

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Sabine Lohrengel

aus Bochum

Tag der mündlichen Prüfung:

Charakterisierung membranverankerter HIV-Fusionsinhibitoren

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich

PD Dr. Stephan Urban

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme des Erstgutachtens.

PD Dr. Stephan Urban für die Übernahme des Zweitgutachtens.

PD Dr. Matthias Dittmar für die Überlassung des interessanten Themas, die intensive Betreuung und seine ständige Gesprächsbereitschaft.

Prof. Dr. Fickenscher, PD Dr. Matthias Dittmar und PD Dr. Stephan Urban für die ausführlichen und konstruktiven Diskussionen im Rahmen meines Promotionskomitees.

Prof. Dr. Dorothee von Laer und Dipl.-Biol. Felix Hermann für die fruchtbare Zusammenarbeit bei der Durchführung der quantitativen Durchflusscytometrie sowie für die zur Verfügung gestellten Zellen und Plasmide.

Isabel Hagmann und Heike Oberwinkler für ihre Unterstützung bei der Durchführung einzelner Versuche.

Allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Virologie für fachliche und technische Hilfen, vor allem aber für die freundschaftliche Atmosphäre.

Markus Crnjak für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Beate, Boris, Christian, Denise, Heike, Kathi, Kristina, Marcel, Markus, Matti, Moritz, Patrick, Sebastian und Steffi für ihre Freundschaft und alles, was sie in den letzten drei Jahren für mich getan haben.

Barbara und Herta Reddigau für ihre kontinuierliche Unterstützung.

Zusammenfassung

Die von gp41 abgeleiteten Peptide T-20 und C46-B inhibieren die für den HIV-Eintritt essentielle Fusion der viralen mit der zellulären Membran.

Der in dieser Arbeit durchgeführte Vergleich der antiretroviralen Aktivität der membranverankerten Fusionsinhibitoren C46-A, C46-B und C46-C sollte zur Definition der Aminosäuresequenz eines optimierten membranverankerten Fusionsinhibitors führen. Es wurde gezeigt, dass mit C46-B bereits ein sehr effektiver und gegen ein breites Spektrum an HIV-Primärisolaten sowie T-20 insensitiven HIV-1-Klonen wirksamer membranverankerter Fusionsinhibitor existiert. Die subtypspezifischen C46-Derivate C46-A und C46-C wiesen gegenüber C46-B keinen signifikanten Vorteil auf.

In einem zweiten Teilprojekt wurde die Resistenzentwicklung gegen mT-20 und C46-B untersucht. Allerdings war es nicht möglich, gegen C46-B resistente HIV-1-Varianten zu selektieren, was die Bedeutung dieses membranverankerten Fusionsinhibitors für die Gentherapie von HIV-Infizierten unterstreicht. Die Resistenz gegen mT-20, die bei selektierten BaL- und NL4.3-Varianten beobachtet wurde, wurde von einem in HR2 liegenden Aminosäureaustausch (BaL, N126K) bzw. einem in HR1 liegenden Aminosäureaustausch (NL4.3, L33S) vermittelt. Im Fall von BaL trat gleichzeitig eine Punktmutation in HR1 (I48V) auf, die die Resistenz moduliert. Obwohl keine dieser Mutationen im mit T-20 Resistenz assoziierten Motiv lag, war die Empfindlichkeit beider selektierten Varianten gegenüber löslichem T-20 herabgesetzt, was darauf schließen lässt, dass sich die Wirkmechanismen der membranverankerten und löslichen Peptide ähneln. Die I48V- und N126K-Mutationen in BaL führten zu einer herabgesetzten viralen Fitness, was vermutlich auf eine schnellere HR1/HR2-Interaktion zurückzuführen ist. Der im Gegensatz dazu durch den L33S-Austausch in NL4.3 vermittelte Fitnessvorteil wird wahrscheinlich dadurch ermöglicht, dass die Mutation die Funktion des RRE nicht beeinträchtigt und die HR1/HR2-Bindung verbessert.

Summary

The gp41 derived peptides T-20 and C46-B inhibit the fusion of viral and cellular membranes, an essential step during HIV entry.

In the first part of this thesis, the antiretroviral activities of the membrane anchored fusion inhibitors C46-A, C46-B and C46-C were analyzed in order to define the amino acid sequence of an optimized membrane anchored fusion inhibitor. It was demonstrated that C46-B is able to efficiently inhibit a broad range of primary HIV isolates as well as T-20 insensitive HIV-1 clones. When compared to C46-B the use of subtype specific C46 derivatives, i.e. C46-A and C46-C, was not advantageous.

In the second part of this thesis, the development of resistance against mT-20 and C46-B was analyzed. Resistance development against C46-B was not observed in cells expressing the inhibitor, emphasizing the importance of this membrane anchored fusion inhibitor for the gene therapy of HIV infected patients. The resistance against mT-20 which was observed in selected BaL and NL4.3 variants was mediated by an amino acid mutation in HR2 (BaL, N126K) and an amino acid mutation in HR1 (NL4.3, L33S), respectively. For BaL, a second point mutation in HR1 (I48V) modulated the resistance. Despite the fact, that none of these mutations changed the motif associated with T-20 resistance, the T-20 sensitivity of both selected variants proved to be reduced. This indicates that the mechanisms of action of membrane anchored and soluble fusion inhibitors are similar. The I48V and N126K mutations in BaL mediated a decreased viral fitness, probably due to faster HR1/HR2 interactions. In contrast to this the L33S mutation conferred an increased fitness. This could be the result of an improved HR1/HR2 binding. Additionally, the mutation does not interfere with RRE functionality.

Abkürzungen

A

α	anti
A	Adenin, Alanin
Abb.	Abbildung
ABK	Antikörperbindekapazität
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
amp	Ampicillin
ARV	<i>anti retroviral</i> , antiretrovirale Substanz

B

bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise

C

C	Cytosin, Cystein
C1-C6	konservierte Regionen 1-6
CA	Capsid
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Oberflächenprotein, -marker
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CoR	Corezeptor

D

D	Asparaginsäure
---	----------------

DC-SIGN	<i>dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin</i>
DC-SIGNR	<i>dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin related</i>
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

E

E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
e.g.	<i>exempli gratia</i> , zum Beispiel
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
<i>env</i>	<i>envelope</i> , für die viralen Hüllproteine kodierendes Gen
Env	Envelope, virales Hüllprotein
<i>et al.</i>	und andere
etc.	<i>et cetera</i> , und so weiter
evtl.	eventuell

F

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusscytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum

FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FIV	felines Immundefizienzvirus
FP	Fusionspeptid
FSC-H	<i>forward scatter</i> , Maß für die Zellgröße

G

G	Guanin, Glycin
<i>gag</i>	für die viralen Strukturproteine kodierendes Gen
Gag	<i>group specific antigen</i> , virale Strukturproteine
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp	Glykoprotein

H

h	Stunde(n)
H	Histidin
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	humanes Immundefizienzvirus

I

I	Isoleucin
IC	<i>inhibitory concentration</i> , inhibitorische Konzentration
i.e.	<i>id est</i> , das heisst
IgG	Immunglobulin G
IN	Integrase

K

K	Lysin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

L

L	Leucin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LNGFR	<i>low affinity nerve growth factor receptor</i>

M

M	Methionin, molar
MA	Matrix
min	Minute(n)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRFP	<i>monomeric red fluorescent protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA, Boten-RNA</i>
MSD	<i>membrane spanning domain, Transmembrandomäne</i>
mT-20	membranverankertes T-20

N

N	Asparagin
NaAc	Natriumacetat

NC	Nucleocapsid
<i>nef</i>	für Nef kodierendes Gen
Nef	<i>negative factor</i> , akzessorisches HIV-Protein
NRTI	nukleosidischer RT Inhibitor
NNRTI	nicht-nukleosidischer RT Inhibitor
O	
oD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
P	
ψ	<i>packaging signal</i> , Verpackungssignal
p	Plasmid
P	Prolin
p6	p6-Protein
p7	Nucleocapsidprotein
p17	Matrixprotein
p24	Capsidprotein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoeithrin
pers.	persönlich(e)
PI	Proteaseinhibitor
PIC	<i>pre integration complex</i> , Präintegrationskomplex
PO	Peroxidase
<i>pol</i>	für die viralen Enzyme kodierendes Gen

Pol	Polymerase, virale Enzyme
PR	Protease
R	
R	Arginin
R5	CCR5
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
<i>rev</i>	für Rev kodierendes Gen
Rev	Rev-Protein, regulatorisches HIV-Protein
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RRE	<i>Rev-responsive element</i>
RT	Reverse Transkriptase, reverse Transkription
S	
s.	siehe
S	Serin
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sel	selektierte Variante
SIV	simianes Immundefizienzvirus
SP	Signalpeptid
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SU	<i>surface</i> , Oberflächenuntereinheit, gp120

T

T	Thymidin, Threonin
Tab.	Tabelle
<i>tat</i>	für Tat kodierendes Gen
Tat	<i>trans-activator of transcription</i> , regulatorisches HIV-Protein
TM	Transmembranuntereinheit, gp41
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA

U

U	<i>unit</i> , Enzymeinheit
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett

V

v/v	<i>volume per volume</i> , Volumenverhältnis
V	Valin
V1-V5	variable Regionen 1-5
<i>vif</i>	für Vif kodierendes Gen
Vif	<i>viral infectivity factor</i> , akzessorisches HIV-Protein
VIS	<i>visual light</i> , sichtbares Licht
<i>vpr</i>	für Vpr kodierendes Gen
Vpr	virales Protein R, akzessorisches HIV-Protein
<i>vpu</i>	für Vpu kodierendes Gen
Vpu	virales Protein U, akzessorisches HIV-Protein

<i>vpx</i>	für Vpx kodierendes Gen
Vpx	virales Protein X, akzessorisches HIV-Protein
VSV-G	Glykoprotein des vesikulären Stomatitis-Virus

W

W	Tryptophan
wt	Wildtyp

X

X4	CXCR4
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid

Y

Y	Tyrosin
---	---------

Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

Inhalt

Danksagung	I
Zusammenfassung	II
Summary	III
Abkürzungen	IV
Inhalt	XII
1. Einleitung	1
1.1. Das humane Immundefizienzvirus	1
1.1.1. Phylogenie und Verbreitung von HIV	2
1.1.2. Genomorganisation und Morphologie von HIV-1	3
1.1.2.1. <i>Genomorganisation</i>	3
1.1.2.2. <i>Morphologie</i>	5
1.1.3. Replikation von HIV-1	7
1.1.4. Eintritt von HIV-1 in die Wirtszelle	9
1.1.4.1. <i>Das HIV-1-Hüllprotein</i>	9
1.1.4.2. <i>Rezeptoren und Zelltropismus</i>	12
1.1.4.3. <i>Ablauf des Viruseintritts</i>	13
1.2. Antiretrovirale Therapie	15
1.2.1. Verlauf der HIV-Infektion ohne Therapie	15
1.2.2. Hochaktive antiretrovirale Therapie	17
1.2.2.1. <i>Wirkmechanismen antiretroviraler Substanzen</i>	18
1.2.2.2. <i>Therapieziele</i>	19
1.2.2.3. <i>Therapieversagen und Resistenz</i>	20
1.2.3. Neue antiretrovirale Substanzen	22
1.2.4. Gentherapie	23

1.3. Aufgabenstellung	24
1.3.1. Hintergrund.....	24
1.3.1.1. <i>Therapie mit T-20</i>	24
1.3.1.2. <i>Membranverankerte Fusionsinhibitoren</i>	25
1.3.1.3. <i>Resistenz gegen T-20</i>	26
1.3.2. Zielsetzung	27
1.3.2.1. <i>Hemmung der HIV-Infektion durch subtypspezifische</i> <i>membranverankerte Fusionsinhibitoren</i>	27
1.3.2.2. <i>Selektion und Charakterisierung von resistenten</i> <i>HIV-1-Varianten</i>	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1. Geräte	29
2.1.2. Chemikalien.....	29
2.1.3. Verbrauchsmaterial	30
2.1.4 Puffer und Lösungen	30
2.1.5. Reagenzien und Reagenziensets.....	31
2.1.6. Enzyme	32
2.1.7. Oligonukleotide.....	32
2.1.8. Antikörper	34
2.1.9. Plasmide.....	35
2.1.10 Nährmedien	36
2.1.11. Bakterien	36
2.1.12. Eukaryotische Zellen	37
2.1.13. HIV-Isolate.....	38
2.1.14. Software	39

2.2. Methoden	39
2.2.1. Arbeiten mit Bakterien und DNA.....	39
2.2.1.1. <i>Analytische Plasmidisolierung aus E. coli (Miniprep)</i>	39
2.2.1.2. <i>Präparative Plasmidisolierung aus E. coli (Maxiprep)</i>	40
2.2.1.3. <i>DNA-Konzentrationsbestimmungen</i>	40
2.2.1.4. <i>Isolierung von RNA aus Virusstocks</i>	40
2.2.1.5. <i>DNA-Restriktion</i>	40
2.2.1.6. <i>DNA-Dephosphorylierung</i>	41
2.2.1.7. <i>DNA-Ligation</i>	41
2.2.1.8. <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	41
2.2.1.9. <i>nested PCR</i>	42
2.2.1.10. <i>RT-PCR</i>	42
2.2.1.11. <i>Primerverlängerung zur Erzeugung doppelsträngiger DNA</i>	42
2.2.1.12. <i>Agarosegelelektrophorese</i>	43
2.2.1.13. <i>Extraktion von DNA aus Agarosegelen</i>	43
2.2.1.14. <i>Reinigung von DNA-Fragmenten</i>	43
2.2.1.15. <i>Klonierung rekombinanter DNA-Plasmide</i>	43
2.2.1.16. <i>Klonierung von pM87o-A und pM87o-C</i>	44
2.2.1.17. <i>TOPO-Klonierung</i>	45
2.2.1.18. <i>in vitro Mutagenese</i>	45
2.2.1.19. <i>DNA-Sequenzierung</i>	45
2.2.1.20. <i>Herstellung transformationskompetenter E. coli Bakterien</i>	45
2.2.1.21. <i>Transformation kompetenter E. coli Bakterien</i>	46
2.2.1.22. <i>E. coli Flüssigkulturen</i>	46
2.2.1.23. <i>E. coli Dauerkulturen</i>	46
2.2.2. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen und Viren	47
2.2.2.1. <i>Kultur und Passage von adhäsiven Zelllinien</i>	47
2.2.2.2. <i>Kultur und Passage von Suspensionszelllinien</i>	47
2.2.2.3. <i>Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen</i>	47
2.2.2.4. <i>Bestimmung der Zellzahl</i>	48

2.2.2.5. <i>Transfektion eukaryotischer Zellen</i>	48
2.2.2.6. <i>Transduktion von PM-1 Zellen</i>	48
2.2.2.7. <i>Transduktion von TZM-bl Zellen</i>	49
2.2.2.8. <i>Nachweis der Fusionsinhibitorexpression</i> <i>mittels FACS</i>	49
2.2.2.9. <i>Nachweis der Rezeptorexpression mittels FACS</i>	50
2.2.2.10. <i>Quantifizierung der Fusionsinhibitorexpression</i> <i>mittels FACS</i>	50
2.2.2.11. <i>Vermehrung von HIV-Isolaten</i>	51
2.2.2.12. <i>Generierung von HIV-Partikeln mittels Transfektion</i>	51
2.2.2.13. <i>Konzentrierung von HIV-Partikeln</i>	51
2.2.2.14. <i>Titration</i>	52
2.2.2.15. <i>p24-ELISA</i>	52
2.2.2.16. <i>Bestimmung der Luziferaseaktivität</i>	53
2.2.2.17. <i>Selektion von Fusionsinhibitor-resistenten</i> <i>HIV-1 Varianten</i>	53
2.2.2.18. <i>Replikationskinetiken</i>	54
2.2.2.19. <i>Bestimmung der HIV-Infektivität in Gegenwart von</i> <i>membranverankerten Fusionsinhibitoren</i>	54
2.2.2.20. <i>T-20 Inhibitionsassay</i>	55
2.2.2.21. <i>Fitnessassay</i>	55
3. Ergebnisse	56
3.1. Expression von membranverankerten Fusionsinhibitoren	56
3.1.1. <i>Sequenzen der Fusionsinhibitoren</i>	56
3.1.2. <i>Transduktion und Selektion der Zellen</i>	57
3.1.3. <i>Nachweis der Expression</i>	58
3.1.4. <i>Quantifizierung der Expression</i>	60

3.2. Inhibition der HIV-Infektion durch subtypspezifische	
C46-Derivate	62
3.2.1. Inhibition der HIV-Infektion durch C46-B	62
3.2.2. Inhibition der HIV-Infektion durch C46-A	65
3.2.3. Inhibition der HIV-Infektion durch C46-C	66
3.3. Resistenz gegen membranverankerte Fusionsinhibitoren	68
3.3.1. Selektion von resistenten HIV-1 Varianten	69
3.3.1.1. <i>Infektion von PM-1 (-A, -B, -C) Zellen mit</i>	
<i>HIV-1-Isolaten</i>	<i>69</i>
3.3.1.2. <i>Infektion von PM-1 (-A, -B, -C) Zellen mit T-20</i>	
<i>insensitiven HIV-1-Klonen</i>	<i>69</i>
3.3.1.3. <i>Infektion von TZM-bl (-A, -B, -C) Zellen mit</i>	
<i>HIV-1-Isolaten</i>	<i>70</i>
3.3.1.4. <i>Infektion von PM-1/M87 Zellen mit BaL und NL4.3</i>	<i>70</i>
3.3.1.5. <i>Infektion von PM-1/M87 Zellen mit HIV-1 Isolaten</i>	<i>72</i>
3.3.1.6. <i>Infektion von PM-1/C46-B Zellen mit den selektierten</i>	
<i>BaL- und NL4.3-Varianten.....</i>	<i>72</i>
3.3.2. Charakterisierung der Fusionsinhibitorresistenz der	
PM-1/M87-selektierten Varianten	73
3.3.2.1. <i>Replikation in Gegenwart membranverankerter</i>	
<i>Fusionsinhibitoren</i>	<i>73</i>
3.3.2.2. <i>Infektivität in Gegenwart membranverankerter</i>	
<i>Fusionsinhibitoren</i>	<i>75</i>
3.3.2.3. <i>Infektivität in Gegenwart von löslichem T-20</i>	<i>77</i>
3.3.3. Bestimmung der resistenzvermittelnden Faktoren.....	78
3.3.3.1. <i>Sequenzanalyse der Hüllproteine der PM-1/M87-</i>	
<i>selektierten HIV-Varianten</i>	<i>78</i>
3.3.3.2. <i>Generierung von mit Env-Punktmutanten</i>	
<i>pseudotypisierten HIV-Partikeln</i>	<i>81</i>
3.3.3.3. <i>Infektivität der pseudotypisierten HIV-Partikel in</i>	
<i>Gegenwart membranverankerter Fusionsinhibitoren</i>	<i>81</i>

3.3.3.4. <i>Infektivität der pseudotypisierten HIV-Partikel in Gegenwart von löslichem T-20</i>	85
3.3.3.5. <i>Relative Fitness von rekombinaten HI-Viren</i>	87
4. Diskussion	91
4.1. Inhibition der HIV-Infektion durch membranverankerte Fusionsinhibitoren	92
4.1.1. Inhibition der HIV-Infektion durch C46-B	93
4.1.2. Vergleich der antiretroviralen Wirkung von C46-A, C46-B und C46-C.....	94
4.2. Resistenz gegen membranverankerte Fusionsinhibitoren	98
4.2.1. Selektion und Charakterisierung von resistenten HIV-1-Varianten.....	98
4.2.2. Bestimmung der resistenzvermittelnden Faktoren und ihr Einfluss auf die virale Fitness.....	101
5. Literatur	105

1. Einleitung

Ende 2004 waren laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) fast 40 Millionen Menschen weltweit mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) infiziert. Davon steckten sich ca. 4.9 Millionen Menschen im vergangenen Jahr an. Etwa 3.1 Millionen Menschen starben im Jahr 2004 an der erworbenen Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*). Damit ist AIDS weltweit die häufigste Todesursache unter den Infektionskrankheiten.

Mehr als die Hälfte der HIV-Infizierten (ca. 25.4 Millionen Menschen) lebt in Afrika südlich der Sahara. Die durchschnittliche Prävalenz liegt hier in der erwachsenen Bevölkerung (15-49 Jahre) bei 7.4%, wobei in den am stärksten betroffenen Gebieten bis zu 40% der Erwachsenen infiziert sind. In West- und Zentraleuropa beträgt die durchschnittliche Prävalenz in der erwachsenen Bevölkerung 0.3%, in Nordamerika 0.6% (UNAIDS, 2004).

1.1. Das humane Immundefizienzvirus

1981 wurden erstmals Fälle einer schweren erworbenen Immundefizienz beschrieben, die mit schlechtem Allgemeinzustand und verschiedenen opportunistischen Infektionen wie *Pneumocystis carinii*-Pneumonien und seltenen malignen Tumoren wie Kaposi Sarkomen einhergeht (Gottlieb *et al.*, 1981; Masur *et al.*, 1981; Schroff *et al.*, 1983). Dieses Krankheitsbild wurde als AIDS bezeichnet.

Wenig später wurden aus AIDS-Patienten bis zu diesem Zeitpunkt unbekannte Retroviren isoliert (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1984), die aufgrund der großen Sequenzhomologie unter der Bezeichnung HIV zusammengefasst wurden (Coffin *et al.*, 1986; Hahn *et al.*, 1984; Ratner *et al.*, 1985). 1986 wurde aus einem westafrikanischen AIDS-Patienten ein weiteres Virus isoliert, dass sich von den bis dahin bekannten Isolaten unterschied (Clavel *et al.*, 1986a; Clavel *et al.*, 1986b). Dieses Virus wurde HIV-2 genannt, um es von den zuvor isolierten Viren (HIV-1) abzugrenzen.

1.1.1. Phylogenie und Verbreitung von HIV

HIV ist ein Retrovirus und gehört zur Familie der Lentiviren. Lentiviren zeichnen sich durch eine der Infektion folgende lange klinische Latenzphase aus (Rubbert, 2004). Neben den humanen Lentiviren HIV-1 und HIV-2 existieren Lentiviren, die andere Primaten (simiane Immundefizienzviren, SIV) aber auch Nichtprimaten (z.B. felines Immundefizienzvirus, FIV) infizieren (Clapham und McKnight, 2002).

Da die aus verschiedenen infizierten Personen isolierten Viren große Sequenzunterschiede aufweisen, teilt man HIV-1-Isolate in drei phylogenetische Gruppen ein. Die meisten Isolate gehören zur Gruppe M (*main group*), die zusätzlich in zehn Subtypen (A-J) unterteilt wird. Die Isolate dieser Subtypen sind global verbreitet, wobei in Europa und Nordamerika hauptsächlich Isolate des Subtyps B, in Afrika hauptsächlich Isolate der Subtypen A und C vorkommen (Stebbing und Moyle, 2003;

Wainberg, 2004). Viren der Gruppen O (*outliner*) und N (*non-M/non-O*) sind seltener und treten hauptsächlich in Zentralafrika auf (Gao *et al.*, 1999; Gürtler *et al.*, 1996).

Auch die Sequenzen der verschiedenen HIV-2-Isolate weisen große Unterschiede auf und werden deswegen in sechs Subtypen (A-F) eingeteilt. HIV-2-Isolate kommen überwiegend in Westafrika vor (Gao *et al.*, 1994; Norrgren *et al.*, 1997).

1.1.2. Genomorganisation und Morphologie von HIV-1

Wie alle Retroviren besitzt HIV-1 ein einzelsträngiges (+)RNA-Genom, das in einem von einer Membranhülle umgebenen Capsid vorliegt.

1.1.2.1. Genomorganisation

Das HIV-1-Genom (s. Abb. 1.1) besteht aus zwei linearen RNA-Einzelsträngen von je ungefähr 9 kb Länge, die durch eine Dimerisierungsstelle miteinander verbunden sind (Frankel und Young, 1998; Paillart *et al.*, 1996). Die virale RNA weist mit der Polyadenylierung am 3'-Ende und der Cap-Struktur am 5'-Ende die Charakteristika zellulärer mRNA auf. In der Nähe des 5'-Endes der viralen RNA befinden sich das Verpackungssignal Ψ , das für die Inkorporation der genomischen RNA in das Virion essentiell ist, und eine Primerbindungsstelle, an die eine Lysyl-tRNA gebunden ist, die als Primer für die Reverse Transkriptase fungiert (Clever und Parslow, 1997; Frankel und Young, 1998; Oude Essink *et al.*, 1996).

Der Regulation von reverser Transkription und Integration dienen Kontrollsequenzen, die die kodierende Region der viralen RNA beiderseits flankieren. Während der reversen Transkription entstehen am 3'- und 5'-Ende der viralen DNA Sequenzwiederholungen, die *long terminal repeats* (LTR). Sie enthalten verschiedene regulatorische Elemente wie Promotoren und *enhancer*, die eine entscheidende Rolle bei der Transkription des Provirus spielen. Die durch die im 5'-LTR beginnende und im 3'-LTR endende Transkription der proviralen DNA entstehenden RNA-Moleküle dienen entweder als genomische RNA für neu produzierte Partikel oder als mRNA (Freed und Martin, 2001).

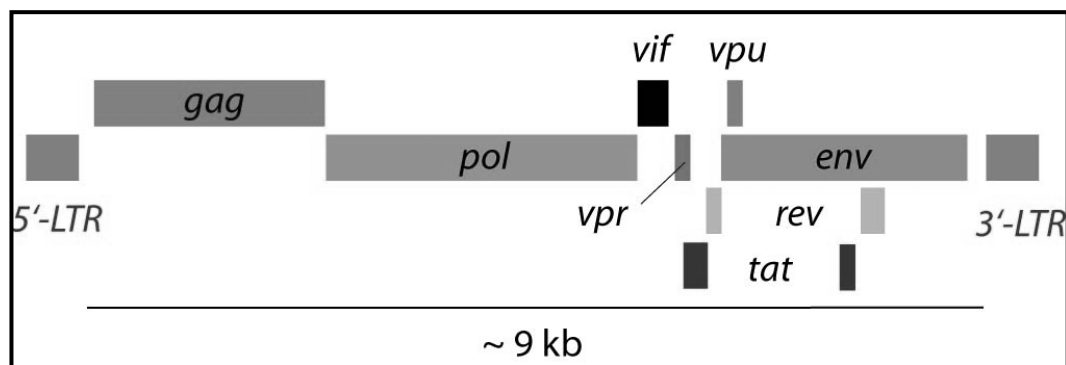


Abb. 1.1: Genomorganisation von HIV-1.

Dargestellt ist die provirale DNA (verändert nach Knipe *et al.*, 2001).

Die ungespleißte Variante der mRNA dient der Translation des *gag/pol*-ORF. Dabei entstehen in 90-95% der Fälle Gag-Vorläuferproteine, die während der Reifung der Viruspartikel in die Strukturproteine Matrix (MA, p17), Capsid (CA, p24), Nukleocapsid (NC, p7) und p6 gespalten werden. In den übrigen 5-10% der Fälle wird das Stopp-Codon von *gag* durch eine Verschiebung des Leserasters übersprungen, wodurch

Gag/Pol-Fusionsproteine entsteht (Cassan *et al.*, 1994; Jacks *et al.*, 1988). Diese dienen als Vorläuferprotein für die viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Die Translation aller anderen viralen Proteine erfolgt von verschiedenen Spleißvarianten der mRNA. Die Produkte der einfach gespleißten mRNA sind das Hüllprotein (Env) sowie die akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Vpu. Die Translation von Nef sowie der regulatorischen Proteine Tat und Rev erfolgt von mehrfach gespleißten mRNA-Molekülen (Muesing *et al.*, 1985; Purcell und Martin, 1993).

1.1.2.2. Morphologie

Infektiöse HIV-1-Partikel (s. Abb. 1.2) sind sphärisch und haben einen Durchmesser von durchschnittlich 140 nm (Gelderblom, 1991; Wyatt und Sodroski, 1998).

Die HIV-Hüllmembran stammt von der Cytoplasmamembran der letztinfizierten Wirtszelle ab. Sie enthält die viralen Hüllproteine, die aus Transmembran- (TM, gp41) und Oberflächenuntereinheiten (SU, gp120) bestehen, die durch enzymatische Proteolyse aus dem Vorläuferprotein gp160 entstehen (Freed und Martin, 1995; Gelderblom, 1991).

Die Innenseite der viralen Membran ist mit Matrixproteinen ausgekleidet. Das konische Capsid besteht aus Capsidproteinen und enthält das mit Nucleocapsidproteinen assoziierte RNA-Dimer (Luciw, 2001). Es beinhaltet auch die drei viralen Proteine, wobei PR sowohl innerhalb als auch außerhalb des Capsids vorliegt. Weitere Bestandteile der Viruspartikel sind akzessorische und regulatorische Virusproteine sowie

zelluläre Proteine wie z.B. Cyclophilin A (Franke *et al.*, 1994; Gelderblom, 1991; Luban *et al.*, 1993; Luciw, 2001).

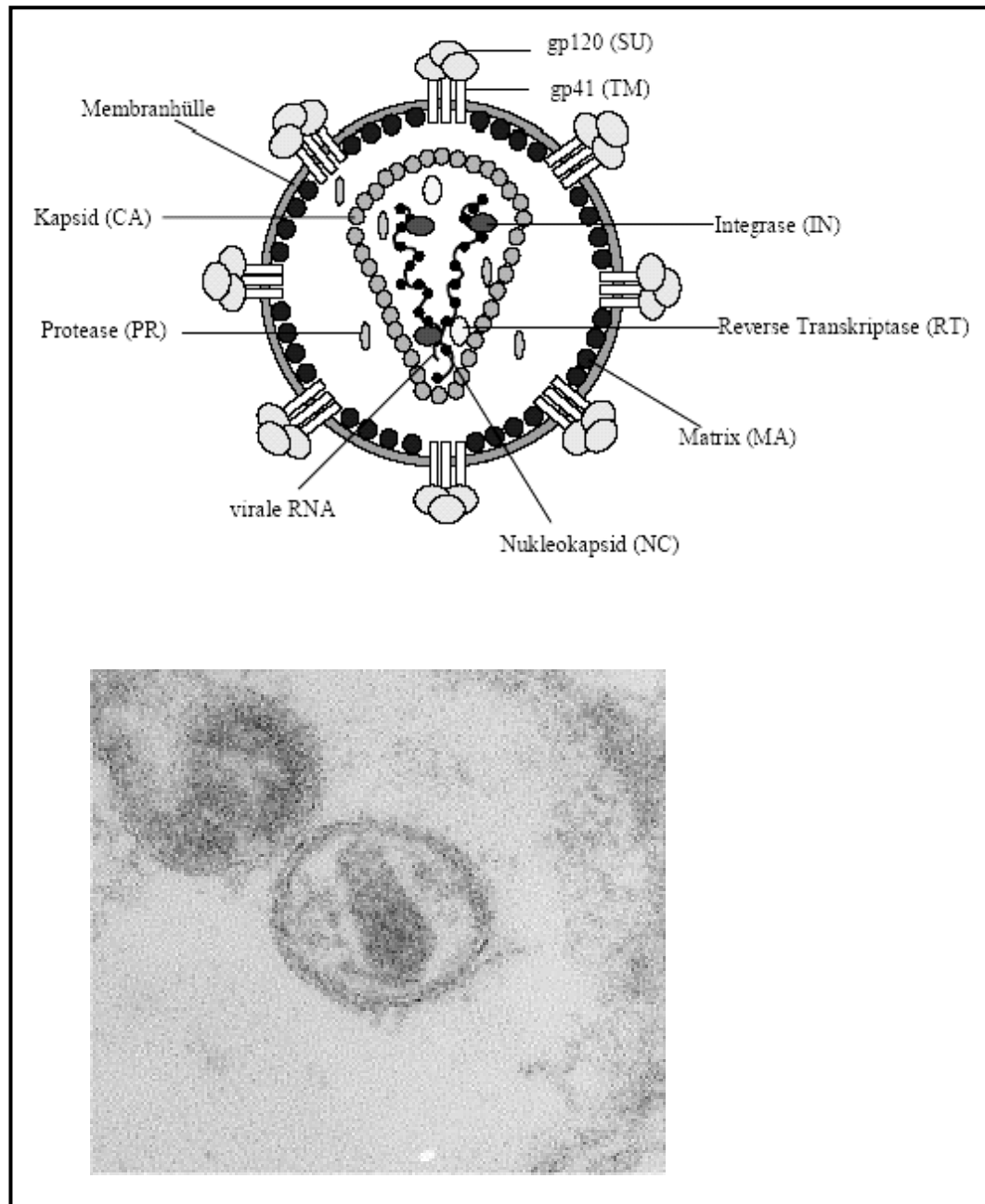


Abb. 1.2: Morphologie von HIV-1.

