Wirksamkeit unterschiedlicher therapeutischer Gene unter standardisierten Bedingungen vergleichbar zu machen.

## 6.2 maC46-exprimierende T-Zelllinien als System zur Selektion resistenter Viren

Für die Selektion von maC46-resistenten Viren wurden zwei HIV-1 Isolate verwendet: Das CXCR4-trope Isolat NL4-3 und das bereits maC36-resistente CCR5-trope Isolat Ba-L\_sel\_MD. Im Verlauf der Selektion wurde ausgehend vom Isolat Ba-L\_sel\_MD ein maC46-resistentes Virus selektiert. Trotz der langen Selektionszeit war die Resistenz jedoch nur relativ schwach ausgebildet; es konnte lediglich eine ca. fünf- bis zehnfache Reduktion der maC46-Sensibilität festgestellt werden. Der Versuch, auch eine resistente Variante des Isolats NL4-3 zu züchten, scheiterte dagegen. Die Gründe für den unterschiedlichen Ausgang der Selektionen beruhen vermutlich auf den speziellen Eigenschaften des verwendeten Selektionssystems:

Der Einsatz von maC46-exprimierenden Zellen zur Resistenzselektion weist im Vergleich zur Selektion mit löslichen Wirkstoffen den Nachteil auf, dass der Selektionsdruck auf das Virus nur in begrenztem Maße flexibel angepasst werden kann. Die Unterschiede der maC46-Expressionshöhen zwischen den Zelllinien waren zum Teil recht groß, so dass der Selektionsdruck in relativ großen Schritten gesteigert wurde. Dies kann dazu führen, dass ein passagiertes Virus auf den niedrig exprimierenden Zellen nicht genug Mutationen anhäuft, um anschließend auf den höher Exprimierenden wachsen zu können. Dieser Effekt fiel für das Isolat NL4-3 wahrscheinlich drastischer aus als für Ba-L\_sel\_MD, da das Letztgenannte bereits zu Beginn der Selektion über eine leichte maC46-Kreuzresistenz verfügte (99). Es ist ferner bekannt, dass CCR5-trope Viren (wie das Ba-L Isolat) häufig eine geringere Grundsensibilität gegenüber C-Peptiden haben als CXCR4-trope Isolate (37, 38). Diese Eigenschaft ist darauf zurückzuführen, dass CCR5-trope Viren meist eine größere Corezeptoraffinität (41) und somit auch eine erhöhte Fusionskinetik aufweisen, was grundsätzlich eine Hemmung durch C-Peptide erschwert (4, 134). Um eine effizientere Selektion von maC46-resistenten Viren zu erreichen, wäre es daher möglicherweise besser gewesen, wenn mehr Zelllinien mit niedrigerem Expressionsniveau existiert hätten und somit ein langsames Anheben des maC46-Selektionsdruckes möglich gewesen wäre.

Des Weiteren muss festgestellt werden, dass der Selektionsdruck innerhalb einer Kultur von maC46-exprimierenden Zellen inhomogen verteilt ist; dies ist bei Selektionskulturen mit löslichen Wirkstoffen nicht der Fall. Wie bereits oben dargestellt, korreliert das maC46-Expressionsniveau jeder Zelllinie mit deren inhibitorischer Aktivität und bestimmt somit den für jede Zelllinie maximal erreichbaren Selektionsdruck. Dieses Maximum wird aber nur in einer Population mit einer homogenen maC46-Expression erreicht. Steigt der Anteil an maC46-negativen Zellen innerhalb der Kultur, fällt der Selektionsdruck, da die Viren zur Replikation in den ungeschützten Zellen übergehen können.

Die für die Selektion verwendeten Zelllinien waren durch retrovirale Transduktion etabliert und anschließend maC46-positive Zellen in der Massenkultur durch G418-Selektion oder FACS-

Sortierung angereichert worden. Die einzelnen Klone solcher Massenkulturen weisen jedoch eine sehr heterogene Transgenexpression auf. Häufig zeigt nur ein Teil der Klone eine kontinuierliche Expression, während andere Zellen die Expression im Laufe der Zeit abschalten (73). Dieses Phänomen wird als Vektor-*Silencing* bezeichnet und ist sowohl in Zelllinien (24, 73) als auch in primären Zellen (23, 119, 127, 178) zu beobachten. Diese Herunterregulierung der Expression wird einerseits durch CpG-Methylierung der proviralen LTR hervorgerufen, was zu einer Inaktivierung des Promotors führt (23, 73). Zum anderen kann die Expression des integrierten Vektors durch epigenetische Modifizierung des Chromatins abgeschaltet werden. Dabei kommt es zu einer Reorganisation und Verdichtung des Chromatins, die keine weitere Transkription mehr erlaubt (127, 178).

Auch für die angereicherten maC46-exprimierenden Zellen der Massenkulturen konnte beobachtet werden, dass der Anteil der nicht-exprimierenden Zellen im Laufe der Zeit langsam zunahm (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grunde kann davon ausgegangen werden, dass zu jedem Zeitpunkt nicht-exprimierende Zellen in der Kultur vorhanden waren, die eine uneingeschränkte Replikation des Virus ermöglichen. In einer solchen Kultur konkurrieren Wildtyp und teilresistente Viren um die Replikation auf diesen maC46-negativen Zellen, da diese Zellen eine effizientere Vermehrung zulassen. Viele Virusisolate, die eine (Teil-)Resistenz gegen einen antiviralen Wirkstoff aufweisen, replizieren häufig langsamer und haben weniger Nachkommen als das Wildtypvirus, d.h. ihre Fitness ist reduziert. In diesen heterogenen Zelllinien wären die teilresistenten Viren daher im Nachteil und schwerer anzureichern im Vergleich zum Wildtyp.

Es ist jedoch fraglich, ob selbst mit einem veränderten Selektionsprotokoll ein sehr viel besseres Ergebnis hätte erzielt werden können. Der Fusionsinhibitor maC46 ist in der Lage, mit der hydrophoben Tasche zu interagieren, welche durch die *coiled-coil* der HR1 gebildet wird. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass es schwierig ist, gegen solche C-Peptide resistentes HIV zu erzeugen (99, 137). Für diesen Umstand sprechen mehrere Gründe: (I) Im Vergleich zu einem C-Peptid, das nicht in der Lage ist, an diese Tasche zu binden (wie z.B. T-20 oder maC36), stabilisiert die Bindung des C-Peptids maC46 an die hydrophobe Tasche die Interaktion mit der HR1 insgesamt. maC46 erreicht daher eine weitaus höhere inhibitorische Wirkung (25, 43). (II) Die hydrophobe Tasche ist eine der am stärksten konservierten Genomregionen bei HIV-1. Selbst zwischen verwandtschaftlich weit entfernten Spezies der Lentiviren wie HIV-1, HIV-2 und SIV ist die AS-Komposition der hydrophoben Tasche nahezu komplett identisch (55, 64, 104). Die hydrophobe Tasche ist für den Fusionsprozess von besonderer Bedeutung. Es lastet somit ein großer Selektionsdruck auf diesem Bereich, der einer Sequenzänderung auf AS-Ebene entgegenwirkt und der die Selektion von Resistenzmutanten verhindert (25). (III) Ferner sind die Nukleotide, die die Proteinsequenz der Tasche kodieren, auch ein Teil der HIV RRE-Struktur, welche wichtig für

den Kernexport von einfach- bzw. ungespleißten viralen Transkripten ist (105, 181). Diese zusätzliche Funktion übt somit weiteren Selektionsdruck aus, durch welchen die Sequenz konserviert wird.

### 6.3 Konservierte Aminosäurepositionen sind von den Resistenzmutationen betroffen

Nach einer Passagezeit von 149 Tagen auf den unterschiedlichen maC46-exprimierenden Zelllinien konnte das maC46-resistente Isolat Ba-L\_FH1 selektiert werden. Die wichtigsten Determinanten der maC46-Resistenz sind vermutlich auf das Hüllproteingen *Env* beschränkt. Das Ausgangsisolat der maC46-Resistenzselektion (Ba-L\_sel\_MD) wies im Vergleich zum Wildtyp zwei Mutationen im gp41 auf (I556V; N634K). Die Ergebnisse von Lohrengel et al. zeigen, dass die maC36/T-20-Resistenz des Isolats vornehmlich durch die Mutation 634K hervorgerufen wird. Darüber hinaus reduziert 634K auch die Sensibilität des Isolats Ba-L\_sel\_MD gegenüber maC46 und T-649. Demgegenüber hat die Mutation 556V nur einen geringen Einfluss auf die maC36/T-20 Resistenz und keine Auswirkungen auf die maC46/T-649-Sensibilität des Isolats (99). Es ist daher nicht verwunderlich, dass während der Selektion des Isolats Ba-L\_FH1 nur die Mutation 634K konserviert wurde, während an Position 556 eine Reversion zur Wildtypsequenz festzustellen war (vgl. **Abbildung 5-6**). Im Hüllprotein Ba-L FH1 konnten ferner vier weitere Punktmutationen identifiziert werden, die zu einem Aminosäureaustausch führten: Drei der Mutation lagen in gp120 (Position 187 (V2), 305 (V3) und 353 (C3)), die vierte in gp41 (Position 579, HR1).

**Tabelle 6-2 Vergleich der in Ba-L\_FH1 mutierten Aminosäurepositionen mit Ba-L\_sel\_MD und natürlich vorkommenden Isolaten**

Env-Region	Aminosäureposition	Aminosäureausprägung von Vergleichsisolaten des Subtyps B (n=199) an der jeweiligen Position	
		Ba-L sel MD (abs. Anzahl / % *)	Ba-L FH1 (abs. Anzahl / % *)
V2	187	I (186 / 93,5)	T (3 / 1,5)
V3	305	N (187 / 94)	Y (4 / 2)
C3	353	E ( 181 / 91)	K ( 11 / 5,5)
gp41	556	V ( 0 / 0)	I (198 / 99,5)
gp41	579	A (196 / 98,5)	T (1 / 0,5)

*Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code dargestellt. \*Differenzen zu 100% ergeben sich durch zusätzliche nichtaufgeführte Aminosäureausprägungen.*

Sequenzanalysen von 199 Vergleichshüllproteinen des Subtyps B (Los Alamos National Laboratory: [www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov)) ergaben, dass alle fünf von Veränderungen betroffenen Aminosäurepositionen stark konserviert sind. Erwartungsgemäß zeigen dabei die AS-Positionen in gp41 eine stärkere Konservierung als im gp120 (Tabelle 6-2) (113).

An Aminosäureposition 187, 305 und 353 in der gp120-Untereinheit war die Ausprägung der Referenzisolate in der großen Mehrheit (mindestens 91% an der jeweiligen Position) mit dem Ausgangsisolat Ba-L\_sel\_MD identisch. Die AS-Ausprägung des Isolats Ba-L\_FH1 an der entsprechenden Position war hingegen nur in weniger als 6% der Referenzhüllproteine zu detektieren.

Die Position 579 der gp41-Untereinheit ist stark konserviert. Nur 1,5% der Referenzisolate wichen an dieser Stelle von der Sequenz des Ausgangsisolats ab und nur ein einziges Isolat wies den in Ba-L\_FH1 gefundenen Threoninrest auf. Position 556 zeigte hingegen ein anderes Bild. Im Isolat Ba-L\_FH1 hatte sich an dieser Position eine Rückmutation hin zur Wildtypausprägung (Isoleucin) ereignet. Dadurch entspricht die AS-Ausprägung der Vergleichsisolate an dieser Position in über 99% der Fälle der des Isolats Ba-L\_FH1. Keine einzige Referenzsequenz zeigte hingegen an der Position 556 die Aminosäureausprägung des Ausgangsisolats Ba-L\_sel\_MD (Valin). Dies ist erstaunlich, da sich beide Aminosäuren in ihren physiko-chemischen Eigenschaften stark ähneln.

Bei dem Isolat Ba-L\_FH1 wurde somit an den vier AS-Positionen 187, 305, 353 und 579 jeweils eine stark konservierte AS durch eine in den Vergleichsisolaten gering oder gar nicht verbreitete AS-Variante ersetzt. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die gefundenen Mutationen durch den maC46-Selektionsdruck zustande kamen und nicht auf zufällige Variationen zurückzuführen sind. Die Rückmutation an Position 556 (Austausch des Valinrests gegen einen Isoleucinrest) zeigt an, dass die maC46 im Vergleich zu maC36 einen anderen Selektionsdruck auf diese Position ausübt und somit der Valinrest des Ausgangsisolats nicht erhalten wird (99).

## 6.4 Der Resistenzmechanismus

Zwei der fünf in Ba-L\_FH1 gefundenen Punktmutationen, 305Y (V3, gp120) und 556I (HR1, gp41), tragen zusammen mit dem Lysinrest an Position 634 (HR2, gp41) deutlich zur reduzierten maC46-Sensibilität des Isolats Ba-L\_FH1 bei. Die verbleibenden drei AS-Austausche haben vermutlich eher modulierende Wirkung (vgl. Abschnitt 5.5.2.3) und werden im Folgenden nicht diskutiert.

Auf welche Weise wird die maC46-Resistenz hervorgerufen? Theoretisch sind mehrere Mechanismen vorstellbar, wie Resistenz gegenüber C-Peptiden vermittelt werden kann: Zum einen kann die Sensibilität des viralen Hüllproteins gegenüber C-Peptiden direkt durch

Veränderungen der Kontaktstellen des Inhibitors beeinflusst werden, wie es für T-20 bereits gezeigt wurde (137, 159). Alternativ können jedoch auch indirekte Effekte zum Tragen kommen. Es ist denkbar, dass durch die Mutationen die Anlagerung des natürlichen Liganden an die Zielstruktur gegenüber dem C-Peptid bevorzugt oder der Zugang des Inhibitors zu seiner Zielstruktur beschränkt wird: So können Veränderungen im Hüllprotein die Bindung des Inhibitors sterisch behindern: Der gp120/gp41-Komplex des SIV-Hüllproteins wird etwa, im Gegensatz zu HIV, durch CD4-Bindung nicht so weit destabilisiert werden, dass die HR1 für T-20 zugänglich wird (56). Ferner kann die Struktur des Hüllproteins die C-Peptidsensibilität beeinflussen, indem die Kinetik des Fusionsprozesses verändert wird und die Zielstruktur über einen kürzeren Zeitraum zugänglich ist (4).

#### **6.4.1 Konkurrenz zwischen maC46 und dem natürlichen Liganden der HR1**

Der HIV-Eintritt ist ein vielphasiger Prozess, in welchem das Hüllprotein eine Reihe distinkter Übergangszustände durchläuft, die letztendlich zur Fusion zwischen Zellmembran und viraler Lipidhülle führen (54, 110). C-Peptid-Fusionsinhibitoren binden während eines transient vorhandenen Übergangszustandes an die HR1 des gp41 und blockieren so den Ablauf des Fusionsprozesses irreversibel (52, 157). Sie konkurrieren dabei mit dem natürlichen Liganden (HR2) und wirken somit dominant negativ (26, 82, 171). C-Peptide zeigen keine Wirkung auf das native Env (54, 56), erst nach gewissen konformationellen Änderungen im Hüllprotein ist die Zielstruktur für sie zugänglich. Der genaue Beginn dieser sensiblen Phase scheint dabei leicht zwischen verschiedenen C-Peptiden zu variieren. So ist die Zielstruktur für das lösliche T-20 im HIV-Hüllprotein bereits nach CD4-Bindung zugänglich (52, 110). Das membranständige C-Peptid maC36 bindet hingegen erst zu einem späteren Zeitpunkt an HR1 und benötigt dazu sowohl CD4- als auch Corezeptorbindung des Hüllproteins (109). Die sensible Phase endet, sobald gp41 die 6-HB-Konfiguration erreicht hat, durch welche die Verschmelzung zwischen viraler Lipidhülle und Zellmembran eingeleitet wird (110).

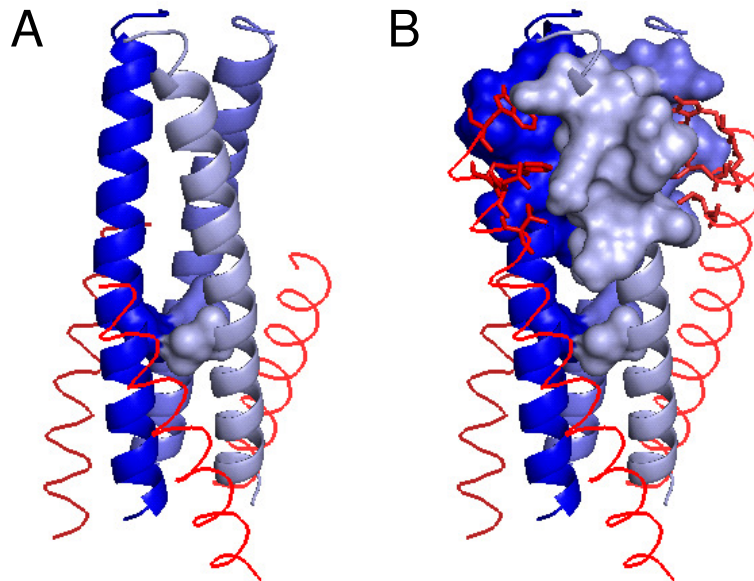
Da sich die Wirksamkeit von Fusionsinhibitoren auf ein relativ kleines zeitliches Fenster beschränkt, ist die Geschwindigkeit, mit der die Bindung des C-Peptids an die Zielstruktur erfolgt, von entscheidender Bedeutung. Ist die Assoziationsrate geringer als die Geschwindigkeit mit der Env die sensible Phase durchläuft, kann der Inhibitor nicht in ausreichender Konzentration an seine Zielstruktur binden (157). Die Bindung des Inhibitors kann direkt durch Veränderungen in der Zielstruktur gestört werden. Dieser Mechanismus der Resistenzentwicklung wurde bereits des Öfteren beschrieben: So haben *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen gezeigt, dass Veränderungen im N-terminalen Bereich der HR1 (AS 541-LLSGIVQQNN-551) zur Resistenz gegenüber den C-Peptiden T-20 und C34 führen, indem die Anlagerung des C-Peptids verhindert wird (137, 155, 159, 167). Die

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheinen jedoch einen solchen direkten Mechanismus als Grund für die maC46-Resistenz auszuschließen.

Die Resistenzmutation 305Y (V3) befindet sich im gp120 und somit außerhalb der Zielstruktur des maC46-Peptids. Die Resistenzmutation 556I des Isolats Ba-L\_FH1 liegt zwar innerhalb der Zielstruktur des maC46-Peptids, jedoch handelt es sich dabei um eine Reversion der AS-Ausprägung 556V (Ba-L\_sel\_MD) hin zur Wildtypkonfiguration. Die AS-Ausprägung des Isolats Ba-L\_FH1 an Position 556 sollte daher die Assoziation des maC46-Peptids an die Zielstruktur und somit dessen Effektivität eher begünstigen als verringern.

Um diesen scheinbaren Widerspruch zu verstehen, wird nun zunächst der Mechanismus betrachtet, durch den die Mutation 556V in dem Isolat Ba-L\_sel\_MD die maC36-Resistenz hervorruft (99). Die Aminosäure 556 liegt innerhalb der N-terminalen Hälfte der HR1. Je drei der HR-1- $\alpha$ -Helices sind zu einer stabartigen Struktur zusammengelagert und bilden so den Kern des gp41-Trimers. In die Furchen zwischen den HR-1-Helices binden die HR-2-Helices und bilden so das 6-HB. Die Furchen stellen auch die Zielstruktur für C-Peptide dar. HIV-Wildtypviren tragen an Position 556 einen Isoleucinrest (**Tabelle 6-2**). Dieser AS-Rest ist ins Innere der Stabstruktur gerichtet und dicht gegen die AS-Reste 556 der anderen beiden HR1 gepackt (158). Bei dem Isolat Ba-L\_sel\_MD verändert die Substitution des Isoleucins durch Valin die Konformation der HR1-Stabstruktur wahrscheinlich stark, da Valin sterisch weniger gut in den Innenraum der Stabstruktur passt.