Oben: Schematische Darstellung eines reifen HIV-1-Partikels (Knipe *et al.*, 2001).
Unten: Elektronenmikroskopisches Bild eines reifen HIV-1-Partikels (Fackler und Geyer, 2002).

1.1.3. Replikation von HIV-1

Die Replikation von HIV-1 (s. Abb. 1.3) beginnt mit dem Eintritt des Virus in die Zielzelle (1,2), einem mehrstufigen Prozess der von gp120 und gp41 vermittelt wird und in der Fusion der viralen mit der zellulären Membran und der Freisetzung des Capsids in das Cytoplasma resultiert (Freed und Martin, 2001).

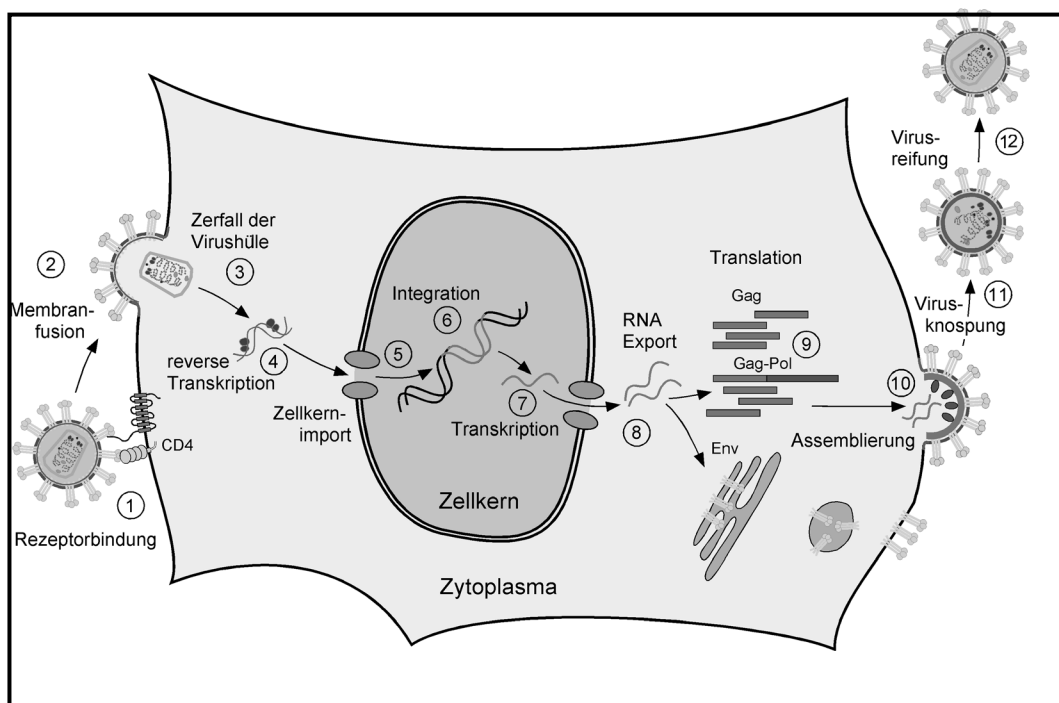


Abb. 1.3: Replikation von HIV-1.

Die einzelnen Schritte sind im Text erläutert (Fackler und Geyer, 2002).

Daraufhin zerfällt das Capsid (3) und der aus viralen und zellulären Proteinen sowie der viralen RNA bestehende Präintegrationskomplex (*pre integration complex*, PIC) wird gebildet. In diesem Komplex findet die reverse Transkription (4) der viralen RNA in doppelsträngige DNA statt

(Telesnitsky und Goff, 1997). Während oder nach *uncoating* und reverser Transkription erfolgt der Import des PIC in den Nukleus (5).

Hier katalysiert IN die Insertion der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle (Brown, 1997). Das so entstandene Provirus verhält sich im Wesentlichen wie ein zelluläres Gen und dient als *template* für die Expression viraler RNA (7), wobei die niedrige basale RNA-Syntheserate durch die Anwesenheit von Tat im Transkriptionskomplex bis zu 100fach erhöht wird (Dayton *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1986). Zunächst entstehen vollständig gespleißte mRNA-Moleküle, die der Synthese von Tat, Rev und Nef dienen (Muesing *et al.*, 1985).

Rev ist am Export von ungespleißten und unvollständig gespleißten Transkripten (8) in das Cytoplasma beteiligt. Diese dienen als *messenger* für die übrigen viralen Proteine (Pollard und Malim, 1998; Purcell und Martin, 1993). Während die Synthese von gp160 am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) stattfindet, erfolgt die Translation von *gag* und *pol* an cytosolischen Ribosomen (9).

Die Gag- und Gag/Pol-Polyproteine werden ebenso wie die RNA-Genome zur Plasmamembran transportiert, wo sie zu unreifen Viruspartikeln assemblieren (10), die durch Knospung von der Plasmamembran freigesetzt werden und dabei die Hüllproteine inkorporieren (11). Während der Reifung der Viruspartikel erfolgt die Prozessierung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine durch die virale Protease (12). Dabei kommt es zu Umlagerungen im Capsid und schließlich zur Entstehung reifer HIV-1-

Partikel (Frankel und Young, 1998). Diese können nun erneut Wirtszellen infizieren.

1.1.4. Eintritt von HIV-1 in die Wirtszelle

Vorraussetzung für die Infektion von Wirtszellen durch umhüllte Viren ist der Transfer ihrer Erbinformationen durch zelluläre und virale Membranen. Dies ist die Funktion integraler Membranproteine, die unter bestimmten Bedingungen durch eine Abfolge von Konformationsänderungen die Fusion beider Membranen vermitteln (Hernandez *et al.*, 1996). Im Fall von HIV-1 übernimmt das Glykoprotein Env diese Aufgabe.

1.1.4.1. Das HIV-1-Hüllprotein

HIV-1-Hüllproteine (s. Abb. 1.4) bestehen aus jeweils drei Transmembran- und Oberflächenuntereinheiten, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind (Earl *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1990).

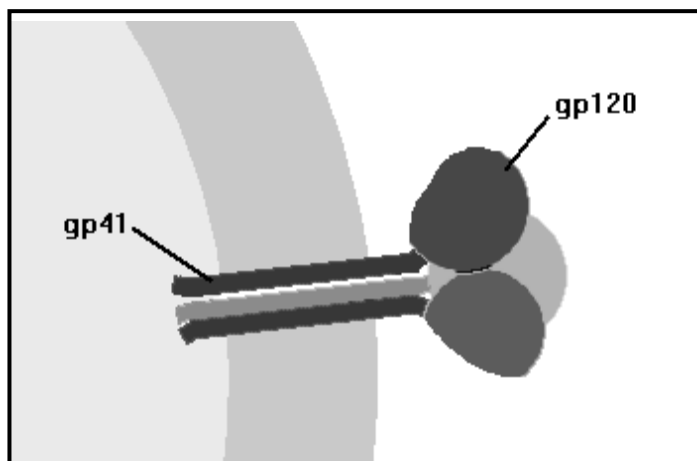


Abb. 1.4: Das HIV-1-Hüllprotein.

Schematische Darstellung des aus jeweils drei gp41- und gp120-Molekülen bestehenden HIV-1-Hüllproteins.

gp120 vermittelt die Bindung des Virus an die Plasmamembran der Wirtszelle. gp41 dagegen ist hauptsächlich für die Fusion verantwortlich (Wyatt und Sodroski, 1998).

Gleichzeitig mit der Synthese von Env als 160 kDa großes Vorläuferprotein wird es ins Lumen des rER transportiert, wo es Trimere bildet und posttranslational durch Glykosylierung und Disulfidbrückenbildung modifiziert wird (Earl *et al.*, 1991). Während des Transportes zur Plasmamembran der Wirtszelle werden die Kohlenhydratreste im Golgi-Apparat weiter modifiziert. Hier findet auch die von der zellulären Protease Furin oder verwandten Enzymen katalysierte Proteolyse von gp160 statt. (Hallenberger *et al.*, 1997; LaBranche *et al.*, 2001; McCune *et al.*, 1988).

Die Aminosäuresequenz von SU weist fünf variable Regionen (V1-V5) auf, die sich mit stärker konservierten Bereichen (C1-C6) abwechseln (Wyatt *et al.*, 1993). Letztere bilden den Kern von SU, der aus einer inneren und einer äußeren Domäne sowie dem die beiden Domänen verbindenden *bridging sheet* besteht (Kwong *et al.*, 1998). V1-V4 bilden variable Schleifen (*loops*), die durch Disulfidbrücken an ihren Basen stabilisiert werden (Leonard *et al.*, 1990). Die variablen Schleifen und die stark glykosylierten Bereiche des Kerns (u.a. die Stammbereiche der V1-V4 *loops* sowie V5) formen die Oberfläche von gp120. Besonders die V1/V2- und V3-Schleifen haben eine sehr flexible Struktur, so dass Aminosäureaustausche in diesen Bereichen toleriert werden. Da Antikörper gegen Kohlenhydratstrukturen selten sind und gegen variable

Bereiche gerichtete Antikörper, die die Selektion von Virusvarianten begünstigen, die von diesen nicht mehr erkannt werden, tragen diese Eigenschaften von SU dazu bei, dass HIV-1 vom menschlichen Immunsystem nicht eradikiert wird (Kwong *et al.*, 1998; Wyatt *et al.*, 1998). Für die Interaktion von SU mit TM sind hauptsächlich Aminosäuren innerhalb der konservierten Bereiche am Amino- und Carboxyterminus des Proteins zuständig. In TM ist eine Region, die carboxyterminal vom Fusionspeptid (s.u.) liegt für die Interaktion mit SU verantwortlich (Cao *et al.*, 1993; Helseth *et al.*, 1991).

TM ist ein integrales Typ-1-Membranprotein, das aus der auf der Membranaußenseite liegenden, aminoterminalen Ectodomäne, der Transmembrandomäne und dem cytoplasmatischen, carboxyterminalen *tail* besteht (Eckert und Kim, 2001). Innerhalb der Ectodomäne liegt eine glycinreiche, hydrophobe Region, das sogenannte Fusionspeptid und zwei ebenfalls hydrophobe 4,3 *heptad repeats* (HR1 und HR2). Dazwischen befindet sich eine *loop*-Region, die zwei Cysteine enthält (Delwart *et al.*, 1990).

Im Gegensatz zu gp120 ist die Aminosäuresequenz von gp41 stark konserviert. Besonders im Bereich von HR1 und HR2 treten nur wenige Variationen (Chan und Kim, 1998). Es wird vermutet, dass gp41 in mindestens zwei verschiedenen Hauptkonformationen vorkommt (Chan *et al.*, 1997). Auf der Oberfläche von freien Virionen liegt es in der nativen, nicht fusogenen Konformation vor. Die fusionsaktive Konformation von gp41 entsteht durch von gp120-CD4 Interaktionen während der Anheftung

des Virus an die Wirtszelle hervorgerufene Konformationsänderungen. Dabei wird u. a. das Fusionspeptid freigelegt (Chan *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1998). In der fusionsaktiven Konformation bilden die *heptad repeat*-Regionen ein α -helikales Trimer aus antiparallel angeordneten HR1/HR2-Dimeren, das sogenannte sechs-Helix-Bündel (Chan *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997).

1.1.4.2. Rezeptoren und Zelltropismus

HIV-1 infiziert vor allem T-Helfer-Zellen und Makrophagen. Dieser enge Zelltropismus wird von den Oberflächenrezeptoren bestimmt, die für den Viruseintritt essentiell sind (Clapham und McKnight, 2002).

Der Hauptrezeptor des HIV-1-Hüllproteins ist das Zelloberflächenprotein CD4 (Klatzmann *et al.*, 1984). CD4 gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und wird hauptsächlich von T-Helfer-Zellen exprimiert. Es interagiert mit MHC Klasse II Molekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen und unterstützt so die Erkennung von Antigenen. Andere Zelltypen von denen CD4 exprimiert wird sind z.B. Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen (Clapham und McKnight, 2002; Janeway, 1992).

Die wichtigsten Corezeptoren für den Zelleintritt von HIV-1 sind die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 (Deng *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996). HI-Viren, die CXCR4 als Corezeptor nutzen, bezeichnet man als X4-trope Viren. Sie infizieren hauptsächlich T-Helfer-Zellen. HI-Viren, die CCR5 als Corezeptor verwenden und zusätzlich Makrophagen infizieren, nennt man R5-trope Viren. Als dualtrope Viren bezeichnet man solche, die beide Corezeptoren nutzen (Berger *et al.*, 1998). Die Corezeptorspezifität

wird durch den *V3-loop* und, in geringerem Ausmaß, durch die *V1/V2*-Region bestimmt (Cho *et al.*, 1998). Neben CXCR4 und CCR5 sind weitere Corezeptoren bekannt, die verschiedenen HIV-1-Stämmen die Infektion bestimmter Zellen *in vitro* ermöglichen, deren *in vivo* Relevanz aber unklar ist (Berger *et al.*, 1999).

1.1.4.3. Ablauf des Viruseintritts

Der Eintrittsprozess kann in drei Abschnitte unterteilt werden: 1) die Anheftung an die Oberfläche der Zielzelle, die CD4-Bindung und daraus resultierende Konformationsänderungen in gp120; 2) die Corezeptorbindung und daraus resultierende Konformationsänderungen in gp41 und 3) die Fusion der viralen mit der zellulären Membran (Doms und Trono, 2000).

Essentiell für die Fusion der viralen mit der zellulären Membran ist die Interaktion von gp120 mit CD4. Die initiale Anheftung von HIV-1 an die Zelloberfläche kann jedoch auch durch die Interaktion von gp120 mit verschiedenen Molekülen wie Heperansulfaten, Gal-C oder den Membranproteine DC-SIGN und DC-SIGNR erfolgen (Curtis *et al.*, 1992; Harouse *et al.*, 1991; Mondor *et al.*, 1998; Pohlmann *et al.*, 2001). Dies ist wahrscheinlich besonders bei der Infektion von Zellen relevant, die wie Makrophagen oder dendritische Zellen nur geringe Mengen an CD4 exprimieren (Ugolini *et al.*, 1999).

Die Bindung von gp120 an CD4 verursacht Konformationsänderungen in gp120, die die Bindung des Corezeptors ermöglichen. So verändert sich z.B. die Position der variablen Regionen *V1/V2* sowie *V3*, wodurch das

bridging sheet exponiert bzw. gebildet wird, welches konservierte Aminosäuren enthält, die die Corezeptorbindestelle bilden (Kwong *et al.*, 1998; Rizzuto und Sodroski, 2000; Wyatt *et al.*, 1998).

Die Interaktion zwischen gp120 und dem Chemokinrezeptor ruft Konformationsänderungen in gp41 hervor, die zur Bildung der fusionsaktiven Form von gp41 (s.o.) führen. Es wird vermutet, dass gp120 als eine Art Klammer fungiert, die gp41 in seiner fusionsinaktiven Form hält. Durch die Bindung von gp120 an Rezeptor und Corezeptor verändert sich die gp120-gp41-Interaktion wodurch gp41 freigegeben und die Fusion induziert wird (Doms und Moore, 2000).

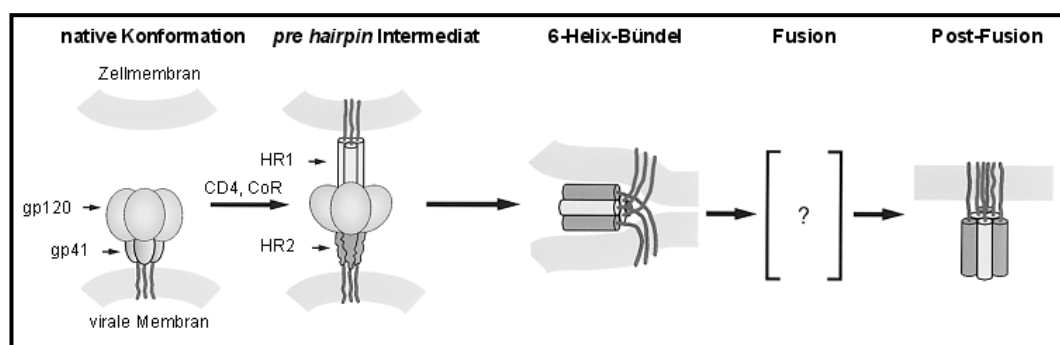


Abb. 1.5: Fusion von HIV-1.

Schematische Darstellung des Fusionsprozesses. Die einzelnen Schritte sind im Text erklärt. CoR: Corezeptor (verändert nach Chan und Kim, 1998).

Die Fusion der viralen Membran (s. Abb. 1.5) mit der Plasmamembran der Wirtszelle beginnt mit der Insertion des Fusionspeptids in die zelluläre Membran, wodurch gp41 zu einem integralen Membranprotein in zwei verschiedenen Membranen wird (LaBranche *et al.*, 2001; Weissenhorn *et al.*, 1997). Dieses *pre-hairpin*-Intermediat ist thermodynamisch relativ stabil (Chan und Kim, 1998). Die drei HR1-Regionen des

rezeptorgebundenen Env-Trimers bilden im nächsten Schritt durch Interaktion mit den drei HR2-Regionen das stabile sechs-Helix-Bündel. Durch die Bildung dieser sogenannten Haarnadelstruktur werden die beiden Membranen in die für die Fusion erforderliche räumliche Nähe gebracht (Chen *et al.*, 1995; Gallo *et al.*, 2003; LaBranche *et al.*, 2001). Die bei der Bildung des sechs-Helix-Bündels freiwerdende Energie wird für die thermodynamisch ungünstige Membranfusion genutzt (Melikyan *et al.*, 2000).

1.2. Antiretrovirale Therapie

1.2.1. Verlauf der HIV-Infektion ohne Therapie

Die HIV-Infektion (s. Abb. 1.6) verläuft in drei Phasen: 1) die akute Phase, 2) die asymptomatische Phase und 3) die symptomatische Phase (Levy, 1998). In der akuten Phase der HIV-Infektion produzieren aktivierte T-Zellen große Mengen des Virus, was zu mononukleoseähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen, Unwohlsein, Lymphadenopathie, Hautausschlag etc. führen kann (Cooper *et al.*, 1985; Embretson *et al.*, 1993; Kahn und Walker, 1998). In dieser bis zu drei Monate dauernden Phase können bis zu 10^7 Kopien der viralen RNA pro Milliliter Plasma nachgewiesen werden. Die Zahl der CD4-positiven T-Zellen nimmt in dieser Zeit ab, steigt aber in der asymptomatischen Phase wieder an (Altfeld und Walker, 2004).

In der asymptomatischen oder Latenzphase, die im Normalfall mehrere Jahre dauert, treten neben selten vorkommender persistierender Lymphadenopathie meist keine Symptome auf. Die Viruslast während der Latenz ist individuell sehr unterschiedlich, liegt zwischen 10^3 und 10^6 Kopien/ml und bleibt auch ohne Therapie weitgehend stabil (Kamps, 2004; Richman, 2001). Dieser Wert wird als viraler Setpoint bezeichnet. Die Geschwindigkeit, mit der die Zahl der CD4-positiven Zellen abnimmt und damit der Progression zu AIDS korreliert mit der Höhe des viralen Setpoints (Carpenter *et al.*, 2000; Mellors *et al.*, 1997).

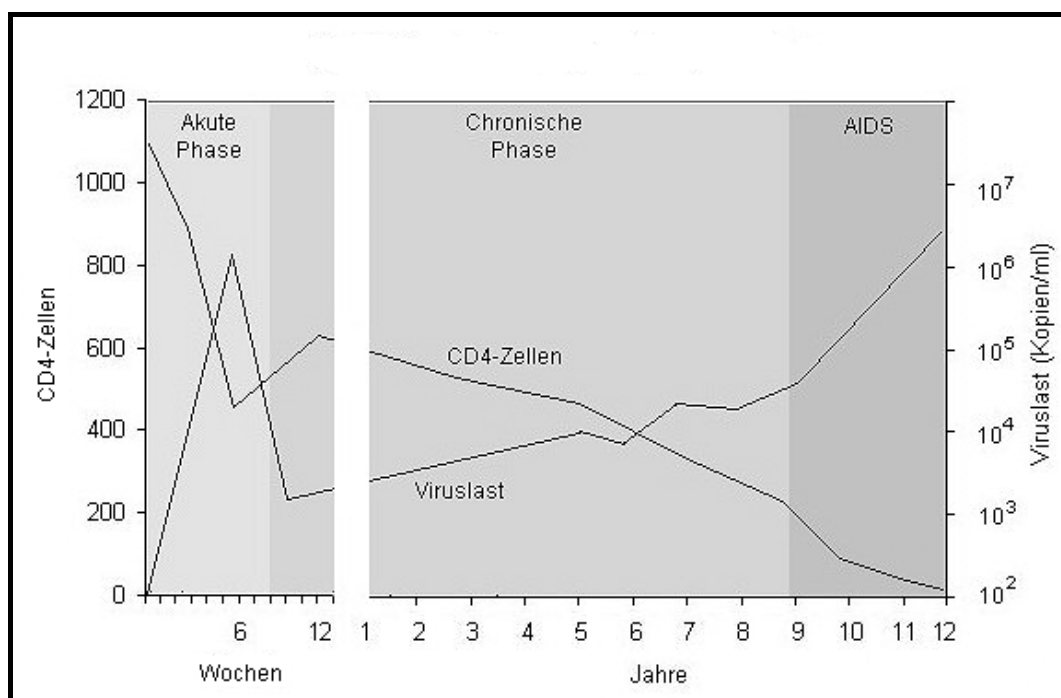


Abb. 1.6: Verlauf der HIV-Infektion ohne Therapie.

Dargestellt sind die Anzahl der CD4-positiven T-Zellen und die Viruslast (Kamps, 2004).

Während der symptomatischen Phase steigt die Viruslast kontinuierlich an und die Anzahl der CD4-positiven T-Zellen sinkt weiter. Zunächst treten

Symptome und opportunistische Infektionen auf, die zwar ursächlich auf die HIV-Infektion zurückgehen, aber noch nicht als AIDS-definierend gelten. Dazu gehören z.B. Fieber, langanhaltende Diarrhö, orale Haarleukoplakie und Listeriose. Sinkt die Zahl der CD4-positiven T-Zellen unter 200 pro Mikroliter Plasma treten AIDS-definierende Erkrankungen wie z.B. CMV-Infektionen, HIV-bedingte Enzephalopathie, Kaposi Sarkome und *Pneumocystis*-Pneumonien auf (Moylett und Shearer, 2002; Richman, 2001). Dies geschieht im Mittel acht bis zehn Jahre nach der Infektion. Ohne Therapie sterben die meisten HIV-Infizierten zwei bis vier Jahre nach dem Auftreten erster AIDS-definierender Erkrankungen. (Kamps, 2004).

1.2.2. Hochaktive antiretrovirale Therapie

1987 wurde mit dem Nucleosidanalogen AZT der antivirale Wirkstoff für die Therapie von HIV-Infizierten zugelassen (Hoffmann, 2004a). Allerdings wurde bald deutlich, dass die Monotherapie mit AZT für die Patienten kaum langfristige Vorteile brachte (Hamilton *et al.*, 1992). In den Jahren 1991 bis 1994 wurden drei weitere nukleosidische RT-Inhibitoren (NRTI) zugelassen und es wurde deutlich, dass eine Kombination mehrerer antiretroviraler Wirkstoffe sinnvoll ist (Delta, 1996; Hammer *et al.*, 1996). Jedoch machte die antiretrovirale Therapie erst nach der Zulassung der ersten Proteaseinhibitoren (PI) und des ersten nicht-nukleosidischen RT-Inhibitors (NNRTI) 1995 und 1996 durch die Kombination der verschiedenen Wirkstoffklassen signifikante Fortschritte. Zwischen 1994

und 1998 sank die AIDS-Inzidenz in Westeuropa um mehr als 90% (Mocroft *et al.*, 2000). Die Kombinationstherapie gegen HIV wird auch als hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) bezeichnet.

Derzeit stehen für die Behandlung der HIV-Infektion 20 Substanzen aus vier Wirkstoffklassen (NRTIs, NNRTIs, PIs und ein Fusionsinhibitor) zur Verfügung. Normalerweise werden drei oder mehr Wirkstoffe gleichzeitig verwendet, wobei meist ein aus zwei NRTIs bestehendes *backbone* mit einem NNRTI oder einem PI kombiniert wird. Andere Kombinationen sind aber ebenso denkbar und der Therapieerfolg ist von der individuellen Anpassung an den jeweiligen Patienten abhängig (Hoffmann, 2004a; Marcus *et al.*, 2002).

1.2.2.1. Wirkmechanismen antiretroviraler Substanzen

Alle NRTIs werden erst nach intrazellulärer Phosphorylierung zu 5'-Triphosphaten aktiv. Ihnen fehlt die 3'-Hydroxygruppe wodurch es bei der Elongation der viralen DNA während der reversen Transkription zum Kettenabbruch kommt (Richman, 2001). NNRTIs sind polyzyklische Substanzen, die in der Nähe des aktiven Zentrums an die RT binden und so die katalytische Aktivität des Enzyms herabsetzen (Kohlstaedt *et al.*, 1992).

PIs sind peptidähnliche Substanzen, die an das aktive Zentrum der viralen Protease binden, von ihr aber nicht gespalten werden können. Auf diese Weise wird die Reifung der Viruspartikel verhindert (Eron, 2000).

Der Fusionsinhibitor T-20 (s. Abb. 1.7) ist ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Peptid, dessen Sequenz von der HR2-Region in gp41

abgeleitet ist. Man geht davon aus, dass der HIV-Eintritt in die Wirtszelle durch T-20 gehemmt wird, indem es an die HR1-Regionen im *pre-hairpin*-Intermediat bindet und so die Membranfusion verhindert (Kilgore *et al.*, 2003; Wild *et al.*, 1995).

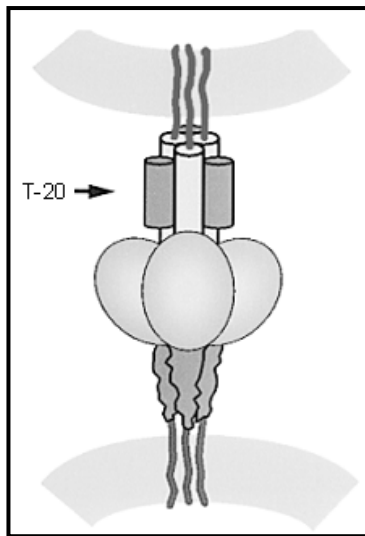


Abb. 1.7: Wirkmechanismus von T-20.

Durch die Bindung von T-20-Peptiden an die HR1-Regionen von gp41 wird die Fusion verhindert. Das inhibierte gp41-Intermediat ist schematisch dargestellt (verändert nach Chan und Kim, 1998).

1.2.2.2. Therapieziele

Die Kombinationstherapie führt zu einer signifikanten Abnahme der Viruslast, im Idealfall bis unter die Nachweisgrenze von 50 Kopien/ml, (virologischer Therapieerfolg), zu einem Anstieg bzw. Gleichbleiben der CD4⁺-Zellzahl (immunologischer Therapieerfolg) und daraus resultierend zum klinischen Therapieerfolg, d.h. vor allem zur Vermeidung bzw. Rückbildung von AIDS (Grabar *et al.*, 2000; Marcus *et al.*, 2002; Piketty *et al.*, 2001). Eine Eradikation des Virus ist bisher trotz langfristiger

Suppression der viralen Replikation nicht möglich. Der wesentliche Grund hierfür sind latent infizierten Zellen, die wahrscheinlich ein lebenslang bestehendes Reservoir bilden, so dass die virale Replikation wieder einsetzt, sobald die Inhibition wegfällt. In diesen Zellen, in denen die provirale DNA Teil des Zellgenoms bildet, findet auch nach jahrelanger Kontrolle der Viruslast auf unter 50 Kopien/ml noch virale Transkription statt (Chun *et al.*, 1998; Finzi *et al.*, 1999; Saksena und Potter, 2003). Die primären Ziele der antiretroviralen Therapie sind deshalb die Reduzierung der HIV bedingten Mortalität und Morbidität sowie die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten (Hoffmann, 2004b).

1.2.2.3. Therapieversagen und Resistenz

Resistente HIV-Varianten stellen eines der Hauptprobleme für den Erfolg der antiretroviralen Therapie dar und führen häufig zum Therapieversagen.

Charakteristisch für die HIV-Infektion ist die hohe Virusproduktion, durch die täglich ca. 10 Millionen Partikel entstehen (Perelson *et al.*, 1996). Diese Viruspopulation ist sehr heterogen, da bei der reversen Transkription durchschnittlich eine Mutation pro Virusgenom eingefügt wird. In dieser viralen Quasispezies können Varianten enthalten sein, die gegen einzelne oder mehrere Substanzen insensitiv sind, vor allem wenn bereits einzelne Aminosäureaustausche zur Reduktion der Sensitivität führen (Clavel und Hance, 2004). In Gegenwart von antiretroviralen Medikamenten werden diese dann zur zahlenmäßig dominanten Spezies selektiert (Drake, 1993). Unter Therapie können Resistenzmutationen nur

entstehen, wenn die HIV-Replikation unvollständig inhibiert wird und die vorhandenen Wirkstoffkonzentrationen einen positiven Selektionsdruck auf Virusvarianten ausüben, die eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber den Wirkstoffen aufweisen. Zu den Faktoren, die mit unvollständiger Inhibition der HIV-Replikation assoziiert werden, gehören unter anderem mangelnde *compliance* der Patienten, suboptimale Pharmakokinetik und Wirksamkeit der Wirkstoffkombination sowie bestehende Resistenzen gegen antiretrovirale Wirkstoffe (Clavel und Hance, 2004).

Immer häufiger werden inzwischen resistente HIV-Stämme übertragen. In Europa lag die Prävalenz primärer Resistenzmutanten bei neu diagnostizierten, also noch nicht behandelten Patienten im Zeitraum zwischen 1996 und 2002 bei etwa 10% (Wensing *et al.*, 2003). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Studien aus den USA (Simon *et al.*, 2003).