Der AS-Rest 556I interagiert direkt mit zwei Aminosäuren der HR2, 642L und 643I (645 und 646 in HXB2) (158), die auch Teil des T-20/maC36 Peptids sind. Durch die Mutation 556V wird somit direkt die Bindung des maC36/T-20-N-Terminus an HR1 gestört (**Abbildung 6-1 A**), was bereits von Lohreggel et al. gezeigt wurde. Die Mutation hat jedoch keine Auswirkungen auf die maC46-Empfindlichkeit (99). Es ist bekannt, dass C-Peptide, welche mit der konservierten hydrophoben Tasche interagieren können, sich durch T-20-Resistenzmutationen im N-Terminus der HR1 meist nur marginal in ihrer Wirksamkeit beeinträchtigen lassen (46, 63, 90) (**Abbildung 6-1 B**).



**Abbildung 6-1 3D-Struktur des 6-Helixbündels.** Die HR1-Helices sind in Blautönen, die Helices der HR2 in Rottönen dargestellt. Es ist jeweils nur das Proteinrückgrat sichtbar. Der dargestellte Bereich der HR1-Helix entspricht den AS-Resten 546-581 (HIV-1 HXB2) bzw. 543-578 (HIV-1 Ba-L). Die N-Termini der HR1 befinden sich im unteren Bereich der Abbildung, während die N-Termini der HR2 oben liegen. (A) Die Isoleucinreste an Position 556 (Ba-L) aller drei HR1-Helices sind raumfüllend hervorgehoben. Die dargestellten Bereiche der HR2 entsprechen dem N-Terminus von T-20 bzw. maC36. (B) Die Aminosäurereste der HR1, die die hydrophobe Tasche ausbilden, sind raumfüllend dargestellt. Die abgebildete Sequenz der HR2 entspricht dem N-Terminus von maC46. Die mit der hydrophoben Tasche interagierenden Aminosäurereste sind als Stockmodell hervorgehoben. Das Modell wurde auf Grundlage der von Chan et al. bestimmten Röntgenstruktur (PDB-Datei: 1AIK) mithilfe der Programms PyMol (Vers.: 0.99rc6) erstellt (26).

Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Mutation 556V den Fusionsprozess stört, da sie nicht nur die Bindung des C-Peptids stört, sondern auch die Anlagerung der viralen HR2 und somit die Ausbildung des 6-HB behindert. Diese Interpretation steht in Einklang mit der Beobachtung, dass die Mutation 556V die Fitness des Isolats Ba-L\_sel\_MD reduziert (99).

Die Erhöhung der maC46-Resistenz durch die Rückmutation zum Isoleucinrest an Position 556 ist am ehesten in Verbindung mit der Mutation 634K, welche sich in der HR2 befindet, zu verstehen. 634K ist für die maC46-Teilresistenz des Isolats Ba-L\_sel\_MD verantwortlich und wurde während der maC46-Selektion konserviert. Die Mutation 634K bewirkt eine höhere Affinität der HR2 zur HR1 (9). Die erhöhte Fusionsgeschwindigkeit des Hüllproteins Ba-L\_MD\_556I spricht dafür, dass die HR1 besser mit der mutierten HR2 (634K) interagieren kann, wenn sich an Position 556 ein Isoleucinrest befindet. Das Virus hat also durch die Kombination der Mutationen 634K und 556I einen Weg entwickelt, die Konkurrenz zwischen maC46 und der HR2 um Bindung an HR1 zu Gunsten der viralen HR2 zu entscheiden (vgl. **Abbildung 5-9**). Ferner wird so auch die 6-HB-Stabilität erhöht.

Andere Studien haben gezeigt, dass dieser Mechanismus auch von Relevanz ist, um Resistenz gegen andere Peptidfusionsinhibitoren zu erzeugen. In diesen Arbeiten wurden



Viren mit Resistenz gegen N44 (N-Peptid) (39) oder C34 (C-Peptid) (121) selektiert. In beiden Fällen wurden sowohl in der HR1- als auch in der HR2-Region Mutationen gefunden, die zu einer Stabilisierung des 6-HB beitragen.

Die für die Fusion zwischen viraler Hülle und Zellmembran benötigte Energie wird durch die Ausbildung des 6-HB verfügbar gemacht (110). Die hier postulierte Stabilisierung des 6-HB könnte somit zur Freisetzung von mehr Energie führen; dies steht in Einklang mit der beschleunigten Eintrittskinetik der beiden Konstrukte Ba-L\_FH1 und Ba-L\_MD\_556I (siehe unten).

#### 6.4.2 Veränderung der Fusionskinetik

Mutationen, die die Fusion des Virus beschleunigen, verkleinern das zeitliche Fenster, in welchem die Zielstruktur für den Inhibitor zugänglich ist. Ein derartiger Resistenzmechanismus ist nicht nur auf die Zielstruktur des Fusionsinhibitors beschränkt, sondern kann alle Bereiche des Hüllproteins betreffen, die Einfluss auf den Eintrittsprozess haben.

Wird etwa der zytoplasmatische Teil des Hüllproteins deletiert, so führt dies zu einer erhöhten Fusionskinetik und einer reduzierten Sensibilität gegenüber dem Fusionsinhibitor C34 (4). Des Weiteren wurde bereits vielfach gezeigt, dass auch natürlich vorkommende Variationen in gp120 zu modifizierter Empfindlichkeit gegenüber C-Peptiden führen können (37, 38, 66).

Vor allem die Corezeptoraffinität des gp120 hat großen Einfluss auf die Eintrittskinetik des Virus und dadurch auch auf die Empfindlichkeit gegenüber Fusionsinhibitoren. Um den viralen Eintrittsprozess erfolgreich katalysieren zu können, muss Env kooperativ an mehrere Corezeptormoleküle binden (87). Die Corezeptoraffinität bestimmt dabei, wie effizient fusionskompetente Komplexe, bestehend aus Env und Corezeptor, gebildet werden und somit auch wie schnell anschließende konformationelle Änderungen erfolgen können, die zur Entstehung des 6-HB führen. Hohe Corezeptoraffinität ist daher (häufig) mit einer reduzierten Sensibilität gegenüber Eintrittsinhibitoren assoziiert (129, 130, 134).

Die beschleunigte Fusionskinetik trägt vermutlich entscheidend zur maC46-Resistenz des Isolats Ba-L\_FH1 bei. Hierfür spricht auch die Kreuzresistenz gegenüber dem mab2F5. Aufgrund der erhöhten TAK-779-Sensibilität des Isolats Ba-L\_FH1 (vgl. **Abbildung 5-15**) scheidet jedoch eine erhöhte Corezeptoraffinität als Grund für den beschleunigten Viruseintritt aus.

Die deutlich erhöhte Eintrittsgeschwindigkeit des Isolats Ba-L\_FH1 wird durch die Kombination der beiden Mutationen V3 (305Y) und 556I (in Verbindung mit 634K) bestimmt (vgl. **Abbildung 5-13**). Die Einzelmutationen hingegen zeigen in Hinblick auf ihre Fusionsgeschwindigkeit ein gänzlich anderes Bild. Durch die Einzelmutation 556I

(Ba-L\_MD\_556I) konnte nur eine leichte Erhöhung der Fusionsgeschwindigkeit erreicht werden, die maximal der des Wildtyps entsprach. Die Auswirkung der Einzelmutation 305Y (Ba-L\_MD\_V3) auf die Fusionsgeschwindigkeit war hingegen verheerend: Die Eintrittsgeschwindigkeit fiel unter die des Ausgangsisolats Ba-L\_sel\_MD ab. Wie lässt sich die Diskrepanz zwischen der relativ langsamen Fusionsgeschwindigkeit (vgl. **Abbildung 5-12**) und der erhöhten maC46-Resistenz (vgl. **Abbildung 5-9**) der beiden Einzelmutanten erklären?

Die Antwort liegt möglicherweise in der Natur des Fusionsversuches. Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz erfasst die virale Fusionsgeschwindigkeit als Funktion aller Eintrittsereignisse, die bis zu dem jeweiligen Zeitpunkt der Messung abgelaufen sind. Die Menge der Eintrittsereignisse hängt dabei von zwei Faktoren ab: (I) Die Anzahl der Viren, die sich zu jedem gegebenen Zeitpunkt in einem fusionskompetenten Komplex mit der Zielzelle befinden (129). (Dieser Parameter wird in erster Linie durch die Rezeptor- und Corezeptoraffinität bestimmt.) (II) Die Geschwindigkeit des Eintrittsprozesses. (Diese wird durch die Stabilität der einzelnen Übergangszustände bestimmt und der Geschwindigkeit, mit welcher die Umwandlung von einem Übergangszustand in den nächsten erfolgt.) Eine Differenzierung des Einflusses dieser beiden Parameter ist durch die hier verwendete Methode nicht möglich. Des Weiteren muss bedacht werden, dass eine maC46-Resistenz erreicht wird, indem die sensible Phase des Fusionsprozesses verkürzt wird. Dies bedeutet jedoch im Umkehrschluss, dass andere für die Sensibilität nicht essentielle Vorgänge durchaus verlangsamt ablaufen können, ohne dass sich eine Auswirkung auf die maC46-Empfindlichkeit ergibt. Unter dieser Prämisse bietet sich eine plausible Erklärung für die Wirkung der Resistenzmutationen 556I und 305Y an:

Die V3-Mutation 305Y ist für die reduzierte Corezeptoraffinität der Einzelmutante Ba-L\_MD\_V3 verantwortlich (vgl. **Abbildung 5-15**, siehe unten). Als Folge davon kann der Vektor wahrscheinlich nur in vermindertem Maß fusionskompetente Komplexe mit dem Corezeptor ausbilden. Dies wiederum reduziert die absolute Anzahl der Fusionsereignisse, die zu jedem beliebigen Zeitpunkt ablaufen, und führt zu der beobachteten langsamen Fusionskinetik. Die reduzierte maC46-Sensibilität des Konstrukts Ba-L\_MD\_V3 (vgl. **Abbildung 5-9**) zeigt jedoch auch, dass dieses Hüllprotein, wenn es erst einmal den Eintrittsprozess initiiert hat, mit großer Wahrscheinlichkeit nicht durch maC46 gehemmt wird. In dieser Arbeit konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch *in vitro*-Selektion Mutationen in gp120 angehäuft werden, die zu einer Resistenz gegen ein C-Peptid führen. Dieses Ergebnis ist auch für die klinische Diagnostik von Bedeutung. Dort wird ausschließlich gp41 sequenziert, um Resistenzmutationen gegenüber T-20 zu identifizieren.

Möglicherweise destabilisiert die V3-Mutation 305Y den gp120/Corezeptor-Komplex. Durch die reduzierte Halbwertszeit dieses Komplexes können die nachfolgenden Konformationsänderungen, die zur Ausbildung des 6-HB führen, schneller erfolgen. D.h. gp120 verweilt nicht in der Konformation, in der es den Corezeptor gebunden hat und welche empfindlich gegenüber maC46 ist, sondern durchläuft zügig nachfolgende Übergangszustände, um den Fusionsprozess abzuschließen. Reeves et al. haben den selben Mechanismus für eine Mutation im Bereich der Corezeptorbindungsstelle des HIV gp120 postuliert, die zu einer stark verringerten Corezeptoraffinität führt und dennoch keinen Einfluss auf die Fusionsgeschwindigkeit und T-1249-Sensibilität des Virus hat (135). Ebenso hat die Arbeitsgruppe um Blumenthal gezeigt, dass HIV-2 im Vergleich zu HIV-1 eine stark reduzierte Corezeptoraffinität hat und gleichzeitig eine wesentlich schnellere Fusionskinetik aufweist (55). Die geringe Corezeptoraffinität des Konstrukts Ba-L\_MD\_V3 überlagert also vermutlich die beschleunigende Wirkung, die die V3-Mutation 305Y auf den Fusionsprozess hat, so dass in der Summe ein Rückgang der Eintrittsereignisse pro Zeit im Vergleich zum Ausgangsisolat zu beobachten ist (vgl. **Abbildung 5-13**).

Bei der Mutante Ba-L\_MD\_556I ist die Corezeptoraffinität im Vergleich zum Ausgangskonstrukt Ba-L\_sel\_MD nur leicht reduziert, so dass sich die erhöhte Assoziationsrate zwischen HR1 und HR2 des gp41 (siehe oben, vgl. 6.4.1) in Form eines absoluten Anstieges der Eintrittsereignisse zeigt. Werden beide Mutationen 305Y und 556I in der Mutante Ba-L\_MD\_V3+556I vereint, so ist der beschleunigende Effekt auf die Fusion, so groß, dass die Reduktion der Corezeptoraffinität durch 305Y nicht mehr ins Gewicht fällt und ein absoluter Anstieg der Eintrittsereignisse pro Zeit im Vergleich zum Ausgangsisolat zu verzeichnen ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei dem Isolat Ba-L\_FH1 zwei unterschiedliche Phasen des Eintrittsprozesses im Vergleich zum Ausgangsisolat verändert sind: Die Mutation 305Y erleichtert vermutlich die konformationellen Änderungen, die der Corezeptorbindung folgen. Die Mutation 556I (zusammen mit 634K) hingegen beschleunigt den Eintritt in einem noch späteren Stadium und unterstützt die Ausbildung des 6-HB direkt.

### **6.4.3 Unterschiedlicher Effekt der Resistenzmutationen auf lösliche und membranständige C-Peptide**

Die Empfindlichkeit der beiden Hüllproteine Ba-L\_FH1 und Ba-L\_sel\_MD gegenüber dem löslichen C-Peptid T-20 war nahezu identisch. Erstaunlicherweise unterschied sich ihre Sensibilität gegenüber dem Fusionsinhibitor maC36, welcher lediglich eine membrangebundenen Variante von T-20 darstellt, deutlich (vgl. **Abbildung 5-9** und **Abbildung 5-16**). Wie ist dieser Umstand zu erklären? Wie bereits oben beschrieben (vgl.

6.4.1), unterscheiden sich die Phasen des Fusionsprozesses, die empfindlich gegenüber löslichen bzw. membrangebundenen C-Peptiden sind. So bedarf T-20, im Gegensatz zu maC36, nur der Interaktion von gp120 mit CD4, um seine Zielstruktur binden zu können (52). Demgegenüber muss sich bereits die *prehairpin*-Struktur gebildet und eine Verbindung zwischen Virus und Zielzelle geschaffen haben, bevor das membrangebundene C-Peptid maC36 die HR1-Region erreichen kann (109). Die selektierte V3-Mutation 305Y beeinflusst vermutlich einen der ersten Prozesse während der Fusion nach Corezeptorbindung, die empfindlich gegenüber membrangebundenen C-Peptiden sind (siehe 6.4.2). Phasen des Eintritts vor der Corezeptorbindung, die bereits das Ziel des löslichen T-20 sein können, werden jedoch durch diese Mutation vermutlich nicht verändert und bleiben somit empfänglich. T-20 entfaltet bereits in sehr frühen Phasen des HIV-Eintritts seine inhibitorische Wirkung und gleicht so die verminderte Aktivität in den späteren Phasen aus, die durch die neue V3-Mutation hervorgerufen wird.

## 6.5 Corezeptoraffinität und -tropismus der Ba-L-Isolate

HIV bindet mithilfe der gp120-Untereinheit des Envs an den zellulären Corezeptor. Ein gp120-Monomer besteht aus einer inneren und einer äußeren Domäne, die über eine  $\beta$ -Faltblattregion (*bridging sheet*) verbunden sind (89). Die Corezeptorbindung wird über den V3-Loop herbeigeführt (28, 175), der sich an die äußere Domäne anschließt (75). Darüber hinaus sind auch einzelne konservierte Aminosäuren, sowohl in der inneren als auch in der äußeren gp120-Domäne, essentiell für die Bindung (138, 139).

Die drei Hüllproteine Ba-L\_FH1, Ba-L\_wt und Ba-L\_sel\_MD wiesen große Unterschiede in ihrer Corezeptoraffinität auf, was sich an ihrer sehr variablen TAK-779-Sensibilität ablesen ließ. Die Mutation 305Y in der V3-Region des Isolats Ba-L\_FH1 reduzierte die Corezeptoraffinität stark, ohne jedoch den Tropismus des Hüllproteins zu beeinflussen. Die Wirkung der Mutation war nicht unerwartet, da die Corezeptoraffinität maßgeblich durch die Sequenz der V3-Region bestimmt wird (138, 139, 175). Ein Wechsel des Corezeptortropismus war hingegen eher unwahrscheinlich, da dieser meist über den 11. und 25. AS-Rest der V3-Region bestimmt wird (75, 136). Beide Aminosäurereste (Position 309 und 323) sind jedoch bei Ba-L\_FH1 unverändert.

Erstaunlicherweise war die TAK-779-Sensibilität des Hüllproteins Ba-L\_sel\_MD im Vergleich zum Wildtyp viermal geringer. Bei diesem Env waren jedoch keine Veränderungen im gp120 festzustellen. Es ist daher anzunehmen, dass die beiden in der gp41-Untereinheit gefundenen Mutationen 556V und 634K einen indirekten Effekt auf die Corezeptorbindung ausüben. gp41 interagiert vor allem über die Schleifenregion (loop) zwischen HR1 und HR2 (180) mit der inneren Domäne der gp120-Untereinheit (77, 89, 138, 177). Mutationen in HR1 können die

Corezeptorbindung und sogar die Neutralisierbarkeit von Viren beeinflussen und haben somit einen großen Einfluss auf die Struktur des Hüllproteins (128). Liu et al. haben gezeigt, dass Mutationen innerhalb des SIV gp41, welche die Ausbildung des 6-HB stören, zu einer Stabilisierung der nativen Env-Konformation führen. Die Position einer der interferierenden Mutationen war dabei interessanterweise homolog zur Position 556V des Ba-L\_sel\_MD-Hüllproteins (97). Es ist daher verlockend zu spekulieren, dass diese maC36-Resistenzmutation in gp41, welche vermutlich die Ausbildung des 6-HB stört (siehe 6.4.1), die native Konformation des Hüllproteins Ba-L\_sel\_MD stabilisiert. Dies könnte zu einer rigideren Bindung des Hüllproteins an den Corezeptor führen und dementsprechend die Effizienz der nachfolgenden Fusions Schritte reduzieren, was in Einklang mit der in dieser Arbeit beobachteten verringerten Fusionskinetik und der erhöhten Corezeptoraffinität des Isolats steht.

## 6.6 Schlussfolgerungen

Über einen Selektionszeitraum von mehr als 149 Tagen wurde das maC46-resistente Isolat Ba-L\_FH1 generiert. Die Hauptdeterminanten für die maC46-Resistenz liegen sowohl in gp41 (556I in Verbindung mit 634K) als auch in der V3-Region von gp120 (305Y). Obwohl bekannt ist, dass Mutationen in gp120 die Sensibilität von HIV-Hüllproteinen gegenüber C-Peptiden beeinflussen, konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass solche Mutationen auch *in vitro* selektiert werden. Die Resistenz des Isolats Ba-L\_FH1 gegenüber dem C-Peptid maC46 ist wohl in erster Linie auf eine erhöhte Fusionskinetik zurückzuführen. Die Mutation 305Y innerhalb der V3-Region des gp120 beschleunigt dabei vermutlich die frühen Phasen des Eintrittsprozesses, indem die Corezeptorbindung destabilisiert wird und nachfolgende Eintrittsschritte so leichter erfolgen können. Diese Mutation ist mit einer Reduktion der Corezeptoraffinität assoziiert. Die Mutation 556I (in Verbindung mit 634K) beschleunigt die wahrscheinlich den Eintritt in einem späteren Zeitpunkt, indem sie ein schnelleres Ausbilden des 6-HB ermöglicht. Die Mutationen (305Y und 556I gemeinsam mit 634K) wirken somit synergistisch und führen so zu der maC46-Resistenz des Hüllproteins. Diese Arbeit zeigt somit, dass Determinanten einer C-Peptidresistenz nicht nur auf die Zielstruktur des C-Peptids innerhalb gp41 beschränkt sind, sondern auch in weit entfernten Regionen (in diesem Fall in der V3-Region des gp120) liegen können.