Ist die Wirksamkeit eines HAART-Regimens aufgrund von bestehenden oder neu auftretenden Resistenzen eingeschränkt, müssen ein oder mehrere Substanzen ausgetauscht werden. Dies geschieht normalerweise unter Berücksichtigung von geno- oder phänotypischen Resistenzbestimmungen (Wilson, 2003). Weitere Faktoren, die häufig zu einer Umstellung von Medikamentenkombinationen führen, sind Nebenwirkungen und Langzeittoxizität der antiretroviralen Wirkstoffe (Mocroft *et al.*, 2001).

1.2.3. Neue antiretrovirale Substanzen

Der Erfolg von HAART mit den verfügbaren antiretroviralen Substanzen wird durch auftretende Resistenzen, Nebenwirkungen, Toxizität und die Komplexität der einzunehmenden Medikamentenkombinationen limitiert. Neue Wirkstoffe können dazu beitragen, diese Probleme zu lösen. Besonders interessant sind hierbei Substanzen, bei denen eine geringe Gefahr besteht, dass Kreuzresistenzen mit bereits zugelassenen Wirkstoffen auftreten (Kilby und Eron, 2003). Dazu gehören vor allem Integrase- und Eintrittsinhibitoren, da diese andere Schritte im HIV-Lebenszyklus inhibieren als die zur Zeit hauptsächlich verwendeten RT- und Proteaseinhibitoren (Gulick, 2003). Obwohl in den letzten Jahren einige Integrasehemmer mit vielversprechenden Eigenschaften beschrieben wurden, war bisher keine dieser Substanzen in klinischen Studien erfolgreich (Debyser *et al.*, 2002; Gulick, 2003).

Die Eintrittsinhibitoren werden aufgrund ihrer Angriffspunkte beim Eintritt des Virus in die Zelle in drei Substanzklassen eingeteilt: 1) Attachmentinhibitoren, die die CD4-gp120-Wechselwirkungen inhibieren; 2) Korezeptorantagonisten, die die Interaktionen zwischen gp120 und CXCR4 oder CCR5 hemmen und 3) Fusionsinhibitoren, die die Fusion der viralen mit der zellulären Membran verhindern (Kilby und Eron, 2003). Zur Zeit befinden sich Substanzen aller dieser Klassen in der Entwicklung. Der Fusionsinhibitor T-20 (s.o.) wurde 2004 für die Therapie vorbehandelter Patienten unter der Bezeichnung Fuzeon (Enfuvirtide)

zugelassen (Gulick, 2003; Jamjian und McNicholl, 2004; Moore und Doms, 2003).

1.2.4. Gentherapie

Als Alternative zur klassischen medikamentenbasierten HIV-Therapie wurde eine Vielzahl von gentherapeutischen Ansätzen vorgeschlagen (Buchsacher und Wrong-Staal, 2001). Diese lassen sich in drei Gruppen einteilen. Zu der ersten Gruppe gehören Strategien, bei der sogenannte Selbstmördergene in die mit HIV infizierten Zellen eingeschleust werden und diese so mittels Zelltod oder Apoptose eliminieren. Die Expression der eingeschleusten Gene kann dabei durch HIV-Promotoren reguliert werden, so dass sie nur in infizierten Zellen exprimiert werden (Vocero-Akbani *et al.*, 1999; von Laer und Brandenburg, 2001). Zur zweiten Gruppe gehören Strategien, die auf der direkten Degradierung der viralen RNA basieren und damit die Produktion neuer Viruspartikel verhindern. Das kann z.B. durch RNA *interference* oder *antisense* RNA erreicht werden (Mautino und Morgan, 2002; Yang, 2004). Ansätze der dritten Gruppe beruhen auf der Idee, antiviral wirksame Gene in die HIV-Zielzellen bzw. deren Vorläuferzellen einzubringen. Dieses Verfahren wird auch als intrazelluläre Immunisierung bezeichnet (von Laer und Brandenburg, 2001). Obwohl einige Gentherapieansätze vielversprechende Ergebnisse *in vitro* und in Tierversuchen lieferten, konnten in den bisher durchgeführten klinischen

Studien keine Vorteile für die behandelten Patienten nachgewiesen werden (von Laer und Brandenburg, 2001; Yang, 2004).

Kritisch ist der effiziente und spezifische Transfer der therapeutischen Moleküle. Im Fall von HIV bieten sich lentivirale Vektoren aufgrund ihrer Spezifität für lymphoide Zellen und der Tatsache, dass sie sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen transduzieren können, an (Mautino, 2002). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Transduktion der Zielzellen mit Hilfe von pseudotypisierten retroviralen Vektoren (von Laer und Brandenburg, 2001).

1.3. Aufgabenstellung

1.3.1. Hintergrund

1.3.1.1. Therapie mit T-20

In einer ersten klinischen Studie wurde gezeigt, dass die intravenöse Gabe von zweimal täglich 100 mg T-20 als Monotherapie die Viruslast um etwa zwei Logstufen senkt (Kilby *et al.*, 1998). Später zeigte sich, dass eine subkutane Verabreichung ebenfalls möglich ist (Kilby *et al.*, 2002). Weitere Studien ergaben, dass T-20, wenn es einer funktionierenden bzw. optimierten HAART hinzugefügt wird, in der Lage ist die Viruslast signifikant zu senken (Lalezari *et al.*, 2003; Lazzarin *et al.*, 2003; Melby *et al.*, 2004).

T-20 verursacht vergleichsweise selten Nebenwirkungen, wahrscheinlich weil es nicht in die Zellen aufgenommen wird. Weiterhin gibt es kaum

Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten (Greenberg und Cammack, 2004). Gegen T-20 werden Antikörper gebildet, die jedoch die klinische Wirksamkeit nicht beeinträchtigen (Walmsley *et al.*, 2003). Resistenzen unter T-20 treten relativ schnell auf, scheinen aber die virale Fitness zu reduzieren (Lu *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2002). Neben der schnellen Resistenzentwicklung und der fehlenden oralen Bioverfügbarkeit stellen die hohen Kosten von etwa 24000 Euro pro Jahr einen weiteren Nachteil der Therapie mit T-20 dar (Jamjian und McNicholl, 2004).

1.3.1.2. Membranverankerte Fusionsinhibitoren

Um diese Nachteile zu umgehen wurde ein gentherapeutischer Ansatz vorgeschlagen, bei dem das Peptid auf der Oberfläche von HIV-Zielzellen exprimiert wird. Dazu wurde mit Hilfe des retroviralen Vektors pM87 T-20 als Fusionsprotein mit der *hinge* Region der schweren Kette des Immunglobulin G (IgG) und der *membrane spanning domain* (MSD) des humanen *low affinity nerve growth factor receptor* (LNGFR) exprimiert. Infektionsstudien zeigten, dass die HIV-1-Replikation in mit pM87 transduzierten PM-1 Zellen mehr als 100fach inhibiert ist (Hildinger *et al.*, 2001). Ein optimierter Vektor (pM87o), der für einen 46 Aminosäuren umfassenden membranverankerten Fusionsinhibitor (C46) kodiert, wurde konstruiert und zeichnet sich sowohl durch eine im Vergleich mit pM87 erhöhte antivirale Aktivität auch in primären Zellen als auch durch geringe Immunogenität und Toxizität aus (Egelhofer *et al.*, 2004).

1.3.1.3. Resistenz gegen T-20

Mittels wiederholter Viruspassage in Gegenwart von ansteigenden T-20-Konzentrationen *in vitro* selektierten Rimsky *et al.* (1998) resistente HIV-Varianten. Sequenzanalysen zeigten, dass Resistenz gegen T-20 mit Punktmutationen im konservierten GIV-Motiv (Aminosäuren 36-38) in der HR1-Region assoziiert ist (Rimsky *et al.*, 1998). Untersuchungen von HIV-Isolaten aus Patienten, die während der ersten klinischen Studie zweimal täglich 30 mg T-20 erhielten, bestätigten die Wichtigkeit dieses Motivs für die Entstehung resistenter Viren (Wei *et al.*, 2002). Mutagenesestudien erweiterten das für Resistenz gegen T-20 relevante Motiv auf die Aminosäurepositionen 36 bis 45 (Mink *et al.*, 2002). Diese Aminosäuren sind in Virusisolaten aus T-20-naiven Patienten hoch konserviert, was darauf schließen lässt, dass das Motiv eine entscheidende Rolle bei der Fusion spielt (Greenberg und Cammack, 2004; Roman *et al.*, 2003). Resistente HIV-1-Varianten entstehen meist durch einzelne Punktmutationen, aber auch zwei Aminosäureaustausche innerhalb dieses Motivs wurden gefunden und sind mit einer starken Reduktion der T-20-Empfindlichkeit assoziiert. So vermittelt die Kombination G36S/V38M ca. 100fache Resistenz gegen T-20 (Mink *et al.*, 2002; Rimsky *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2002).

T-20 inhibiert sowohl Subtyp B- als auch andere HIV-1-Isolate (Sista *et al.*, 2001). Obwohl keine genotypische Resistenz gegen T-20 in HIV-1-Isolaten aus T-20-naiven Patienten gefunden wurde, variiert die T-20-Empfindlichkeit primärer Isolate stark. Dies scheint jedoch keinen Einfluss

auf den Erfolg der Therapie mit dem Fusionsinhibitor zu haben (Derdeyn *et al.*, 2001; Greenberg *et al.*, 2002; Sista *et al.*, 2003; Zollner *et al.*, 2001). Zunächst wurde angenommen, dass diese Variabilität mit der Korezeptorspezifität der Isolate zusammenhängt (Derdeyn *et al.*, 2000). Weitere Studien relativierten diese initialen Ergebnisse bzw. konnten sie nicht bestätigen (Derdeyn *et al.*, 2001; Greenberg *et al.*, 2001). Mit Hilfe von gp120-gp41-chimären HIV-1-Hüllproteinen wurde gezeigt, dass die T-20-Empfindlichkeit von Faktoren innerhalb von gp41 determiniert wird und somit unabhängig von der Korezeptorspezifität ist. Man geht davon aus, dass beide HR-Regionen von gp41 an der Determination der T-20 Empfindlichkeit beteiligt sind (Heil *et al.*, 2003; Stanfield-Oakley *et al.*, 2003).

1.3.2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkweise membranverankerter Fusionsinhibitoren näher zu charakterisieren. Dazu wurden folgende Teilprojekte bearbeitet:

1.3.2.1. Hemmung der HIV-Infektion durch subtypspezifische membranverankerte Fusionsinhibitoren

In diesem Teilprojekt sollte die Inhibition der Replikation verschiedener HIV-Subtypen durch membranverankertes C46 sowie durch subtypspezifische membranverankerte C46-Derivate untersucht werden. Die Ergebnisse sollten zur Bestimmung der Sequenz eines optimierten

Fusionsinhibitors dienen, der gegen ein möglichst breites Spektrum von HIV-Isolaten wirksam ist.

1.3.2.2. Selektion und Charakterisierung von resistenten HIV-1-Varianten

Das zweite Teilprojekt beschäftigte sich mit der Charakterisierung der Resistenzentwicklung gegen membranverankerte HIV-Fusionsinhibitoren. Dazu sollten mittels serieller Viruspassage zunächst resistente HIV-1-Varianten selektiert werden. Diese sollten dann bezüglich ihrer replikativen und resistenzvermittelnden Eigenschaften charakterisiert werden. Weiterhin sollte ermittelt werden welche Teile der Hüllproteine die Resistenz vermitteln und ob es einzelne resistenzvermittelnde Aminosäureaustausche gibt. Durch die Verwendung von HIV-1-Isolaten aus verschiedenen Subtypen sollte festgestellt werden, ob diese sich bezüglich der Resistenzentwicklung gegen membranverankerte Fusionsinhibitoren unterscheiden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

DNA-Sequenzierer	CEQ2000, Beckman ABI 3100, Applied Biosystems
Durchflusscytometer	FACScan , Becton Dickinson & Co. FACS Calibur, Becton Dickinson & Co.
ELISA-Reader	Thermo Labsystem
Fluoreszenzmikroskop	Leitz
Fluorometer	Safire, Tecan
Luminometer	Luminoscan Ascent, Thermo Labsystem
Sterilbank	SterilGARD III advance, J.T. Baker
Thermocycler	MiniCycler™ MJ Research, Biozym
UV/VIS-Spektrometer	DK 640, Beckman Coulter
Zentrifugen	Kühlzentrifuge J2-HC, Beckman Coulter Kühlzentrifuge ZK380, Eppendorf Tischzentrifuge, Hereaus Ultrasenzrifuge XL-70, Beckman Coulter

2.1.2. Chemikalien

Es wurden Chemikalien mit dem jeweils höchsten Reinheitsgrad von den folgenden Firmen verwendet: Becton Dickenson, Cambrex, Chroma, Fermentas, Gibco, J.T. Baker, Merck, Riedel de Haen, Roche, Roth, Serva. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien mit zweifach destilliertem H₂O angesetzt.

2.1.3. Verbrauchsmaterial

Das verwendete Verbrauchsmaterial stammte von den folgenden Firmen: American National Can, Becton Dickinson, Falcon, Greiner, Nunc, Sarstedt, TPP.

2.1.4. Puffer und Lösungen

Soweit nicht anderes angegeben ist, wurden Puffer und Lösungen mit vollentsalztem H₂O angesetzt und bei Bedarf mittels Autoklavieren bzw. Sterilfiltration keimfrei gemacht.

1000x Ampicillinlösung	10% Ampicillin
100x X-Gal-Lösung	0.05% X-Gal in DMF
6x DNA-Probenpuffer	0.15% Bromphenolblau, 29.7 mM Tris pH 7.6, 36% (v/v) Glycerin
ELISA-AK-Puffer	1% (v/v) Tween20 in ELISA-Blockpuffer
ELISA-Blockpuffer	10% (v/v) FCS in PBS
ELISA-Puffer	0.5% (v/v) Tween20 in PBS
ELISA-Stopplösung	0.5 M H ₂ SO ₄
ELISA-Substratlösung	0.02 (v/v) H ₂ O ₂ , 1% TMB, 0.1 M NaAc
FACS-Puffer	5% (v/v) FCS in PBS
Färbelösung für X-Gal	3 mM K ₃ Fe[CN] ₆ , 3mM K ₄ Fe[CN] ₆ , 1 mM MgCl ₂ in PBS
PBS	140 mM NaCl, 25 mM KCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM CaCl ₂ , 0.5 mM MgCl ₂ , pH 7.4
PBS/EDTA	25 mM EDTA in PBS
PFA	3% Paraformaldehyd in PBS
TAE	40 mM Tris, 10 mM EDTA, 5 mM Natriumacetat, pH 7.8
TB	10 mM Pipes, 55 mM MnCl ₂ , 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl, pH 6.7

2.1.5. Reagenzien und Reagenziensets

1 kb Leiter	Invitrogen
BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit	Applied Biosystems
CEQ2000 Cycle Sequencing Kit	Beckman Coulter
DMEM	Invitrogen
DMSO	Gibco
FCS	BioWhittaker
Fluorotag FITC conjugation Kit	Sigma Aldrich
FuGene 6 Transfektionsreagenz	Roche
Glutamin	Invitrogen
Metafectene Transfektionsreagenz	Biontex
Nucleobond AX500	Machery-Nagel
NucleoSpin Extract Kit	Machery-Nagel
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
QIAamp viral RNA Kit	Qiagen
Quantum simply cellular beads	Bangs Laboratories Inc.
QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Renilla Luciferase Assay System	Promega
RPMI	Invitrogen
Steady-Glo Luciferase Assay System	Promega
T-20	Peptide Speciality Laboratories
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Biochrom

2.1.6. Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	MBI-Fermentas
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega
Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas
MMLV Reverse Transkriptase	Ambion
T4 DNA-Ligase	MBI-Fermentas
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Qiagen

2.1.7. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech AG bezogen und in zweifach destilliertem H₂O gelöst.

Tab. 2.1: Für Polymerasekettenreaktionen verwendete Oligonukleotide.

pA, pC, pMN und pN dienen der Amplifikation von HIV-1 *env*-Genen. Wurde eine *nested*-PCR durchgeführt, wurde die erste PCR-Runde mit pA und pMN, die zweite mit pC und pN durchgeführt. C46 minus und C46 plus dienen der Amplifikation der Produkte der Primerverlängerungsreaktionen.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
C46 minus	CTGAGAGATCTAAACCAATTC
C46 plus	GACGAAGATCTTGG
pA	GGCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA
pC	TTGTGGGTCACCGTCTATGGGG
pMN	ATTTGCGGCCGCTAGCCCTTCCAGTCCCCCCTTTTCT TTTA
pN	CTGCCAATCAGGGAAGTAGCCTTGTGT

Tab. 2.2: Für Primerverlängerungen verwendete Oligonukleotide.

C46-A minus und C46-A plus dienen der Darstellung der für C46-A kodierenden Nukleotidsequenz. C46-C minus und C46-C plus dienen der Darstellung der für C46-C kodierenden Nukleotidsequenz.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
C46-A minus	CTTAGAGATCTAAACCAATTCCACAGATTTGCCCACT TGTCCTCAACTCCAATAAGTCTTGTTTCATTCTTTTCCTGC TGGTTCTGCGATTTC
C46-A plus	GACGAAGATCTTGGCTGCAATGGGATAAAGAAATTA GCAATTACACACAGATAATATATCAACTAATTGAAGAA TCGCAGAACCAGCAG
C46-C minus	CTGAGAGATCTAAACCAATTCCACAGATTTGCCCACT TGTCCTCAACTCTAGTAAATCTTTTTCATTTTTTTCCTGC TGGTTTTGCGAGTC
C46-C plus	GACGAAGATCTTGGATGCAGTGGGATAGAGAAATTA GTAATTACACAAACACAATATACAGGTTGCTTGAAGA CTCGCAAACCAGCAG

Tab. 2.3: Für *in vitro* Mutagenese verwendete Oligonukleotide.

Die Bezeichnungen beziehen sich auf die mit Hilfe des jeweiligen Oligonukleotidpaars (plus und minus) eingeführten Mutationen.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
BaL-K minus	AAGCTATATATTATGCTTGTGTATTTGTTAATTTCTCT GTCCCACTC
BaL-K plus	GAGTGGGACAGAGAAATTAACAAATACACAAGCATAA TATATAGCTT
BaL-V minus	CTGTTGCGCCTCAACAGCCCTCAGCAG
BaL-V plus	CTGCTGAGGGCTGTTGAGGCGCAACAG
NL-S minus	CTGCACTATATCAGACAATGATTGTCTGGCCTGTACC
NL-S plus	GGTACAGGCCAGACAATCATTGTCTGATATAGTGCA G

Tab. 2.4: Für DNA-Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide.

M235 plus und minus wurden zur Sequenzierung der für C46 (-A, -B, -C) kodierenden DNA verwendet. V3 diente der Sequenzierung des für die V3-Region kodierenden Bereichs. wei2 und wei3 dienten der Sequenzierung des für gp41 kodierenden Bereichs.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
M235 minus	CTTGATATCGAATTCCTGCAGC
M235 plus	CTAATAGTCCCTCTCTCCAAGC
V3	AACTCAACTGCTGTAAATGGCAG
wei2	GTGAGTATCCCTGCCTAACTCTAT
wei3	GGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAG

2.1.8. Antikörper

2F5	Muster <i>et al.</i> (1993)
α humanes IgG-PE	Dianova
α CD4-FITC	Becton Dickinson
α CCR5-FITC	Becton Dickinson
α CXCR4-FITC	Becton Dickinson
183	AIDS reagent Programme (NIH)
rabbit α Capsid	AG Kräusslich
α rabbit IgG-PO	Dianova

2.1.9. Plasmide

Tab. 2.5: Verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Beschreibung
pGEM-11	Klonierungsvektor (Promega)
pGEM-11- Δ C46	Zwischenklon für die Klonierung von pM87o-A und pM87o-C (diese Arbeit)
pM3	VSV-G Expressionsplasmid
pM87	Transduktionsvektor, kodiert für membranverankertes T-20 (Hildinger <i>et al.</i> , 2001)
pM87o-A	Transduktionsvektor, kodiert für C46-A (diese Arbeit)
pM87o-B	Transduktionsvektor, kodiert für C46-B (Egelhofer <i>et al.</i> , 2004)
pM87o-C	Transduktionsvektor, kodiert für C46-C (diese Arbeit)
pMP11	retrovirales Expressionsplasmid (Schambach <i>et al.</i> , 2000)
pMP11-BaL	Expressionsplasmid für das BaL-Hüllprotein (L. Scrivano, Diplomarbeit)
pMP11-BaL-K	Expressionsplasmid für das BaL-K-Hüllprotein (diese Arbeit)
pMP11-BaL-V	Expressionsplasmid für das BaL-V-Hüllprotein (diese Arbeit)
pMP11-BaL-VK	Expressionsplasmid für das BaL-VK-Hüllprotein (diese Arbeit)
pMP11-eGFP	eGFP-Expressionsplasmid (Schambach <i>et al.</i> , 2000)
pMP11-NL4.3	Expressionsplasmid für das NL4.3-Hüllprotein (L. Scrivano, Diplomarbeit)
pMP11-NL4.3-S	Expressionsplasmid für das NL4.3-S-Hüllprotein (diese Arbeit)
pNL4.3	kodiert für das gesamte HIV _{NL4.3} -Genom (Polzer <i>et al.</i> , 2001)

TN6G	HIV-1 Expressionsplasmid, in das verschiedenen Hüllproteine kloniert werden können, exprimiert eGFP anstelle von Nef (Neumann <i>et al.</i> , 2005)
TN7-Stopp	HIV-1 Expressionsplasmid, exprimiert kein Hüllprotein, exprimiert Renilla Luziferase anstelle von Nef (Neumann <i>et al.</i> , 2005)
TN8	HIV-1 Expressionsplasmid, in das verschiedenen Hüllproteine kloniert werden können, exprimiert mRFP anstelle von Nef (Neumann <i>et al.</i> , 2005)

2.1.10. Nährmedien

Alle verwendeten Nährmedien wurden mit entsalztem H₂O angesetzt und durch Autoklavieren oder Sterilfiltration keimfrei gemacht.

SOB	2% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , pH 7.0
LB	1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 0.5% NaCl, pH 7.2-7.5
LB-Festmedium	1.5% Agar in LB
DMEM high komplett	DMEM high supplementiert mit 10% (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 2 mM Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin, 50 U/ml Penicillin
RPMI komplett	RPMI supplementiert mit 10% (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 2 mM Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin, 50 U/ml Penicillin
Einfriermedium	10% DMSO (v/v) in FCS

2.1.11. Bakterien

Für alle DNA-Präparationen und -Klonierungen wurde der Bakterienstamm *E. coli* XL-1 blue (Stratagene) verwendet.

2.1.12. Eukaryotische Zellen

Tab. 2.6: Verwendete Zelllinien und transduzierte Zellen.

Bezeichnung	Beschreibung
293T	humane embryonale Nierenfibroblasten Zelllinie (Pear <i>et al.</i> , 1993)
FLY-GALV	Verpackungszelllinie (Cosset <i>et al.</i> , 1995)
PM-1	humane T-Zelllinie, exprimiert CD4, CXCR4, CCR5 (Lusso <i>et al.</i> , 1995)
PM-1/M87	transduzierte PM-1 Zellen, exprimieren T-20-Fusionsprotein (Hildinger <i>et al.</i> , 2001)
PM-1/C46-A	transduzierte PM-1 Zellen, exprimieren C46-A-Fusionsprotein (diese Arbeit)
PM-1/C46-B	transduzierte PM-1 Zellen, exprimieren C46-B-Fusionsprotein (Egelhofer <i>et al.</i> , 2004)
PM-1/C46-C	transduzierte PM-1 Zellen, exprimieren C46-C-Fusionsprotein (diese Arbeit)
TZM-bl	HeLa-Subklon, exprimieren CD4, CXCR4, CCR5 und enthalten die unter der Kontrolle von HIV-1 LTR stehenden Gene für β -Galaktosidase und <i>firefly</i> Luziferase (Wei <i>et al.</i> , 2002)
TZM-bl/M87	transduzierte TZM-bl Zellen, exprimieren T-20-Fusionsprotein (diese Arbeit)
TZM-bl/C46-A	transduzierte TZM-bl Zellen, exprimieren C46-A-Fusionsprotein (diese Arbeit)
TZM-bl/C46-B	transduzierte TZM-bl Zellen, exprimieren C46-B-Fusionsprotein (diese Arbeit)
TZM-bl/C46-C	transduzierte TZM-bl Zellen, exprimieren C46-C-Fusionsprotein (diese Arbeit)
TZM-bl/M426	transduzierte TZM-bl Zellen, exprimieren M426-Fusionsprotein (diese Arbeit)

2.1.13. HIV-Isolate

Alle verwendeten HIV-Isolate wurden vom AIDS reagent Programm des NIH bezogen und in PM-1 Zellen vermehrt.

Tab. 2.7: Verwendete HIV-Isolate.

Bezeichnung	Subtyp
2005	HIV-1 Gruppe M Subtyp B
BaL	HIV-1 Gruppe M Subtyp B
CBL20	HIV-2 Subtyp A
IN22	HIV-1 Gruppe M Subtyp C
JRCSF	HIV-1 Gruppe M Subtyp B
MVP8161	HIV-1 Gruppe O
RU570	HIV-1 Gruppe M Subtyp G
RW29	HIV-1 Gruppe M Subtyp A
RW9	HIV-1 Gruppe M Subtyp A
SE12808	HIV-1 Gruppe M Subtyp A
SE9280	HIV-1 Gruppe M Subtyp J
TZ5	HIV-1 Gruppe M Subtyp C
UG29	HIV-1 Gruppe M Subtyp A
UG35	HIV-1 Gruppe M Subtyp D
YBF	HIV-1 Gruppe N
ZA3	HIV-1 Gruppe M Subtyp C

2.1.14. Software

MS Office	Microsoft
Vector NTI	InforMax, Invitrogen

Für die Steuerung des ELISA-Readers, der FACS-Geräte, des Fluorometers, des Luminometers, und des UV/VIS-Spektrometers wurden die jeweiligen vom Gerätehersteller zur Verfügung gestellten Programme verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit Bakterien und DNA

2.2.1.1. Analytische Plasmidisolierung aus *E. coli* (Miniprep)

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden die Puffer S1-S3 aus dem Nucleobond AX500 Kit verwendet. 1.5 ml einer Übernachtskultur wurden in 5 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl S1-Puffer resuspendiert und die Suspension anschließend mit 200 µl S2-Puffer versetzt und bis zur Lyse der Zellen bei RT inkubiert. Dem Lysat wurden dann 200 µl S3-Puffer zugegeben worauf eine Zentrifugation (4 °C, 13000 rpm, 10 min) folgte. Der Überstand wurde mit 900 µl Ethanol versetzt und für 10 min bei -20 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze 10 min lang bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die so gefällte DNA wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei 50 °C getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen. Danach konnte die Plasmid-DNA mittels analytischer Restriktion überprüft werden. Die Lagerung der DNA-Lösungen erfolgte bei -20 °C.

2.2.1.2. Präparative Plasmidisolierung aus *E. coli* (Maxiprep)

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren wurden 200 ml einer *E. coli*-Flüssigkultur bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Aus dem Bakterienpellet wurde dann mit Hilfe des Nucleobond AX500 Kits entsprechend der Herstellerangaben die Plasmid-DNA isoliert. Nach der Isopropanolpräzipitation wurde das DNA-Pellet in 50-200 µl H₂O gelöst. Anschließend wurden Konzentration und Reinheit der DNA-Lösung bestimmt und die DNA mittels einer Restriktionsanalyse überprüft. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.1.3. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen erfolgte spektrometrisch. Dazu wurden die maximalen Extinktionen bei 260 und 280 nm gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht einer OD_{280} von 1.0 eine Konzentration von 50 µg/ml. Der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} beträgt bei reinen DNA-Lösungen 1.8. Abweichende Werte weisen auf eine Kontamination mit Proteinen oder RNA hin.

2.2.1.4. Isolierung von RNA aus Virusstocks

Die RNA-Isolierung aus Virusstocks wurde von Heike Oberwinkler mit Hilfe des QIAamp viral RNA Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde jeweils 1 ml zellfreien, virushaltigen Zellkulturmediums verwendet. Die RNA-Lösungen wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.1.5. DNA-Restriktion

Für die Restriktion von DNA wurden Reaktionsbedingungen entsprechend der Angaben des Enzymherstellers gewählt. Bei analytischen Restriktionen wurden 0.5 µg DNA bzw. 5 µl einer DNA-Miniprep eingesetzt, bei präparativen Restriktionen 1-5 µg DNA. Das Reaktionsvolumen betrug 20-100 µl.

2.2.1.6. DNA-Dephosphorylierung

Für die Dephosphorylierung von Vektoren wurde CIAP nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.1.7. DNA-Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Insert-DNA. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Ansätze wurden bei 16 °C über Nacht inkubiert und anschließend für die Transformation von kompetenten *E. coli* verwendet.

2.2.1.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR diente der spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die einzelnen Ansätze hatten ein Volumen von 50-100 µl und enthielten:

50-200 ng Plasmid-DNA (Template)
20-200 pmol je Primer
25 mM dNTP's
10 x Polymerasepuffer
1-5 U *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase

Als Kontrolle diente mindestens ein Ansatz, der keine Template-DNA enthielt. Zu Beginn der Reaktion wurden die Proben zur initialen Denaturierung für 5 min auf 94 °C (*Taq*) bzw. 96 °C (*Pfu*) erhitzt. Darauf folgten 25-30 aus Denaturierung (60 s, 94 °C bzw. 96 °C), Annealing (30 s, 35-60 °C) und Elongation (*Taq*: 30 s/kb, 72 °C; *Pfu*: 2 min/kb, 68 °C) bestehende Zyklen. Abschließend wurden die Reaktionsansätze 5-10 min bei 72 °C bzw. 68 °C inkubiert, um eine Vervollständigung der DNA-Synthese zu ermöglichen. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Dazu wurden generell 1/10 des Ansatzes verwendet.

2.2.1.9. *nested* PCR

Bei der *nested* PCR wird das Zielfragment zunächst mit einem Primerpaar vervielfältigt. Das Produkt der ersten PCR wird anschliessend in eine zweite Reaktionsrunde eingesetzt. Das Primerpaar, das in der zweiten Runde verwendet wird, lag innerhalb des ersten Paares. Die *nested* PCR wurde analog zur oben beschriebenen PCR durchgeführt, wobei 1/10 des Ansatzes der ersten Reaktionsrunde in den Ansatz der Reaktionsrunde eingesetzt wurde. Der Erfolg der Reaktion wurde ebenfalls mittels Agarosegelelektrophorese überprüft, wozu 1/10 des Ansatzes verwendet wurde.

2.2.1.10. RT-PCR

Bei der RT-PCR geht der regulären PCR ein Schritt voraus, bei dem RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben wird. Sie diente der Amplifikation von HIV-1 *env*-Genen aus Virusstocks. Die RT-Reaktion wurde von Heike Oberwinkler mit Hilfe der MMLV RT durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Pro Reaktion wurden 5 µl RNA-Lösung eingesetzt. Als Primer wurde pMN verwendet. Ein Ansatz der keine RT enthielt diente als Negativkontrolle. Die Produkte der RT-Reaktion wurden als Template für eine *nested* PCR verwendet.