## 7 Literatur

1. 2007. <http://aidsinfo.nih.gov/DrugsNew/Default.aspx?MenuItem=Drugs>. U.S. Department of Health and Human Services (DHHS).
2. 1981. Kaposi's Sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**:305-308.
3. 1981. Pneumocystis pneumonia - Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**:250-252.
4. **Abrahamyan, L. G., S. R. Mkrtychyan, J. Binley, M. Lu, G. B. Melikyan, and F. S. Cohen.** 2005. The cytoplasmic tail slows the folding of human immunodeficiency virus type 1 Env from a late prebundle configuration into the six-helix bundle. *J Virol* **79**:106-15.
5. **Aiuti, A., S. Slavin, M. Aker, F. Ficara, S. Deola, A. Mortellaro, S. Morecki, G. Andolfi, A. Tabucchi, F. Carlucci, E. Marinello, F. Cattaneo, S. Vai, P. Servida, R. Miniero, M. G. Roncarolo, and C. Bordignon.** 2002. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* **296**:2410-3.
6. **Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-8.
7. **Artelt, P., R. Grannemann, C. Stocking, J. Friel, J. Bartsch, and H. Hauser.** 1991. The prokaryotic neomycin-resistance-encoding gene acts as a transcriptional silencer in eukaryotic cells. *Gene* **99**:249-54.
8. **Baba, M., O. Nishimura, N. Kanzaki, M. Okamoto, H. Sawada, Y. Iizawa, M. Shiraishi, Y. Aramaki, K. Okonogi, Y. Ogawa, K. Meguro, and M. Fujino.** 1999. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5698-703.
9. **Baldwin, C. E., R. W. Sanders, Y. Deng, S. Jurriaans, J. M. Lange, M. Lu, and B. Berkhout.** 2004. Emergence of a drug-dependent human immunodeficiency virus type 1 variant during therapy with the T20 fusion inhibitor. *J Virol* **78**:12428-37.
10. **Baltimore, D.** 1988. Gene therapy. Intracellular immunization. *Nature* **335**:395-6.
11. **Barbato, G., E. Bianchi, P. Ingallinella, W. H. Hurni, M. D. Miller, G. Ciliberto, R. Cortese, R. Bazzo, J. W. Shiver, and A. Pessi.** 2003. 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.
12. **Barre Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler Blin, F. Vezinet Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
13. **Bazan, H. A., G. Alkhatib, C. C. Broder, and E. A. Berger.** 1998. Patterns of CCR5, CXCR4, and CCR3 usage by envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *J Virol* **72**:4485-91.
14. **Bentz, J.** 2000. Minimal aggregate size and minimal fusion unit for the first fusion pore of influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion. *Biophys J* **78**:227-45.
15. **Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber.** 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**:657-700.

16. **Berkowitz, R. D., S. Alexander, C. Bare, V. Linnquist-Stepps, M. Bogan, M. E. Moreno, L. Gibson, E. D. Wieder, J. Kosek, C. A. Stoddart, and J. M. McCune.** 1998. CCR5- and CXCR4-utilizing strains of human immunodeficiency virus type 1 exhibit differential tropism and pathogenesis in vivo. *J Virol* **72**:10108-17.
17. **Bewley, C. A., J. M. Louis, R. Ghirlando, and G. M. Clore.** 2002. Design of a novel peptide inhibitor of HIV fusion that disrupts the internal trimeric coiled-coil of gp41. *J Biol Chem* **277**:14238-45.
18. **Bjorndal, A., H. Deng, M. Jansson, J. R. Fiore, C. Colognesi, A. Karlsson, J. Albert, G. Scarlatti, D. R. Littman, and E. M. Fenyo.** 1997. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* **71**:7478-87.
19. **Blumenthal, R., D. P. Sarkar, S. Durell, D. E. Howard, and S. J. Morris.** 1996. Dilatation of the influenza hemagglutinin fusion pore revealed by the kinetics of individual cell-cell fusion events. *J Cell Biol* **135**:63-71.
20. **Cao, J., L. Bergeron, E. Helseth, M. Thali, H. Repke, and J. Sodroski.** 1993. Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. *J Virol* **67**:2747-55.
21. **Caruso, M., B. Salomon, S. Zhang, E. Brisson, F. Clavel, I. Lowy, and D. Klatzmann.** 1995. Expression of a Tat-inducible herpes simplex virus-thymidine kinase gene protects acyclovir-treated CD4 cells from HIV-1 spread by conditional suicide and inhibition of reverse transcription. *Virology* **206**:495-503.
22. **Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bousso, F. L. Deist, and A. Fischer.** 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**:669-72.
23. **Challita, P. M., and D. B. Kohn.** 1994. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:2567-2571.
24. **Challita, P. M., D. Skelton, A. el-Khoueiry, X. J. Yu, K. Weinberg, and D. B. Kohn.** 1995. Multiple modifications in cis elements of the long terminal repeat of retroviral vectors lead to increased expression and decreased DNA methylation in embryonic carcinoma cells. *J Virol* **69**:748-55.
25. **Chan, D. C., C. T. Chutkowski, and P. S. Kim.** 1998. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15613-7.
26. **Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-273.
27. **Cheng, Y. C., G. E. Dutschman, K. F. Bastow, M. G. Sarngadharan, and R. Y. Ting.** 1987. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. General properties and its interactions with nucleoside triphosphate analogs. *J Biol Chem* **262**:2187-9.
28. **Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski.** 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**:1135-48.
29. **Cichutek, K., H. Merget, S. Norley, R. Linde, W. Kreuz, M. Gahr, and R. Kurth.** 1992. Development of a quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:7365-7369.

30. **Colman, P. M., and M. C. Lawrence.** 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:309-19.
31. **Cone, R. D., and R. C. Mulligan.** 1984. High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:6349-53.
32. **Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-7.
33. **Danieli, T., S. L. Pelletier, Y. I. Henis, and J. M. White.** 1996. Membrane fusion mediated by the influenza virus hemagglutinin requires the concerted action of at least three hemagglutinin trimers. *J Cell Biol* **133**:559-69.
34. **De Clercq, E.** 2004. HIV-chemotherapy and -prophylaxis: new drugs, leads and approaches. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:1800-22.
35. **de Rosny, E., R. Vassell, S. Jiang, R. Kunert, and C. D. Weiss.** 2004. Binding of the 2F5 monoclonal antibody to native and fusion-intermediate forms of human immunodeficiency virus type 1 gp41: implications for fusion-inducing conformational changes. *J Virol* **78**:2627-31.
36. **Demaison, C., K. Parsley, G. Brouns, M. Scherr, K. Battmer, C. Kinnon, M. Grez, and A. J. Thrasher.** 2002. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* **13**:803-13.
37. **Derdeyn, C. A., J. M. Decker, J. N. Sfakianos, X. Wu, W. A. O'Brien, L. Ratner, J. C. Kappes, G. M. Shaw, and E. Hunter.** 2000. Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J Virol* **74**:8358-67.
38. **Derdeyn, C. A., J. M. Decker, J. N. Sfakianos, Z. Zhang, W. A. O'Brien, L. Ratner, G. M. Shaw, and E. Hunter.** 2001. Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to fusion inhibitors targeted to the gp41 first heptad repeat involves distinct regions of gp41 and is consistently modulated by gp120 interactions with the coreceptor. *J Virol* **75**:8605-14.
39. **Desmezieres, E., N. Gupta, R. Vassell, Y. He, K. Peden, L. Sirota, Z. Yang, P. Wingfield, and C. D. Weiss.** 2005. Human immunodeficiency virus (HIV) gp41 escape mutants: cross-resistance to peptide inhibitors of HIV fusion and altered receptor activation of gp120. *J Virol* **79**:4774-81.
40. **Dimitrov, D. S.** 1997. How do viruses enter cells? The HIV coreceptors teach us a lesson of complexity. *Cell* **91**:721-30.
41. **Doranz, B. J., S. S. Baik, and R. W. Doms.** 1999. Use of a gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of human immunodeficiency virus fusion events. *J Virol* **73**:10346-58.
42. **Dragic, T., A. Trkola, D. A. Thompson, E. G. Cormier, F. A. Kajumo, E. Maxwell, S. W. Lin, W. Ying, S. O. Smith, T. P. Sakmar, and J. P. Moore.** 2000. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5639-44.
43. **Dwyer, J. J., A. Hasan, K. L. Wilson, J. M. White, T. J. Matthews, and M. K. Delmedico.** 2003. The hydrophobic pocket contributes to the structural stability of the N-terminal coiled coil of HIV gp41 but is not required for six-helix bundle formation. *Biochemistry* **42**:4945-53.
44. **Earl, P. L., B. Moss, and R. W. Doms.** 1991. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* **65**:2047-55.



45. **Eckert, D. M., and P. S. Kim.** 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* **70**:777-810.
46. **Egelhofer, M., G. Brandenburg, H. Martinus, P. Schult-Dietrich, G. Melikyan, R. Kunert, C. Baum, I. Choi, A. Alexandrov, and D. von Laer.** 2004. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J Virol* **78**:568-75.
47. **Fehse, B., O. S. Kustikova, M. Bubenheim, and C. Baum.** 2004. Pois(s)on--it's a question of dose. *Gene Ther* **11**:879-81.
48. **Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**:872-7.
49. **Follis, K. E., S. J. Larson, M. Lu, and J. H. Nunberg.** 2002. Genetic evidence that interhelical packing interactions in the gp41 core are critical for transition of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein to the fusion-active state. *J Virol* **76**:7356-62.
50. **Frankel, A. D., and J. A. Young.** 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**:1-25.
51. **Freed, E. O., and M. A. Martin.** 1996. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* **70**:341-51.
52. **Furuta, R. A., C. T. Wild, Y. Weng, and C. D. Weiss.** 1998. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat Struct Biol* **5**:276-9.
53. **Furuta, R. A., C. T. Wild, Y. Weng, and C. D. Weiss.** 1998. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41 [published erratum appears in *Nat Struct Biol* 1998 Jul;5(7):612]. *Nat.Struct.Biol.* **5**:276-279.
54. **Gallo, S. A., G. M. Clore, J. M. Louis, C. A. Bewley, and R. Blumenthal.** 2004. Temperature-dependent intermediates in HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion revealed by inhibitors that target N- and C-terminal helical regions of HIV-1 gp41. *Biochemistry* **43**:8230-3.
55. **Gallo, S. A., J. D. Reeves, H. Garg, B. Foley, R. W. Doms, and R. Blumenthal.** 2006. Kinetic studies of HIV-1 and HIV-2 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Retrovirology* **3**:90.
56. **Gallo, S. A., K. Sackett, S. S. Rawat, Y. Shai, and R. Blumenthal.** 2004. The stability of the intact envelope glycoproteins is a major determinant of sensitivity of HIV/SIV to peptidic fusion inhibitors. *J Mol Biol* **340**:9-14.
57. **Gartner, S., P. Markovits, D. M. Markovitz, M. H. Kaplan, R. C. Gallo, and M. Popovic.** 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* **233**:215-219.
58. **Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, M. Ozel, G. Pauli, and M. A. Koch.** 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**:171-6.
59. **Goodenow, M., T. Huet, W. Saurin, S. Kwok, J. Sninsky, and S. Wain Hobson.** 1989. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J.Acquir.Immune.Defic.Sydr.* **2**:344-352.
60. **Gottlieb, G. J., A. Ragaz, J. V. Vogel, A. Friedman-Kien, A. M. Rywlin, E. A. Weiner, and A. B. Ackerman.** 1981. A preliminary communication on extensively disseminated Kaposi's sarcoma in young homosexual men. *Am J Dermatopathol* **3**:111-4.
61. **Graham, F. L., and A. J. van der Eb.** 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**:456-67.

62. **Greenberg, M. L., D. Davison, L. Jin, S. Mosier, T. Melby, P. Sista, R. Demasi, D. Miralles, N. Cammack, and T. J. Matthews.** 2002. In vitro antiviral activity of T-1249. *Antiviral Therapy* **7**:S10.
63. **Greenberg, M. L., P. Sista, G. D. Miralles, T. Melby, D. Davison, L. Jin, S. Mosier, M. Mink, E. Nelson, R. Demasi, L. Fang, N. Cammack, M. Salgo, F. Duff, and T. J. Matthews.** 2002. Enfuvirtide (T-20) and T-1249 resistance: observations from Phase II clinical trials of enfuvirtide in combination with oral antiretrovirals and a Phase I/II dose-ranging monotherapy trial of T-1249. *Antiviral Therapy* **7**:140.
64. **Gustchina, E., G. Hummer, C. A. Bewley, and G. M. Clore.** 2005. Differential inhibition of HIV-1 and SIV envelope-mediated cell fusion by C34 peptides derived from the C-terminal heptad repeat of gp41 from diverse strains of HIV-1, HIV-2, and SIV. *J Med Chem* **48**:3036-44.
65. **Hallenberger, S., V. Bosch, H. Angliker, E. Shaw, H. D. Klenk, and W. Garten.** 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**:358-61.
66. **Heil, M. L., J. M. Decker, J. N. Sfakianos, G. M. Shaw, E. Hunter, and C. A. Derdeyn.** 2004. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 baseline susceptibility to the fusion inhibitors enfuvirtide and T-649 reside outside the peptide interaction site. *J Virol* **78**:7582-9.
67. **Helseth, E., U. Olshevsky, C. Furman, and J. Sodroski.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* **65**:2119-23.
68. **Hermann, F. G., H. Martinius, M. Egelhofer, T. Giroglou, R. Zahn, P. Schult-Dietrich, A. Alexandrov, D. Dietrich, C. Baum, and D. von Laer.** 2007. Protein Scaffold and Expression Level Determine Antiviral Activity of Membrane-Anchored Antiviral Peptides. *Hum Gene Ther In Review*.
69. **Herskowitz, I.** 1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* **329**:219-22.
70. **Hildinger, M., K. L. Abel, W. Ostertag, and C. Baum.** 1999. Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J Virol* **73**:4083-4089.
71. **Hildinger, M., M. T. Dittmar, P. Schult-Dietrich, B. Fehse, B. S. Schnierle, S. Thaler, G. Stiegler, R. Welker, and D. von Laer.** 2001. Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J Virol* **75**:3038-42.
72. **Ho, D. D.** 1997. Perspectives series: host/pathogen interactions. Dynamics of HIV-1 replication in vivo. *J Clin Invest* **99**:2565-7.
73. **Hoeben, R. C., A. A. Migchielsen, R. C. van der Jagt, H. van Ormondt, and A. J. van der Eb.** 1991. Inactivation of the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position. *J Virol* **65**:904-12.
74. **Holm, L.** 1986. Codon usage and gene expression. *Nucleic Acids Res* **14**:3075-87.
75. **Huang, C. C., M. Tang, M. Y. Zhang, S. Majeed, E. Montabana, R. L. Stanfield, D. S. Dimitrov, B. Korber, J. Sodroski, I. A. Wilson, R. Wyatt, and P. D. Kwong.** 2005. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **310**:1025-8.
76. **Hwang, S. S., T. J. Boyle, H. K. Lyerly, and B. R. Cullen.** 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**:71-74.
77. **Jacobs, A., J. Sen, L. Rong, and M. Caffrey.** 2005. Alanine scanning mutants of the HIV gp41 loop. *J Biol Chem* **280**:27284-8.

78. **Jiang, S., K. Lin, N. Strick, and A. R. Neurath.** 1993. HIV-1 inhibition by a peptide. *Nature* **365**:113.
79. **Jiang, S., Q. Zhao, and A. K. Debnath.** 2002. Peptide and non-peptide HIV fusion inhibitors. *Curr Pharm Des* **8**:563-80.
80. **Kantanen, M. L., P. Leinikki, and E. Kuismanen.** 1995. Endoproteolytic cleavage of HIV-1 gp160 envelope precursor occurs after exit from the trans-Golgi network (TGN). *Arch Virol* **140**:1441-9.
81. **Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag.** 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**:1302-7.
82. **Kilgore, N. R., K. Salzwedel, M. Reddick, G. P. Allaway, and C. T. Wild.** 2003. Direct evidence that C-peptide inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry bind to the gp41 N-helical domain in receptor-activated viral envelope. *J Virol* **77**:7669-72.
83. **Kitamura, Y., T. Ishikawa, N. Okui, N. Kobayashi, T. Kanda, T. Shimada, K. Miyake, and K. Yoshiike.** 1999. Inhibition of replication of HIV-1 at both early and late stages of the viral life cycle by single-chain antibody against viral integrase. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **20**:105-14.
84. **Kliger, Y., and Y. Shai.** 2000. Inhibition of HIV-1 entry before gp41 folds into its fusion-active conformation. *J Mol Biol* **295**:163-8.
85. **Krambovitis, E., F. Porichis, and D. A. Spandidos.** 2005. HIV entry inhibitors: a new generation of antiretroviral drugs. *Acta Pharmacol Sin* **26**:1165-73.
86. **Kraunus, J., D. H. Schaumann, J. Meyer, U. Modlich, B. Fehse, G. Brandenburg, D. von Laer, H. Klump, A. Schambach, J. Bohne, and C. Baum.** 2004. Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing. *Gene Ther* **11**:1568-78.
87. **Kuhmann, S. E., E. J. Platt, S. L. Kozak, and D. Kabat.** 2000. Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**:7005-15.
88. **Kuritzkes, D. R., J. Jacobson, W. G. Powderly, E. Godofsky, E. DeJesus, F. Haas, K. A. Reimann, J. L. Larson, P. O. Yarbough, V. Curt, and W. R. Shanahan, Jr.** 2004. Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J Infect Dis* **189**:286-91.
89. **Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson.** 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**:648-59.
90. **Lalezari, J. P., N. C. Bellos, K. Sathasivam, G. J. Richmond, C. J. Cohen, R. A. Myers, Jr., D. H. Henry, C. Raskino, T. Melby, H. Murchison, Y. Zhang, R. Spence, M. L. Greenberg, R. A. Demasi, and G. D. Miralles.** 2005. T-1249 retains potent antiretroviral activity in patients who had experienced virological failure while on an enfuvirtide-containing treatment regimen. *J Infect Dis* **191**:1155-63.
91. **Lazzarin, A., B. Clotet, D. Cooper, J. Reynes, K. Arasteh, M. Nelson, C. Katlama, H. J. Stellbrink, J. F. Delfraissy, J. Lange, L. Huson, R. DeMasi, C. Wat, J. Delehanty, C. Drobnes, and M. Salgo.** 2003. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med* **348**:2186-95.
92. **Lee, B., M. Sharron, L. J. Montaner, D. Weissman, and R. W. Doms.** 1999. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5215-20.

93. **Leitner, T., B. Foley, B. Hahn, P. Marx, F. McCutchan, J. Mellors, S. Wolinsky, and B. Korber.** 2005. HIV Sequence Compendium 2005.
94. **Leonard, C. K., M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory.** 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry* **265**:10373-10382.
95. **Lewis, W., B. J. Day, and W. C. Copeland.** 2003. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov* **2**:812-22.
96. **Li, Y., L. Luo, N. Rasool, and C. Y. Kang.** 1993. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J Virol* **67**:584-8.
97. **Liu, J., S. Wang, J. A. Hoxie, C. C. LaBranche, and M. Lu.** 2002. Mutations that destabilize the gp41 core are determinants for stabilizing the simian immunodeficiency virus-CPmac envelope glycoprotein complex. *J Biol Chem* **277**:12891-900.
98. **Liu, S., H. Lu, J. Niu, Y. Xu, S. Wu, and S. Jiang.** 2005. Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J Biol Chem* **280**:11259-73.
99. **Lohrengel, S., F. Hermann, I. Hagmann, H. Oberwinkler, L. Scrivano, C. Hoffmann, D. von Laer, and M. T. Dittmar.** 2005. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to membrane-anchored gp41-derived peptides. *J Virol* **79**:10237-46.
100. **Lu, M., S. C. Blacklow, and P. S. Kim.** 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* **2**:1075-82.
101. **Lunzen, J. V., T. Glaunsinger, I. Stahmer, V. V. Baehr, C. Baum, A. Schilz, K. Kuehlcke, S. Naundorf, H. Martinius, F. Hermann, T. Giroglou, S. Newrzela, I. Muller, F. Brauer, G. Brandenburg, A. Alexandrov, and D. von Laer.** 2007. Transfer of Autologous Gene-modified T Cells in HIV-infected Patients with Advanced Immunodeficiency and Drug-resistant Virus. *Mol Ther.*
102. **Lusso, P., F. Cocchi, C. Balotta, P. D. Markham, A. Louie, P. Farci, R. Pal, R. C. Gallo, and M. S. Reitz, Jr.** 1995. Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J Virol* **69**:3712-20.
103. **Makoff, A., N. Parry, and L. Dicken.** 1989. Translational fusions with fragments of the trpE gene improve the expression of a poorly expressed heterologous gene in *Escherichia coli*, p. 11-24, *J Gen Microbiol*, vol. 135.
104. **Malashkevich, V. N., D. C. Chan, C. T. Chutkowski, and P. S. Kim.** 1998. Crystal structure of the simian immunodeficiency virus (SIV) gp41 core: conserved helical interactions underlie the broad inhibitory activity of gp41 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9134-9.
105. **Malim, M. H., S. Bohnlein, J. Hauber, and B. R. Cullen.** 1989. Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell* **58**:205-214.
106. **Malim, M. H., J. Hauber, R. Fenrick, and B. R. Cullen.** 1988. Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* **335**:181-3.
107. **Markosyan, R. M., F. S. Cohen, and G. B. Melikyan.** 2003. HIV-1 envelope proteins complete their folding into six-helix bundles immediately after fusion pore formation. *Mol Biol Cell* **14**:926-38.

108. **Masur, H., M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Stouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray, and S. Cunningham-Rundles.** 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* **305**:1431-8.
109. **Melikyan, G. B., M. Egelhofer, and D. von Laer.** 2006. Membrane-anchored inhibitory peptides capture human immunodeficiency virus type 1 gp41 conformations that engage the target membrane prior to fusion. *J Virol* **80**:3249-58.
110. **Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert, and F. S. Cohen.** 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* **151**:413-23.
111. **Mitsuyasu, R. T., P. A. Anton, S. G. Deeks, D. T. Scadden, E. Connick, M. T. Downs, A. Bakker, M. R. Roberts, C. H. June, S. Jalali, A. A. Lin, R. Pennathur-Das, and K. M. Hege.** 2000. Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* **96**:785-93.
112. **Mkrtchyan, S. R., R. M. Markosyan, M. T. Eadon, J. P. Moore, G. B. Melikyan, and F. S. Cohen.** 2005. Ternary complex formation of human immunodeficiency virus type 1 Env, CD4, and chemokine receptor captured as an intermediate of membrane fusion. *J Virol* **79**:11161-9.
113. **Modrow, S., B. H. Hahn, G. M. Shaw, R. C. Gallo, F. Wong Staal, and H. Wolf.** 1987. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *Journal of Virology* **61**:570-578.
114. **Moore, J. P., J. A. McKeating, Y. X. Huang, A. Ashkenazi, and D. D. Ho.** 1992. Virions of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates resistant to soluble CD4 (sCD4) neutralization differ in sCD4 binding and glycoprotein gp120 retention from sCD4-sensitive isolates. *J Virol* **66**:235-43.
115. **Moore, J. P., J. A. McKeating, R. A. Weiss, and Q. J. Sattentau.** 1990. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* **250**:1139-1142.
116. **Moore, J. P., Q. J. Sattentau, P. J. Klasse, and L. C. Burkly.** 1992. A monoclonal antibody to CD4 domain 2 blocks soluble CD4-induced conformational changes in the envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-1 infection of CD4+ cells. *J Virol* **66**:4784-93.
117. **Moore, J. P., and J. Sodroski.** 1996. Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *J Virol* **70**:1863-72.
118. **Muster, T., F. Steindl, M. Purtscher, A. Trkola, A. Klima, G. Himmler, F. Rucker, and H. Katinger.** 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **67**:6642-7.
119. **Mutskov, V., and G. Felsenfeld.** 2004. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *Embo J* **23**:138-49.
120. **Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma, and D. Trono.** 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**:263-7.
121. **Nameki, D., E. Kodama, M. Ikeuchi, N. Mabuchi, A. Otaka, H. Tamamura, M. Ohno, N. Fujii, and M. Matsuoka.** 2005. Mutations conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitors are restricted by gp41 and Rev-responsive element functions. *J Virol* **79**:764-70.

122. **Ndung'u, T., B. Renjifo, and M. Essex.** 2001. Construction and analysis of an infectious human immunodeficiency virus type 1 subtype C molecular clone. *J Virol* **75**:4964-72.
123. **Nowak, M.** 1990. HIV mutation rate [letter]. *Nature* **347**:522.
124. **Ott, D. E.** 1997. Cellular proteins in HIV virions. *Rev Med Virol* **7**:167-180.
125. **Ott, M. G., M. Schmidt, K. Schwarzwaelder, S. Stein, U. Siler, U. Koehl, H. Glimm, K. Kuhlcke, A. Schilz, H. Kunkel, S. Naundorf, A. Brinkmann, A. Deichmann, M. Fischer, C. Ball, I. Pilz, C. Dunbar, Y. Du, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, U. Luthi, M. Hassan, A. J. Thrasher, D. Hoelzer, C. von Kalle, R. Seger, and M. Grez.** 2006. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* **12**:401-9.
126. **Pages, J. C., and T. Bru.** 2004. Toolbox for retrovectorologists. *J Gene Med* **6 Suppl 1**:S67-82.
127. **Pannell, D., C. S. Osborne, S. Yao, T. Sukonnik, P. Pasceri, A. Karaiskakis, M. Okano, E. Li, H. D. Lipschitz, and J. Ellis.** 2000. Retrovirus vector silencing is de novo methylase independent and marked by a repressive histone code. *Embo J* **19**:5884-94.
128. **Park, E. J., and G. V. Quinnan, Jr.** 1999. Both neutralization resistance and high infectivity phenotypes are caused by mutations of interacting residues in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 leucine zipper and the gp120 receptor- and coreceptor-binding domains. *J Virol* **73**:5707-13.
129. **Platt, E. J., J. P. Durnin, and D. Kabat.** 2005. Kinetic factors control efficiencies of cell entry, efficacies of entry inhibitors, and mechanisms of adaptation of human immunodeficiency virus. *J Virol* **79**:4347-56.
130. **Platt, E. J., D. M. Shea, P. P. Rose, and D. Kabat.** 2005. Variants of human immunodeficiency virus type 1 that efficiently use CCR5 lacking the tyrosine-sulfated amino terminus have adaptive mutations in gp120, including loss of a functional N-glycan. *J Virol* **79**:4357-68.
131. **Platt, E. J., K. Wehrly, S. E. Kuhmann, B. Chesebro, and D. Kabat.** 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**:2855-64.
132. **Poumbourios, P., W. el Ahmar, D. A. McPhee, and B. E. Kemp.** 1995. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein oligomeric structure. *J Virol* **69**:1209-18.
133. **Poumbourios, P., K. A. Wilson, R. J. Center, W. El Ahmar, and B. E. Kemp.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein oligomerization requires the gp41 amphipathic alpha-helical/leucine zipper-like sequence. *J Virol* **71**:2041-9.
134. **Reeves, J. D., S. A. Gallo, N. Ahmad, J. L. Miamidian, P. E. Harvey, M. Sharron, S. Pohlmann, J. N. Sfakianos, C. A. Derdeyn, R. Blumenthal, E. Hunter, and R. W. Doms.** 2002. Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:16249-54.
135. **Reeves, J. D., J. L. Miamidian, M. J. Biscione, F. H. Lee, N. Ahmad, T. C. Pierson, and R. W. Doms.** 2004. Impact of mutations in the coreceptor binding site on human immunodeficiency virus type 1 fusion, infection, and entry inhibitor sensitivity. *J Virol* **78**:5476-85.
136. **Resch, W., N. Hoffman, and R. Swanstrom.** 2001. Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks. *Virology* **288**:51-62.
137. **Rimsky, L. T., D. C. Shugars, and T. J. Matthews.** 1998. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41- derived inhibitory peptides. *J Virol*. **72**:986-993.

138. **Rizzuto, C., and J. Sodroski.** 2000. Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:741-9.
139. **Rizzuto, C. D., R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, and J. Sodroski.** 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**:1949-53.
140. **Roberts, J. D., K. Bebenek, and T. A. Kunkel.** 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**:1171-3.
141. **Root, M. J., M. S. Kay, and P. S. Kim.** 2001. Protein Design of an HIV-1 Entry Inhibitor. *Science* **11**:11.
142. **Ross, T. M., and B. R. Cullen.** 1998. The ability of HIV type 1 to use CCR-3 as a coreceptor is controlled by envelope V1/V2 sequences acting in conjunction with a CCR-5 tropic V3 loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7682-6.
143. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**:5463-5467.
144. **Sattentau, Q. J., J. P. Moore, F. Vignaux, F. Traincard, and P. Poignard.** 1993. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol* **67**:7383-93.
145. **Sattentau, Q. J., S. Zolla-Pazner, and P. Poignard.** 1995. Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. *Virology* **206**:713-7.
146. **Schambach, A., J. Bohne, C. Baum, F. G. Hermann, L. Egerer, D. von Laer, and T. Giroglou.** 2006. Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression. *Gene Ther* **13**:641-5.
147. **Schambach, A., H. Wodrich, M. Hildinger, J. Bohne, H. G. Krausslich, and C. Baum.** 2000. Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther* **2**:435-45.
148. **Schneider, S. E., B. L. Bray, C. J. Mader, P. E. Friedrich, M. W. Anderson, T. S. Taylor, N. Boshernitzan, T. E. Niemi, B. C. Fulcher, S. R. Whight, J. M. White, R. J. Greene, L. E. Stoltenberg, and M. Lichty.** 2005. Development of HIV fusion inhibitors. *J Pept Sci* **11**:744-53.
149. **Schols, D., S. Claes, S. Hatse, K. Princen, K. Vermeire, E. De Clercq, R. Skerlj, G. Bridger, and G. Calandra.** 2002. Anti-HIV activity profile of AMD070, an orally bioavailable CXCR4 antagonist. *Proceedings of the 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.*
150. **Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman.** 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-9.
151. **Shaheen, F., L. Duan, M. Zhu, O. Bagasra, and R. J. Pomerantz.** 1996. Targeting human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle. *J Virol* **70**:3392-400.
152. **Shioda, T., J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer.** 1992. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell- line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:9434-9338.
153. **Shioda, T., J. A. Levy, and C. Cheng Mayer.** 1991. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* **349**:167-169.

154. **Shugars, D. C., C. T. Wild, T. K. Greenwell, and T. J. Matthews.** 1996. Biophysical characterization of recombinant proteins expressing the leucine zipper-like domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J Virol* **70**:2982-91.
155. **Sista, P. R., T. Melby, D. Davison, L. Jin, S. Mosier, M. Mink, E. L. Nelson, R. DeMasi, N. Cammack, M. P. Salgo, T. J. Matthews, and M. L. Greenberg.** 2004. Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *Aids* **18**:1787-94.
156. **Starcich, B. R., B. H. Hahn, G. M. Shaw, P. D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E. S. Parks, W. P. Parks, S. F. Josephs, R. C. Gallo, and et al.** 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**:637-648.
157. **Steger, H. K., and M. J. Root.** 2006. Kinetic dependence to HIV-1 entry inhibition. *J Biol Chem* **281**:25813-21.
158. **Tan, K., J. Liu, J. Wang, S. Shen, and M. Lu.** 1997. Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:12303-8.
159. **Trivedi, V. D., S. F. Cheng, C. W. Wu, R. Karthikeyan, C. J. Chen, and D. K. Chang.** 2003. The LLSGIV stretch of the N-terminal region of HIV-1 gp41 is critical for binding to a model peptide, T20. *Protein Eng* **16**:311-7.
160. **Trkola, A., T. J. Ketas, K. A. Nagashima, L. Zhao, T. Cilliers, L. Morris, J. P. Moore, P. J. Maddon, and W. C. Olson.** 2001. Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J Virol* **75**:579-88.
161. **Trkola, A., W. A. Paxton, S. P. Monard, J. A. Hoxie, M. A. Siani, D. A. Thompson, L. Wu, C. R. Mackay, R. Horuk, and J. P. Moore.** 1998. Genetic subtype-independent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by CC and CXC chemokines. *J Virol* **72**:396-404.
162. **Ugolini, S., I. Mondor, P. W. Parren, D. R. Burton, S. A. Tilley, P. J. Klasse, and Q. J. Sattentau.** 1997. Inhibition of virus attachment to CD4+ target cells is a major mechanism of T cell line-adapted HIV-1 neutralization. *J Exp Med* **186**:1287-98.
163. **UNAIDS.** 2006. 2006 Report on the global AIDS epidemic. <http://www.unaids.org/>.
164. **Vocero-Akbani, A. M., N. V. Heyden, N. A. Lissy, L. Ratner, S. F. Dowdy, T. C. Lee, B. A. Sullenger, H. F. Gallardo, G. E. Ungers, and E. Gilboa.** 1999. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med* **5**:29-33.
165. **von Laer, D., S. Hasselmann, and K. Hasselmann.** 2006. Gene therapy for HIV infection: what does it need to make it work? *J Gene Med* **8**:658-667.
166. **von Laer, D., S. Hasselmann, and K. Hasselmann.** 2006. Impact of gene-modified T cells on HIV infection dynamics. *J Theor Biol* **238**:60-77.
167. **Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani, J. M. Kilby, M. S. Saag, X. Wu, G. M. Shaw, and J. C. Kappes.** 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1896-905.
168. **Wei, X., J. M. Decker, S. Wang, H. Hui, J. C. Kappes, X. Wu, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G. Salazar, J. M. Kilby, M. S. Saag, N. L. Komarova, M. A. Nowak, B. H. Hahn, P. D. Kwong, and G. M. Shaw.** 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**:307-12.
169. **Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**:426-30.



170. **Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, and R. Axel.** 1978. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* **14**:725-31.
171. **Wild, C., J. W. Dubay, T. Greenwell, T. Baird, Jr., T. G. Oas, C. McDanal, E. Hunter, and T. Matthews.** 1994. Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12676-80.
172. **Wild, C., T. Oas, C. McDanal, D. Bolognesi, and T. Matthews.** 1992. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10537-41.
173. **Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, and T. J. Matthews.** 1994. 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**:9770-9774.
174. **Wilson, I. A., J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* **289**:366-73.
175. **Wu, L., N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski.** 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**:179-83.
176. **Wyatt, R., P. D. Kwong, E. Desjardins, R. W. Sweet, J. Robinson, W. A. Hendrickson, and J. G. Sodroski.** 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**:705-11.
177. **Yang, X., E. Mahony, G. H. Holm, A. Kassa, and J. Sodroski.** 2003. Role of the gp120 inner domain beta-sandwich in the interaction between the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein subunits. *Virology* **313**:117-25.
178. **Yao, S., T. Sukonnik, T. Kean, R. R. Bharadwaj, P. Pasceri, and J. Ellis.** 2004. Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol Ther* **10**:27-36.
179. **Yee, J.-K., A. Miyanochara, P. LaPorte, K. Bouic, J. C. Burns, and T. Friedmann.** 1994. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: Highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**:9564-9568.
180. **York, J., and J. H. Nunberg.** 2004. Role of hydrophobic residues in the central ectodomain of gp41 in maintaining the association between human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein subunits gp120 and gp41. *J Virol* **78**:4921-6.
181. **Zapp, M. L., and M. R. Green.** 1989. Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* **342**:714-6.
182. **Zhang, L., Y. Huang, T. He, Y. Cao, and D. D. Ho.** 1996. HIV-1 subtype and second-receptor use. *Nature* **383**:768.
183. **Zhu, P., J. Liu, J. Bess, Jr., E. Chertova, J. D. Lifson, H. Grise, G. A. Ofek, K. A. Taylor, and K. H. Roux.** 2006. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**:847-52.
184. **Zufferey, R., J. E. Donello, D. Trono, and T. J. Hope.** 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* **73**:2886-92.
185. **Zwick, M. B., A. F. Labrijn, M. Wang, C. Spenlehauer, E. O. Saphire, J. M. Binley, J. P. Moore, G. Stiegler, H. Katinger, D. R. Burton, and P. W. Parren.** 2001. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* **75**:10892-905.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

5H	5-Helix
6-HB	Sechs-Helixbündel
ABC	Antikörperbindestellen ( <i>antibody binding capacity</i> )
AIDS	Erworbenes Immundefizienzsyndrom ( <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> )
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
ATCC	American tissue culture collection
bp	Basenpaare
d	Tag
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CMV	Cyomegalie Virus
ddH <sub>2</sub> O	Autoklaviertes Reinstwasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Env	Hüllprotein ( <i>Envelope</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FP	Fusionspeptid
Gag	Gruppenspezifische Antigene
gp	Glykoprotein
gp120	120kDa großes Glykoprotein von HIV-1
gp160	Vorläuferprotein von gp120 und gp41
gp41	41kDa großes Transmembranglykoprotein von HIV-1
h	Stunde
HAART	Hochwirksame antiretrovirale Therapie ( <i>highly active anti-retroviral therapy</i> )

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HR	<i>heptad repeat</i>
IN	Integrase
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Gelenkregion ( <i>linker</i> )
LTR	<i>Long terminal repeats</i>
ma	membrangebunden
mab	monoklonaler Antikörper
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
min	Minute
MoMLV	Moloney Murines Leukämievirus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Nef	<i>Negative factor</i>
ORF	Offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
Ori	Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
Pol	Polymerase
PR	Protease
Rev	<i>Regulator of expression of virion proteins</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SFFV	<i>Spleen focus-forming virus</i>
SIN	<i>Self inactivating</i>
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
SP	Signalpeptid
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TMD	Transmembrandomäne
UTR	Untranslatierte Region

UV	Ultraviolett
v/v	Verhältnisangabe Volumen zu Volumen ( <i>volume per volume</i> )
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
VSV-g	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus
w/v	Verhältnisangabe Gewicht zu Volumen ( <i>weight per volume</i> )
wPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
wt	Wildtyp

## 8.2 Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

### 8.3 Vergleich der Hüllproteinsequenzen

Im Folgenden ist das *Alignment* der Hüllproteinsequenzen Ba-L\_FH2, Ba-L\_FH1, Ba-L\_sel\_MD und Ba-L\_wt dargestellt. Sequenzabweichungen sind blau markiert. N-Glykosylierungsstellen sind hervorgehoben (^^^). Die Aminosäuren der *heptad repeat 1-Region*, die die hydrophobe Tasche bilden, sind gelb unterlegt. Die N-terminalen Aminosäuren der *heptad repeat 2-Region*, die in die hydrophobe Tasche binden, sind rot dargestellt. Cysteinreste sind fettgedruckt und unterstrichen.