2.2.1.11. Primerverlängerung zur Erzeugung doppelsträngiger DNA

Um doppelsträngige DNA-Inserts für die Klonierung der retroviralen Vektoren pM87o-A und pM87o-C wurden die jeweils ein komplementäres Oligonukleotidpaar, C46a⁺ und C46a⁻ bzw. C46c⁺ und C46c⁻ verwendet, die für die komplette Länge des Inserts kodierten. Es wurden jeweils 200 pmol pro Oligonukleotid verwendet. Ansonsten entsprachen die Reaktionsbedingungen denen einer PCR. Das Produkt der Primerverlängerung wurde anschließend in zwei reguläre PCR-Runden eingesetzt. Der Erfolg der Amplifikation wurde mittels

Agarosegelelektrophorese überprüft. Danach konnten die Fragmente für die Klonierung der Vektorene pM87o-A und pM87-C verwendet werden.

2.2.1.12. Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese von DNA-Molekülen erfolgte in nicht-denaturierenden Agarosegelen. In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden DNA-Moleküle wurden 0.8-3.0 prozentige Gele verwendet, die 1.0-3.0 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Die Proben wurden mit 6fach Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 6-8 V/cm aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE verwendet. Eine 1kb-Leiter wurde als Größenstandard verwendet. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators mit angeschlossener Kamera.

2.2.1.13. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden nach der Elektrophorese ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kits nach Herstellerangaben extrahiert. Die Elution erfolgte in 30 µl H₂O.

2.2.1.14. Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kits nach Herstellerangaben. Die Elution erfolgte in 30 µl H₂O.

2.2.1.15. Klonierung rekombinanter DNA-Plasmide

Für die Klonierung rekombinanter DNA-Plasmide wurde zunächst der gewünschte Vektor vorbereitet. In einem ersten Schritt erfolgte die Linearisierung mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Dann wurde die DNA dephosphoryliert, um die Religation des Vektors zu vermeiden. Das gewünschte Insert wurde entweder mittels PCR amplifiziert und anschließend restringiert oder mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus Plasmid-DNA ausgeschnitten. In beiden Fällen wurden Insert- und Vektor-DNA gereinigt, indem sie aus einem Agarosegel extrahiert wurde. Eine weitere Agarosegelelektrophorese

diente der Mengenbestimmung sowie der Überprüfung der Größe der DNA-Fragmente. Danach wurden Vektor- und Insert-DNA in einem Verhältnis 1:3 bis 1:10 in eine Ligationreaktion eingesetzt. Nach der Ligation erfolgte die Transformation. Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurde die DNA von 6-12 Einzelkolonien je Klon mittels Miniprep isoliert und in Testrestriktionen eingesetzt. Klone mit dem korrekten Bandenmuster wurden mittels DNA-Sequenzierung verifiziert.

2.2.1.16. Klonierung von pM87o-A und pM87o-C

Zuächst wurden die Plasmide pGEM-11 und pM87o-B mit *Apal* und *HindIII* restringiert. Dann wurden die linearisierte pGEM-11-DNA und das 771 kb lange *Apal/HindIII*-Fragment von pM87o-B, das die für C46-B kodierende Region beinhaltet, aus einem Agarosegel extrahiert. Die so gereinigten Fragmente wurden ligiert und in *E. coli* transformiert. Aus dem resultierenden Plasmid, pGEM-11-C46-B, wurde durch *BglII*-Restriktion die 138 kb lange für C46-B kodierende Region entfernt und nach der Reinigung des DNA-Fragments durch eine Extraktion aus einem Agarosegel religiert und in *E. coli* transformiert. Das so gewonnene Plasmid wurde als pGEM-11- Δ C46 bezeichnet und diente als Zwischenklon für die Klonierung von pM87o-A und pM87o-C. Die für C46-A und C46-C kodierenden DNA-Fragmente wurden mittels Primerverlängerungsreaktionen hergestellt, mit *BglII* restringiert und zur Reinigung aus einem dreiprozentigem Agarosegel extrahiert. Danach erfolgte die Ligation der DNA-Fragmente mit dem mit *BglII* linearisierten und dephosphorylierten Vektor pGEM-11- Δ C46 und die Transformation in *E. coli*. Mittels DNA-Sequenzierung wurde jeweils ein Einzelklon ausgewählt, der das *BglII*-Insert in der korrekten Orientierung trug. Diese Plasmide wurden als pGEM-11-C46-A bzw. pGEM-11-C46-C bezeichnet. Es folgte eine *Apal/HindIII*-Restriktion beider Plasmide. Aus einem Agarosegel wurden jeweils die 771 kb langen Fragmente extrahiert. Diese wurden dann mit den gereinigten, aus einer *Apal/HindIII*-Restriktion resultierenden *HindIII/HindIII*- (1656 kb) und *Apal/HindIII*-Fragmenten

(4213 kb) ligiert und in *E. coli* transformiert. Mehrere der in diesem Klonierungsschritt hergestellten Einzelklone wurden mittels analytischer Restriktion und DNA-Sequenzierung überprüft. Die Plasmide mit der korrekten Sequenz wurden als pM87o-A bzw. pM87o-C bezeichnet. Sie unterscheiden sich von pM87o-B nur durch die jeweilige für C46-A bzw. C46-C kodierende Region.

2.2.1.17. TOPO-Klonierung

Die PCR-Produkte wurden zunächst mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kits von überflüssigen DNA-Fragmenten, Nukleotiden und Enzymen befreit. Danach erfolgte eine Agarosegelelektrophorese zur Mengen- und Größenbestimmung. Danach erfolgte die TOPO-Klonierung mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits gemäß den Herstellerangaben. Diese Methode diente vor allem der schnellen Sequenzierung von Env-Einzelklonen.

2.2.1.18. *in vitro* Mutagenese

Die *in vitro* Mutagenese zur Herstellung der pMP11-BaL- und pMP11-NL4.3-Punktmutanten erfolgte mit Hilfe des QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kits nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.19. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte entweder mit dem CEQ 2000 (Beckman) oder mit dem ABI 3100 (Applied Biosystems). Je nachdem welches der Geräte verwendet wurde, wurden die Sequenzierungsreaktionen mit dem CEQ2000 Cycle Sequencing Kit oder dem BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit nach den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 150-300 ng DNA bzw. 3 µl einer DNA-Miniprep pro Reaktion eingesetzt.

2.2.1.20. Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Bakterien

Um *E. coli* XL-1 blue Zellen transformationskompetent zu machen, wurde 1l SOB-Medium 1:100 mit einer Flüssigkulturkultur angeimpft und bis zu einer oD_{600} von 0.5 bei 20 °C im Bakterienrüttler inkubiert. Alle

folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert, mit TB gewaschen und in 100 ml TB resuspendiert. Nach einer 10 minütigen Inkubation wurde die Bakteriensuspension mit DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% versetzt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die Transformationskompetenz lag bei maximal 10^9 Kolonien/ μ g Plasmid-DNA.

2.2.1.21. Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Transformationskompetente *E. coli* Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 10-50 μ l der Bakteriensuspension wurden mit 5-20 μ l Ligationsansatz bzw. 100 ng Plasmid-DNA vermischt und anschließend ca. 10 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42 °C. Die Proben wurden noch einmal für einige Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden 500 μ l LB-Medium hinzugefügt und die Bakterien 1h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension zur Selektion transformierter Bakterien auf antibiotikumhaltige LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.22. *E. coli* Flüssigkulturen

Abhängig vom Verwendungszweck wurden 3-200 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit *E. coli* Einzelkolonien bzw. einigen Mikrolitern Bakteriensuspension oder Dauerkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Bakterieneschüttler inkubiert.

2.2.1.23. *E. coli* Dauerkulturen

Um transformierte Bakterien dauerhaft zu lagern wurden 500 μ l einer Flüssigkultur mit 500 μ l Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen und Viren

2.2.2.1. Kultur und Passage von adhäsiven Zelllinien

Sämtliche verwendete adhäsive Zelllinien (293T, FLY-GALV, TZM-bl und transduzierte TZM-bl Zellen) wurden in supplementiertem DMEM high bei 37 °C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre kultiviert. Um die Zellen zu passagieren wurde zunächst das verbrauchte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Ablösung der Zellen. Dazu wurden je nach Zellart 1-2 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro 100 cm² Kulturfläche verwendet. Sobald sich alle Zellen von der Kulturfläche gelöst hatten, wurde das Trypsin durch Zugabe von Medium inaktiviert. Dann wurde 1/10 der Zellsuspension in eine frische Zellkulturflasche überführt. Zuletzt wurde Medium hinzugefügt, um die Kulturfläche ausreichend zu bedecken. Die Passage erfolgte alle 3-4 Tage.

2.2.2.2. Kultur und Passage von Suspensionszelllinien

Die verwendeten Suspensionszellen (PM-1 und transduzierte PM-1 Zellen) wurden in supplementiertem RPMI bei 37 °C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage 1:10 gesplittet. Dazu wurde die Zellsuspension zunächst gründlich resuspendiert. Dann wurden 9/10 der Suspension verworfen bzw. zur Expansion in frische Zellkulturflaschen überführt. Dem restlichen Zehntel der Suspension wurde dann bis zum ursprünglichen Volumen frisches Medium zugefügt. Die Zelldichte betrug $1 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

2.2.2.3. Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Um eukaryotische Zellen dauerhaft zu lagern wurden diese (evtl. nach dem Ablösen von der Kulturfläche, s.o.) in 5 min bei 1000 rpm pelletiert und anschließend in Einfriermedium resuspendiert und in Aliquots in einem Einfrierbehälter langsam auf -80 °C abgekühlt. Danach wurden die gefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Pro Aliquot wurden je

nach Zelllinie $1 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ verwendet. Um die Zellen erneut in Kultur zu nehmen wurden sie bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, mit PBS gewaschen und in einem entsprechenden Volumen Medium in ein frisches Zellkulturgefäß überführt. 6-24h später erfolgte ein Mediumwechsel. Dann wurden die Zellen wie gewöhnlich weiter kultiviert.

2.2.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.2.5. Transfektion eukaryotischer Zellen

24h vor der Transfektion wurden $2-3 \cdot 10^6$ Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. 2-6h vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Transfektion erfolgte mit Metafectene oder FuGene 6 nach den jeweiligen Herstellerangaben. Pro 10 cm Schale wurden im Allgemeinen 3-6 µg DNA und 10 µl der Transfektionsreagenz verwendet. Als Kontrolle wurde eine Schale mit pMP11-eGFP transfiziert und die Transfektionseffizienz 2-3 Tage nach der Transfektion mit dem Fluoreszenz-Mikroskop bestimmt.

2.2.2.6. Transduktion von PM-1 Zellen

Um PM-1 Zellen zu transduzieren wurden zunächst FLY-GALV Zellen mit dem jeweiligen retroviralen Vektor und pM3 transduziert. Dazu wurden pro 10 cm Schale 3 µg des retroviralen Vektors und 1 µg pM3 verwendet. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit pMP11-eGFP. 2 Tage nach der Transfektion wurde das verbrauchte DMEM durch RPMI ersetzt. 3 Tage nach der Transfektion wurden die Überstände geerntet, sterilfiltriert und entweder in Aliquots bei -80 °C gelagert oder direkt für die Transduktion verwendet. Pro Transduktion wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei 1000 rpm bei 4 °C in 5 min pelletiert. Dann wurde das Zellpellet in 2 ml des Transfektionsüberstandes aufgenommen und in eine 12-well-Zellkulturplatte überführt. Anschließend folgte eine 90 minütige Zentrifugation bei 3200 rpm und 32 °C. Einen Tag nach der Transduktion

erfolgte ein Mediumwechsel. 3-5 Tage nach der Transduktion wurde mit der G418-Selektion begonnen, falls eine FACS-Analyse der Zellen den Erfolg der Transduktion bestätigte. Die wurden Zellen pelletiert und in RPMI resuspendiert, das 1 mg/ml G418 enthielt. Die Selektionsdruck wurde so lange aufrechterhalten, bis sämtliche Zellen eines Kontrollansatzes mit untransduzierten Zellen abgestorben waren. Danach wurden die transduzierten Zellen in Medium mit einer G418-Konzentration von 0.5 mg/ml kultiviert. Nach der Selektion wurde erneut eine FACS-Analyse durchgeführt.

2.2.2.7. Transduktion von TZM-bl Zellen

Um TZM-bl Zellen zu transduzieren, erfolgte die Transfektion von FLY-GALV Zellen wie oben beschrieben, allerdings wurde der Mediumwechsel an Tag 2 nach der Transfektion mit DMEM. Einen Tag vor der Transduktion wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen pro *well* in 6-*well*-Platten ausgesät. Am Tag danach wurde das Medium entfernt und durch 1 ml frisches DMEM ersetzt. Dann wurden 1 ml des Transfektionsüberstandes hinzugefügt. Einen Tag nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. 3-5 Tage nach der Transduktion erfolgte die Kontrolle der Transduktionseffizienz mittels FACS. War die Transduktion erfolgreich, wurde mit der G418-Selektion begonnen. Dabei betrug die G418-Konzentration 1-3 mg/ml. Der Selektionsdruck wurde aufrecht erhalten bis alle Zellen der Kontrolle abgestorben waren. Danach wurden die Zellen in DMEM mit 1 mg/ml kultiviert. Nach der Selektion wurde erfolgte eine weitere FACS-Analyse der Zellen.

2.2.2.8. Nachweis der Fusionsinhibitorexpression mittels FACS

Die Expression membranverankerter Fusionsinhibitoren durch transduzierte PM-1 und TZM-bl Zellen mittels Durchflusscytometrie nachgewiesen. Dazu wurden $2 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Probe verwendet. PM-1 Zellen wurden in 5 min bei 1000 rpm und 4 °C pelletiert, TZM-bl Zellen mit PBS/EDTA abgelöst. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C bzw. auf Eis. Zuerst wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer

gewaschen. Dann wurden die Pellets in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und mit 1 μ g 2F5-Antikörper pro $2 \cdot 10^5$ Zellen versetzt. Darauf folgte eine Inkubation von 30 min und 3 Waschschrte mit FACS-Puffer. Danach wurden die Zellen erneut in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert und mit 2-10 μ l des Zweitantikörpers (anti-humanes IgG, PE-gekoppelt) versetzt. Es folgte eine Inkubation von 20 min. Danach wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 0.5-1.0 ml aufgenommen und im Kanal 2 des FACScan analysiert. Als Kontrollen dienten untransduzierte Zellen, die entweder mit beiden oder nur mit dem Zweitantikörper behandelt wurden.

2.2.2.9. Nachweis der Rezeptorexpression mittels FACS

Die Expression von CD4, CXCR4 und CCR5 durch die für Infektionsstudien verwendeten Zellen wurde mittels einer FACS-Analyse überprüft. Dazu wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Probe verwendet. PM-1 Zellen wurden pelletiert (1000 rpm, 4°C, 5 min), TZM-bl Zellen mit PBS/EDTA abgelöst. Alle darauf folgenden Schritte erfolgten bei 4 °C bzw. auf Eis. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und danach in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Dann wurden 10 μ l des entsprechenden Antikörpers hinzugefügt (α CD4-FITC, α CXCR4-FITC bzw. α CCR5-FITC) und die Proben 30 min lang inkubiert. Es folgten 2 weitere Waschschrte mit FACS-Puffer, danach wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und im FACScan (Kanal 1) analysiert.

2.2.2.10. Quantifizierung der Fusionsinhibitorexpression mittels FACS

Die Expression membranverankerter Fusionsinhibitoren mit Hilfe eines FACS-Assays wurde in Zusammenarbeit mit Felix Hermann und Dorothee von Laer im Georg-Speyer-Haus, Frankfurt durchgeführt. Dazu wurde der 2F5-Antikörper mit Hilfe des Fluorotag FITC conjugation Kits entsprechend der Herstellerangaben mit dem Fluorophor FITC gekoppelt. Der FITC-gekoppelte 2F5-Antikörper wurde dann dazu verwendet je $1 \cdot 10^6$ Zellen bzw. Quantum simply cellular beads (50 μ l) zu färben. PM-1 Zellen

wurden pelletiert (1000 rpm, 4 °C, 5 min), TZM-bl Zellen mit PBS/EDTA abgelöst. Alle folgende Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C bzw. auf Eis. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 50 µl PBS resuspendiert. Nach der Zugabe von 10 µl 2F5-FITC pro Probe (Zellen bzw. *beads*) erfolgte eine 30 minütige Inkubation. Nach der Inkubation wurden alle Proben zweimal mit PBS gewaschen und in 0.3-1.0 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Proben im FACScalibur (Kanal 1) analysiert. Die geometrischen Mittel der Fluoreszenz jeder der vier *bead*-Populationen mit definierter Antikörperbindekapazität (ABK) wurden gegen die ABKs aufgetragen. Die so erstellte Eichgerade diente der Ermittlung der ABK-Werte der Zellproben.

2.2.2.11. Vermehrung von HIV-Isolaten

Zunächst wurden PM-1 Zellen mit dem gewünschten HIV-Isolat infiziert. Die Kultur wurde dann so lange expandiert, bis die p24-Konzentration im Zellkulturmedium Werte von 2000 ng/ml oder mehr erreicht hatte. Dies war normalerweise nach 7 bis 15 Tagen der Fall. Anschließend wurde die Kulturen 5 min bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe von 0.45 µm Filtern von Zellresten befreit. Die Virussuspension wurde dann aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.12. Generierung von HIV-Partikeln mittels Transfektion

Um HIV-Partikel mit Hilfe von DNA-Plasmiden zu generieren wurden 239T Zellen wie oben beschrieben transfiziert. 3 Tage nach der Transfektion wurde das virushaltige Medium geerntet, durch Filter mit einer Porengröße von 0.45 µm gepresst und in Aliquots bei -80 °C gelagert bzw. durch Ultrazentrifugation (s.u.) konzentriert.

2.2.2.13. Konzentrierung von HIV-Partikeln

Die Konzentrierung von HIV-Partikel erfolgte mittels Ultrazentrifugation. Dazu wurden 30 ml des virushaltigen Zellkulturüberstands in einem SW28 Zentrifugenröhrchen auf 4 ml Sacharoselösung (20% in PBS) geschichtet und 2h bei 25000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Viruspellet

in 300 µl Zellkulturmedium resuspendiert und aliquotiert. Die Lagerung der konzentrierten Virusstocks erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.14. Titration

Die Titration von Virusstocks erfolgte mit Hilfe von TZM-bl Zellen. Dazu wurden diese in 96-*well*-Platten ausgesät $3 \cdot 10^3$ Zellen/*well*. Einen Tag später erfolgte die Infektion. Dazu wurde der zu untersuchende Virusstock in 5 Schritten (jeweils 1:5 oder 1:10) verdünnt. Nachdem das Medium von den zu infizierende Zellen abgesaugt wurde, wurden je 100 µl unverdünnte bzw. verdünnte Virussuspension hinzugegeben. Die Auswertung erfolgte 3 Tage nach der Infektion. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit PFA 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurden sie mit 100 µl X-Gal-Lösung überschichtet und ca. 1h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die β -Galaktosidaseaktivität blau gefärbten d.h. mit HIV infizierten Zellen im Lichtmikroskop gezählt, wobei jeweils ein *well* gewählt wurde, in dem die Anzahl der infizierten Zellen bei 10-100 lag. Mit Hilfe der so gewonnenen Daten konnte dann der Titer des jeweiligen Virusstocks berechnet werden.

2.2.2.15. p24-ELISA

Zur Bestimmung der p24-Konzentration im Zellkulturmedium von mit HIV-1 infizierten Zellen wurde ein ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) verwendet. Im Allgemeinen wurde eine Doppelbestimmung von Proben und Standard durchgeführt und die Mittelwerte für die anschließende Auswertung verwendet. Dazu wurden zunächst MaxiSorb-96-*well* Platten mit dem anti-Capsid-Antikörper 183 (1:1000 in PBS, 100 µl pro *well*) über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer beladen. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit ELISA-Puffer gewaschen. Danach wurden 200 µl Blockpuffer in jedes *well* gefüllt und die Platten 2 h bei 37 °C inkubiert. Auf das Blocken folgten drei Waschschrte mit ELISA-Puffer. Die mit 0.2% Triton-X-100 inaktivierten und zellfreien Mediumproben wurden mit ELISA-Puffer verdünnt (je nach erwarteter p24-Konzentration 1:10 bis 1:10000). Pro *well* wurden 100 µl der verdünnten

Proben aufgetragen. Als Standard wurden je 100 µl von in ELISA-Puffer verdünntem Capsidprotein in sieben verschiedenen Konzentrationen zwischen 12.5 und 0.2 ng/µl aufgetragen. Nach dem Aufbringen der Proben und des Standards wurden die Platten über Nacht bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Am dritten Tag wurden die Platten zunächst erneut gewaschen bevor 100 µl von in AK-Puffer verdünntem Zweitantikörper (Kaninchen-anti-p24, rabbit α p24, 1:1000) in jedes *well* gegeben wurden. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die Platten wieder gewaschen. Darauf folgte die Zugabe von 100 µl des ebenfalls in AK-Puffer verdünnten Drittantikörpers (Peroxidase-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper, α rabbit-PO, 1:2000) und eine weitere einstündige Inkubation bei 37 °C. Vor der Entwicklung wurden die Platten dreimal mit ELISA-Puffer und anschließend dreimal mit H₂O gewaschen. Dann wurden 100 µl/*well* Substralösung zugegeben. Die Farbreaktion wurde nach 5 min bei Raumtemperatur mit Stopplösung angehalten. Die Quantifizierung der Reaktion erfolgte photometrisch im ELISA-Reader. Mit Hilfe der Werte der Standardproben konnte eine Eichgerade erstellt werden, die der Ermittlung der p24-Konzentrationen der Zellkulturproben diene.

2.2.2.16. Bestimmung der Luziferaseaktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Firefly- bzw. Renillaluziferase erfolgte mit dem Steady-Glo Luciferase Assay System bzw. dem Renilla Assay System nach den jeweiligen Herstellerangaben. Dazu wurden die jeweiligen Zellproben lysiert und mit dem jeweiligen Substrat versetzt. Anschließend wurde die relative Lichtintensität im Luminometer gemessen.

2.2.2.17. Selektion von Fusionsinhibitor-resistenten HIV-1-Varianten

TZM-bl Zellen wurden einen Tag vor der Infektion in 6-*well*-Platten ausgesät, dabei wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen/*well* verwendet. PM-1 Zellen wurden direkt vor der Infektion pelletiert, in frischen RPMI aufgenommen und in

der verwendeten Zellzahl entsprechenden Zellkulturgefäße überführt. Im Allgemeinen wurden $1 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen verwendet. Die Virusstocks wurden aufgetaut, mit DMEM-Medium verdünnt und zu den Zellen gegeben. Je nach Experiment betrug die MOI 0.01-1.0. 24h nach der Infektion erfolgte ein Mediumwechsel. Danach wurden die Zellen unter den üblichen Kulturbedingungen gehalten, dabei wurde die virale Replikation mittels p24-ELISA beobachtet. Die maximale Kulturdauer betrug 40 Tage.

2.2.2.18. Replikationskinetiken

Für die Replikationskinetiken der selektierten HIV-Varianten wurden PM-1, PM-1/M87 und PM-1/C46-B Zellen bei einer MOI von 0.01 infiziert. 24h nach der Infektion erfolgte ein Mediumwechsel. Danach wurden die infizierten Zellen unter den üblichen Bedingungen kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden Proben für den p24-ELISA entnommen. Die maximale Kulturdauer betrug 18 Tage. Es wurden stets zwei unabhängige Infektionen pro Virus und Zelllinie durchgeführt.

2.2.2.19. Bestimmung der HIV-Infektivität in Gegenwart von membranverankerten Fusionsinhibitoren

Die Infektivität von HIV wurde mit Hilfe von transduzierten TZM-bl oder PM-1 Zellen ermittelt. Sollten TZM-bl Zellen verwendet werden, so wurden diese einen Tag vor der Infektion in 96-well-Zellkulturplatten ($2.5 \cdot 10^3$ Zellen/well) ausgesät. In diesem Fall wurden 4 unabhängige Infektionen pro Virus und Zelllinie angesetzt. PM-1 Zellen wurden direkt vor der Infektion pelletiert, mit PBS gewaschen und zusammen mit frischem RPMI-Medium in 96-well-Spitzbodenplatten ($1 \cdot 10^4$ Zellen/well) verteilt. Bei der Verwendung von PM-1 Zellen wurden 6 unabhängige Infektionen angesetzt. Die Zellen wurden mit 1000 infektiösen Einheiten/well infiziert. 48-72h nach der Infektion wurde das Medium von den TZM-bl Zellen abgesaugt und die Firefly-Luziferaeaktivität mit Hilfe des Steady-Glo Luciferase Assay System bestimmt. PM-1 Zellen wurden nach 48h mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen

und die Messung der Renilla-Luziferase mit Hilfe des Renilla Assay Systems. In beiden Fällen wurden die für untransduzierte Zellen gemessenen relativen Lichteinheiten auf 100% gesetzt und so die relativen Infektionsraten für die transduzierten Zellen ermittelt.

2.2.2.20. T-20 Inhibitionsassay

Um die Konzentration zu bestimmen, bei der lösliches T-20 die Infektivität von HIV zu 50% inhibiert (IC_{50} -Wert), wurden TZM-bl Zellen verwendet. Diese wurden am Tag vor der Infektion in 96-well-Zellkulturplatten ($2.5 \cdot 10^3$ Zellen/well) ausgesät. Vor der Infektion mit jeweils 1000 infektiösen Einheiten wurden die Zellen 30 min lang mit löslichem T-20 in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0.004-10 $\mu\text{g/ml}$ vorinkubiert. Pro Virus und T-20-Konzentration wurden 3 unabhängige Infektionen angesetzt. 72h nach der Infektion wurde die Luziferaeaktivität mit Hilfe des Steady Glo Luciferase Assays bestimmt und die relativen Infektionsraten, bezogen auf die relativen Lichteinheiten, die für unbehandelte TZM-bl Zellen gemessen wurden, ermittelt.

2.2.2.21. Fitnessassay

Die Fitnessassays wurden im Wesentlichen wie von Neumann *et al.* (2005) beschrieben von Isabel Hagmann durchgeführt. Dazu wurden die BaL-, BaL-VK-, NL4.3- und NL4.3-S-Hüllproteinen in die Vektoren TN6G und TN8 kloniert. Die so erhaltenen Plasmide wurden wie zur Produktion infektiöser Viruspartikel mittels 293T Transfektion verwendet. Danach erfolgte die Titration der geernteten Virusstocks. Anschließend wurden $1 \cdot 10^6$ PM-1 Zellen bei einer MOI von jeweils 0.025 mit je einem TN6G- und einem TN8-Virus coinfiziert. 6h nach der Infektion wurden die Zellen gewaschen, danach wurden sie unter den üblichen Kulturbedingungen gehalten. Die Hälfte der Zellen wurde 3 Tage nach der Infektion mit PFA fixiert. Darauf folgte die Quantifikation der eGFP- und mRFP-Fluoreszenz im Fluorometer. Die restlichen Zellen wurden bis zum Tag 7 nach der Infektion weiter kultiviert und dann ebenfalls fluorometrisch untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Expression von membranverankerten Fusionsinhibitoren

Vorraussetzung für die Durchführung der beiden in der vorliegenden Arbeit zu bearbeitenden Teilprojekte war es, verschiedene HIV-Fusionsinhibitoren auf der Oberfläche von HIV-Zielzellen zu exprimieren. Dazu wurde die T-Zelllinie PM-1 verwendet. Zusätzlich sollte auch die Indikatorzelllinie TZM-bl so modifiziert werden, dass sie die membranverankerten Fusionsinhibitoren exprimiert.

3.1.1. Sequenzen der Fusionsinhibitoren

Die Aminosäuresequenzen von T-20 und C46 entsprechen den Positionen 127-162 bzw. 117-162 von gp41 des HIV-1 Subtyp B-Stamms HXB2 (Egelhofer *et al.*, 2004; Wild *et al.*, 1993). Um die unterschiedliche inhibitorische Wirkung auf die Replikation verschiedener HIV-Subtypen genauer untersuchen zu können, wurden Subtyp A- und C-spezifische C46-Derivate (C46-A bzw. C46-C) verwendet. Die Sequenz dieser C46-Derivate wurde von den entsprechenden Consensussequenzen der bekannten Subtyp A- und C-Isolate abgeleitet (HIV Sequence Database, 2003). Zur Abgrenzung von den subtypspezifischen C46-Derivaten werden im Folgenden das von der HXB2-Sequenz abgeleitete C46 als C46-B und der zur Expression von C46-B verwendete Vektor als pM87-B

bezeichnet. Abbildung 3.1 zeigt die Sequenzen der verwendeten Fusionsinhibitoren. Da die Sequenzunterschiede auch das Epitop des zum Nachweis der Expression der membranverankerten Fusionsinhibitoren verwendeten humanen Antikörpers 2F5 betreffen, wurden die Sequenzen von C46-A und C46-C so verändert, dass das ELDKWA-Motiv enthalten ist.

Als Kontrolle für die Infektivitätsassays mit den selektierten HIV-Varianten (s. Abschnitt 3.3.2.2) wurde zusätzlich das membranverankerte Peptid M426 verwendet, in dessen Sequenz im Vergleich zu C46-B elf Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurden.

T-20	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLE ELDKWA SLWNWF
C46-B	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLE ELDKWA SLWNWF
C46-A	-LQ--K--S---QI-YQ-----D-- A -----N-----
C46-C	-MQ-----S---NT-YR-L-D-----KD-- A--S-QN -----
M426	A--A---A--A--AA--AA-----AA-A-

Abb. 3.1: Aminosäuresequenzen der verwendeten Fusionsinhibitoren.

Bei den subtypspezifischen C46-Derivaten und M426 sind nur die gegenüber C46 veränderten Aminosäuren dargestellt. Fett gedruckte Buchstaben kennzeichnen das ELDKWA-Epitop des Antikörpers 2F5 bzw. die in C46-A und C46-C hiervon abweichenden Aminosäuren, die in den verwendeten membranverankerten Peptiden entsprechend abgewandelt wurden.

3.1.2. Transduktion und Selektion der Zellen

Membranverankertes T-20 (mT-20), C46-B und M426 wurden mit Hilfe der Plasmide pM87, pM87o-B und pM426 exprimiert, die von Dorothee von

Laer zur Verfügung gestellt wurden. Für die Expression von C46-A und C46-C wurde pM87o-B entsprechend modifiziert.

Die mT-20 exprimierenden PM-1 Zellen (PM-1/M87) wurden von Dorothee von Laer zur Verfügung gestellt. Für die Expression von C46-A, C46-B und C46-C wurden PM-1 und TZM-bl Zellen mit den entsprechenden retroviralen Vektoren transduziert. Außerdem wurden TZM-bl Zellen mit pM87 und pM426 transduziert. Danach wurden die transduzierten Zellen mit Hilfe des Antibiotikums G418 selektiert.

3.1.3. Nachweis der Expression

Die Expression der Fusionsinhibitoren auf der Zelloberfläche der transduzierten und selektierten Zellen wurde mittels Durchflusscytometrie (FACS) nachgewiesen. Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch die FACS-Ergebnisse der transduzierten PM-1 Zellen. Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse der Expressionskontrolle zusammen. Alle verwendeten Zellen exprimierten die membranverankerten Fusionsinhibitoren zu 87-99%, wobei der Anteil der Zellen, die die Peptide exprimieren bei mT-20 jeweils am geringsten, bei C46-B jeweils am höchsten war.