Ba-L Isolat-		-----			GP120		-----
		-----SIGNALPEPTID-----					
FH2	1	MRVTEIRKSY	QHWWRWGIML	LGILMI	<u>C</u> NAE	EKLWVTVYYG	VPVWKEATTT LF <u>C</u> ASDAKAY
FH1	1	MRVTEIRKSY	QHWWRWGIML	LGILMI	<u>C</u> NAE	EKLWVTVYYG	VPVWKEATTT LF <u>C</u> ASDAKAY
SEL_MD	1	MRVTEIRKSY	QHWWRWGIML	LGILMI	<u>C</u> NAE	EKLWVTVYYG	VPVWKEATTT LF <u>C</u> ASDAKAY
WT	1	MRVTEIRKSY	QHWWRWGIML	LGILMI	<u>C</u> NAE	EKLWVTVYYG	VPVWKEATTT LF <u>C</u> ASDAKAY
		-----			GP120		-----
					^^^		
FH2	61	DTEVHNVWAT	HA <u>C</u> VPTDPPN	QEVELK	KNVTE	NFNMWKN	NMV EQMHEDIISL WDQSLKP <u>C</u> VK
FH1	61	DTEVHNVWAT	HA <u>C</u> VPTDPPN	QEVELK	KNVTE	NFNMWKN	NMV EQMHEDIISL WDQSLKP <u>C</u> VK
SEL_MD	61	DTEVHNVWAT	HA <u>C</u> VPTDPPN	QEVELK	KNVTE	NFNMWKN	NMV EQMHEDIISL WDQSLKP <u>C</u> VK
WT	61	DTEVHNVWAT	HA <u>C</u> VPTDPPN	QEVELK	KNVTE	NFNMWKN	NMV EQMHEDIISL WDQSLKP <u>C</u> VK
		-----			GP120		-----
					V1		V2
			^^^ ^	^^^^^		^^ ^	^^^
FH2	121	LTPL <u>C</u> VTLN <u>C</u>	TDLRNATS	SRN	VTNTTSS	SRG	MVGGGEMK <u>C</u> SFNITTGIRG KVQKEYALFY
FH1	121	LTPL <u>C</u> VTLN <u>C</u>	TDLRNATS	SRN	VTNTTSS	SRG	MVGGGEMK <u>C</u> SFNITTGIRG KVQKEYALFY
SEL_MD	121	LTPL <u>C</u> VTLN <u>C</u>	TDLRNATS	SRN	VTNTTSS	SRG	MVGGGEMK <u>C</u> SFNITTGIRG KVQKEYALFY
WT	121	LTPL <u>C</u> VTLN <u>C</u>	TDLRNATS	SRN	VTNTTSS	SRG	MVGGGEMK <u>C</u> SFNITTGIRG KVQKEYALFY
		-----			GP120		-----
		V2	-----	^ ^^			
FH2	181	ELDIVP <u>T</u> DNK	NDRYRLIS	<u>C</u> SN	TSVITQA	<u>C</u> PK	VSFEPPIPIHY <u>C</u> APAGFAILK <u>C</u> KDKKFNGKG
FH1	181	ELDIVP <u>T</u> DNK	NDRYRLIS	<u>C</u> SN	TSVITQA	<u>C</u> PK	VSFEPPIPIHY <u>C</u> APAGFAILK <u>C</u> KDKKFNGKG
SEL_MD	181	ELDIVP <u>I</u> DNK	NDRYRLIS	<u>C</u> SN	TSVITQA	<u>C</u> PK	VSFEPPIPIHY <u>C</u> APAGFAILK <u>C</u> KDKKFNGKG
WT	181	ELDIVP <u>I</u> DNK	NDRYRLIS	<u>C</u> SN	TSVITQA	<u>C</u> PK	VSFEPPIPIHY <u>C</u> APAGFAILK <u>C</u> KDKKFNGKG
		-----			GP120		-----
		^^^			^^^		^^ ^
FH2	241	P <u>C</u> SNVSTV <u>Q</u> <u>C</u>	THGIRPV	VVST	QLLLNG	SLAE	EEVVIRSENF TNNAKTIIVQ LNESVEIN <u>C</u> T
FH1	241	P <u>C</u> SNVSTV <u>Q</u> <u>C</u>	THGIRPV	VVST	QLLLNG	SLAE	EEVVIRSENF TNNAKTIIVQ LNESVEIN <u>C</u> T
SEL_MD	241	P <u>C</u> SNVSTV <u>Q</u> <u>C</u>	THGIRPV	VVST	QLLLNG	SLAE	EEVVIRSENF TNNAKTIIVQ LNESVEIN <u>C</u> T
WT	241	P <u>C</u> SNVSTV <u>Q</u> <u>C</u>	THGIRPV	VVST	QLLLNG	SLAE	EEVVIRSENF TNNAKTIIVQ LNESVEIN <u>C</u> T

```

-----
---      V3-SCHLEIFE      GP120      -----|      ^^^      ^^^      ^^^
      ^^^
FH2  301  RPNNYTRKSI NIGPGRALYT TGEIIGDIRQ AHCNLSRAKW NDTLNKIVIK LRFKQFGNKTI
FH1  301  RPNNYTRKSI NIGPGRALYT TGEIIGDIRQ AHCNLSRAKW NDTLNKIVIK LRFKQFGNKTI
SEL_MD 301  RPNNNTRKSI NIGPGRALYT TGEIIGDIRQ AHCNLSRAKW NDTLNKIVIK LREQFGNKTI
WT    301  RPNNNTRKSI NIGPGRALYT TGEIIGDIRQ AHCNLSRAKW NDTLNKIVIK LREQFGNKTI

```

```

-----
      CD4 CD4      GP120      -----|      ^^^      ^^^      ^^^
      | |      |----- V4 SCHLEIFE -----|
      | |      ^^^      ^^^      ^^^
FH2  361  VFKHSSGGDP EIVTHSFNCG GEFFYCNSTQ LFNSTWNVTE ESNNTVENNT ITLPCRIKQI
FH1  361  VFKHSSGGDP EIVTHSFNCG GEFFYCNSTQ LFNSTWNVTE ESNNTVENNT ITLPCRIKQI
SEL_MD 361  VFKHSSGGDP EIVTHSFNCG GEFFYCNSTQ LFNSTWNVTE ESNNTVENNT ITLPCRIKQI
WT    361  VFKHSSGGDP EIVTHSFNCG GEFFYCNSTQ LFNSTWNVTE ESNNTVENNT ITLPCRIKQI

```

```

-----
      CD4 CD4-BINDUNG      GP120      CD4      |--- V5 ---|
      | | |      ^^^      |      ^      ^
FH2  421  INMWQEVGRA MYAPPPIRGQI RCSSNITGLL LTRDGGPEDN KTEVFRPGGG DMRDNWRSEL
FH1  421  INMWQEVGRA MYAPPPIRGQI RCSSNITGLL LTRDGGPEDN KTEVFRPGGG DMRDNWRSEL
SEL_MD 421  INMWQEVGRA MYAPPPIRGQI RCSSNITGLL LTRDGGPEDN KTEVFRPGGG DMRDNWRSEL
WT    421  INMWQEVGRA MYAPPPIRGQI RCSSNITGLL LTRDGGPEDN KTEVFRPGGG DMRDNWRSEL

```

```

      GP120      -----| |-----      GP41      -----
      | - FUSIONSPEPTID -| |-----
FH2  481  YKYKVVKIEP LGVAPTKAKR RVVQREKRAV GIGAVFLGFL GAAGSTMGAA SMTLTVQARL
FH1  481  YKYKVVKIEP LGVAPTKAKR RVVQREKRAV GIGAVFLGFL GAAGSTMGAA SMTLTVQARL
SEL_MD 481  YKYKVVKIEP LGVAPTKAKR RVVQREKRAV GIGAVFLGFL GAAGSTMGAA SMTLTVQARL
WT    481  YKYKVVKIEP LGVAPTKAKR RVVQREKRAV GIGAVFLGFL GAAGSTMGAA SMTLTVQARL

```

```

-----
      HEPTAD REPEAT 1      GP41      |---      LOOP
      ^^^      ^^^      ^^^
FH2  541  LLSGIVQQQN NLLRAIEAQQ HLLQLTVWGI KQLQARVLTV ERYLRDQQLL GIWGCCSGKLI
FH1  541  LLSGIVQQQN NLLRAIEAQQ HLLQLTVWGI KQLQARVLTV ERYLRDQQLL GIWGCCSGKLI
SEL_MD 541  LLSGIVQQQN NLLRAVEAQQ HLLQLTVWGI KQLQARVLAV ERYLRDQQLL GIWGCCSGKLI
WT    541  LLSGIVQQQN NLLRAIEAQQ HLLQLTVWGI KQLQARVLAV ERYLRDQQLL GIWGCCSGKLI

```

```

-----
      GP41      |-----      HEPTAD REPEAT 2
      ^^^      ^^^      ^^^
FH2  601  CTTAVPWNAS WSNKSLNKIW DNMTWMEWDR EINKYTSIIY SLIEESQNQQ EKNEQELLEL
FH1  601  CTTAVPWNAS WSNKSLNKIW DNMTWMEWDR EINKYTSIIY SLIEESQNQQ EKNEQELLEL
SEL_MD 601  CTTAVPWNAS WSNKSLNKIW DNMTWMEWDR EINKYTSIIY SLIEESQNQQ EKNEQELLEL
WT    601  CTTAVPWNAS WSNKSLNKIW DNMTWMEWDR EINNYTSIIY SLIEESQNQQ EKNEQELLEL

```

```

-----
      GP41      |-----      HEPTAD REPEAT 2
      ^^^      ^^^      ^^^
FH2  661  DKWASLWNWF DITKWLWYIK IFIMIVGGLI GLRIVFSVLS IVNRVRQGY S PLSFQTHLPA
FH1  661  DKWASLWNWF DITKWLWYIK IFIMIVGGLI GLRIVFSVLS IVNRVRQGY S PLSFQTHLPA
SEL_MD 661  DKWASLWNWF DITKWLWYIK IFIMIVGGLI GLRIVFSVLS IVNRVRQGY S PLSFQTHLPA
WT    661  DKWASLWNWF DITKWLWYIK IFIMIVGGLI GLRIVFSVLS IVNRVRQGY S PLSFQTHLPA

```

```

-----
      GP41
      ^^^
FH2  721  SRGPDRPGGI EEEGGERDRD RSGPLVNGFL ALIWVDLRS L FLFSYHRLRD LLLIVTRIVE
FH1  721  SRGPDRPGGI EEEGGERDRD RSGPLVNGFL ALIWVDLRS L FLFSYHRLRD LLLIVTRIVE
SEL_MD 721  SRGPDRPGGI EEEGGERDRD RSGPLVNGFL ALIWVDLRS L FLFSYHRLRD LLLIVTRIVE
WT    721  SRGPDRPGGI EEEGGERDRD RSGPLVNGFL ALIWVDLRS L FLFSYHRLRD LLLIVTRIVE

```

```
-----
GP41
FH2      781  LLGRRGWEVL KYWWNLLQYW SQELKNSAVS LLNTIAIAVA EGTDRVIEWV QRAVRAILHI
FH1      781  LLGRRGWEVL KYWWNLLQYW SQELKNSAVS LLNTIAIAVA EGTDRVIEWV QRAVRAILHI
SEL_MD   781  LLGRRGWEVL KYWWNLLQYW SQELKNSAVS LLNTIAIAVA EGTDRVIEWV QRAVRAILHI
WT       781  LLGRRGWEVL KYWWNLLQYW SQELKNSAVS LLNTIAIAVA EGTDRVIEWV QRAVRAILHI

      GP41-----|
FH2      841  PRRIRQGLER ALL
FH1      841  PRRIRQGLER ILL
SEL_MD   841  PRRIRQGLER ILL
WT       841  PRRIRQGLER ILL
```

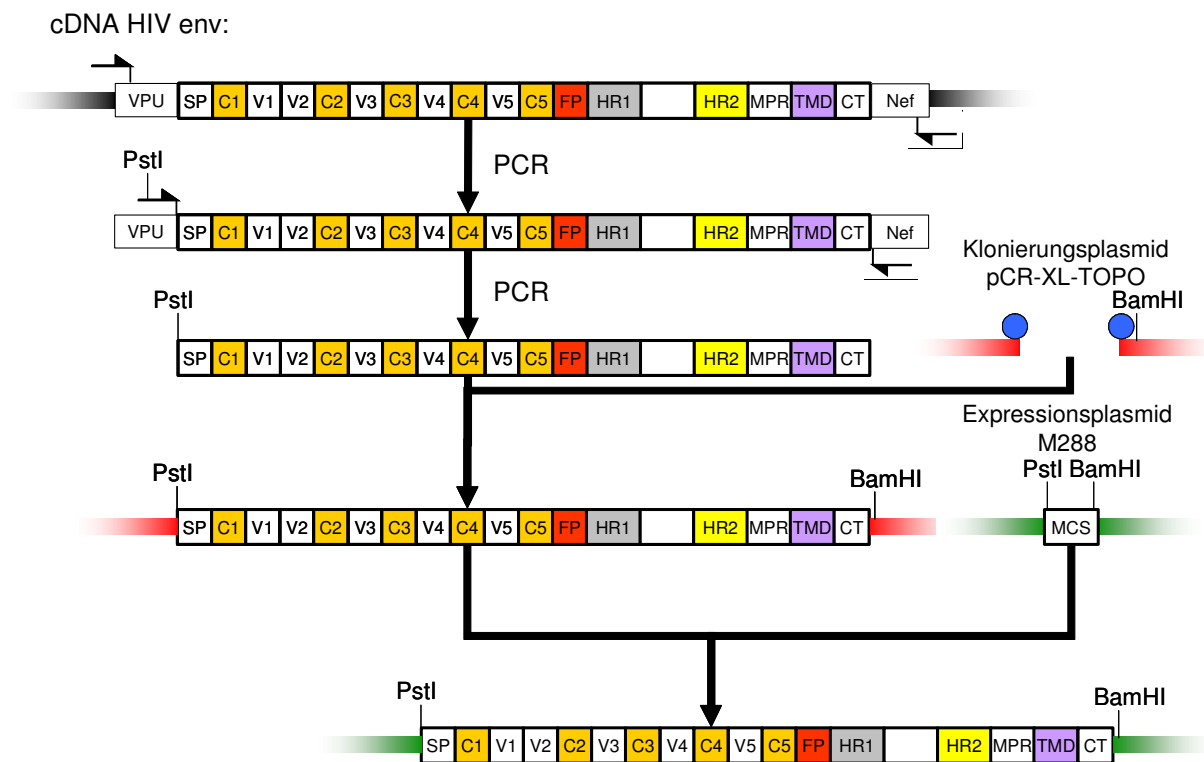
## 8.4 Klonierungen

Im Folgenden sind die Klonierungsstrategien aller in dieser Arbeit erstellten HIV-Hüllproteinkonstrukte skizziert. Folgende Elemente des Env-Gens sind bei allen Abbildungen dargestellt: gp120 trägt N-terminal ein Signalpeptid (SP) und ist in konstante (C1-C5) und variable (V1-V5) Regionen unterteilt. Am N-Terminus der gp41-Untereinheit befindet sich ein Fusionspeptid (FP). Daran schließen sich und *heptad repeat*-Regionen 1 und 2 (HR1 bzw. HR2), die membranproximale Region (MPR), die Transmembrandomäne (TMD) und der zytoplasmatische C-Terminus (CT) an. Aminosäurepositionen, die im Vergleich zum Wildtypisolat Ba-L\_wt mutiert sind, sind farblich hervorgehoben. Die Wildtypkonfiguration der entsprechenden AS-Position ist grün markiert. Die rote Färbung zeigt Mutationen an, die durch die Passage des Wildtypisolats auf maC36-Zellen selektiert wurden (99). Blau markierte Aminosäuremutationen wurden durch die Selektion auf maC46-Zellen angereichert. Die Zahlen geben die Aminosäureposition relativ zum N-Terminus des Ba-L Hüllproteins an. Primerbindungsstellen (Pfeile) und *multiple cloning sites* (MCS) sind hervorgehoben.



### 8.4.1 Klonierung der Expressionsplasmide M749 (Ba-L\_wt), M750 (Ba-L\_FH1) und M759 (Ba-L\_sel\_MD)

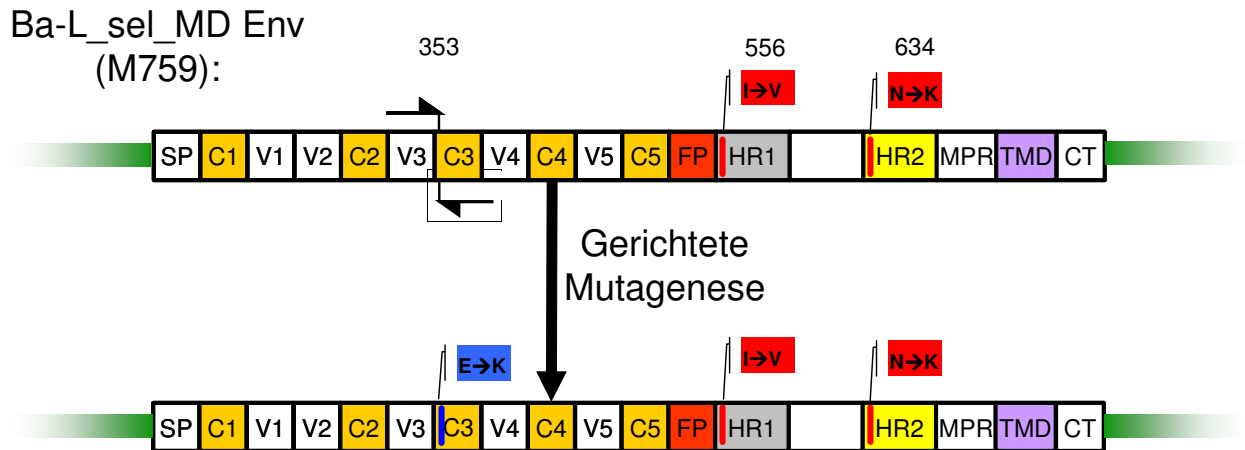
Genomische RNA des jeweiligen Isolats wurde aus Zellkulturüberständen isoliert und per RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Von dieser cDNA wurde durch *nested*-PCR das Env-Gen amplifiziert (Primer der äußeren PCR: A und TNE3\_fh; Primer der inneren PCR: HIVkozakEnv6253f-(2) und HIVnef9047rev). Anschließend wurde das PCR-Produkt in den pCR-XL-TOPO-Vektor eingefügt. Mutationen in den pCR-XL-TOPO-Klonen, die zu Abweichungen der Sequenz im Vergleich zur Mastersequenz des PCR-Produkts führten, wurden mithilfe des *Quikchange Mutagenesis*-Kit entfernt. Anschließend wurde das Hüllprotein in den Expressionsvektor M288 überführt.



**Abbildung 8-1** Klonierung der Expressionsplasmide M749 (Ba-L\_wt), M750 (Ba-L\_FH1) und M759 (Ba-L\_sel\_MD). Die hervorgehobenen Elemente sind in 8.4 beschrieben.

### 8.4.2 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_C3 (M776)

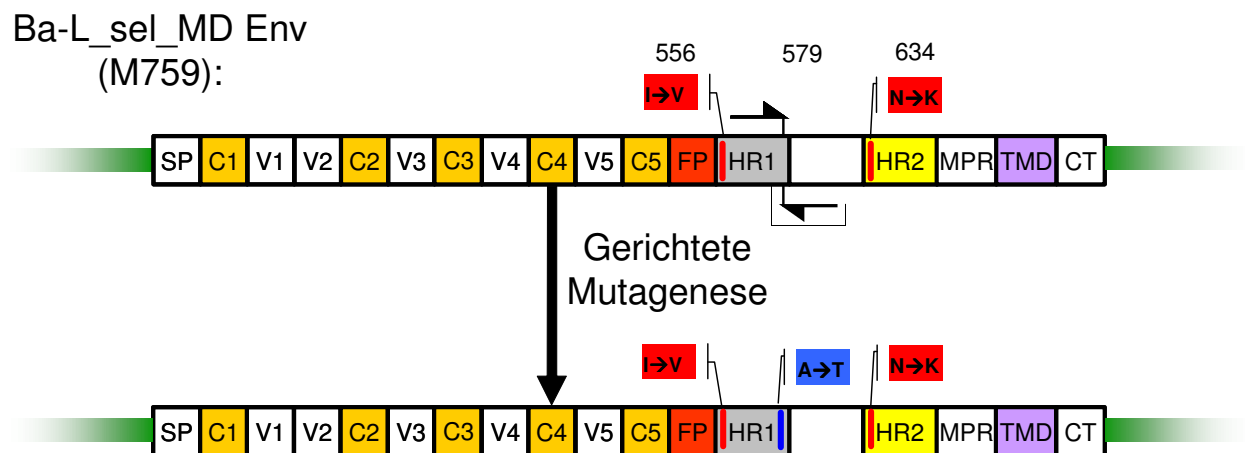
Die Einzelmutante wurde durch gerichtete Mutagenese (Primer: BaL3qcforII und BaL3qcrevII) hergestellt. Als Matrize diente das Konstrukt Ba-L\_sel\_MD (M759).



**Abbildung 8-2** Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_C3 (M776). Die hervorgehobenen Elemente sind in 8.4 beschrieben.

### 8.4.3 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_579T (M777)

Die Einzelmutante wurde durch gerichtete Mutagenese (Primer: NHR\_AtoT\_forII und NHR\_AtoT\_revII) hergestellt. Als Matrize diente das Konstrukt Ba-L\_sel\_MD (M759).