Neben der Expression der Fusionsinhibitoren wurde auch die Expression von CD4, CXCR4 und CCR5 kontrolliert um sicherzustellen, dass die Voraussetzungen für Infektionen mit HIV gegeben sind. Alle für weitere Untersuchungen verwendeten Zellen exprimierten die Rezeptoren in einem mit den untransduzierten Zellen vergleichbaren Maß (Daten nicht gezeigt).

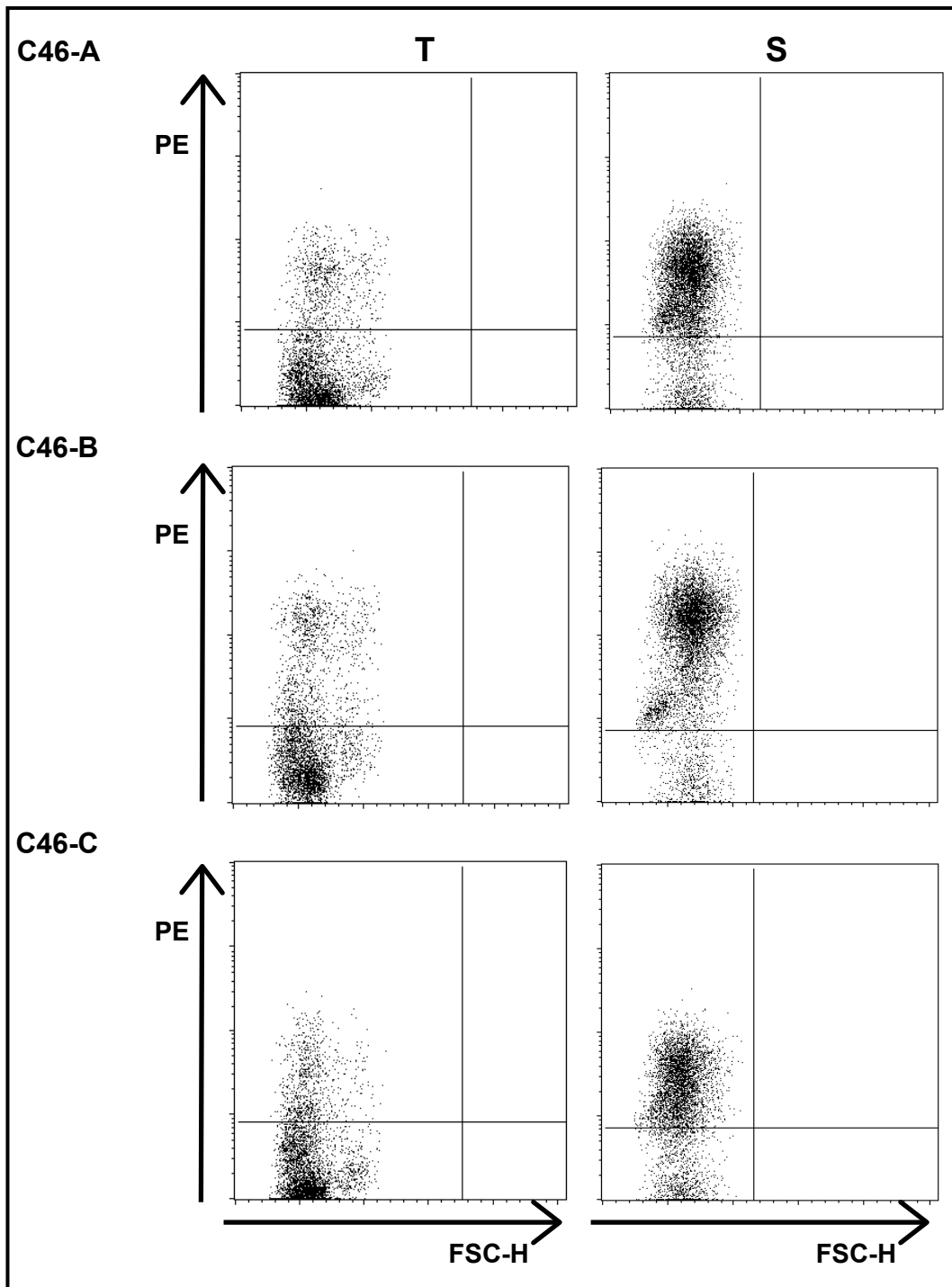


Abb. 3.2: FACS-Analyse transduzierter und selektierter PM-1 Zellen.
Als Primärantikörper diente 2F5, als Sekundärantikörper ein PE-gekoppelter gegen humanes IgG gerichteter Antikörper. Als Kontrolle dienten untransduzierte Zellen. Links sind jeweils die FACS-Ergebnisse nach der Transduktion (T) rechts nach der Selektion (S) abgebildet.

Tab. 3.1: Expression von Fusionsinhibitoren.

Angegeben sind die Fusionsinhibitor exprimierenden Zellen nach der G418-Selektion in Prozent.

	mT-20	C46-A	C46-B	C46-C
PM-1	87	90	94	89
TZM-bl	92	98	99	98

3.1.4. Quantifizierung der Expression

Die Quantifikation der Expression membranverankerter Fusionsinhibitoren auf der Zelloberfläche wurde in Zusammenarbeit mit Felix Hermann und Dorothee von Laer im Georg-Speyer-Haus, Frankfurt mit Hilfe eines quantitativen FACS-Assays durchgeführt. Dazu wurden die zu analysierenden Zellen sowie eine Mischung aus mit vier verschiedenen, definierten Mengen von anti-humanen IgG gekoppelten *beads* mit FITC-markiertem 2F5 angefärbt und im Durchflusscytometer analysiert. Die ermittelten geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenz der vier *bead*-Populationen wurden dann gegen die bekannten Antikörperbindekapazitäten (ABK) aufgetragen. Mit Hilfe der so ermittelten Eichgerade konnten dann die ABK-Werte der untersuchten Zellen bestimmt werden. Tabelle 3.2 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tab. 3.2: Expressionsstärke membranverankerter Fusionsinhibitoren.
 Angegeben sind die jeweiligen Antikörperbindekapazitäten.

	mT-20	C46-A	C46-B	C46-C
PM-1	738	5869	24837	3605
TZM-bl	315	14607	23231	8424

Es wird deutlich, dass die Transduktion mit pM87o-B zu den jeweils höchsten ABK-Werte führte. So war der für PM-1/C46-B Zellen ermittelte ABK-Wert viermal größer als der für PM-1/C46-A Zellen ABK-Wert und siebenmal größer als der für PM-1/C46-C Zellen ermittelte ABK-Wert. Der ABK-Wert, der für TZM-bl/C46-B Zellen bestimmt wurde war 1.5mal so hoch wie der ABK-Wert der TZM-bl/C46-A Zellen und dreimal so hoch wie der ABK-Wert der TZM-bl/C46-C Zellen. Zwar waren die Unterschiede bei den transduzierten TZM-bl Zellen geringer als bei den transduzierten PM-1 Zellen, die Tendenz, dass die Expression von C46-B am stärksten und die von C46-C am schwächsten ausgeprägt war, war jedoch für beide Zelllinien gleich. Auch die Tatsache, dass mT-20 wesentlich weniger stark exprimiert wurde, gilt sowohl für PM-1 als auch für TZM-bl Zellen. Allerdings war hier der Unterschied bei den transduzierten TZM-bl Zellen stärker ausgeprägt. So war der für TZM-bl/M87 Zellen ermittelte ABK-Wert 70mal höher als der für TZM-bl/C46-B Zellen bestimmte Wert während die Transduktion mit dem optimierten Vektor bei PM-1 Zellen zu einer 34fachen Erhöhung des ABK-Werts führte.

3.2. Inhibition der HIV-Infektion durch subtypspezifische C46-Derivate

Ziel dieses Teilprojektes war es, die Unterschiede bei der Inhibition verschiedener HIV-Subtypen durch membranverankerte Fusionsinhibitoren zu ermitteln. Dazu wurde zunächst die Inhibition verschiedener HIV-Isolate und -Klone durch C46-B quantifiziert. Ein Vergleich mit der Inhibition durch die Subtyp A- und C- spezifischen C46-Derivate sollte es dann ermöglichen die Sequenz eines optimierten Fusionsinhibitors zu ermitteln, der in der Lage ist ein möglichst breites Spektrum von HIV-Subtypen zu inhibieren.

3.2.1. Inhibition der HIV-Infektion durch C46-B

Um die Inhibition der Infektion verschiedener HIV-Isolate und durch C46-B miteinander vergleichen zu können, wurde ein *single round* Infektionsassay verwendet. Dazu wurden TZM-bl und TZM-bl/C46-B jeweils mit der gleichen Anzahl infektiöser Einheiten infiziert. 48 bis 72 Stunden nach der Infektion wurde die Effektivität der Infektion mit Hilfe des Steady-Glo Luziferaseassays im Luminometer ermittelt. Um die Infektionsraten der verschiedenen Isolate miteinander vergleichen zu können, wurden die für die Infektion von TZM-bl Zellen ermittelten relativen Lichteinheiten als 100 prozentige Infektionsrate für das jeweilige Isolat definiert. Es wurden Isolate der HIV-1 Gruppe M Subtypen A, B, C, D, G und J, der HIV-1 Gruppen N und O sowie ein HIV-2-Isolat verwendet. Zusätzlich wurde auch die Inhibition der T-20 insensitiven HIV-Klone TN7-

R14 und TN7-X23 untersucht. Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

Mit VSV-G pseudotypisierte HIV_{NL4.3}-Partikel dienten als Kontrolle der Infizierbarkeit der transduzierten Zellen und konnten diese mit einer relativen Infektionsrate von $88.9 \pm 11.3\%$ infizieren. Dahingegen wurde die NL4.3 Infektion zu 98% inhibiert (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchungen zur inhibitorischen Kapazität von C46-A und C46-C wurden auf die gleiche Weise durchgeführt wie bei C46-B (s. Abb. 3.4 und Abb. 3.5).

Die relative Infektionsraten der Subtyp B-Isolate BaL und 2005 in TZM-bl/C46-B Zellen betrug weniger als 3%. Auch für die beiden T-20 insensitiven HIV-Klone wurde eine niedrige Infektionsrate von weniger als 5% ermittelt. Im Gegensatz dazu betrug die Infektionsrate von JRCSF 26%. Die beiden Subtyp A-Isolate RW29 und UG29 sowie zwei der drei Subtyp C-Isolate (TZ5 und SE12808) wiesen Infektionsraten zwischen 5 und 10% auf, die Infektionsrate des dritten untersuchten Subtyp C-Isolats IN22 betrug 18%. Auch UG25 (Subtyp D), RU570 (Subtyp G) und YBF (Gruppe N) konnten TZM-bl/C46-B Zellen nur zu weniger als 5% infizieren. Die Infektionsrate von SE9280 (Subtyp J), MVP8161 (Gruppe O) und CBL20 (HIV-2) betrug etwa 40%.

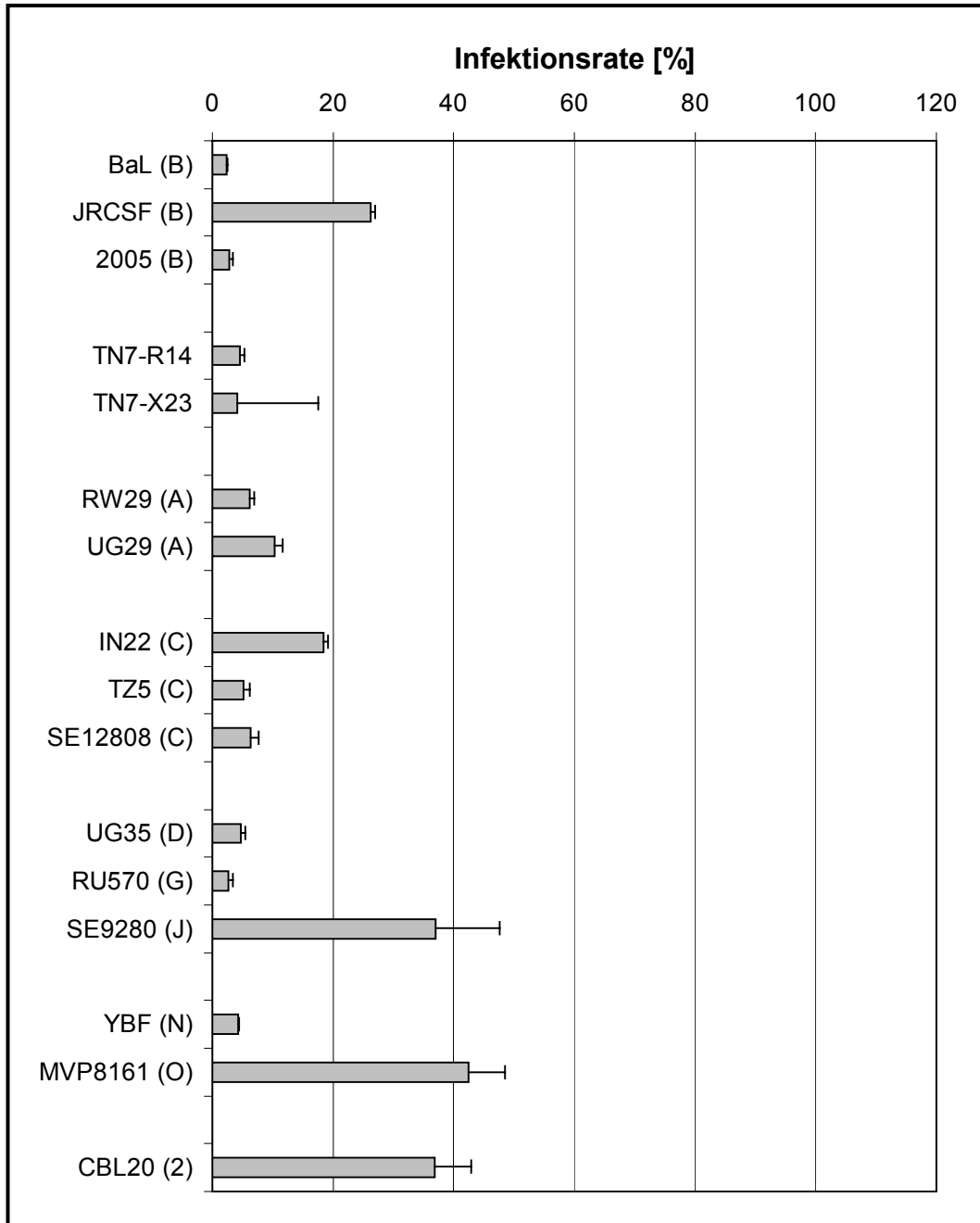


Abb. 3.3: Inhibition der Infektion durch TZM-bl/C46-B Zellen.

Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils vier unabhängigen Infektionen, dargestellt als relative Infektionsrate in Prozent bezogen auf die Infektion von TZM-bl Zellen. Die MOI betrug 0.2. Eingeklammerte Buchstaben bezeichnen die jeweiligen HIV-1-Subtypen der Gruppe M bzw. die HIV-1 Gruppen N und O. (2) steht für HIV-2. Bei TN7-R14 und TN7-X23 handelt es sich um T-20 insensitive HIV-1-Klone des Subtyps B.

TZM-bl/C46-B Zellen waren also in der Lage die Infektion von Isolaten der HIV-1 Subtypen A, B, C, D und J sowie der Gruppe N und von T-20

insensitiven HIV-Klonen zu 90% oder mehr zu inhibieren, wobei einzelne Isolate (JRCSF, IN22) nur zu 75-80 % inhibiert werden. Auch die Infektion der übrigen untersuchten Isolate (Subtyp J, Gruppe N und HIV-2) wurde durch TZM-bl/C46-B Zellen immerhin noch zu ungefähr 60 % gehemmt.

3.2.2. Inhibition der HIV-Infektion durch C46-A

Wie aus Abbildung 3.4 hervorgeht, betragen die relativen Infektionsraten der Subtyp A-Isolate RW29 und UG29 in TZM-bl/C46-A Zellen 51 bzw. 65%. Die Infektionsraten der Subtyp B HI-Viren BaL, 2005 und TN7-R14 betragen 22-29%. JRCSF infizierte TZM-bl/C46-A Zellen zu 47%, TN7-X23 zu 57%. Die Infektionsrate von UG35 betrug 12% dagegen waren RU570 und YBF in der Lage TZM-bl/C46-A Zellen zu 37 bzw. 33% zu infizieren. Die Infektionsraten von SE9280 (85%), MVP8161 (92%) und CBL20 (100%) in TZM-bl/C46-A Zellen unterschieden sich kaum bzw. nicht von denen in untransduzierten Zellen.

Auffallend ist, dass die Infektion sämtlicher untersuchter HIV-Isolate und -Klone in TZM-bl/C46-A Zellen weniger stark inhibiert wurde als in TZM-bl/C46-B Zellen. Das gilt insbesondere auch für die Subtyp A-Isolate, die nur zu ca. 50% (RW29) bzw. 35% (UG29) inhibiert wurden. Die Inhibition der Subtyp B, C, D, und G-Viren und des Gruppe N-Isolates betrug 45-90%. SE9280, MVP8161 und CBL20 wurden in TZM-bl/C46-A Zellen nicht gehemmt.

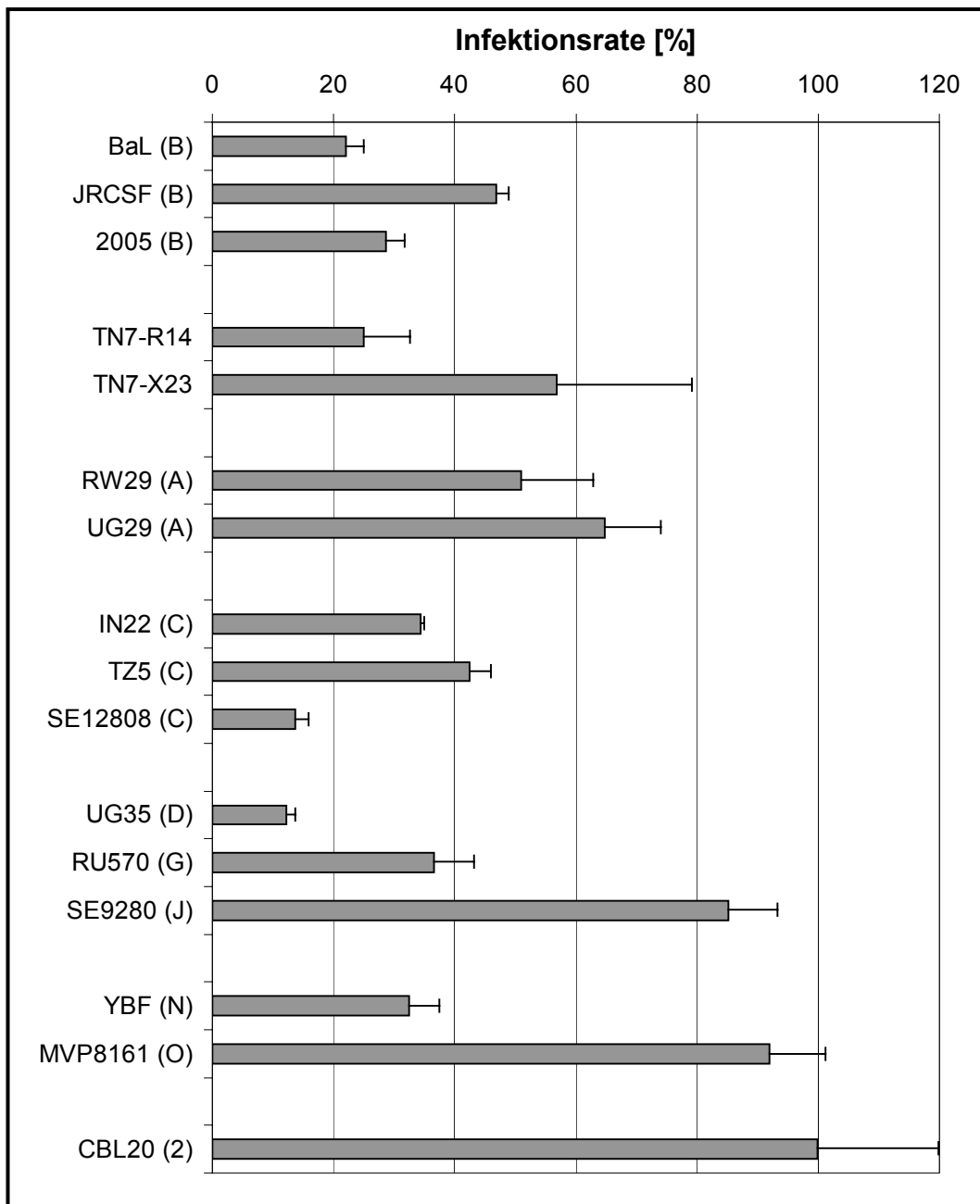


Abb. 3.4: Inhibition der Infektion durch TzM-bl/C46-A Zellen.
Erläuterungen s. Abb. 3.3.

3.2.3. Inhibition der HIV-Infektion durch C46-C

Abbildung 3.5 zeigt, dass die relativen Infektionsraten der Subtyp C-Isolate in TzM-bl/C46-C Zellen zwischen 3 und 10% lagen. Die Subtyp

A-Isolate wiesen Infektionsraten von 20-25% auf. BaL, 2005 und TN7-R14 infizierten TZM-bl/C46-C Zellen zu 10-15%, TN7-X23 zu 30% und JRCSF zu 63%.

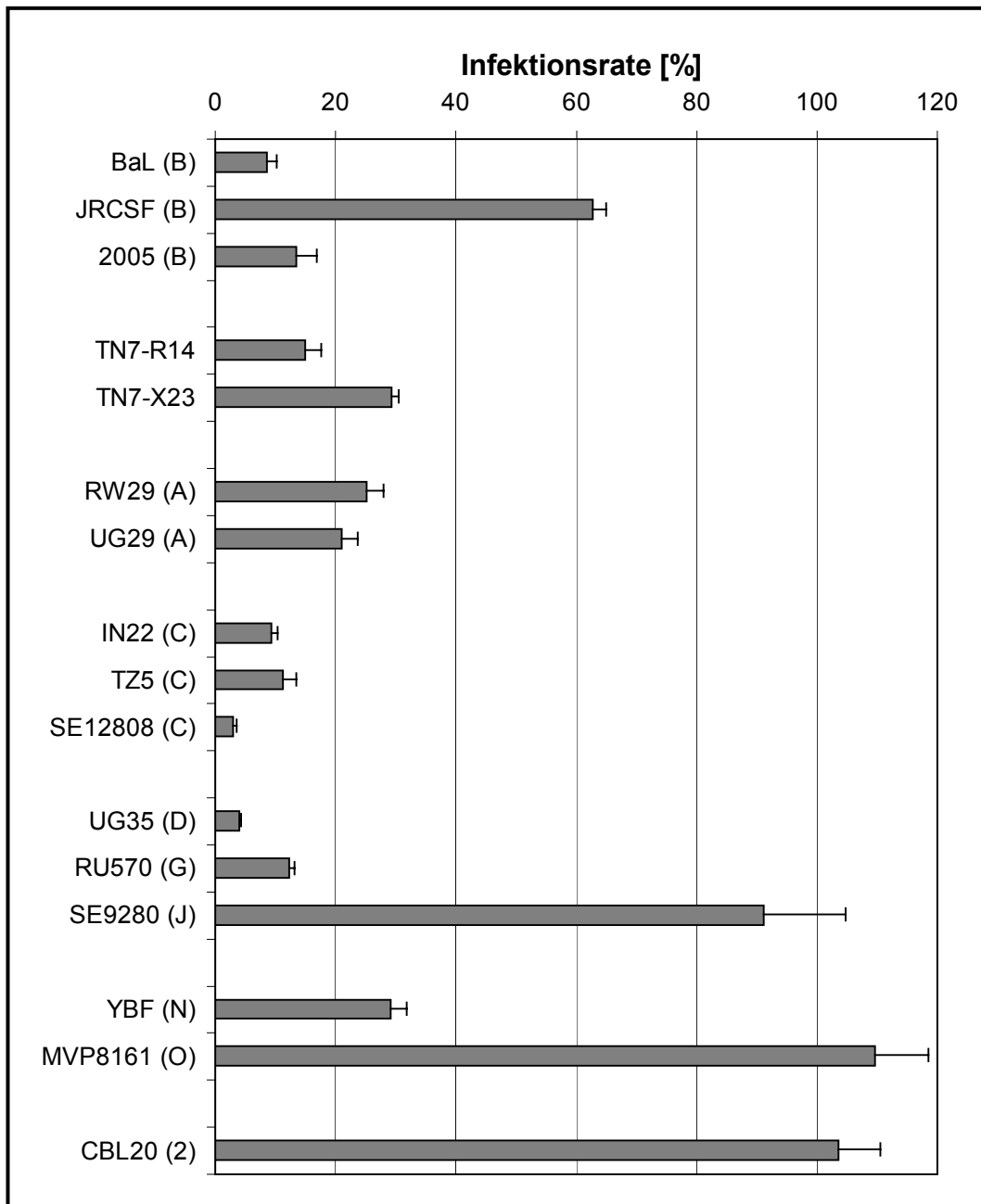


Abb. 3.5: Inhibition der Infektion durch TZM-bl/C46-C Zellen.
Erläuterungen s. Abb. 3.3.

Die Infektionsraten von UG35, RU570 und YBF betragen 4%, 12% bzw. 29%. Die Infektionsraten von SE9280, MVP8161 und CBL20 in TZM-bl/C46-C Zellen unterschieden sich nicht signifikant von denen in TZM-bl Zellen.

Die Inhibition der Subtyp C-Isolate IN22 und SE12808 war in TZM-bl/C46-C (90 bzw. 97%) Zellen stärker ausgeprägt als in TZM-bl/C46-B Zellen (80 bzw. 94%). Dagegen wurde TZ5-Infektion in TZM-bl/C46-B Zellen (95%) stärker gehemmt als in TZM-bl/C46-C Zellen (90%). Die Inhibition von UG35 (ca. 95%) war in beiden Zelllinien vergleichbar, für alle weiteren HI-Viren gilt, dass sie in TZM-bl/C46-C Zellen nicht so stark inhibiert wurden wie in TZM-bl/C46-B Zellen. Abgesehen von JRCSF (ca. 30% Inhibition) wurden die Subtyp B-Viren zu 70-90% inhibiert. Die Inhibition der Subtyp A-Isolate betrug 75-80%. Die Infektion von RU570 und YBF wurde zu 88 bzw. 70% inhibiert. SE9280, MVP8161 und CBL20 wurden in TZM-bl/C46-C Zellen nicht inhibiert.

3.3. Resistenz gegen membranverankerte Fusionsinhibitoren

In diesem Teilprojekt sollte die Resistenzentwicklung gegen membranverankerte Fusionsinhibitoren charakterisiert werden. Ein weiteres Ziel war es, die Resistenzentwicklung verschiedener HIV-1-Subtypen miteinander zu vergleichen.

3.3.1. Selektion von resistenten HIV-1-Varianten

Die Selektion resistenter HIV-1-Varianten sollte mittels serieller Viruspassage in den transduzierten Zellen erfolgen.

3.3.1.1. Infektion von PM-1/C46 (-A, -B, -C) Zellen mit HIV-1-Isolaten

Um resistente HI-Viren zu selektieren wurden zunächst C46-A, C46-B und C46-C exprimierende PM-1 Zellen mit den HIV-1 Isolaten RW29 (Subtyp A), BaL (Subtyp B), JRCSF (Subtyp B) und IN22 (Subtyp C) infiziert. Um sicherzustellen, dass alle verwendeten Virusisolate infektiös sind wurden auch untransduzierte PM-1 Zellen infiziert. Die MOI betrug jeweils 0.1. Die virale Replikation wurde mittels p24-ELISA kontrolliert. Trotz einer langen Kulturdauer von bis zu 40 Tagen und mehrfacher Wiederholung der Infektionen, konnte in den transduzierten Zellen keine virale Infektion nachgewiesen werden. Auch die Erhöhung der MOI auf 1.0 und die Verwendung der zusätzlichen HIV-1-Isolate RW9 (Subtyp A) und ZA3 (Subtyp C) sowie des HIV-1-Klons NL4.3 (Subtyp B) führte nicht zum Auftreten von resistenten Virusvarianten.

3.3.1.2. Infektion von PM-1/C46 (-A, -B, -C) Zellen mit T-20 insensitiven HIV-1-Klonen

Da die Selektion resistenten HIV-1-Isolaten nicht erfolgreich war, wurde untersucht, ob es mit Hilfe der T-20 insensitiven Klone TN7-R14 und TN7-X23 möglich ist C46 resistente HI-Viren zu selektieren. Dazu wurden PM-1, PM-1/C46-A, PM-1/C46-B, und PM-1/C46-C Zellen bei einer MOI von 1.0 infiziert und die virale Replikation mittels p24-ELISA kontrolliert.

Auch die T-20 insensitiven HIV-1-Klone waren nicht in der Lage in den transduzierten Zellen zu replizieren.

3.3.1.3. Infektion von TZM-bl/C46 (-A, -B, -C) Zellen mit HIV-1-Isolaten

Aus den Infektionsstudien mit transduzierten TZM-bl Zellen (s. Abb. 3.3, 3.4 und 3.5) war bekannt, dass eine Infektion dieser Zellen grundsätzlich möglich ist. Deshalb wurden für das nächste Selektionsexperiment TZM-bl, TZM-bl/C46-A, TZM-bl/C46-B und TZM-bl/C46-C Zellen mit je zwei Subtyp A- (RW29 und UG29) und Subtyp B-Isolaten (BaL und JRCSF), drei Subtyp C-Isolaten (IN22, ZA3, TZ5) und dem Subtyp G-Isolat RU570 infiziert. Die virale Replikation wurde mit Hilfe des Steady Glo Luziferaseassays im Luminometer kontrolliert. Die MOI betrug 0.01. Auch durch die Verwendung der transduzierten TZM-bl Zellen konnten keine C46-resistenten HIV-1-Varianten selektiert werden.

3.3.1.4. Infektion von PM-1/M87 Zellen mit BaL und NL4.3

Da keine HIV-1-Varianten, die gegen die verschiedenen C46-Derivate resistent sind selektiert werden konnten, wurden nun die mT-20 exprimierenden PM-1/M87 Zellen mit BaL und NL4.3 infiziert. Die MOI betrug jeweils 0.1. Die virale Replikation wurde mittels p24-ELISA kontrolliert.

14 Tage nach der Infektion betrugen die p24-Konzentrationen der zellfreien Überstände der mit BaL infizierten PM-1 Kultur 4350 ng/ml und der Überstände der mit BaL infizierten PM-1/M87 Kultur 3740 ng/ml.

19 Tage nach der Infektion waren die p24-Konzentrationen auf 5420 ng/ml (PM-1) bzw. 4160 ng/ml (PM-1/M87) angestiegen. Die p24-Konzentrationen der mit NL4.3 infizierten Kulturen betragen 14 Tage nach der Infektion 3260 ng/ml (PM-1) bzw. 2960 ng/ml (PM-1/M87) und 19 Tage nach der Infektion 6250 ng/ml (PM-1) bzw. 7281 ng/ml (PM-1/M87).