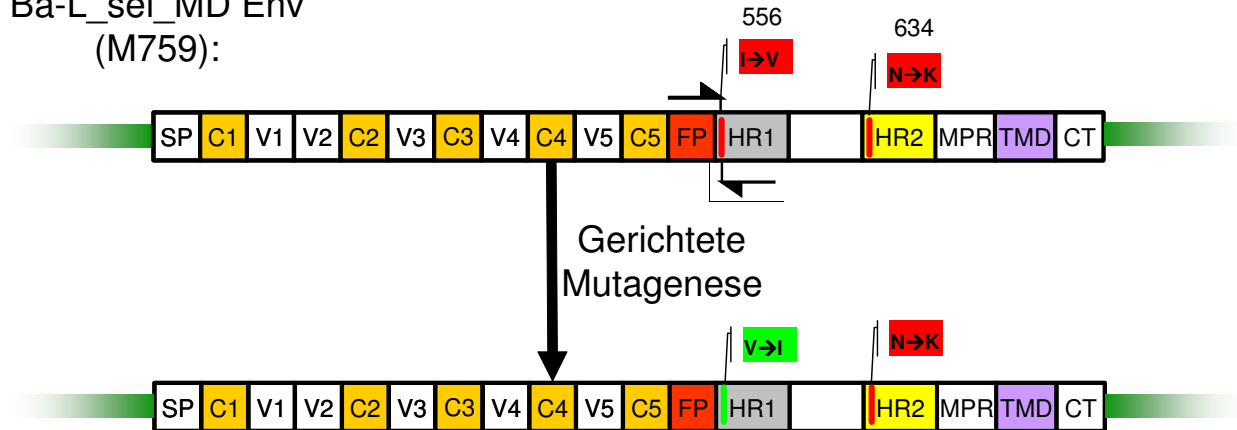


**Abbildung 8-3** Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_579T (M777). Die hervorgehobenen Elemente sind in 8.4 beschrieben.

#### 8.4.4 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_556I (M778)

Die Einzelmutante wurde durch gerichtete Mutagenese (Primer: NHR\_Vtol\_forII und NHR\_Vtol\_revII) hergestellt. Als Matrize diente das Konstrukt Ba-L\_sel\_MD (M759).

Ba-L\_sel\_MD Env  
(M759):

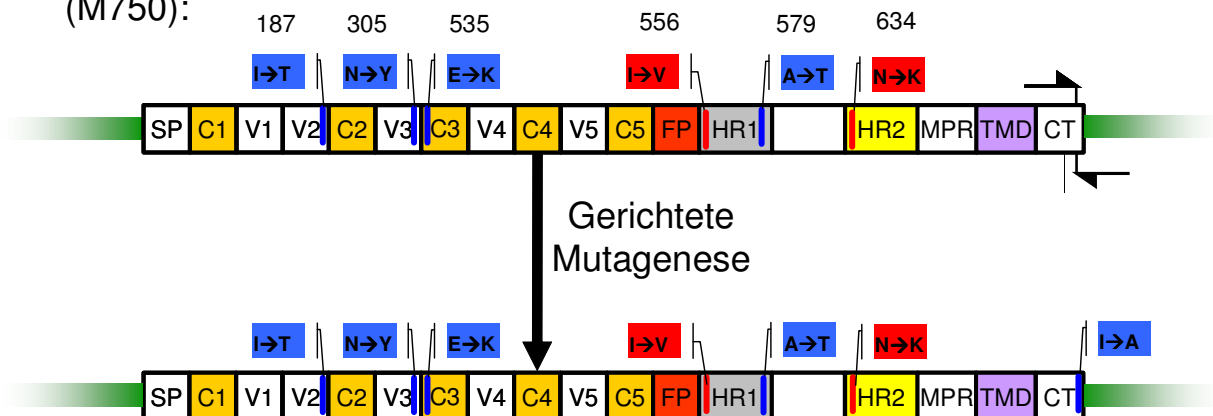


**Abbildung 8-4** Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_556I (M778). Die hervorgehobenen Elemente sind in 8.4 beschrieben.

#### 8.4.5 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_FH2 (M779)

Die Einzelmutante wurde durch gerichtete Mutagenese (Primer: QCM750CTfor2 und QCM750CTrev2) hergestellt. Als Matrize diente das Konstrukt Ba-L\_FH1 (M750)

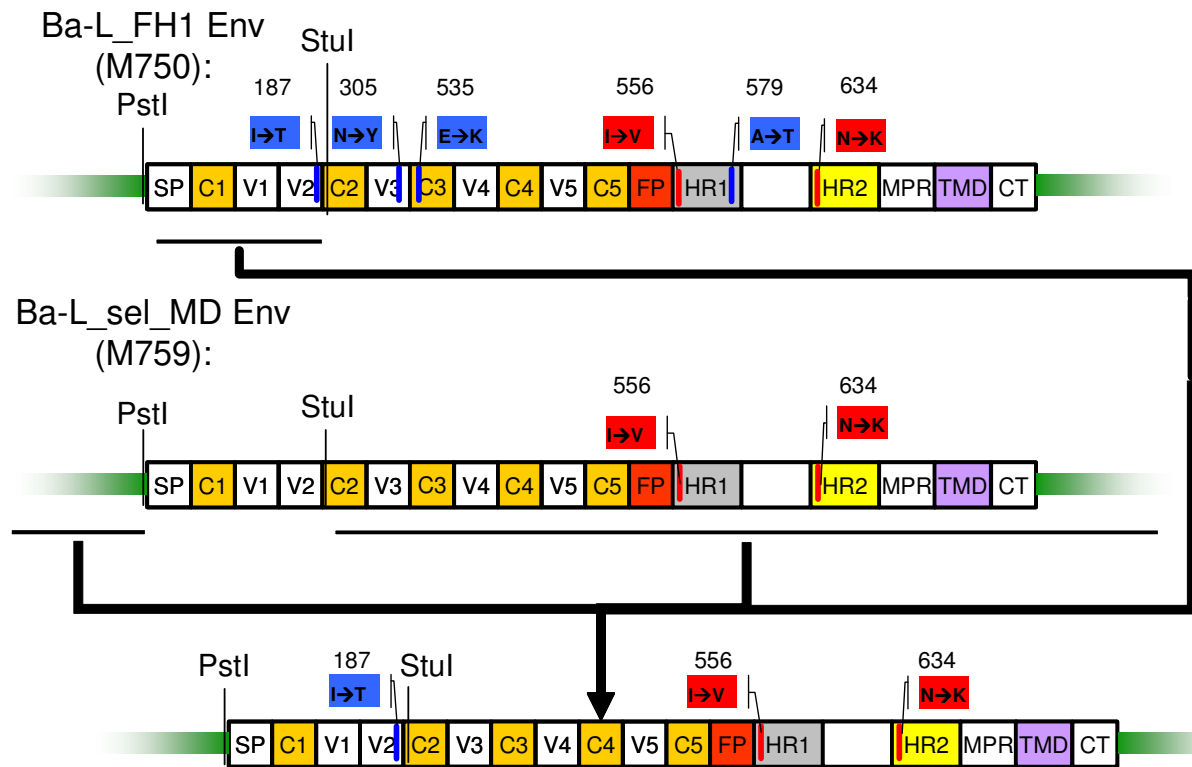
Ba-L\_FH1 Env  
(M750):



**Abbildung 8-5** Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_556I (M778). Die hervorgehobenen Elemente sind in 8.4 beschrieben.

### 8.4.6 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_V2 (M772)

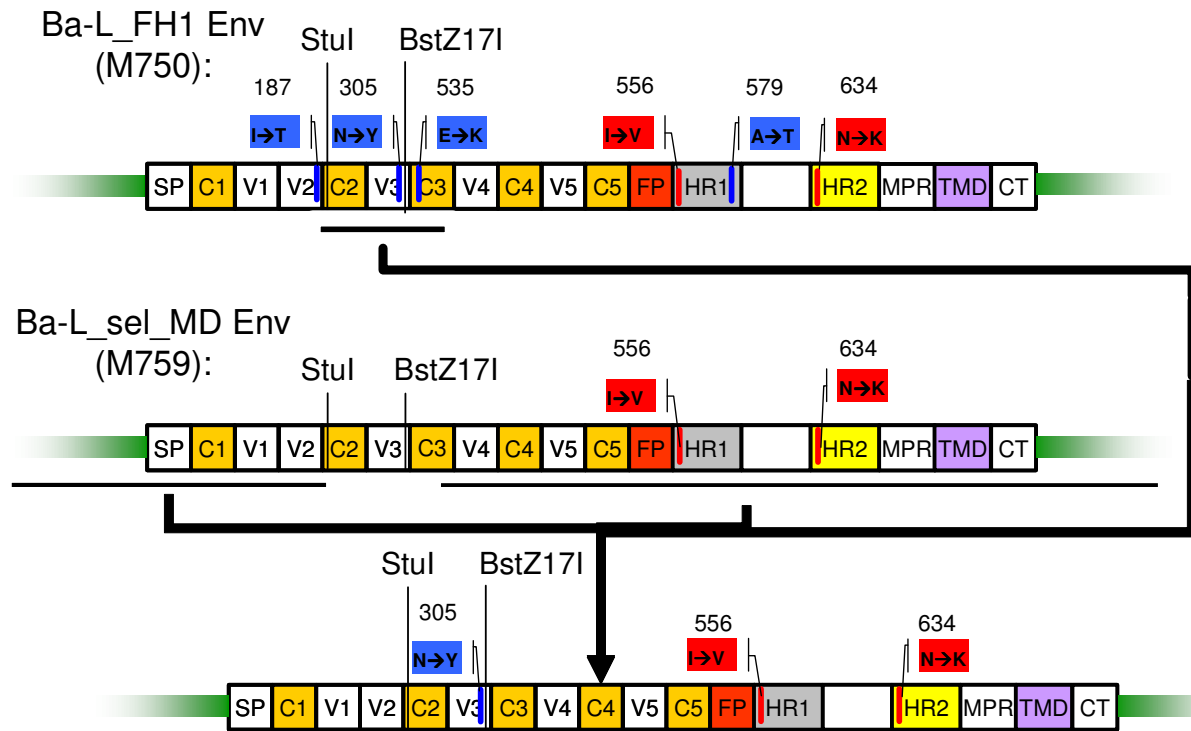
Die V2-Mutation wurde durch einen PstI/StuI-Restriktionsverdau aus Ba-L\_FH1 herausgeschnitten und in Ba-L\_sel\_MD eingefügt.



**Abbildung 8-6 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_V2 (M772).** Die hervorgehobenen Elemente sind in 8.4 beschrieben.

### 8.4.7 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_V3 (M773)

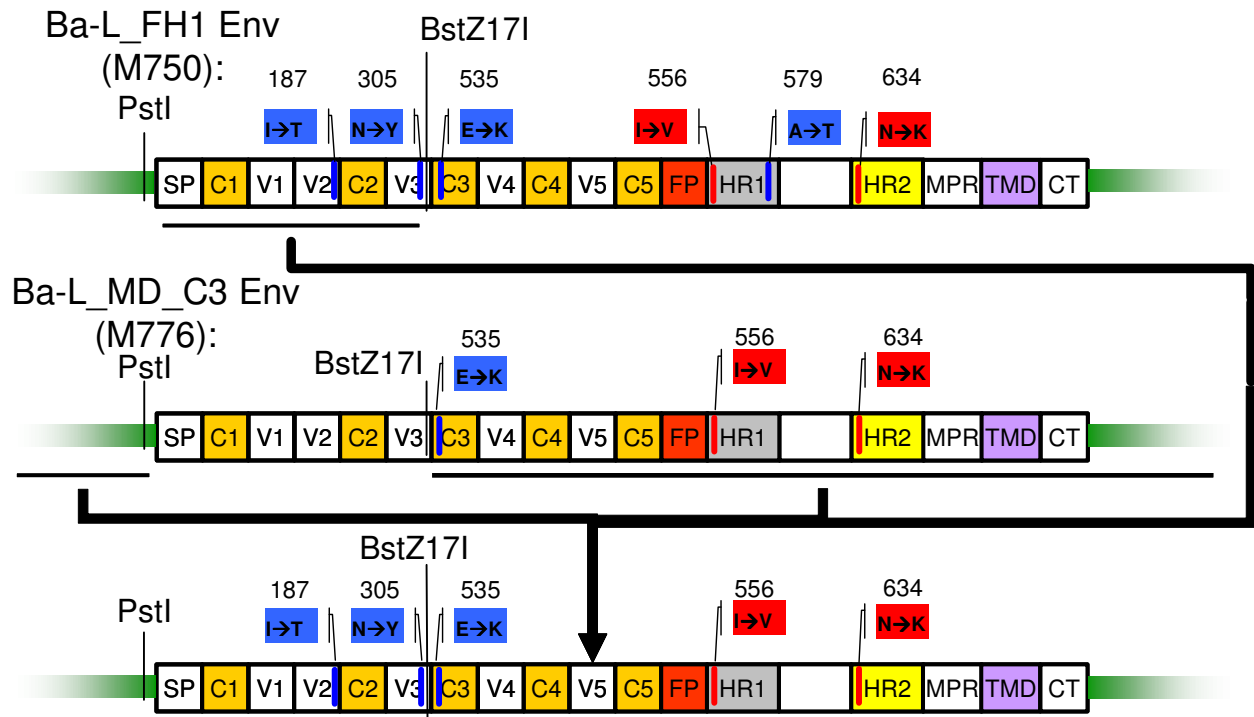
Die V3-Mutation wurde durch einen StuI/BstZ171-Restriktionsverdau aus Ba-L\_FH1 herausgeschnitten und in Ba-L\_sel\_MD eingefügt.



**Abbildung 8-7 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_V3 (M773).** Die hervorgehobenen Elemente sind in 8.4 beschrieben.

### 8.4.8 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_V2+V3+C3 (M782)

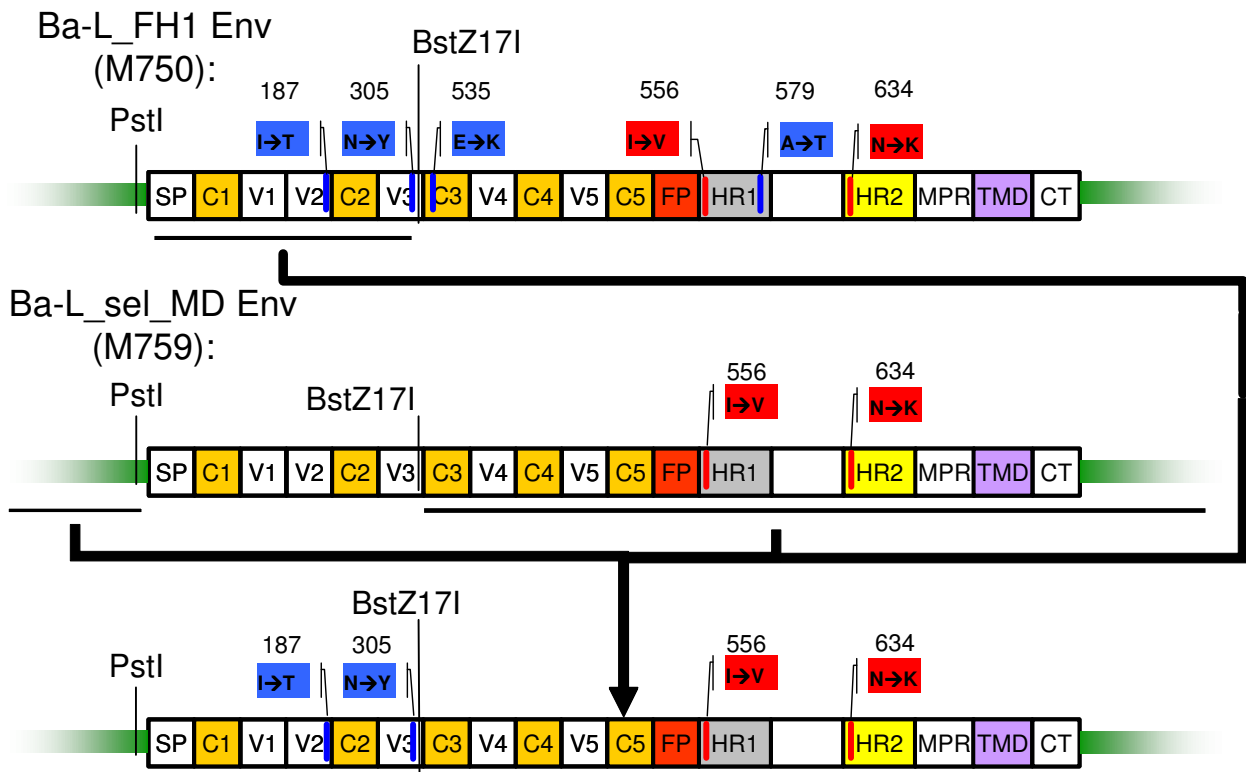
Die V2+V3-Mutationen wurden durch einen PstI/BstZ171-Restriktionsverdau aus Ba-L\_FH1 herausgeschnitten und in Ba-L\_MD\_C3 (M776) eingefügt.



**Abbildung 8-8 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_V2+V3+C3 (M782).** Die hervorgehobenen Elemente sind in 8.4 beschrieben.

### 8.4.9 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_V2+V3 (M783)

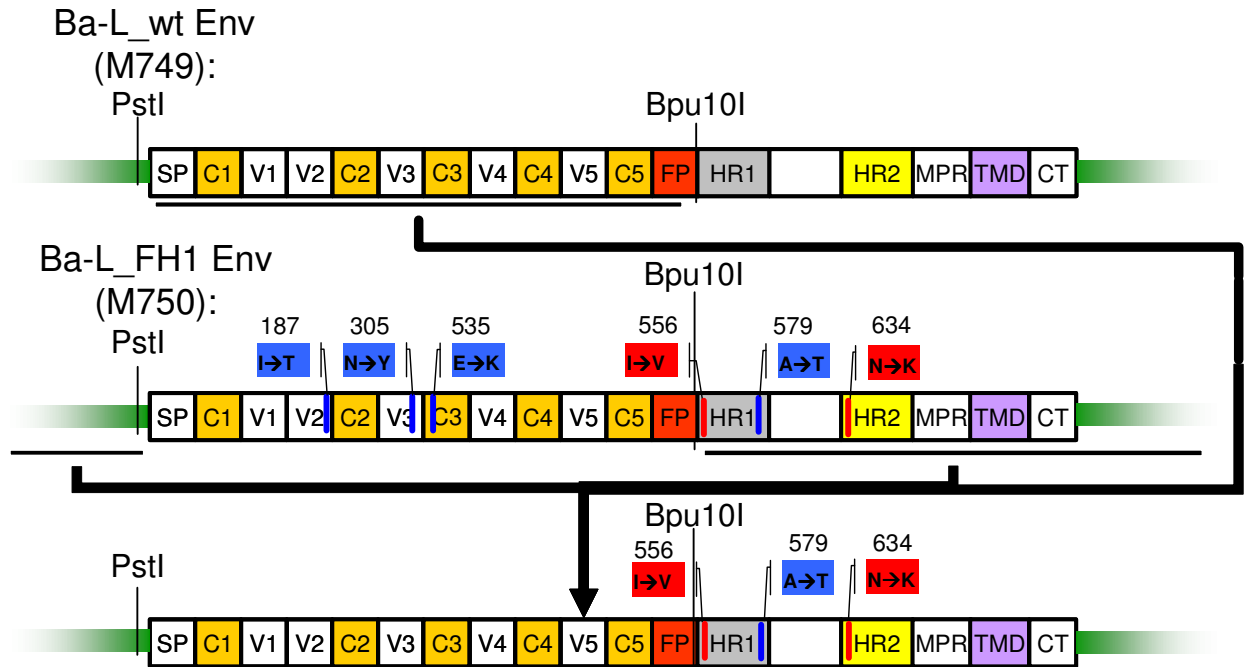
Die V2+V3-Mutationen wurden durch einen PstI/BstZ171-Restriktionsverdau aus Ba-L\_FH1 herausgeschnitten und in Ba-L\_sel\_MD eingefügt.



**Abbildung 8-9 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_V2+V3 (M783).** Die hervorgehobenen Elemente sind in 8.4 beschrieben.

### 8.4.10 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_gp41\_N-HR (M789)

Das PstI/Bpu10I-Fragment wurde aus Ba-L\_wt (M749) herausgeschnitten und in Ba-L\_FH1 (M750) eingefügt.