Die zweite Selektionsrunde wurde gestartet indem je $1 \cdot 10^5$ PM-1 bzw. PM-1/M87 Zellen mit je 1 ml zellfreien Überstandes (Tag 19) der ersten Selektionsrunde infiziert wurden. Die p24-Konzentrationen in den zellfreien Überständen der mit BaL infizierten Kulturen betragen sieben Tage nach der Infektion 3160 ng/ml (PM-1) bzw. 1130 ng/ml (PM-1/M87) und elf Tage nach der Infektion 6740 (PM-1) bzw. 3840 ng/ml (PM-1/M87). In den zellfreien Überständen der mit NL4.3 infizierten Kulturen wurden am siebten Tag nach der Infektion p24-Konzentrationen von 2800 ng/ml (PM-1) bzw. 2850 ng/ml (PM-1/M87), am elften Tag nach der Infektion p24-Konzentrationen von 6800 ng/ml (PM-1) bzw. 7180 ng/ml (PM-1/M87) bzw. nachgewiesen. Elf Tage nach Beginn der zweiten Selektionsrunde wurden die zellfreien Überstände geerntet, bei -20°C eingefroren und anschließend mit der Hilfe von TZM-bl Zellen titriert.

Eine dritte Selektionsrunde wurde durch die Infektion von PM-1/M87 Zellen mit den jeweiligen nach der zweiten Selektionsrunde geernteten Virusstocks bei einer MOI von 0.5 begonnen. Als Kontrolle wurden PM-1 Zellen unter den gleichen Bedingungen infiziert. Die virale Replikation wurde wieder mittels p24-ELISA der zellfreien Kulturüberstände kontrolliert. 15 Tage nach der Infektion betragen die jeweiligen

p24-Konzentrationen 1110 ng/ml (BaL; PM-1) bzw. 9860 ng/ml (BaL; PM-1/M87) und 11330 ng/ml (NL4.3; PM-1) bzw. 9880 ng/ml (NL4.3; PM-1/M87). Am 17. Tag nach Beginn der dritten Selektionsrunde wurden die zellfreien Überstände bei -20°C eingefroren und die jeweiligen Titer anschließend mit Hilfe von TZM-bl Zellen ermittelt. Die so gewonnenen Virusstocks dienten der Charakterisierung der selektierten BaL- und NL4.3-Varianten.

3.3.1.5. Infektion von PM-1/M87 Zellen mit HIV-1-Isolaten

Nach der erfolgreichen Selektion von mT-20 resistenten BaL- und NL4.3-Varianten wurden nun PM-1/M87 Zellen mit den HIV-1-Isolaten RW29, JRCSF, IN22 und TZ5 sowie als Kontrolle mit NL4.3 bei einer MOI von 0.1 infiziert. Außer bei der NL4.3-Kontrolle konnte mittels p24-ELISA jedoch keine virale Replikation in PM-1/M87 Zellen detektiert werden.

3.3.1.6. Infektion von PM-1/C46-B Zellen mit den selektierten BaL- und NL4.3-Varianten

Weiterhin wurde versucht mit Hilfe der selektierten BaL- und NL4.3-Varianten C46-B-resistente Varianten zu selektieren. Dazu wurden PM-1/C46-B Zellen bei einer MOI von 0.02 mit den aus der PM-1/M87-Selektion gewonnenen Virusstocks infiziert. Auch mit diesem Ansatz war es nicht möglich C46-B-resistente Virusvarianten zu selektieren.

3.3.2. Charakterisierung der Fusionsinhibitorresistenz der PM-1/M87-selektierten HIV-Varianten

3.3.2.1. Replikation in Gegenwart membranverankerter Fusionsinhibitoren

Zunächst wurden die selektierten BaL- und NL4.3-Varianten (BaL/sel, NL4.3/sel) bezüglich ihrer Replikationseigenschaften in PM-1, PM-1/M87 und PM-1/C46-B Zellen charakterisiert. Dazu wurden die verschiedenen Zellen mit den selektierten Varianten sowie mit den ursprünglichen BaL- und NL4.3-Virusstocks infiziert. Die virale Replikation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels p24-ELISA quantifiziert. Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

Die Wachstumskurven von NL4.3/sel und des parentalen Virus NL4.3/wt in PM-1 Zellen wiesen keine wesentlichen Unterschiede auf. Die selektierte BaL-Variante replizierte jedoch deutlich langsamer als der parentale Virus BaL/wt. Die Wachstumskurve von NL4.3/sel in PM-1/M87 Zellen war mit der in PM-1 Zellen vergleichbar. NL4.3/wt war dagegen nicht in der Lage in den mT-20 exprimierenden Zellen zu replizieren. Die Wachstumskurve von BaL/sel in PM-1/M87 Zellen wies keine signifikanten Unterschiede zu der von NL4.3/sel auf. BaL/wt war ebenso wie NL4.3/wt nicht in der Lage in PM-1/M87 Zellen zu replizieren. Die selektierten BaL und NL4.3-Varianten weisen also einen mT-20-resistenten Phänotyp auf.

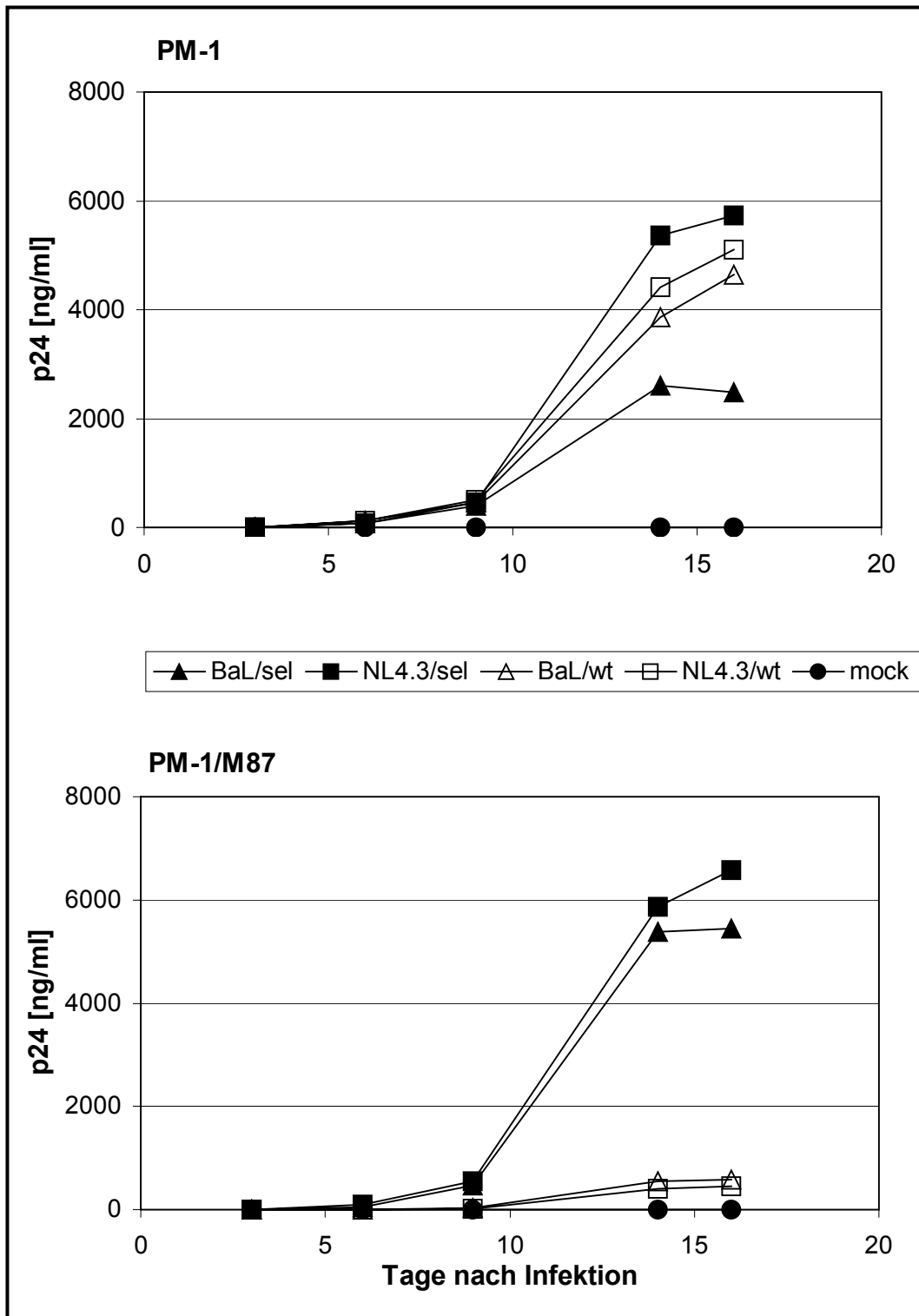


Abb.3.6: Replikationskinetiken der selektierte BaL- und NL4.3-Varianten. Dargestellt sind Mittelwerte der p24-Konzentrationen im zellfreien Überstand von jeweils zwei unabhängigen Infektionen. Die MOI betrug 0.01. sel: selektierte Variante; wt: Wildtyp, ursprüngliche Variante; mock: nicht infizierte Zellen.

Der leichte Anstieg der p24-Konzentrationen in den mit den parentalen Viren infizierten PM-1/M87-Kulturen ab Tag 14 ist wahrscheinlich auf die beginnende Selektion resistenter Varianten zurückzuführen (s. Abschnitt 3.3.1.4). Keine der untersuchten Virusvarianten konnte in PM-1/C46-B Zellen replizieren (Daten nicht gezeigt; s. Abschnitt 3.3.1.6).

3.3.2.2. Infektivität in Gegenwart membranverankerter Fusionsinhibitoren

In weiteren Experimenten erfolgte die Charakterisierung der selektierten BaL- und NL4.3-Varianten bezüglich ihrer Infektivität. Dazu wurde der oben beschriebene *single round* Infektionsassay verwendet. TZM-bl, TZM-bl/M87, TZM-bl/C46-B und TZM-bl/M426 Zellen wurden mit den parentalen und selektierten BaL- und NL4.3-Varianten sowie als Kontrolle der Infizierbarkeit der transduzierten Zellen mit VSV-G-pseudotypisierten NL4.3-Partikeln infiziert. Abbildung 3.7 zeigt ein repräsentatives Ergebnis dieses Experiments.

Die für die TZM-bl/M426 Zellen ermittelten Werte wiesen keine signifikanten Unterschiede zu den für TZM-bl Zellen ermittelten Werte auf (Daten nicht gezeigt). Mit VSV-G pseudotypisierte NL4.3-Partikel infizierten TZM-bl/M87 zu $109 \pm 10\%$, TZM-bl/C46-B Zellen zu $86 \pm 11\%$.

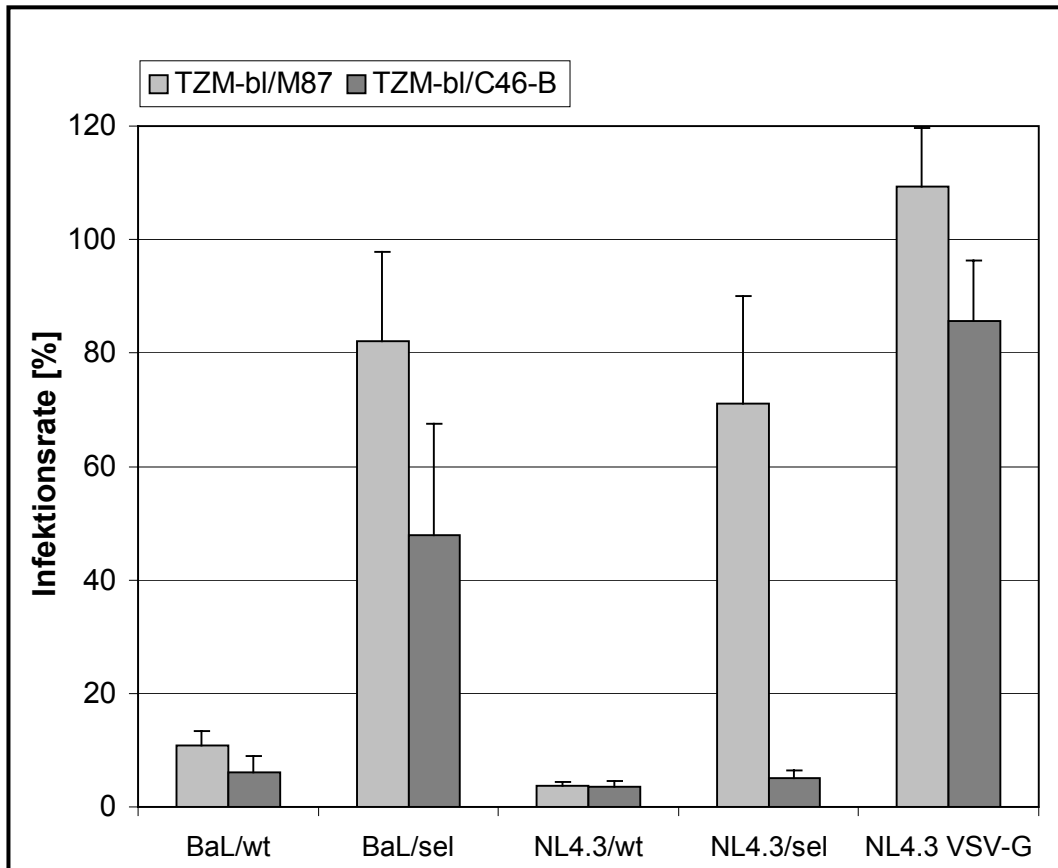


Abb. 3.7: Infektionsraten der selektierten HIV-Varianten.

Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Infektionen, dargestellt als relative Infektionsrate in Prozent bezogen auf die Infektion von TzM-bl Zellen. Die MOI betrug 0.2. NL4.3 VSV-G: mit VSV-G-pseudotypisierte NL4.3-Partikel.

Die relativen Infektionsraten von BaL/wt-Viren in TzM-bl/M87 und TzM-bl/C46-B Zellen betragen 11 bzw. 6%, die der selektierten BaL-Varianten 82 bzw. 48%. NL4.3/wt konnte sowohl TzM-bl/M87 als auch TzM-bl/C46-B Zellen nur zu etwa 4 % infizieren. Für NL4.3/sel betragen die relativen Infektionsraten in TzM-bl/M87 Zellen 71%, in TzM-bl/C46-B Zellen 5%.

Die mit Hilfe von PM-1/M87 Zellen selektierten HIV-Varianten erwiesen sich demnach als resistent gegen die Inhibition der Infektion in TzM-bl/M87 Zellen. Im Gegensatz zu NL4.3/sel wurde die Infektion mit

BaL/sel von TZM-bl/C46-B Zellen zu etwa 50% inhibiert. BaL/sel zeichnet sich also zusätzlich zur Resistenz gegen mT-20 auch durch eine partielle Resistenz gegen C46-B aus. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen der PM-1/C46-B Infektionen (s. Abschnitte 3.3.1.6 und 3.3.2.1).

3.3.2.3. Infektivität in Gegenwart von löslichem T-20

Ein weiteres Ziel war es, herauszufinden ob die in Gegenwart von membranverankertem T-20 selektierten HIV-Varianten auch eine Resistenz gegen das lösliche Peptid aufweisen. Dazu wurden TZM-bl Zellen mit verschiedenen Mengen von löslichem T-20 inkubiert, bevor sie mit den selektierten BaL- und NL4.3-Varianten sowie den parentalen Viren infiziert wurden. 48 Stunden nach der Infektion wurde die relative Infektivität mit Hilfe des Steady Glo Luziferaseassays ermittelt, wobei die bei unbehandelten TZM-bl Zellen ermittelten Werte auf 100% gesetzt wurden. Die relativen Infektionsraten wurden in Abhängigkeit der T-20-Konzentration aufgetragen und mit Hilfe der so erhaltenen Graphen konnten die jeweiligen T-20-Konzentrationen ermittelt werden, bei der die Infektivität auf 50% reduziert ist (IC_{50} -Wert).

Der IC_{50} -Wert der parentalen BaL-Variante betrug 0.22 $\mu\text{g/ml}$, der der selektierten BaL-Variante 3.1 $\mu\text{g/ml}$. Für NL4.3/wt wurde ein IC_{50} -Wert von 0.9 $\mu\text{g/ml}$ und für NL4.3/sel ein IC_{50} -Wert von 6.0 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Also sank die Empfindlichkeit für lösliches T-20 durch die M87-Selektion im Fall von BaL etwa 15fach, im Fall von NL4.3 etwa siebenfach.

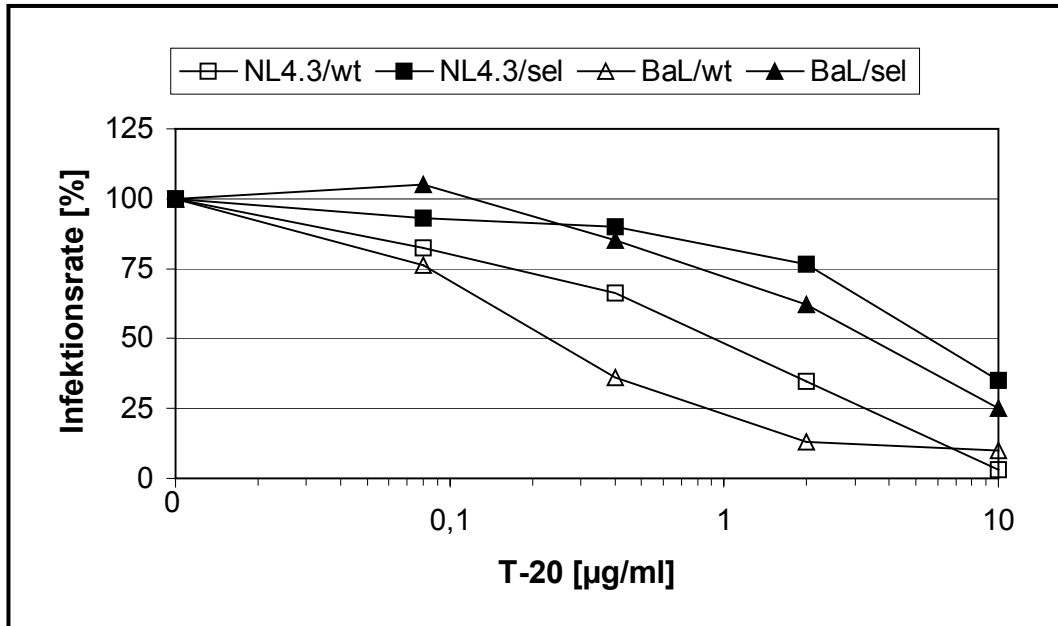


Abb. 3.8: Resistenz der selektierten Variaten gegen lösliches T-20.

Angegeben sind Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Infektionen, dargestellt als relative Infektionsrate in Prozent. Die MOI betrug 0.02. Diese Graphik diente der Ermittlung der IC_{50} -Werte.

3.3.3. Bestimmung der resistenzvermittelnden Faktoren

3.3.3.1. Sequenzanalyse der Hüllproteine der PM-1/M87-selektierten HIV-Varianten

Um festzustellen, ob einzelne Aminosäureaustausche die Resistenz gegen die membranverankerten Fusionsinhibitoren vermitteln, wurden die *env*-Gene der selektierten BaL- und NL4.3-Varianten sequenziert. Dazu wurde zunächst die virale RNA aus den nach der dritten Selektionsrunde geernteten Virusstocks extrahiert. Dann wurden die *env*-Gene mittels RT-PCR amplifiziert und die PCR-Produkte in den Vektor pCR4-TOPO kloniert. Danach erfolgte die DNA-Sequenzierung der für HR1 und HR2 kodierenden Bereiche.

Insgesamt wurden die DNA-Sequenzen von 20 BaL/sel-Klone und 24 NL4.3/sel-Klone analysiert. Auf Aminosäureebene wiesen die Sequenzen von 19 der untersuchten BaL/sel-Klone zwei Mutationen, eine in HR1 die andere in HR2, auf. Dabei handelte es sich um einen Isoleucin zu Valin-Austausch an Position 48 und einen Asparagin zu Leucin-Austausch an Position 126. Die Aminosäuresequenz eines BaL/sel-Klons wies einen Lysin zu Prolin-Austausch an Position 32 auf.

Die Sequenzen aller NL4.3/sel-Klone wiesen einen Leucin zu Serin-Austausch an Position 33 auf. Bei 18 Klonen war dies die einzige Mutation auf Aminosäureebene bei den übrigen sechs untersuchten Klonen kam jeweils ein weitere Aminosäureaustausch in HR1 oder HR2 dazu. Auffallend ist, dass keine der gefundenen Aminosäuremutationen in dem mit T-20-Resistenz assoziierten Motiv (Positionen 36-45) liegt. Abbildung 3.9 fasst die Ergebnisse der Sequenzanalyse der HR1- und HR2-Regionen zusammen. Um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um Varianten der parentalen HI-Viren BaL bzw. NL4.3 handelt, wurden die für V3 kodierenden Regionen der amplifizierten *env*-Gene sequenziert (Daten nicht gezeigt).

	HR1	HR2
	29	112
BaL/wt	QARLLS GI VQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWCIKQLQARVLAVERYLDQQLL	WDNMTWMEWDREINMYTSLIHSLSLIEESQWQEKNEQELLELDKWA SLWVDFD
48V/126K (19)	----- V -----	----- K -----
32P (1)	--- P -----	-----
N14. 3/wt	QARQLLS DI VQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWCIKQLQARVLAVERYLDQQLL	WNNMTWMEWDREINMYTSLIHSLSLIEESQWQEKNEQELLELDKWA SLWVDFN
33S (18)	--- S -----	-----
33S/46G (1)	--- S ----- G -----	-----
33S/68G (1)	--- S ----- G -----	-----
33S/74S (1)	--- S ----- S -----	-----
33S/113D (1)	--- S -----	--- D -----
33S/118I (1)	--- S -----	----- I -----
33S/144T (1)	--- S -----	----- T -----

Abb. 3.9: HR1- und HR2-Sequenzen der untersuchten Klone.

Angegeben sind die Aminosäuresequenzen im Einbuchstabencode. Eingeklammerte Zahlen geben die Anzahl der Einzelklone mit der jeweiligen Sequenz an. Zahlen über den Sequenzen geben die Aminosäureposition innerhalb von gp41 an. Gegenüber der Wildtypsequenz unveränderte Aminosäuren sind als Striche dargestellt. Fett gedruckte Buchstaben in den Wildtypsequenzen kennzeichnen die mit T-20-Resistenz assoziierten Aminosäuren. Alle weiteren fett gedruckten Buchstaben weisen auf die hauptsächlich auftretenden Mutationen hin.

3.3.3.2. Generierung von mit Env-Punktmutanten pseudotypisierten HIV-Partikeln

Im Folgenden sollte ermittelt werden, ob die gefundenen Aminosäureaustausche in den HR1- und HR2-Regionen die Resistenz gegen membranverankerte und lösliche Fusionsinhibitoren vermitteln. Dazu wurden die vorwiegend vorkommenden Aminosäuremutationen (I48V und N126K im Fall von BaL/sel, L33S im Fall von NL4.3) in die Env-Expressionsplasmide pMP11-BaL bzw. pMP11-NL4.3 eingeführt. Die so entstandenen Plasmide pMP11-BaL-V, pMP11-BaL-K, pMP11-BaL-VK und pMP11-NL4.3-S wurden zusammen mit TN7-stopp transfiziert, um mit den mutierten Hüllproteinen pseudotypisierte HIV-Partikel zu generieren. Nachdem die Transfektionsüberstände geerntet wurden, wurden sie ultrazentrifugiert, um die Viruspartikel aufzukonzentrieren. Danach erfolgte die Titration. Die pseudotypisierten Partikel wurden für *single round* Infektionsassays sowie zu Bestimmung der Resistenz gegen lösliches T-20 verwendet.

3.3.3.3. Infektivität der pseudotypisierten HIV-Partikel in Gegenwart membranverankerter Fusionsinhibitoren

Zunächst wurde ermittelt, ob die ausgewählten Punktmutationen in der Lage sind, die für die PM-1/M87-selektierten BaL- und NL4.3-Varianten beobachtete Resistenz gegen mT-20 und (im Fall von BaL/sel) C46-B zu vermitteln. Dazu wurde der oben beschriebene *single round* Infektionsassay (s. Abschnitt 3.2.2.2) verwendet.

Wie aus Abbildung 3.10 hervorgeht, betragen die auf die Infektivität in TZM-bl Zellen bezogenen Infektionsraten der mit dem BaL-Hüllprotein pseudotypisierten HIV-Partikel in TZM-bl/M87 und TZM-bl/C46-B Zellen weniger als 1%. Auch die mit dem BaL-V-Env pseudotypisierten Artikel infizierten TZM-bl/C46-B Zellen nur zu 0.7%. Die Infektionsrate in TZM-bl/M87 Zellen betrug dagegen 8%. Die mit BaL-K bzw. BaL-VK Hüllproteinen pseudotypisierten HIV-Partikel infizierten TZM-bl/M87 Zellen zu 57% bzw 40%, TZM-bl/C46-B Zellen zu 26% bzw 40%, TZM-bl/C46-B Zellen zu 26%.

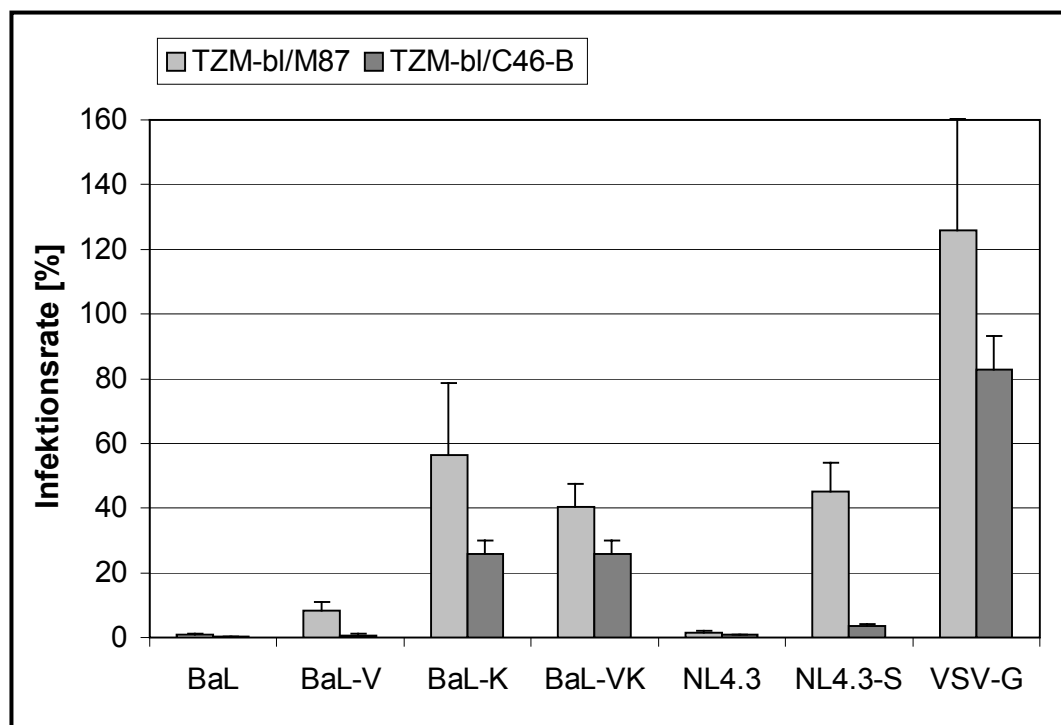


Abb. 3.10: Infektivität der pseudotypisierten HIV-Partikel in transduzierten TZM-bl Zellen.

Es wurden jeweils vier unabhängige Infektionen durchgeführt. Die MOI betrug 0.2. Die angegebenen sind Mittelwerte der auf TZM-bl bezogenen relativen Infektionsraten in Prozent eines repräsentativen Experiments. Die Bezeichnungen unter den Balken beziehen auf die jeweiligen Hüllproteine.

Die relativen Infektionsraten der mit dem NL4.3-Env pseudotypisierten HIV-Partikel in TZM-bl/M87 und TZM-bl/C46-B Zellen betragen weniger als 1.5%. Die mit NL4.3-S-Env pseudotypisierten HIV-Partikel infizierten TZM-bl/M87 Zellen zu 45%, die relative Infektionsrate in TZM-bl/C46-B Zellen betrug 3.7%. Die mit VSV-G pseudotypisierten HIV-Partikel infizierten TZM-bl/M87 Zellen zu 126%, TZM-bl/C46-B Zellen zu 83%.

Anschließend wurde ein weiterer *single round* Infektionsassay, diesmal mit den transduzierten PM-1 Zellen durchgeführt. Dazu wurden jeweils $1 \cdot 10^4$ Zellen mit 1000 infektiöser Einheiten der verschiedenen Virusstocks infiziert. Als Kontrolle dienten Infektionen mit VSV-G pseudotypisierten HIV-Partikeln. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Renilla-Luziferase determiniert. Die relativen Lichteinheiten, die für die infizierten PM-1 Zellen gemessen wurden, wurden auf 100% gesetzt.

Abbildung 3.11 zeigt, dass die mit BaL-Hüllproteinen pseudotypisierten HIV-Partikel PM-1/M87 zu 4.5% und PM-1/C46-B zu 0.5% infizierte. Mit BaL-V-Env pseudotypisierte Partikel wiesen relative Infektionsraten von 18% (PM-1/M87) und 7% (PM-1/C46-B) auf. Die Infektionsraten von mit BaL-K-Env und BaL-VK-Env pseudotypisierte HIV-Partikeln betragen 81% bzw. 89% in PM-1/M87 Zellen und jeweils 20% in PM-1/C46-B Zellen.

Die mit NL4.3-Env pseudotypisierten Viruspartikel infizierten PM-1/M87 Zellen zu 13% und PM-1/C46-B Zellen zu 1.8%. Die mit NL4.3-S-Env pseudotypisierten HIV-Partikel hatten relative Infektionsraten von 80%

(PM-1/M87) und 3.8% (PM-1/C46-B). Die Infektionsraten der VSV-G pseudotypisierten Viruspartikel betragen jeweils ca. 95%.

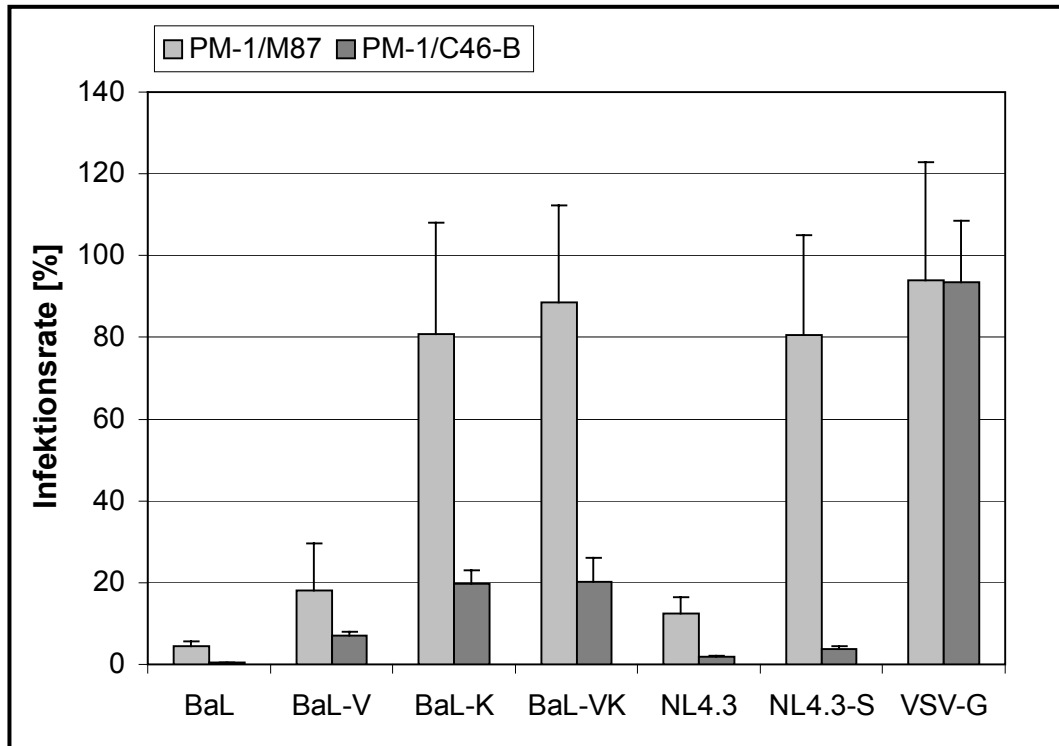


Abb. 3.11: Infektivität der pseudotypisierten HIV-Partikel in transduzierten PM-1 Zellen.