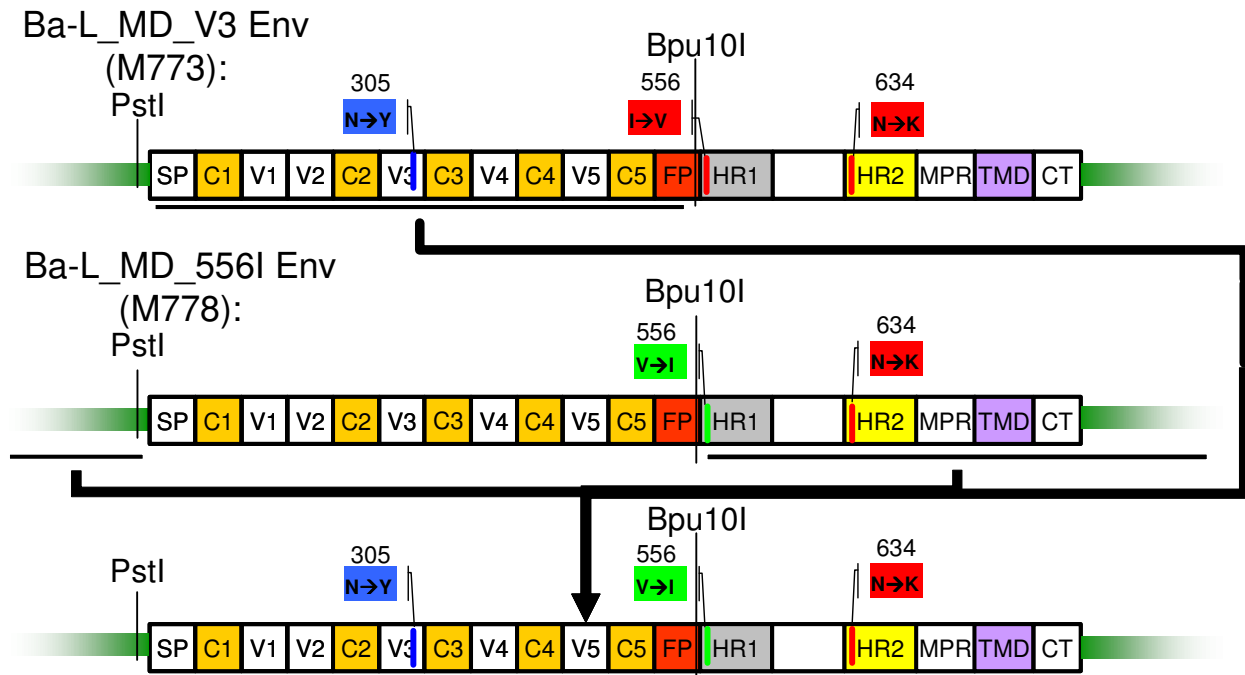


**Abbildung 8-10** Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_gp41\_N-HR (M789). Die hervorgehobenen Elemente sind in 8.4 beschrieben.



### 8.4.11 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_V3+556I (M798)

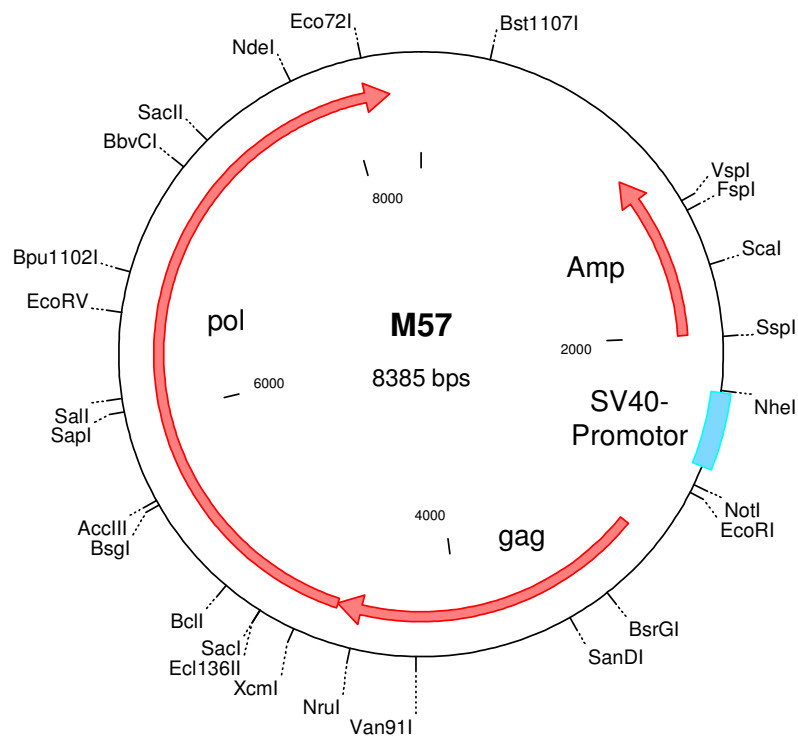
Das PstI/Bpu10I-Fragment wurde aus Ba-L\_MD\_V3 (M773) herausgeschnitten und in Ba-L\_MD\_556I (M778) eingefügt.

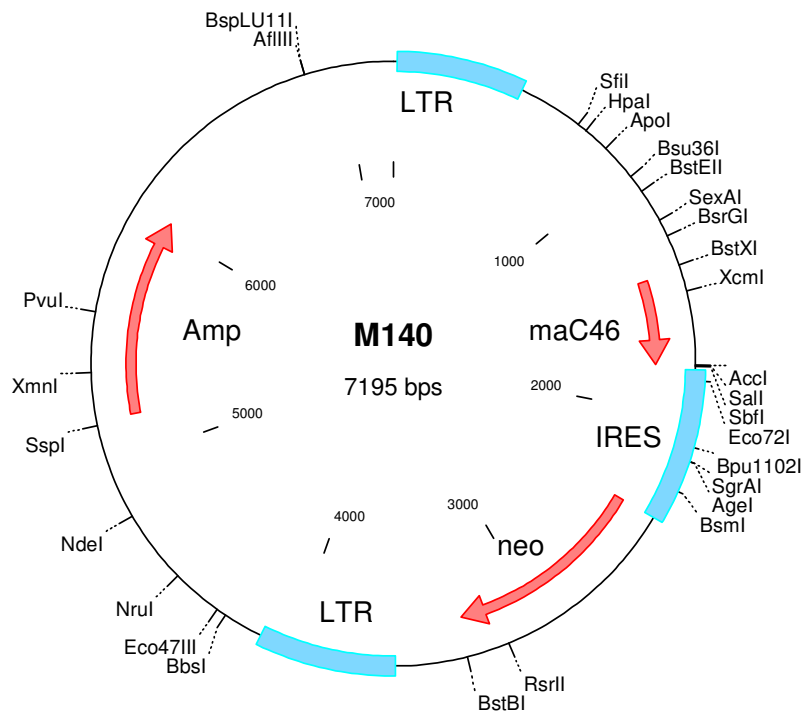
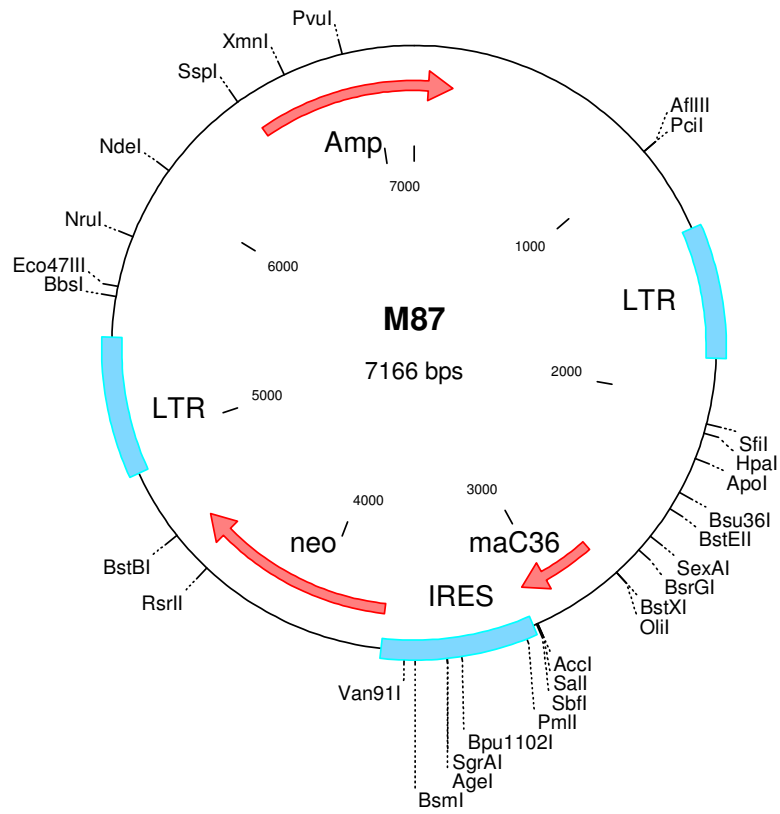


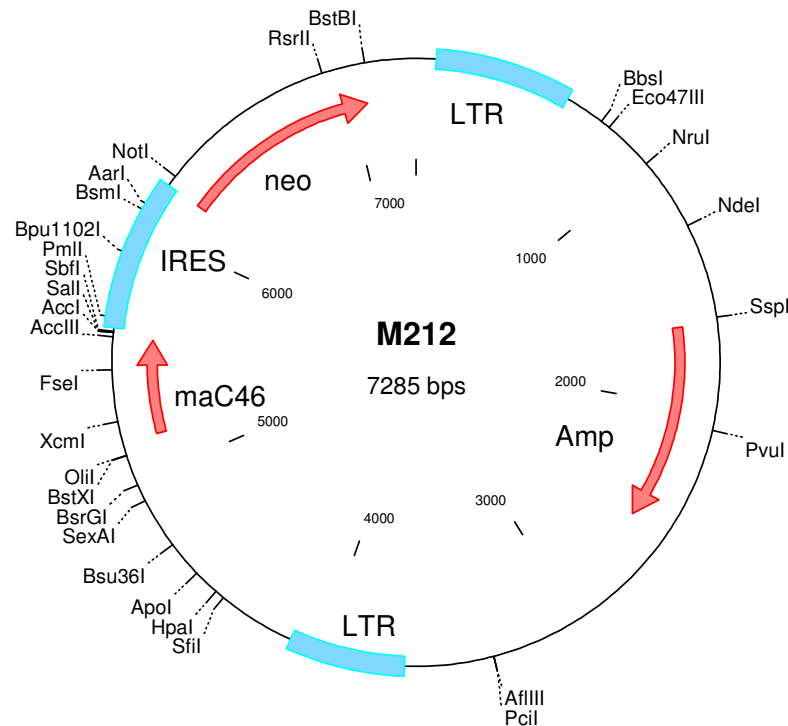
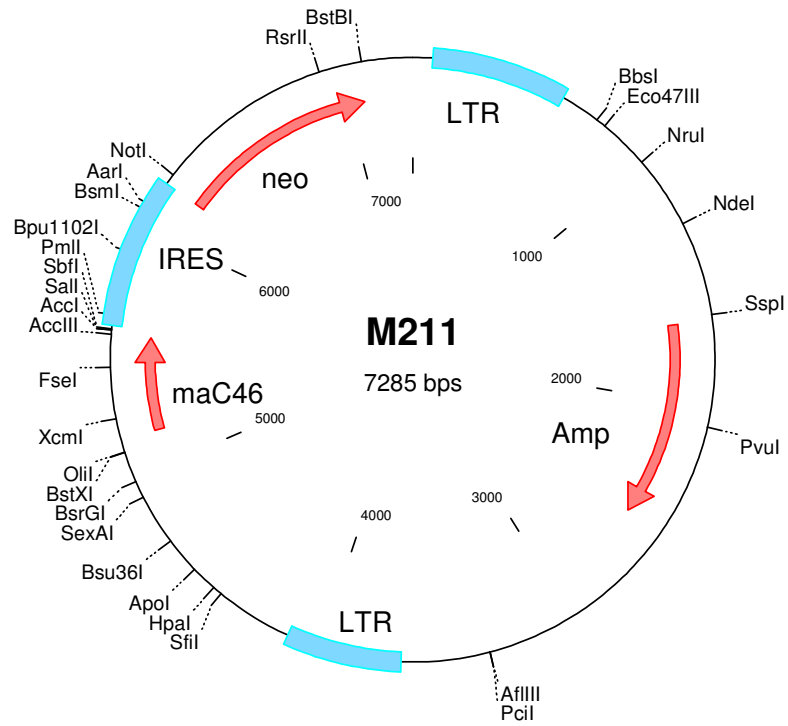
**Abbildung 8-11 Herstellung des Konstrukts Ba-L\_MD\_V3+556I (M798).** Die hervorgehobenen Elemente sind in 8.4 beschrieben.

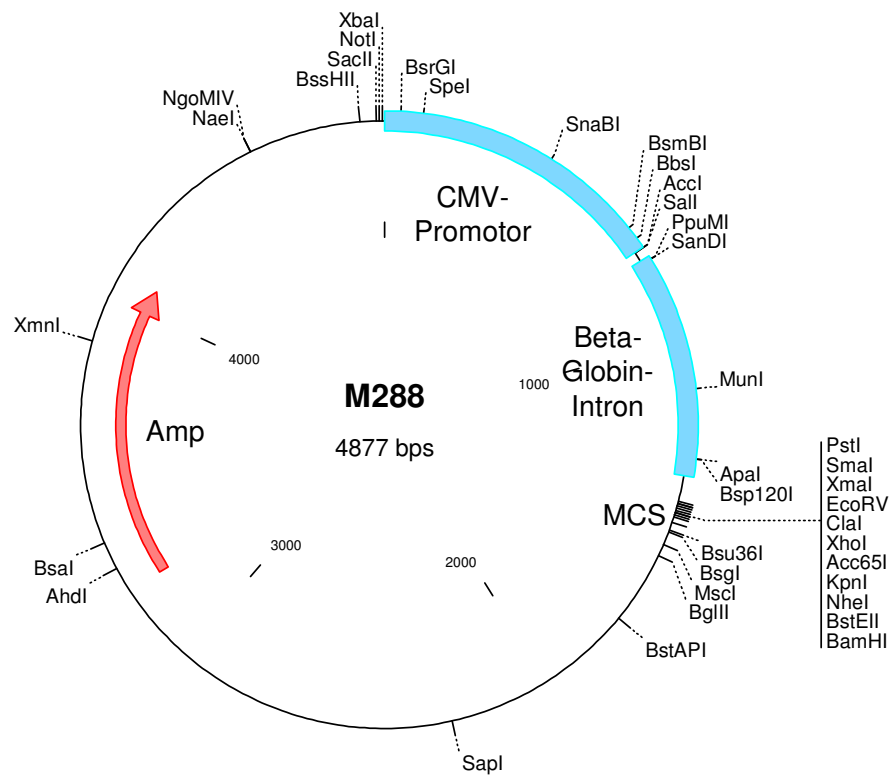
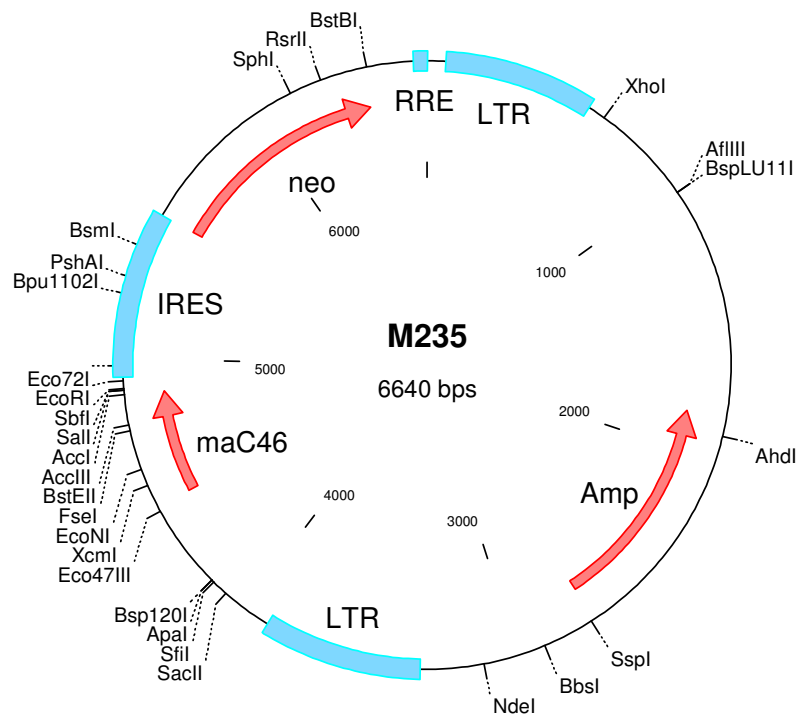
## 8.5 Plasmidkarten

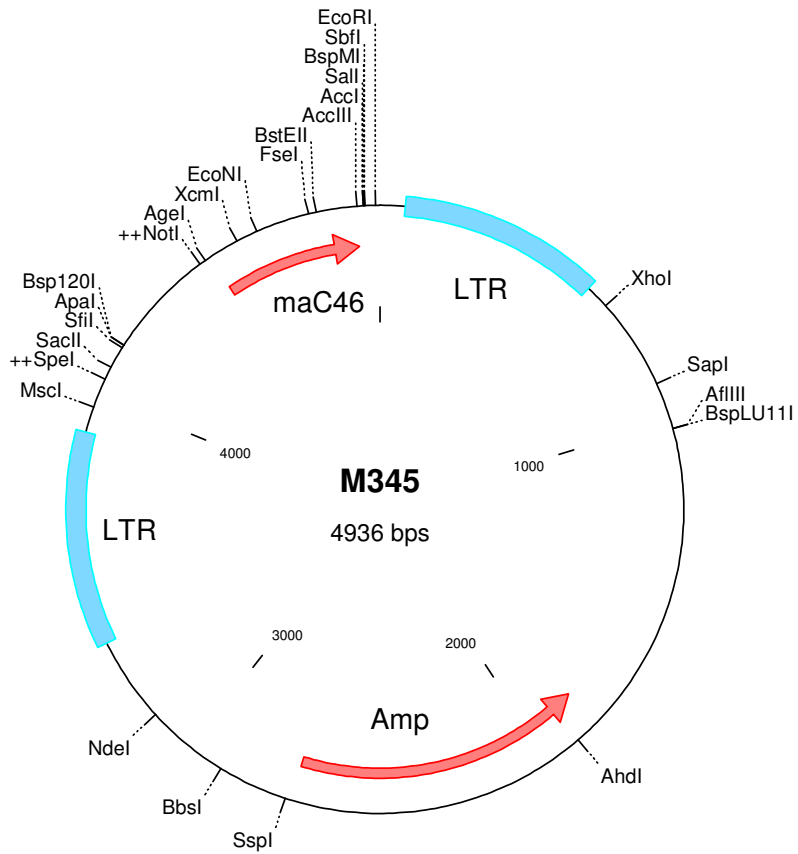
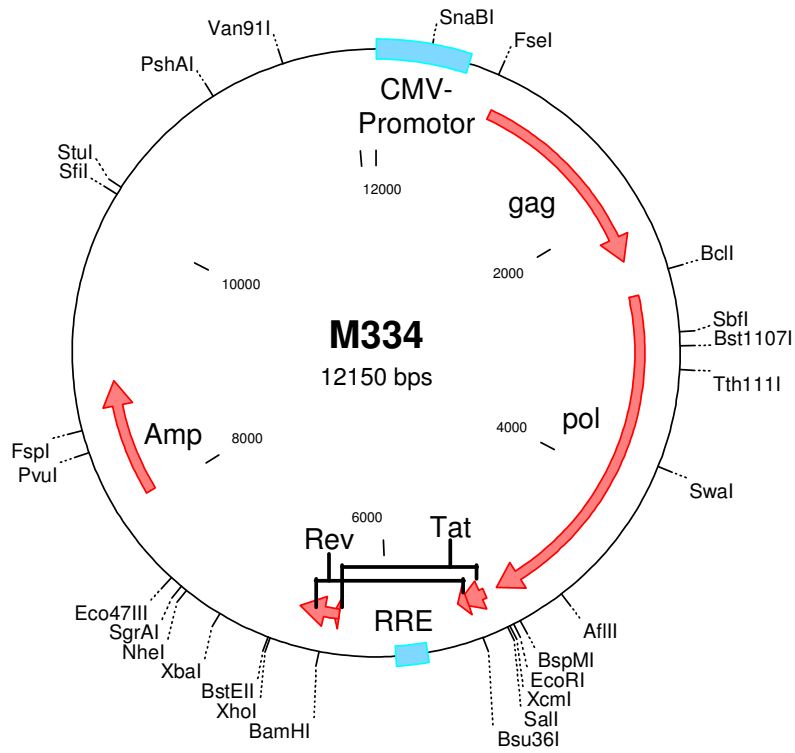
Im Folgenden sind die Karten, der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt. Die Darstellungsweise der Karten ist für jedes Konstrukt identisch: Rote Pfeile markieren Gene, blaue Bereiche stellen wichtige Sequenzelemente dar. Bei allen Konstrukten sind die singulären Restriktionsschnittstellen hervorgehoben. Weitere Informationen zu den abgebildeten Karten sind den Abschnitten 3.5.2 und 3.5.3 zu entnehmen. Da die klonierten Ba-L Hüllproteinvarianten bis auf die jeweiligen Punktmutationen (vgl. **Tabelle 5-1**) identisch sind, ist stellvertretend für alle Env-Konstrukte nur das Konstrukt Ba-L\_wt (M749) dargestellt. Folgende Abkürzungen werden in den Karten verwendet: Amp: Ampicillinresistenzgen; CMV: Cytomegalievirus, eGFP: *enhanced green fluorescent protein*, gag: Gruppenspezifische Antigene, IRES: *internal ribosome entry site*, Kan: Kanamycinresistenzgen, LTR: *long terminal repeats*, ma: membrangebunden, MCS: *multiple cloning site*, neo: Neomycinresistenzgen, Ori: Replikationsursprung, pol: Polymerase, Rev: *Regulator of expression of virion proteins*, RRE: *Rev responsive element*, SFFV: *Spleen focus-forming virus*, SIN: *self inactivating*, SV40: *simian virus 40*, Tat: *transactivator of transcription*, wPRE: *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*, Zeo: Zeocin

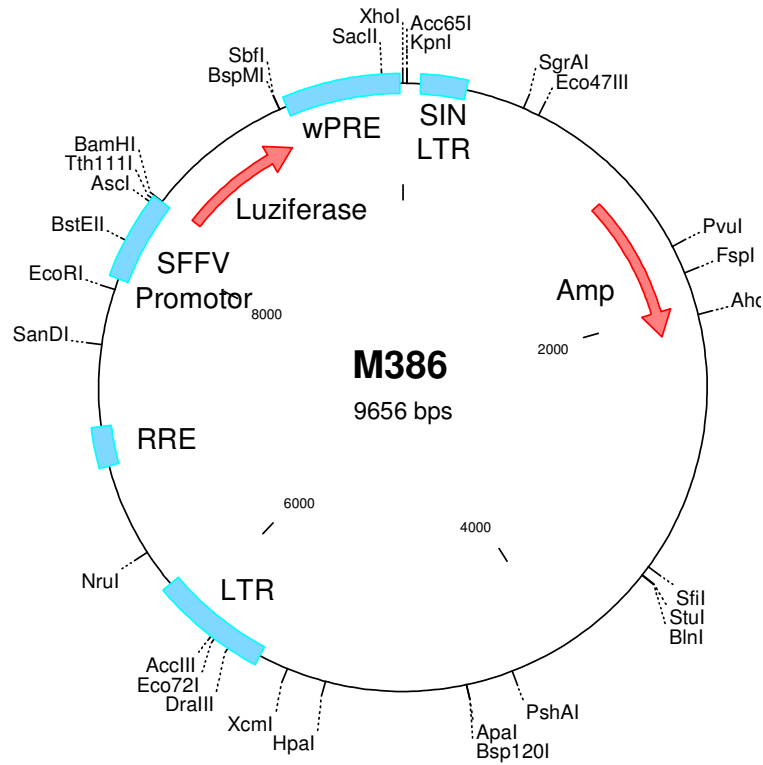
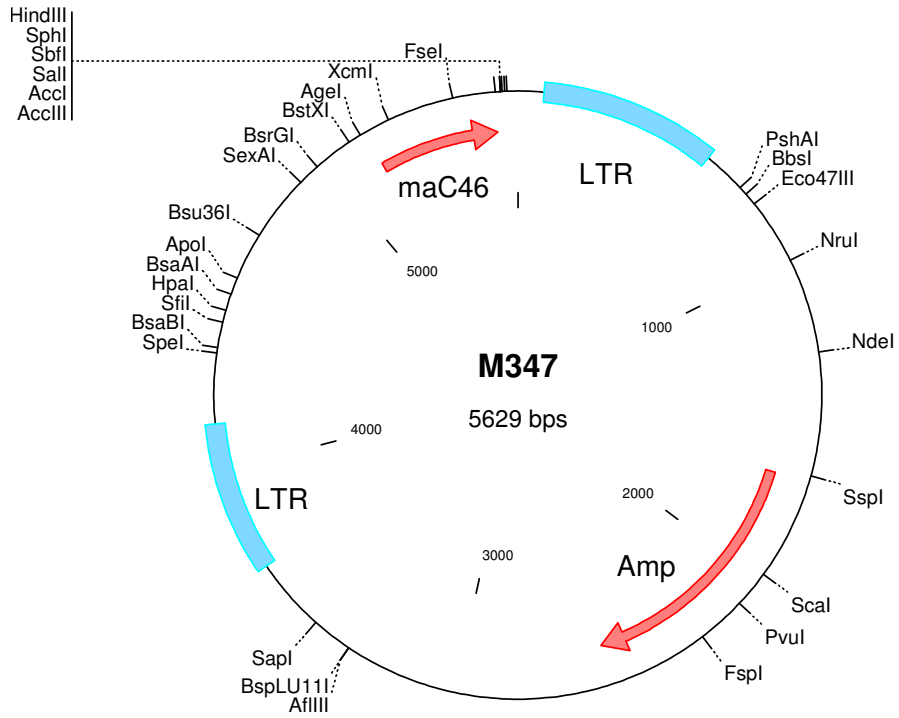


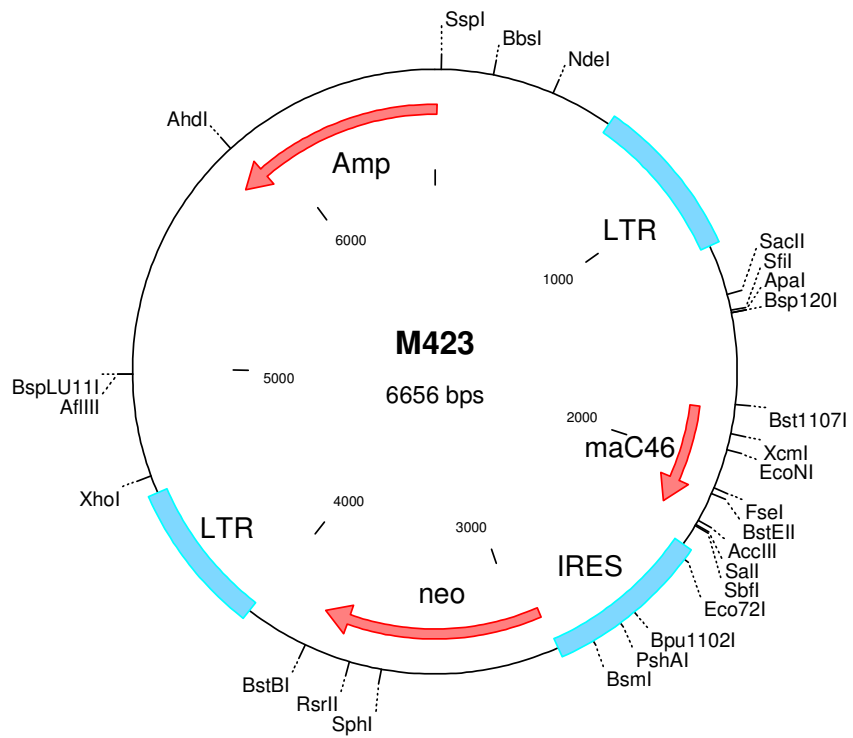
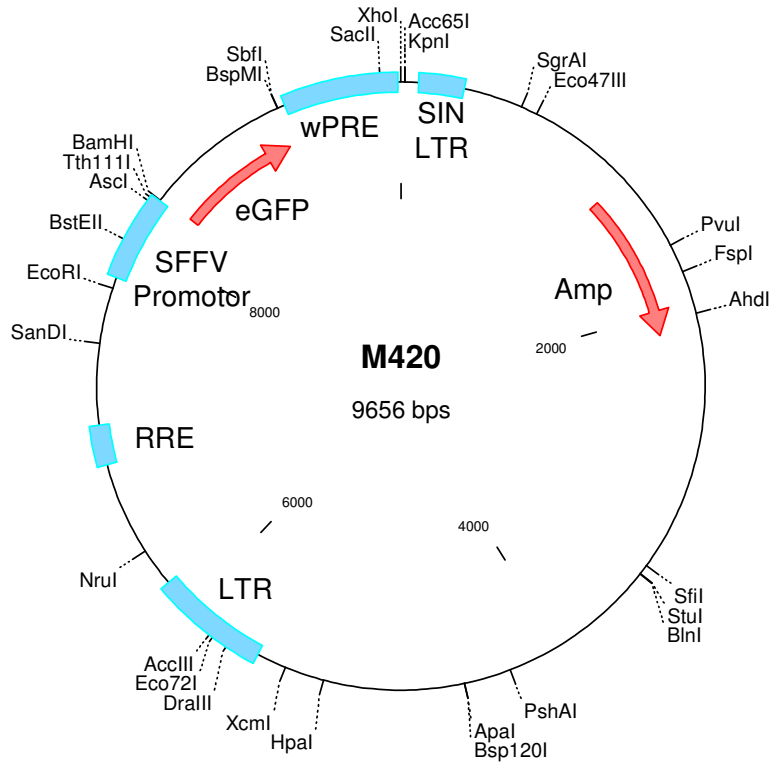




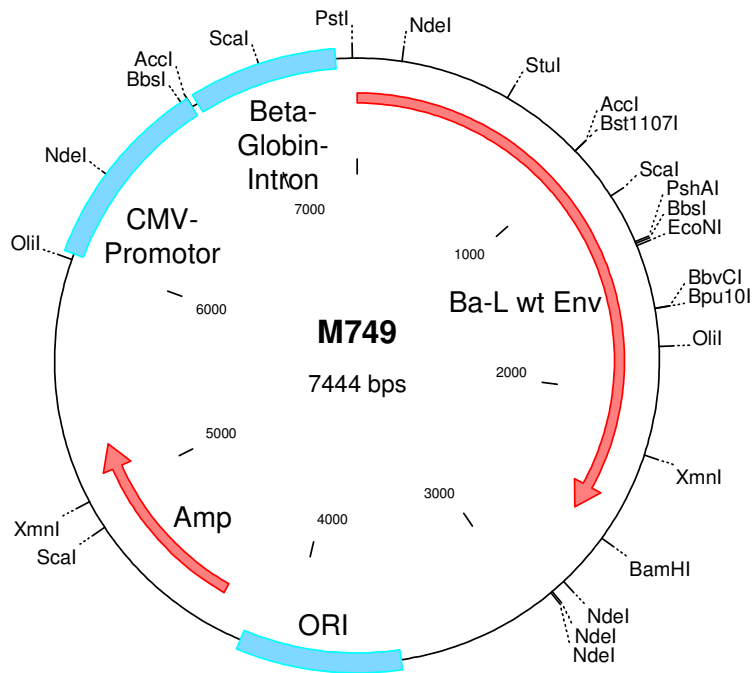
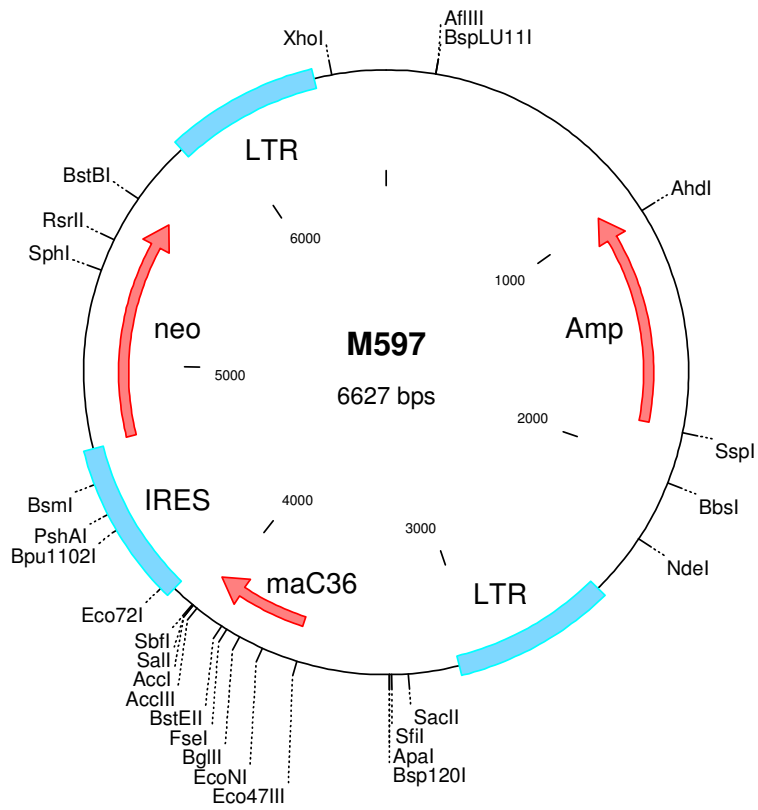


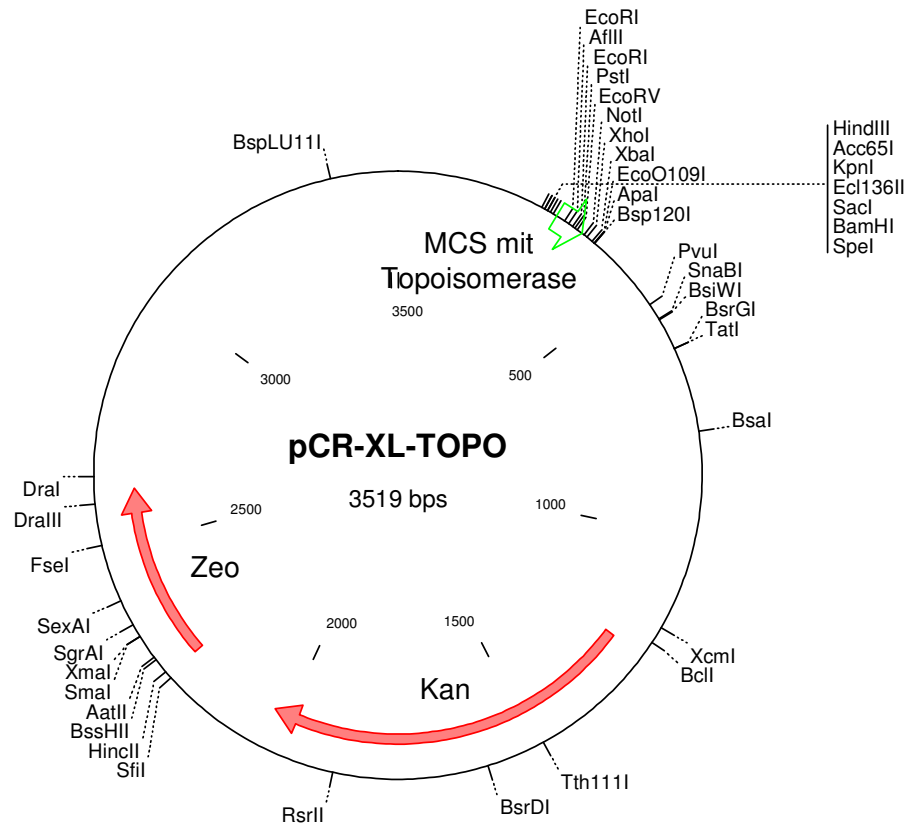












## 8.6 Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Vorträge

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Lohrengel, S., Hermann, F., Hagmann, I., Oberwinkler, H., Scrivano, L., Hoffmann, C., von Laer, D. und Dittmar, M.T. (2005). Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to membrane-anchored gp41-derived peptides. *J Virol* **79**, 10237-10246.

Schambach, A., Bohne, J., Baum, C., Hermann, F.G., Egerer, L., von Laer, D., Giroglou, T. (2006). Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression. *Gene Ther* **13**, 641-645.

Schambach, A., Schiedlmeier, B., Kuhlcke, K., Versteegen, M., Margison, G.P., Li, Z., Kamino, K., Bohne, J., Alexandrov, A., Hermann, F.G., von Laer, D. und Baum, C. (2006). Towards hematopoietic stem cell-mediated protection against infection with human immunodeficiency virus. *Gene Ther* **13**, 1037–1047.

Lunzen, J.V., Glaunsinger, T., Stahmer, I., Baehr, V.V., Baum, C., Schilz, A., Kuehlcke, K., Naundorf, S., Martinius, H., Hermann, F., Giroglou, T., Newrzela, S., Muller, I., Brauer, F., Brandenburg, G., Alexandrov, A. und von Laer, D. (2007). Transfer of Autologous Gene-modified T Cells in HIV-infected Patients with Advanced Immunodeficiency and Drug-resistant Virus. *Mol Ther.* **15**, 1024-33.

Hermann, F.G., Martinius, H., Egelhofer, M., Giroglou, T., Tonn, T. Roth, S. D., Zahn, R., Schult-Dietrich, P., Alexandrov, A., Dietrich, U., Baum, C., von Laer, D. (2007). Protein Scaffold and Expression Level Determine Antiviral Activity of Membrane-Anchored Antiviral Peptides. *Hum. Gen. Ther.* (in Review)

### Vorträge

Hermann, F. und von Laer, D.M. Entry inhibitory genes for HIV-1 gene therapy. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie (DG-GT) 2005, 29.06.-02.07.2005, Würzburg

Hermann, F., Newrzela, S., Seyd, R., Schult-Dietrich, P., Szyroki, A., Schmitz, J.E., und von Laer, D.M. Entry inhibitory genes for therapy of HIV-infection. 10. Deutscher und 16. Österreichischer AIDS-Kongress, 01.-04.07 2005, Wien

## Lebenslauf

### Felix Günter Hermann

---

Geburtsdaten:	06.10.1975 in Bad Soden am Taunus
Anschrift:	Sindlinger Straße 13 60326 Frankfurt am Main
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### Schulbildung

---

1982 – 1986	Geschwister Scholl Grundschule, Schwalbach / Taunus
1986 – 1992	Leibniz-Gymnasium, Frankfurt am Main
1992 – 1995	Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt am Main
20.06.1995	Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

---

1995 – 1996	Zivildienst beim "Mobilen-Sozialen-Hilfsdienst des Diakonischen Werkes", Frankfurt am Main
-------------	--

### Studium

---

1996 – 2002	Biologiestudium an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
1996 – 1998	Grundstudium mit Diplomvorprüfung
1998 – 2002	Hauptstudium
1999 – 2000	Biochemiestudium an der Cardiff University, Wales, U.K. (Austauschstudent, ERASMUS-Programm)
2002	Diplomarbeit im Institut für Biochemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Fahrenholz zum Thema: Untersuchung der regulatorischen Funktion der Prodomänen von $\alpha$ -Sekretasen
19.09.2002	Studienabschluss als Diplom-Biologe

### Promotion

---

seit 10.2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) am Georg Speyer Haus, Frankfurt am Main, Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. D. von Laer
--------------	--

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Selektion und Analyse von Fusionsinhibitor-resistenten HIV-1-Varianten“ von mir selbstständig und nur unter Verwendung der darin angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Frankfurt am Main, im Mai 2007

Felix G. Hermann