Es wurden jeweils sechs unabhängige Infektionen durchgeführt. Die MOI betrug 0.1. Angegeben sind Mittelwerte der auf PM-1 Zellen bezogenen relativen Infektionsraten in Prozent eines repräsentativen Experiments. Die Bezeichnungen unter den Balken beziehen sich auf die jeweiligen Hüllproteine.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die N126K-Mutation im BaL-Hüllprotein in der Lage ist, die Resistenz gegen mT-20, die für die selektierte BaL-Variante beobachtet wurde zu vermitteln. Zusätzlich vermittelt diese Mutation auch ein gewisses Maß an Resistenz gegen C46-B. Die I48V-Mutation scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die Resistenzvermittlung zu haben. Auch im Fall von NL4.3 vermittelt mit der L33S-Mutation ein einzelner Aminosäureaustausch Resistenz gegen membranverankertes T-20.

3.3.3.4. Infektivität der pseudotypisierten HIV-Partikel in Gegenwart von löslichem T-20

Weiterhin wurde untersucht, ob die Aminosäureaustausche in den BaL- und NL4.3-Hüllproteinen auch zur Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber löslichem T-20 führen. Dazu wurden wie oben beschrieben TZM-bl Zellen in Gegenwart von verschiedenen T-20-Konzentrationen mit den pseudotypisierten HIV-Partikel infiziert. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

Die T-20-Konzentration, durch die die Infektionsrate der mit dem BaL-Hüllprotein pseudotypisierten HIV-Partikel auf 50% herabgesetzt wurde, betrug 0.2 ng/ml. Der IC_{50} -Wert der mit BaL-V-Env pseudotypisierten Viruspartikel lag bei 0.61 ng/ml. Die IC_{50} -Werte der mit BaL-K-Env und BaL-VK-Env pseudotypisierten HIV-Partikel betragen jeweils 1.2 ng/ml. Die I48V-Mutation im BaL-Hüllprotein führte also zu einer dreifachen Erhöhung des IC_{50} -Werts. Die N126K-Mutation vermittelte eine sechsfache Resistenz gegen lösliches T-20. Das Einführen beider Punktmutationen führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der Resistenz. Die mit NL4.3-Env pseudotypisierten Partikel wiesen einen IC_{50} -Wert von 0.80 ng/ml auf. Der IC_{50} -Wert der mit NL4.3-S-Env pseudotypisierten HIV-Partikel betrug 10.0 ng/ml. Die L33S-Mutation vermittelte also 12.5fache Resistenz gegen lösliches T-20

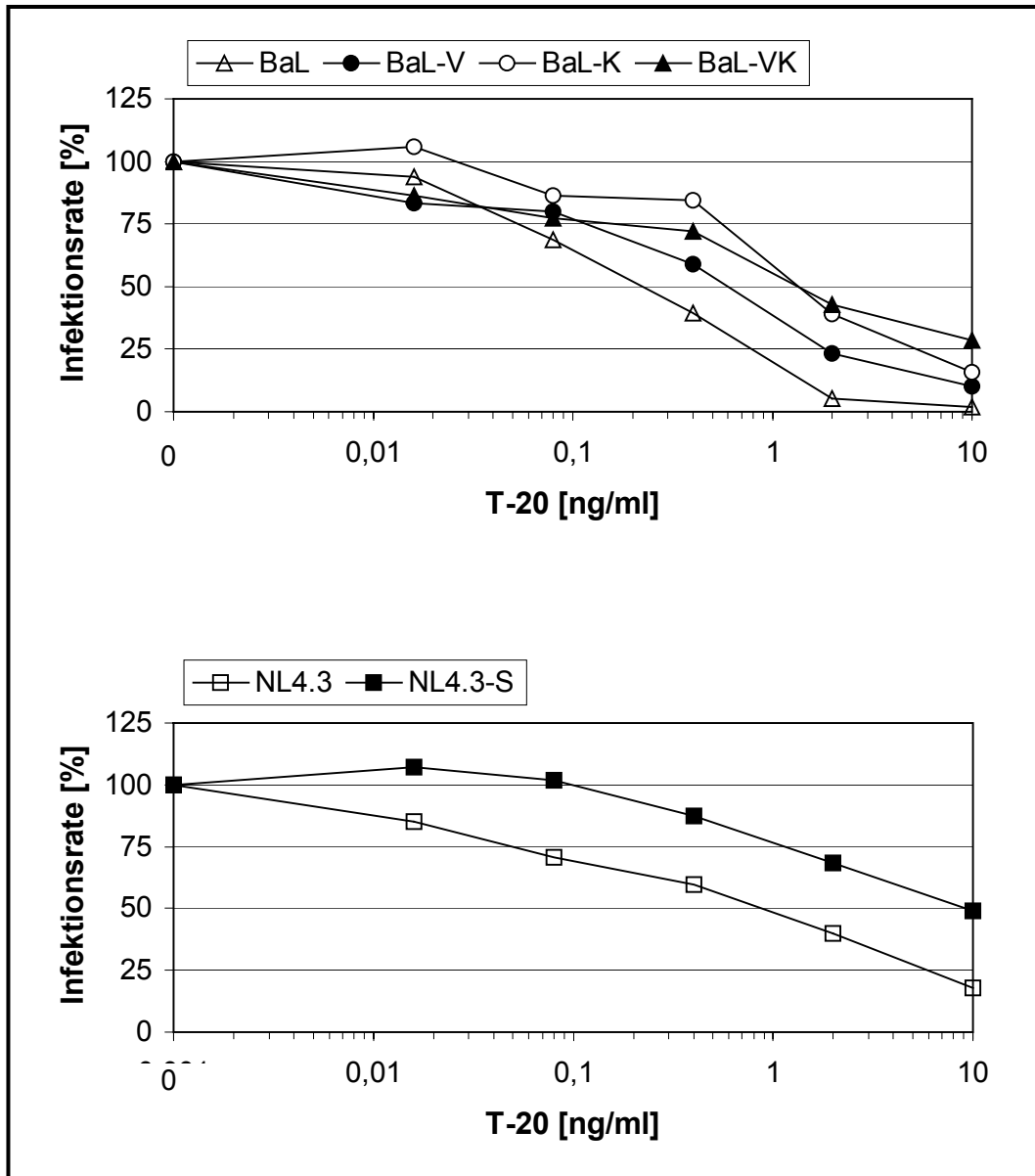


Abb. 3.12: Resistenz pseudotypisierter HIV-Partikel gegen lösliches T-20. Angegeben sind Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Infektionen, dargestellt als relative Infektionsrate in Prozent. Diese Graphik diente der Ermittlung der IC_{50} -Werte. Oben: Infektivität der mit BaL, BaL-V, BaL-K und BaL-VK pseudotypisierten HIV-Partikel in Gegenwart von löslichem T-20. Unten: Infektivität der mit NL4.3 und NL4.3-S pseudotypisierten HIV-Partikel in Gegenwart von löslichem T-20.

3.3.3.5. Relative Fitness von rekombinanten HI-Viren

Der Einfluss der resistenzvermittelnden Punktmutationen wurde mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Fitnessassays untersucht. Die BaL-VK und NL4.3-S sowie die parentalen *env*-Gene wurden in die Vektoren TN6G und TN8 kloniert. Diese Vektoren basieren auf pNL4.3 und tragen anstelle des *nef*-Gens für eGFP (TN6G) bzw. mRFP (TN8) kodierende Gene. Mittels Transfektion von 293T Zellen mit den jeweiligen Plasmiden wurden rekombinante HI-Viren erzeugt, die für den Fitnessassay verwendet wurden. Dazu wurden PM-1 Zellen mit der gleichen Anzahl an infektiösen Einheiten der zu vergleichenden Viruspaare (z.B. TN6G-NL4.3 und TN8-NL4.3-S) coinfiziert und die relativen Fluoreszenzen von Zellproben drei und sieben Tage nach der Infektion ermittelt.

Dabei wurden immer beide möglichen Env-Markerprotein-Kombinationen verwendet. Parallel durchgeführte Coinfektionen mit rekombinante HI-Viren, die das gleiche Hüllprotein exprimieren (z.B. TN6G-NL4.3 und TN8-NL4.3) dienen der Standardisierung. Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Fitnessassays.

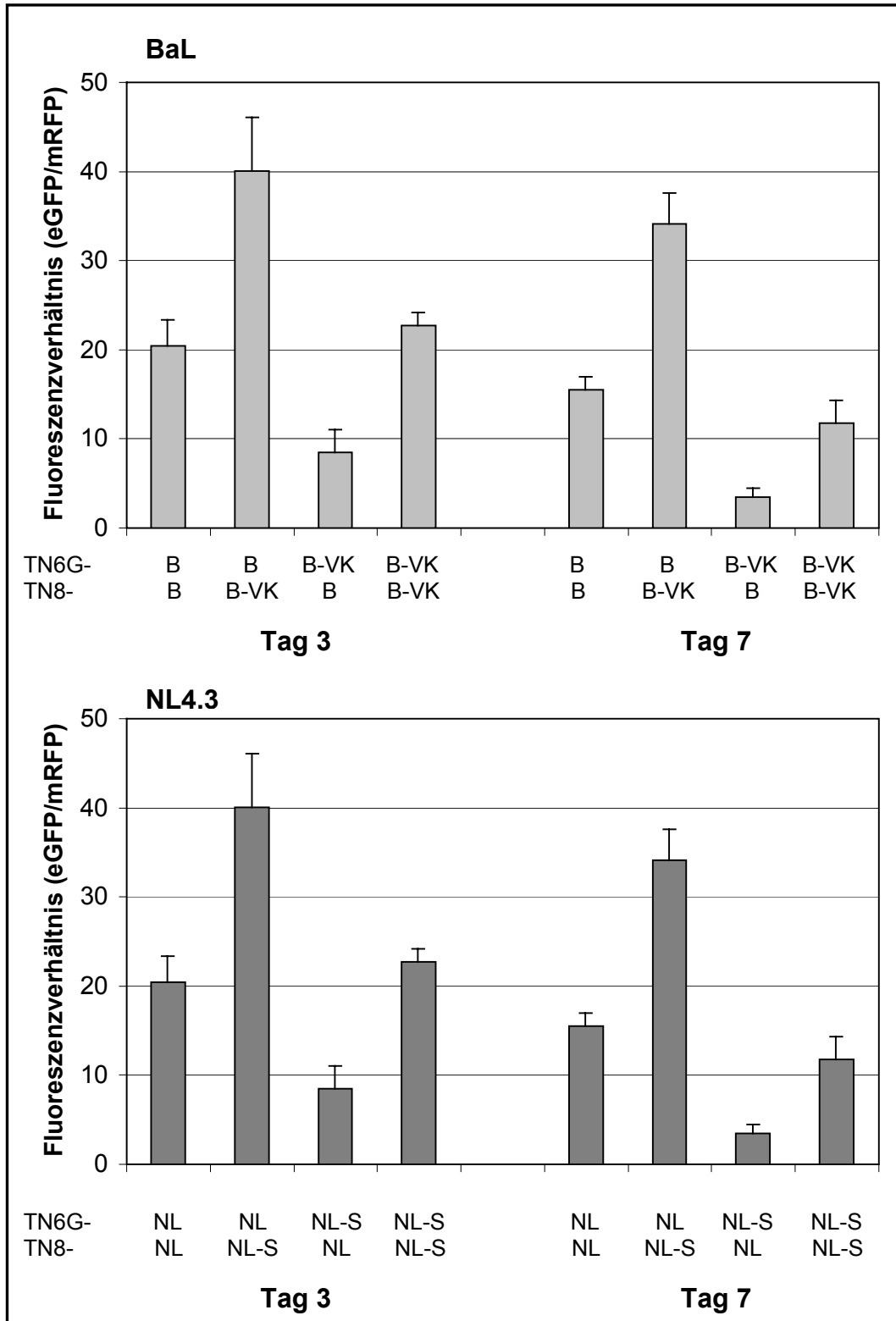


Abb. 3.13: Relative Fitness der rekombinanten HI-Viren.

Dargestellt sind Verhältnisse der relativen Fluoreszenzen bei 508 nm (eGFP) zu den relativen Fluoreszenzen bei 609 nm (mRFP). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Proben aus jeweils zwei unabhängigen Infektionen, von denen Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. NL: NL4.3, B: BaL.

Das Verhältnis der eGFP-Fluoreszenz zur mRFP-Fluoreszenz betrug drei Tage nach der Infektion bei den mit TN6G-BaL und TN8-BaL coinfizierten Zellen 20.4, das der mit TN6G-BaL-VK und TN8-BaL-VK coinfizierten Zellen 22.7. Für die Coinfektionen bei denen die BaL- und BaL-VK-Hüllproteine verglichen wurden, wies somit ein Wert innerhalb dieses Bereichs darauf hin, dass kein Fitnessunterschied zwischen den beiden rekombinanten HI-Viren bestand. Werte, die unterhalb von 20.4 lagen, wiesen auf einen selektiven Vorteil für das mRFP-Virus hin. Werte, die über 22.7 lagen sprachen für eine größere Fitness des eGFP-Virus.

Das Verhältnis der in der TN6G-BaL/TN8-BaL-VK Coinfektion gemessenen Fluoreszenzen lag mit 40.1 signifikant über diesem Bereich während das Verhältnis der in der TN6G-BaL-VK/TN8-BaL Coinfektion gemessenen Fluoreszenzen mit 8.5 deutlich darunter lag. Beide Werte wiesen also auf einen selektiven Vorteil der BaL-Viren gegenüber den BaL-S-Viren hin. Dies wurde durch die am siebten Tag nach der Infektionen ermittelten Fluoreszenzverhältnisse bestätigt. Das Fluoreszenzverhältnis in der TN6G-BaL/TN8-BaL-VK Coinfektion lag mit 34.1 über und das Fluoreszenzverhältnis in der TN6G-BaL-VK/TN8-BaL Coinfektion lag mit 3.5 unter den in den TN6G-BaL/TN8-BaL (15.5) und TN6G-BaL-VK/TN8-BaL-VK (11.8) Coinfektionen ermittelten Fluoreszenzverhältnissen.

Drei Tage nach der Infektion betrug das Fluoreszenzverhältnis bei der Coinfektion mit TN6G-NL4.3 und TN8-NL4.3 25.2, bei der Coinfektion von TN6G-NL4.3-S und TN8-NL4.3-S 27.4. Das Fluoreszenzverhältnis in der

TN6G-NL4.3/TN8-NL4.3-S Coinfektion betrug drei Tage nach der Infektion 21.5 und wies somit auf einen selektiven Vorteil für TN8-NL4.3-S hin. Das Fluoreszenzverhältnis der TN6G-NL4.3-S/TN8-NL4.3 Coinfektion lag mit 31.3 über 27.4 und bestätigte so den größere Fitness der Viren, die für das mutierte Hüllprotein trugen. Sieben Tage nach der Infektion betrugen die Fluoreszenzverhältnisse der Coinfektionen mit TN6G-NL4.3 und TN8-NL4.3 bzw. TN6G-NL4.3-S und TN8-NL4.3-S 18.1 bzw. 14.6. Das Fluoreszenzverhältnis der TN6G-NL4.3/TN8-NL4.3-S Coinfektion betrug 6.3 und lag somit deutlich unter dem Bereich der einem ausgeglichenen Fitnessverhältnis entspräche. Das Fluoreszenzverhältnis der TN6G-NL4.3-S/TN8-NL4.3 Coinfektion lag mit 26.7 über diesem Bereich und bestätigte so den selektiven Vorteil für die NL4.3-S-Viren.

Im Fall des BaL-Hüllproteins vermittelten die Punktmutationen I48V und N126K also eine Verringerung der viralen Fitness, während das Einführen der L33S-Mutation in das NL4.3-Hüllprotein zu einer Steigerung der Fitness gegenüber dem Wildtyp-Protein führte.

4. Diskussion

Trotz der Fortschritte, die in der Therapie von HIV-Infizierten in den letzten zwei Jahrzehnten erzielt wurden, ist eine Heilung bisher nicht möglich. Vorrangige Ziele der HIV-Therapie sind deshalb die Reduzierung der HIV bedingten opportunistischen Infektionen und der Sterblichkeitsrate sowie die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Durch die Kombination mehrerer Substanzen aus verschiedenen Wirkstoffklassen kann die HIV-Replikation langfristig inhibiert werden, so dass die Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze liegt und die Anzahl der CD4-positiven T-Zellen konstant bleibt oder ansteigt. Limitiert wird der Erfolg von HAART durch unerwünschte Nebenwirkungen, Langzeittoxizität und Resistenzentwicklung. Neue Strategien zur Behandlung der HIV-Infektion werden deshalb dringend benötigt. Dazu gehören neue antivirale Wirkstoffe, besonders solche die andere Ziele im viralen Replikationszyklus angreifen als die bisher verwendeten Medikamente, genauso wie alternative, z.B. gentherapeutische Methoden.

Hildinger *et al.* (2001) zeigten, dass die HIV-Infektion in PM-1 Zellen, die membranverankertes T-20 exprimieren, deutlich inhibiert ist. Um die antiretrovirale Wirkung des membranverankerten Peptids zu verstärken wurde es am Aminoterminus um zehn Aminosäuren verlängert. Weiterhin wurde die Expression des Fusionsproteins durch eine Codonoptimierung des retroviralen Vektors, mit dem die HIV-Zielzellen transduziert wurde, erhöht. Die Effizienz des resultierenden membranverankerten

Fusionsinhibitors C46 ist im Vergleich zu mT-20 in PM-1 Zellen signifikant erhöht. Weiterhin führt auch die Transduktion von primären Lymphozyten mit dem optimierten Vektor zu einer starken Inhibition der HIV-Infektion (Egelhofer *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Inhibition der HIV-Infektion in Zellen, die membranverankerte Fusionsinhibitoren exprimieren, charakterisiert werden. Dazu sollten zwei Teilprojekte bearbeitet werden. Im ersten Teilprojekt sollte die Wirkung membranverankerter Fusionsinhibitoren auf verschiedene HIV-Subtypen untersucht werden. Im zweiten Teilprojekt sollte die Resistenzentwicklung gegen membranverankerte Fusionsinhibitoren charakterisiert werden.

4.1. Inhibition der HIV-Infektion durch membranverankerte Fusionsinhibitoren

In diesem Teilprojekt wurde die inhibitorische Wirkung von C46-B auf HIV-Primärisolate verschiedener Subtypen analysiert und mit der Wirkung der subtypspezifischen C46-Derivate C46-A und C46-B verglichen. Die Ergebnisse dieses Teilprojekts sollten der Definition der Sequenz eines optimierten Fusionsinhibitorpeptids dienen, das in der Lage ist, ein möglichst breites Spektrum von HIV-Subtypen zu inhibieren.

4.1.1. Inhibition der HIV-Infektion durch C46-B

Infektionsstudien mit transduzierten TZM-bl Zellen zeigten, dass die Infektion aller verwendeten HIV-Isolate und -Klone durch C46-B inhibiert wird. Dabei fielen deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Isolaten auf. Abgesehen von JRCSF (Subtyp B, 75% Inhibition) und IN22 (Subtyp C, 80% Inhibition) wurden die untersuchten Isolate der Subtypen A, B, C, D und G sowie der Gruppe N zu mindestens 90% inhibiert. SE9280 (Subtyp J), MVP8161 (Gruppe O) und CBL20 (HIV-2) wurden zu ca. 60% inhibiert (s. Abb. 3.3).

Die von Egelhofer *et al.* (2004) beschriebene antiretrovirale Aktivität des membrangebundenen Fusionsinhibitors C46-B in der T-Zelllinie PM-1 und in primären Lymphozyten wurde auch in der Indikatorzelllinie TZM-bl beobachtet. Mit Hilfe der transduzierten TZM-bl Zellen ist es also möglich die antiretrovirale Wirkung der membranverankerten Fusionsinhibitoren zu charakterisieren.

Die Inhibition von HIV-Primärisolaten verschiedener HIV-1 Subtypen bzw. Gruppen und des untersuchten HIV-2-Isolats in TZM-bl/C46-B Zellen korreliert mit der Tatsache, dass die Replikation von Isolaten der Subtypen B, D und E, der Gruppe O sowie von HIV-2-Isolaten in PM-1/M87 Zellen zu 60-95% inhibiert wird (Hildinger *et al.*, 2001). Auch in Studien mit löslichem T-20 wurde nachgewiesen, dass das Peptid gegen Isolate wirksam ist, die nicht zum Subtyp B gehören (Sista *et al.*, 2001). Erwartungsgemäß war die Inhibition bei Isolaten, deren HR1- und HR2-Sequenzen große Übereinstimmung mit denen von HXB2 aufweisen

tendenziell am stärksten ausgeprägt. Unklar bleibt, warum JRCSF und IN22 nicht so stark gehemmt werden wie die anderen untersuchten Subtyp B- und C-Isolate.

Die Infektivität von TN7-R14 und TN7-X23 ist in TZM-bl/C46-B Zellen zu 95% inhibiert (s. Abb. 3.3). Die Empfindlichkeit gegenüber löslichem T-20 ist bei TN7-R14 7.5-fach, bei TN7-X23 neunfach verringert (Neumann *et al.*, 2005). In TZM-bl/M87 Zellen wird die Infektivität von TN7-R14 nicht, von TN7-X23 nur zu ca. 25% inhibiert (Daten nicht gezeigt). C46-B wirkt also auch gegen Viren, deren Empfindlichkeit gegenüber löslichem und membranverankertem T-20 signifikant herabgesetzt ist.

Mit C46-B steht daher ein hoch wirksamer membranverankerter Fusionsinhibitor zur Verfügung, der sowohl in der Lage ist ein breites Spektrum an HIV-Primärisolaten als auch T-20 insensitive Viren zu inhibieren.

4.1.2. Vergleich der antiretroviralen Wirkung von C46-A, C46-B und C46-C

Die Infektivität fast aller untersuchten Isolate wird in TZM-bl/C46-A und TZM-bl/C46-C Zellen weniger stark inhibiert als in TZM-bl/C46-B Zellen. Eine Ausnahme hiervon bilden die Subtyp-C Isolate IN22 und SE12808, deren Inhibition in TZM-bl/C46-C Zellen stärker ausgeprägt war als in TZM-bl/C46-B Zellen. Im Fall von SE12808 war dieser Unterschied allerdings nur schwach ausgeprägt (97% Inhibition in TZM-bl/C46-C und 94% Inhibition in TZM-bl/C46-B Zellen). Die analysierten Subtyp J,

Gruppe O und HIV-2-Isolate wurden weder in TZM-bl/C46-A noch in TZM-bl/C46-C Zellen inhibiert (s. Abb. 3.3, 3.4 und 3.5).

Die beiden subtypspezifischen C46-Derivate weisen also entgegen den Erwartungen gegenüber C46-B keinen entscheidenden Vorteil auf. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass es sich bei C46-A und C46-C um Peptide handelt, deren Sequenzen von den jeweiligen Consensussequenzen abgeleitet wurden und nicht natürlich vorkommen. So ergab eine Analyse aller in der Datenbank der Los Alamos National Library enthaltenen Env-Sequenzen, dass keines der bekannten HIV-1-Isolate eine HR2-Sequenz aufweist, die den Subtyp A- bzw. C-Consensussequenzen entspricht. Dies sowohl für die eigentlichen Consensussequenzen als auch für die in dieser Arbeit verwendeten subtypspezifischen C46-Derivate, die im Bereich des 2F5-Epitops von den jeweiligen Consensussequenzen abweichen (HIV Sequence Database, 2003). Im Gegensatz dazu entspricht die Sequenz von C46-B einem Teil der HR2-Region von HIV-1_{HXB2} (Egelhofer *et al.*, 2004). Dies könnte der Grund dafür sein, dass die Sekundärstruktur von C46-B stabiler und dadurch die Interaktion mit den HR1-Regionen der analysierten HIV-Isolate stärker ausgeprägt ist als bei C46-A und C46-C, was zu einer höheren antiretroviralen Aktivität von C46-B führen würde.

Neben einer höheren antiretroviralen Aktivität des Peptids könnte auch eine stärkere Expression von C46-B im Vergleich zu den beiden anderen membranverankerten Fusionsinhibitoren dafür verantwortlich sein, dass die meisten untersuchten HIV-Isolate in TZM-bl/C46-B Zellen am besten

inhibiert werden. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Expression der verschiedenen C46-Derivate und mT-20 auf der Oberfläche von TZM-bl Zellen quantifiziert. Dabei wurde für TZM-bl/C46-A Zellen ein 1.5fach niedriger ABK-Wert ermittelt als für TZM-bl/C46-B Zellen. Der ABK-Wert für TZM-bl/C46-C Zellen betrug nur ein Drittel des für TZM-bl/C46-B Zellen ermittelten Werts (s. Tab. 3.2). Dies spricht dafür, dass C46-B tatsächlich besser exprimiert wird als die beiden anderen membranverankerten Fusionsinhibitoren.

Möglicherweise ist aber auch die Affinität des 2F5-Antikörpers für C46-A und C46-C kleiner als für C46-B. In diesem Fall würden die ermittelten ABK-Werte nicht mit der tatsächlichen Anzahl der Peptidmoleküle auf der Zelloberfläche korrelieren und es könnte keine Aussage über eventuelle Unterschiede bezüglich der Expressionsstärke der Fusionsinhibitoren getroffen werden. Als Epitop von 2F5 wurde mittels Peptid-ELISA das ELDKWA-Motiv definiert (Muster *et al.*, 1993). Alle drei Fusionsinhibitoren enthalten das ELDKWA-Motiv und können durchflusszytometrisch mit Hilfe dieses Antikörpers nachgewiesen werden (s. Abb. 3.1 und 3.2; Tab. 3.1). Es wurde gezeigt, dass das DKW-Motiv für die neutralisierende Wirkung von 2F5 bzw. für die Bindung an synthetische Peptide ausreicht (Menendez *et al.*, 2004; Zwick *et al.*, 2005). Allerdings zeigte eine weitere Studie, dass das wesentlich längere Peptid NEQELLELDKWASLWN in einem Protease *protection assay* in Anwesenheit von 2F5 vor der Proteolyse geschützt wurde (Parker *et al.*, 2001). Untersuchungen von gegen den V3-loop gerichteten neutralisierenden Antikörpern ergaben,

dass die Interaktion mit den am stärksten gebundenen Aminosäuren nur für 10% der Gesamtbindungsenergie verantwortlich sind (Gorny *et al.*, 1992). Die Spezifität von 2F5 wird vermutlich durch das aus nur drei Aminosäuren bestehende *core* Epitop DKW determiniert, die Affinität des Antikörpers scheint aber von weiteren, flankierenden Aminosäuren abhängig zu sein (Parker *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu C46-B, dessen Sequenz das erweiterte Epitop vollständig beinhaltet, weicht die Sequenz von C46-A an zwei, die von C46-C an drei Positionen davon ab (s. Abb. 3.1). Dies korreliert mit den Ergebnissen des quantitativen FACS-Assays, in dem sowohl für PM-1 als auch für TZM-bl Zellen jeweils die höchsten ABK-Werte für C46-B und die niedrigsten ABK-Werte für C46-C ermittelt wurden (s. Tab. 3.2).

Um die Frage zu klären, ob die beobachteten Unterschiede der HIV-Inhibition in den transduzierten TZM-bl/Zellen auf unterschiedliche antiretrovirale Aktivitäten oder unterschiedliche Expressionsstärken der Peptide zurückzuführen sind, könnte ein Peptid-ELISA durchgeführt werden.

4.2. Resistenz gegen membranverankerte Fusionsinhibitoren

In diesem Teilprojekt wurde die Resistenzentwicklung gegen membranverankerte Fusionsinhibitoren charakterisiert. Insbesondere sollte untersucht werden, ob Unterschiede zur Resistenz gegen lösliche Fusionsinhibitoren bestehen. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob sich verschiedene HIV-1-Subtypen bezüglich der Resistenzentwicklung unterscheiden.

4.2.1. Selektion und Charakterisierung von resistenten HIV-1-Varianten

Die Selektion von resistenten HIV-1-Varianten sollte durch serielle Passage in Zellen erfolgen, die membranverankerte Fusionsinhibitoren auf ihrer Oberfläche exprimieren. Zahlreiche Versuche Resistenz gegen C46-B oder eins der subtypspezifischen C46-Derivate zu selektieren blieben jedoch ohne Erfolg. So konnte weder nach Infektionen von PM-1/C46-A, PM-1/C46-B und PM-1/C46-C mit verschiedenen HIV-1-Isolaten (Subtypen A, B und C) noch mit den T-20 insensitiven HIV-1-Klonen TN7-R14 und TN7-X23 die Replikation der Viren mittels p24-ELISA nachgewiesen werden (s. Abschnitte 3.3.1.1. und 3.3.1.2.). Auch Infektionen von TZM-bl/C46-A, TZM-bl/C46-B und TZM-bl/C46-C Zellen mit verschiedenen HIV-1-Isolaten (Subtyp A, B, C und G) führten nicht zur Selektion resistenter Varianten (s. Abschnitt 3.3.1.3.). Im Gegensatz dazu waren HIV-1_{BaL} und HIV-1_{NL4.3} in der Lage in PM-1/M87

Zellen zu replizieren. Wie Replikationskinetiken zeigten, sind die nach drei aufeinanderfolgenden Selektionsrunden geernteten BaL- und NL4.3-Varianten resistent gegen mT-20 (s. Abb. 3.6).

Hildinger *et al.* (2001) beobachteten 14 bis 20 Tage nach der Infektion von PM-1/M87 Zellen mit NL4.3 cytopatische Effekte. Dagegen konnte in PM-1/C46-B keine Resistenzentwicklung nachgewiesen werden (Egelhofer *et al.*, 2004). Im Vergleich mit mT-20 werden C46-A, C46-B und C46-C von den transduzierten PM-1 Zellen wesentlich stärker exprimiert (s. Tab. 3.2). Dies wurde durch die Optimierung der zur Transduktion verwendeten retroviralen Vektoren erreicht (Egelhofer *et al.*, 2004). Weiterhin beinhalten C46-B und die beiden subtypspezifischen C46-Derivate im Vergleich zu T-20 zehn zusätzliche aminoterminal Aminosäuren. Diese binden an einen stark konservierten Bereich von gp41, der als hydrophobe Tasche bezeichnet wird (Egelhofer *et al.*, 2004; Sodroski, 1999). Sowohl die höhere Anzahl von Fusionsinhibitormoleküle auf der Oberfläche der verwendeten Zellen als auch die Verlängerung der Peptide sind mögliche Gründe für die Tatsache, dass Resistenzen gegen mT-20, aber nicht gegen die drei C46-Varianten selektiert werden konnten. Die fehlende Resistenzentwicklung gegen C46-B *in vitro* bestätigt die Bedeutung von membranverankerten Fusionsinhibitoren für die Gentherapie von HIV-Infizierten.

Infektionsstudien mit transduzierten TZM-bl Zellen zeigten, dass die selektierten BaL- und NL4.3-Varianten im Gegensatz zu den parentalen Viren in der Lage sind TZM-bl/M87 Zellen zu infizieren. BaL/sel infizierte

außerdem auch TZM-bl/C46-B Zellen zu ca. 50% (s. Abb. 3.7). Die Selektion in TZM-bl Zellen führte weiterhin zu einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber löslichem T-20. Die T-20-Konzentration, die notwendig ist um eine 50-prozentige Inhibition der BaL/sel-Infektivität zu bewirken war 15mal höher als der für BaL/wt ermittelte IC_{50} -Wert. Im Fall von NL4.3/sel wurde ein im Vergleich mit NL4.3/wt siebenmal höherer IC_{50} -Wert bestimmt (s. Abb. 3.8).

Weiterführende Untersuchungen ergaben eine stark herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber löslichem T-649, einem den Aminosäurepositionen 117-152 von gp41 entsprechenden Peptid (M. Dittmar, pers. Mitteilung). Von der HR2-Region in gp41 abgeleitete Peptide interagieren mit Aminosäuren der HR1-Region und inhibieren den Viruseintritt in die Zielzelle indem sie die Bildung des für die Fusion der viralen mit der zellulären Membran essentiellen sechs-Helix-Bündels verhindern (Kilgore *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass der Eintritt von mit VSV-G pseudotypisierten NL4.3env⁻-Partikeln im Gegensatz zum Eintritt von mit verschiedenen HIV-1-Hüllproteinen pseudotypisierten NL4.3env⁻-Partikeln in PM-1/M87 Zellen nicht inhibiert wurde (Hildinger *et al.*, 2001). Weiterhin wurde eine vorübergehende Inhibition der Fusion von PM-1/M87 Zellen mit HIV-1-Env exprimierenden 293T Zellen nachgewiesen (Egelhofer *et al.*, 2004).

Die Selektion in mT-20 exprimierenden PM-1 Zellen führte also nicht nur zur Entwicklung von Resistenz gegen den membranverankerten Fusionsinhibitor, sondern auch zur Verringerung der Empfindlichkeit

gegenüber den löslichen Fusionsinhibitoren T-20 und T-649. Dies weist darauf hin, dass der Wirkmechanismus der membranverankerten Fusionsinhibitoren dem der löslichen Peptide ähnelt und korreliert mit den von Hildinger *et al.* (2001) und Egelhofer *et al.* (2004) beschriebenen Beobachtungen.

4.2.2. Bestimmung der resistenzvermittelnden Faktoren und ihr Einfluss auf die virale Fitness

Die Sequenzanalyse der HR1- und HR2-Regionen der selektierten BaL- und NL4.3-Varianten ergab, dass 19 der 20 untersuchten BaL-Klone die beiden Punktmutationen I48V (HR1) und N126K (HR2) und alle 24 untersuchten NL4.3-Klone die Punktmutation L33S (HR1) trugen. Keiner der analysierten Klone wies Mutationen in dem mit T-20-Resistenz assoziierten Motiv (Aminosäurepositionen 36-45) auf (s. Abb. 3.9).

Infektionen von transduzierten TZM-bl und PM-1 Zellen mit BaL-V, BaL-K und BaL-VK pseudotypisierten HIV-1-Partikeln zeigten, dass die bei BaL/sel beobachtete Resistenz gegen mT-20 und C46-B von der N126K-Mutation im BaL-Hüllprotein vermittelt wird (s. Abb. 3.10 und 3.11). Die Empfindlichkeit gegen lösliches T-20 wurde durch das Einführen der N126K-Mutation in das BaL-Hüllprotein sechsfach verringert (s. Abb. 3.12). Der Einfluss der I48V-Mutation auf die Infektivität in Gegenwart von membranverankerten oder löslichem T-20 war deutlich geringer und die Kombination beider Mutationen führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Fusionsinhibitorresistenz (s. Abb. 3.10, 3.11 und 3.12). Ergänzende Studien zeigten, dass die verringerte Empfindlichkeit gegen

T-649, die bei BaL/sel beobachtet wurde, ebenfalls von der N126K-Mutation vermittelt wurde (M. Dittmar, pers. Mitteilung).

Infektionen von TZM-bl/M87 und PM-1/M87 Zellen mit NL4.3-S pseudotypisierten HIV-1-Partikeln ergaben, dass die bei NL4.3/sel beobachtete Resistenz gegen mT-20 von der L33S-Mutation vermittelt wird (s. Abb. 3.10 und 3.11). Die L33S-Mutation führte außerdem zu einer 12.5fachen Reduktion der Empfindlichkeit gegen lösliches T-20 (s. Abb. 3.12). Auch die bei NL4.3/sel beobachtete Verringerung der Empfindlichkeit gegen T-649 war auf die L33S-Mutation im NL4.3-Hüllprotein zurückzuführen (M. Dittmar, pers. Mitteilung) .

Durch Coinfektionen mit den die resistenzvermittelnden Aminosäureaustausche tragenden fluoreszenzmarkierte HI-Viren wurde ermittelt, dass die I48V- und N126K-Mutationen im BaL-Hüllproteinen zu einer Verringerung der viralen Fitness führen. Im Gegensatz dazu führte die L33S-Mutation im NL4.3-Hüllprotein zu einer Erhöhung der viralen Fitness (s. Abb. 3.13).

Im Fall von BaL/sel ist die beobachtete Resistenz gegen membranverankerte und lösliche Fusionsinhibitoren also hauptsächlich auf einen Aminosäureaustausch in der HR2-Region zurückzuführen, der mit einer verringerten viralen Fitness einhergeht. Die hier beobachtete N126K-Mutation trat im Kontext von NL4.3 auch bei einer *in vitro* Selektion mit dem von den Aminosäurepositionen 117-150 von gp41 abgeleiteten Peptid C34 auf (Nameki *et al.*, 2005). Weiterhin wurde das Vorkommen dieser Mutation in einem Patienten nachgewiesen, bei dem eine T-20-

haltige antiretrovirale Therapie versagt hatte (Baldwin *et al.*, 2004). Bindungsstudien mit C34 sowie einem die N126K-Mutation enthaltenden C34-Derivat und einem von der HR1-Region abgeleiteten Peptid zeigten, dass die Bindungsaffinität zwischen den Peptiden durch die Mutation erhöht wird. Dies weist auf eine schnellere intramolekulare Interaktion von HR1 und HR2 hin, resultiert aber auch in einer reduzierten viralen Fitness (Nameki *et al.*, 2005). Baldwin *et al.* (2004) beobachteten eine von der N126K-Mutation in Kombination mit einer G38A-Mutation in HR1 vermittelte T-20-Abhängigkeit von HI-Viren. Im Gegensatz dazu waren sowohl die in dieser Arbeit erzeugten mit BaL-VK pseudotypisierten HIV-1-Partikel als auch die TN6G-BaL-VK- und TN8-BaL-VK-Viren infektiös. Zwar waren die Titer dieser Partikel geringer als die der jeweiligen Wildtyp-Varianten, konnten aber durch die Gegenwart von löslichem T-20 oder T-649 nicht erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist möglicherweise auf Unterschiede der zwischen den HR1-HR2-Interaktionen von BaL und dem von Baldwin *et al.* (2004) beschriebenen aus einem HIV-Patienten isoliertem HI-Virus zurückzuführen.

Die in dieser Arbeit in Gegenwart von mT-20 selektierte L33S-Mutation im NL4.3-gp41 trat auch in *in vitro* Selektionen mit den löslichen Fusionsinhibitoren T-20 und C34 auf (Armand-Ugon *et al.*, 2003; Fikkert *et al.*, 2002). Überraschenderweise erhöhte sich die virale Fitness durch das Einführen der L33S-Mutation, obwohl resistenzvermittelnde Aminosäureaustausche in der HR1-Region häufig zu einer verringerten Fitness führen (Lu *et al.*, 2002). Allerdings zeigten Fitnessassays mit T-20-

insensitiven HIV-1-Klonen, dass eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Fusionsinhibitoren nicht immer mit einer Verringerung der viralen Fitness einhergeht (Neumann *et al.*, 2005). Nameki *et al.* (2005) untersuchten den Einfluss resistenzvermittelnder Mutationen in dem teilweise mit der für HR1 kodierenden Region überlappenden *Rev-responsive element* (RRE) auf die virale Replikation. Demnach beeinträchtigen Mutationen in dem für das Lysin an Position 33 kodierenden Triplet die Funktion des RRE nur minimal. Dies ist vermutlich ein Grund dafür, dass die Fitness von HI-Viren, die die L33S-Mutation tragen nicht reduziert ist.

5. Literatur

- Altfeld M, Walker BD (2004)** Die akute HIV-1-Infektion. *HIVNET 2004*. Steinhäuser Verlag, Wuppertal
- Armand-Ugon M, Gutierrez A, Clotet B, Este JA (2003)** HIV-1 resistance to the gp41-dependent fusion inhibitor C34. *Antiviral Res* 59:137-42
- Baldwin CE, Sanders RW, Deng Y, Jurriaans S, Lange JM, Lu M, Berkhout B (2004)** Emergence of a drug-dependant human immunodeficiency virus type 1 variant during therapy with T20 fusion inhibitor. *J Virol* 78:12428-37
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, et al. (1983)** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-71
- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA (1998)** A new classification for HIV-1. *Nature* 391:240
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999)** Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657-700
- Brown PO (1997)** Integration. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Buchsacher GL, Wrong-Staal F (2001)** Approaches to gene therapy for human immunodeficiency virus infection. *Hum Gene Ther* 12:1013-9
- Cao J, Bergeron L, Helseth E, Thali M, Repke H, Sodroski J (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
- Carpenter CCJ, Cooper DA, Fischl MA, J.M. G, B.G. G, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Katzenstein DA, J.S. M, et al. (2000)** Antiretroviral therapy in adults: updated recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *J Am Med Assoc* 283:381-90

- Cassan M, Delaunay N, Vaquero C, Rousset JP (1994)** Translational frameshifting at the gag-pol junction of human immunodeficiency virus type 1 is not increased in infected T-lymphoid cells. *J Virol* 68:1501-8
- Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS (1997)** Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89:263-73
- Chan DC, Kim PS (1998)** HIV Entry and its inhibition. *Cell* 93:681-4
- Chen CH, Matthews TJ, McDanal CB, Bolognesi DP, Greenberg ML (1995)** A molecular clasp in the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 TM protein determines the anti-HIV activity of gp41 derivatives: implication for viral fusion. *J Virol* 69:3771-7
- Cho MW, Lee MK, Carney MC, Berson JF, Doms RW, Martin MA (1998)** Identification of determinants on a dual-tropic human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. *J Virol* 72:2509-15
- Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS (1998)** Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8869-73
- Clapham PR, McKnight A (2002)** Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J General Virology* 83:1809-29
- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, et al. (1986a)** Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233:343-6
- Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M (1986b)** Molecular cloning and polymorphism of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 324:691-5
- Clavel F, Hance AJ (2004)** HIV Drug Resistance. *N Engl J Med* 1023-33
- Clever JL, Parslow TG (1997)** Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J Virol* 71:3407-14
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, et al. (1986)** What to call the AIDS virus? *Nature* 321:10
- Cooper DA, Gold J, Maclean P, Donovan B, Finlayson R, Barnes TG, Michelmore HM, Brooke P, Penny R (1985)** Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1:537-40

- Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MK (1995)** High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* 69:7430-6
- Curtis BM, Scharnowske S, Watson AJ (1992)** Sequence and expression of a membrane associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8356-60
- Dayton AI, Sodroski JG, Rosen CA, Goh WC, Haseltine WA (1986)** The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* 44:941-7
- Debyser Z, Cherepanov P, Van Maele B, De Clercq E, Wityrouw M (2002)** In search of authentic inhibitors of HIV-1 integration. *Antivir Chem Chemother* 13:1-15
- Delta (1996)** A randomized double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. *Lancet* 348:283-91
- Delwart EL, Mosialos G, Gilmore T (1990)** Retroviral envelope glycoproteins contain a leucine zipper-like repeat. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6:703-6
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, et al. (1996)** Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661-6
- Derdeyn CA, Decker JM, Sfakianos JN, Wu X, O'Brien WA, Ratner L, Kappes JC, Shaw GM, Hunter E (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
- Derdeyn CA, Decker JM, Sfakianos JN, Zhang Z, O'Brien WA, Ratner L, Shaw GM, Hunter E (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
- Doms RW, Moore JP (2000)** HIV-1 membrane fusion: Targets of opportunity. *J Cell Biol* 151:F9-F14
- Doms RW, Trono D (2000)** The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Gen Dev* 14:2677-88
- Drake JW (1993)** Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4171-75

- Earl PL, Koenig S, Moss B (1991)** Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of the proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol* 65:31-41
- Eckert DM, Kim PS (2001)** Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 70:777-810
- Egelhofer M, Brandenburg G, Martinus H, Schult-Dietrich P, Melikyan GB, Kunert R, Baum C, Choi I, Alexandrov A, von Laer D (2004)** Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry in Cells Expressing gp41-Derived Peptides. *J Virol* 78:568-75
- Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Haase AT (1993)** Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362:359-62
- Eron JJ (2000)** HIV-1 protease inhibitors. *Clin Infect Dis* 30:S160-70
- Fackler O, Geyer M (2002)** Neue Strategien für die Bekämpfung von HIV: Der Aktivität des Nef-Proteins auf der Spur. *Biologie in unserer Zeit* 32:90-100
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA (1996)** HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-7
- Fikkert V, Cherepanov P, van Laethem K, Hantson A, van Remoortel B, Pannecouque C, De Clercq E, Debyser Z, Vandamme A-M, Witvrouw M (2002)** env chimeric virus technology for evaluating human immunodeficiency virus susceptibility to entry inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3954-62
- Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson TC, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, et al. (1999)** Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 5:512-7
- Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Marselle LM, Reyes G, Gonda MA, Aldovini A, Debouk C, Gallo RC, et al. (1986)** The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* 320:367-71
- Franke EK, Yuan HE, Luban J (1994)** Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372:359-62
- Frankel AD, Young JAT (1998)** HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67:1-25

- Freed EO, Martin MA (1995)** The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem* 270:23883-6
- Freed EO, Martin MA (2001)** HIVs and their replication. *Fields Virology*. Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al. (1984)** Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-3
- Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, Puri A, Durell S, Blumenthal R (2003)** The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 1614:36-50
- Gao F, Yue L, Robertson DL, Hill SC, Hui H, Biggar RJ, Neequaye AE, Whelan TM, Ho DD, Shaw GM, et al. (1994)** Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* 68:7433-47
- Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, et al. (1999)** Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 397:436-41
- Gelderblom HR (1991)** Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 5:617-37
- Gorny MK, Conley AJ, Karwowska S, Buchbinder A, Xu J-Y, Emini EA, König S, Zolla-Pazner S (1992)** Neutralizing of diverse human immunodeficiency virus type 1 variants by anti-V3 human monoclonal antibody. *J Virol* 66:7538-42
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A (1981)** Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305:1425-31
- Grabar S, Le Moing V, Goujard C, Leport C, Kazatchkine MD, Costagliola D, Weiss L (2000)** Clinical outcome of patients with HIV-1 infection according to immunologic and virologic response after 6 months of HAART. *Ann Intern Med* 133:401-10
- Greenberg ML, McDanal CB, Stanfield-Oakley SA, Jin L, Tremblay C, Sista P, Hirsch MS, Matthews TJ (2001)** Virus sensitivity to T-20 and T-1249 is independent of coreceptor usage. *8th CROI, Chicago*

- Greenberg ML, Sista P, Miralles G, Melby T, Davison D, Jin L, Mosier S, Mink M, Nelson EL, DeMasi R, et al. (2002)** Enfuvirtide (T-20) and T-1249 resistance: observations from phase II clinical trials of enfuvirtide in combination with oral antiretrovirals (ARVs) and phase I/II dose-ranging monotherapy trial of T-1249. *Antivir Therapy* 7:S106
- Greenberg ML, Cammack N (2004)** Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother*
- Gulick RM (2003)** New antiretroviral drugs. *Clin Microbiol Infect* 9:186-93
- Gürtler LG, Zekeng L, Tsague JM, van Brunn A, Afane Ze E, Eberle J, Kaptue L (1996)** HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. *Arch Virol Suppl* 11:195-202
- Hahn BH, Shaw GM, Arya SK, Popovic M, Gallo RC, Wong-Staal F (1984)** Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature* 312:166-9
- Hallenberger S, Moulard M, Sordel M, Klenk HD, Garten W (1997)** The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem* 270:1036-45
- Hamilton JD, Hartigan PM, Simberkoff MS, Day PL, Diamond GR, Dickinson GM, Drusano GL, Egorin MJ, George WL, Gordin FM, et al. (1992)** A controlled trial of early versus late treatment with zidovudine in symptomatic HIV infection. *N Engl J Med* 326:437-43
- Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haybrich RH, Henry WK, Lederman MM, Phair JP, Niu M, et al. (1996)** A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. *N Engl J Med* 335:1081-90
- Harouse JM, Bhat S, Spitalnik SL, Laughlin M, Stefano K, Silverberg DH, Gonzalez Scarano F (1991)** Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* 253:320-3
- Heil M, Decker JM, Chen J, Sfakianos JN, Shaw GM, Hunter E, Derdeyn CA (2003)** Analysis of patient-derived HIV-1 isolates suggests a novel mechanism for decreased sensitivity to inhibition by enfuvirtide and T-649. *Antivir Therapy* 8:S408

- Helseth E, Olshesky U, Furman C, Sodroski J (1991)** Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* 65:2119–23
- Hernandez LD, Hoffmann LR, Wolfsberg TG, White JM (1996)** Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Dev Cell Biol* 12:627-61
- Hildinger M, Dittmar MT, Schult-Dietrich P, Fehse B, Schnierle BS, Thaler S, Stiegler G, Welker R, von Laer D (2001)** Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus type. *J Virol* 75:2228-38
- HIV Sequence Database. (2003)** www.hiv-web.lanl.gov
- Hoffmann C (2004a)** ART 2004. *HIVNET 2004*. Steinhäuser Verlag, Wuppertal
- Hoffmann C (2004b)** Therapieziele und Prinzipien. *HIVNET 2004*. Steinhäuser Verlag, Wuppertal
- Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE (1988)** Characterization of ribosomal frame-shifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 231:280-3
- Jamjian MC, McNicholl IR (2004)** Enfuvirtide: first fusion inhibitor for treatment of HIV infection. *Am J Health Syst Pharm* 61:1242-7
- Janeway CA (1992)** The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 10:645-74
- Jiang S, Lin K, Lu M (1998)** A confirmation-specific monoclonal antibody reacting with fusion-active gp41 from the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* 72:10213-7
- Kahn JO, Walker BD (1998)** Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 339:33-9
- Kamps BS (2004)** Epidemie, Übertragungswege, natürlicher Verlauf. *HIVNET 2004*. Steinhäuser Verlag, Wuppertal
- Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassino B, Cloud A, Lee JY, Allredge L, Hunter E, Lambert DM, Bolognesi DP, et al. (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

- Kilby JM, Lalezari JP, Eron JJ, Carlson M, Cohen C, Arduino RC, Goodgame JC, Gallant JE, Volberding PA, Murphy RL, et al. (2002)** The safety, plasma pharmacokinetics, and antiviral activity of subcutaneous enfuvirtide (T-20), a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIV-infected adults. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18:585-93
- Kilby JM, Eron JJ (2003)** Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med* 348:2228-38
- Kilgore RN, Salzwedel K, Reddick M, Allaway GP, Wild CT (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
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L (1984)** T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312:767-8
- Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (2001)** *Fields Virology*. Lipinscott, Williams, and Wilkins, Philadelphia
- Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA (1992)** Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256:1783-90
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA (1998)** Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648-59
- LaBranche CC, Galasso G, Moore JP, Bolognesi DP, Hirsch MS, Hammer SM (2001)** HIV fusion and its inhibition. *Antivir Res* 50:95-115
- Lalezari JP, Henry K, O'Hearn M, Montaner JS, Piliero PJ, Trottier B, Walmsley S, Cohen C, Kuritzkes DR, Eron JJ, et al. (2003)** Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med* 348:2175-85
- Lazzarin A, Clotet B, Cooper D, Reynes J, Arasteh K, Nelson M, Katlama C, Stellbrink HJ, Delfraissy JF, Lange J, et al. (2003)** Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med* 348:2186-95

- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ (1990)** Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 265:10373-82
- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS (1984)** Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225:840-2
- Levy JA (1998)** HIV and the pathogenesis of AIDS. ASM Press, Washington, D.C.
- Lu J, Sista P, Cammack N, Kuritzkes D (2002)** Fitness of HIV-1 clinical isolates resistant to T-20 (enfuvirtide). *Antiviral therapy* 7:S56
- Lu M, Blacklow SC, Kim PS (1995)** A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* 2:1075-82
- Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP (1993)** Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 73:1067-78
- Luciw PA (2001)** Human immunodeficiency virus and its replication. *Fields Virology*. Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia
- Lusso P, Cocchi F, Balotta C, Markham PD, Louie A, Farci P, Pal R, Gallo RC, Reitz MS (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
- Marcus U, Dittmar MT, Kräusslich HG (2002)** HIV: Epidemiology and strategies for therapy and vaccination. *Intervirology* 45:260-6
- Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, Wormser G, Brettman L, Lange M, Murray HW, et al. (1981)** An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 305:1431-8
- Mautino MR (2002)** Lentiviral vectors for gene therapy of HIV-1 infection. *Curr Gene Ther* 2:23-43
- Mautino MR, Morgan RA (2002)** Enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by novel lentiviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope antisense RNA. *Hum Gene Ther* 13:1027-37

- McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR, Weissman IL (1988)** Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53:55-67
- Melby T, DeMasi R, Kuritzkes DR, Heilek-Snyder G, Salgo MP, Cammack N, Matthews TJ, Greenberg ML (2004)** Analysis of virological response and enfurvitide resistance through 48 weeks in the TORO1 and TORO2 studies. *Antivir Therapy* 9:S181
- Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, Delmedico MK, Lambert DM, Cohen FS (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
- Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, et al. (1997)** Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 126:946-54
- Menendez A, Chow KC, Pan OC, Scott JK (2004)** Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibody 2F5 is multispecific for sequences flanking the DKW core epitope. *J Mol Biol* 338:311-27
- Mink M, Greenberg ML, Mosier S, Janumpalli S, Davison D, Jin L, Melby T, Sista P, Lambert DM, Cammack N, et al. (2002)** Impact of HIV-1 gp41 amino acid substitutions (positions 36-45) on susceptibility to T-20 (enfuvirtide) in vitro: Analysis of primary virus isolates recovered from patients during chronic enfurvitide treatment and site directed mutants in NL4-3. *Antivir Therapy* 7:S24
- Mocroft A, Katlama C, Johnson AM, Pradier C, Antunes F, Mulcahy F, Chiesi A, Phillips AN, Kirk O, Lundgren JD (2000)** AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study. *Lancet* 356:291-6
- Mocroft A, Youle M, Moore A, Sabin CA, Madge S, Lepri AC, Tyrer M, Chaloner C, Wilson D, Loveday D, et al. (2001)** Reasons for modification and discontinuation of antiretrovirals: results from a single treatment center. *AIDS* 15:185-94
- Mondor I, Ugolini S, Sattentau QJ (1998)** Human immunodeficiency virus type I attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol* 72:3623-34
- Moore JP, Doms RW (2003)** The entry of entry inhibitors: A fusion of science and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10598-602

- Moylett EH, Shearer WT (2002)** HIV: Clinical manifestations. *J Allergy Clin Immunol* 110:3-16
- Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton CV, Lasky LA, Capon DJ (1985)** Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 313:450-8
- Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Ruker F, Katinger H (1993)** A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 67:6642-7
- Nameki D, Kodama E, Ikeuchi M, Mabuchi N, Otaka A, Tamamura H, Ohno M, Fujii N, Matsuoka M (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
- Neumann T, Hagmann I, Lohrengel S, Heil ML, Derdeyn CA, Kräusslich H-G, Dittmar MT (2005)** T20 insensitive HIV-1 from naive patients exhibits high viral fitness in a novel dual color competition assay on primary cells. *Virology* 332:251-62
- Norrgrén H, Marquina S, Leitner T, Aaby P, Melbye M, Poulsen AG, Larsen O, Dias F, Escanilla D, Andersson S, et al. (1997)** HIV-2 genetic variation and DNA load in asymptomatic carriers and AIDS cases in Guinea-Bissau. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 16:31-8
- Oude Essink BB, Das AT, Berkhout B (1996)** HIV-1 reverse transcriptase discriminates against non-self tRNA primers. *J Mol Biol* 264:243-54
- Paillart JC, Skripkin E, Ehresmann B, Ehresmann C, Marquet R (1996)** A loop-loop "kissing" complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5572-7
- Parker CE, Deterding LJ, Hager-Braun C, Binley JM, Schülke N, Katinger H, Moore JP, Tomer KB (2001)** Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 for the neutralizing monoclonal antibody 2F5. *J Virol* 75:10906-11
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993)** Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8392-6
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD (1996)** HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1582-6

- Piketty C, Weiss L, Thomas F, Mohamed AS, Belec L, Kazatchkine MD (2001)** Long-term clinical outcome of HIV-infected patients with discordant immunologic and virologic responses to a protease inhibitor-containing regimen. *J Infect Dis* 183:1328-35
- Pohlmann S, Soilleux EJ, Baribaud F, Leslie GJ, Morris LS, Trowsdale J, Lee B, Coleman N, Doms RW (2001)** DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2670-5
- Pollard VW, Malim MH (1998)** The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 52:491-532
- Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Meyer B, Müller H, Kräusslich HG, Schreiber M (2001)** Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology* 11:11-9
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC (1984)** Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500
- Purcell DF, Martin MA (1993)** Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* 67:6365-78
- Ratner L, Gallo RC, Wong-Staal F (1985)** HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature* 313:636-7
- Richman DD (2001)** HIV chemotherapy. *Nature* 410:995-1001
- Rimsky LT, Shugars DC, Matthews TJ (1998)** Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J Virol* 72:986-93
- Rizzuto C, Sodroski J (2000)** Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:741-9
- Roman F, Gonzalez D, Lambert C, Deroo S, Fischer A, Baurith T, Staub T, Boulme R, Arendt V, Schneider F, et al. (2003)** Uncommon mutations at residue positions critical for enfuvirtide (T-20) resistance in enfuvirtide-naïve patients infected with subtype B and non-B HIV-1 strains. *J AIDS* 33:134-9
- Rubbert A (2004)** Pathophysiologie der HIV-Infektion. *HIVNET 2004*. Steinhäuser Verlag, Wuppertal

- Saksena NK, Potter SJ (2003)** Reservoirs of HIV-1 in vivo: implications for antiretroviral therapy. *AIDS Rev* 5:3-18
- Schambach A, Wodrich H, Hildinger M, Bohne J, Kräusslich HG, Baum C (2000)** Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther* 2:435-45
- Schroff RW, Gottlieb MS, Prince HE, Chai LL, Fahey JL (1983)** Immunological studies of homosexual men with immunodeficiency and Kaposi's sarcoma. *Clin Immunol Immunopathol* 27:300-14
- Simon V, Hogan C, Louie M, Vasan S, Rowe L, Hurley A, Padte N, Vanderhoeven J, Dawson K, Balfe P, et al. (2003)** Frequency of transmitted drug resistance and phylogenetic clusters in a homogeneous cohort of newly infected individuals. *10th CROI, Boston, USA*
- Sista P, Melby T, Dhingra U, Cammack N, McKenna P, Dehertogh P, Matthews TJ (2001)** The fusion inhibitors T-20 and T-1249 demonstrate potent in vitro antiviral activity against clade B HIV-1 isolates resistant to reverse transcriptase inhibitors and non-B clades. *Antivir Therapy* 6:S3
- Sista P, Melby T, Greenberg ML (2003)** Subgroup analysis of baseline (BL) susceptibility and early virological response to enfuvirtide in the combined TORO studies. *Antivir Therapy* 8:S60
- Sodroski JG (1999)** HIV-1 entry inhibitors in the side pocket. *Cell* 99:243-6
- Stanfield-Oakley SA, Jeffrey J, McDanal CB (2003)** Determinants of susceptibility to enfuvirtide map to gp41 in enfuvirtide-naive HIV-1. *Antivir Therapy* 8:S22
- Stebbing J, Moyle G (2003)** The clades of HIV: their origins and clinical significance. *AIDS Rev* 5:205-13
- Tan K, Liu J, Wang J, Lu M (1997)** Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12303-8
- Telesnitsky A, Goff SP (1997)** Reverse transcription and the generation of retroviral DNA. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Ugolini S, Mondor I, Sattentau QJ (1999)** HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol* 7:144-9
- UNAIDS (2004)** AIDS epidemic update.

- Vocero-Akbani AM, Heyden NV, Lissy NA, Ratner L, Dowdy SF (1999)** Killing HIV-1 infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med* 5:29-33
- von Laer D, Brandenburg G (2001)** Gene therapy for HIV infection by intracellular immunization with antiviral genes. *AIDS Rev* 3:169-77
- Wainberg MA (2004)** HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *AIDS* 18:S63-8
- Walmsley S, Henry K, Katlama C, Nelson M, Castagna A, Reynes J, Clotet B, Hui J, Salgo MP, DeMasi R, et al. (2003)** Enfuvirtide (T-20) cross-reactive glycoprotein 41 antibody does not impair the efficacy or safety of enfuvirtide. *J Infect Dis* 188:1827-33
- Wei X, Decker JM, Liu H, Zhang Z, Arani RB, Kilby JM, Saag MS, Wu X, Shaw GM, Kappes JC (2002)** Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1896-905
- Weiss CD, Levy JA, White JM (1990)** Oligomeric organization of the gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 64:5674-7
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC (1997)** Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387:426-30
- Wensing AMJ, van der Vijver DAMC, Asjo B, Balotta C, Camacho R, de Luca A, de Mendoza C, Deroo S, Derdelinck I, Grossman Z, et al. (2003)** Analysis from more than 1600 newly diagnosed patients with HIV from 17 European countries shows that 10 % of the patients carry primary drug resistance: The Catch-study. *2nd IAS 2003, Paris, France*
- Wild C, Greenwell T, Matthews TJ (1993)** A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9:1051-3
- Wild C, Greenwell T, Shugars D, Rimsky-Clarke L, Matthews TJ (1995)** The inhibitory activity of a HIV-1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11:323-5
- Wilson JW (2003)** Update on antiretroviral drug resistance testing: Combining laboratory technology with patient care. *AIDS* 13:25-38

- Wyatt R, Sullivan N, Thali M, Repke H, Ho DD, Robinson J, Posner M, Sodroski J (1993)** Functional and immunologic characterization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins containing deletions of the major variable regions. *J Virol* 67:4557-65
- Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski J (1998)** The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393:705-11
- Wyatt R, Sodroski JG (1998)** The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884-8
- Yang Q (2004)** Eradication of HIV in infected patients: Some potential approaches. *Med Sci Monit* 10:RA155-65
- Zollner B, Feucht HH, Schroter M, Schafner P, Plettenberg A, Stoehr A, Laufs R (2001)** Primary genotypic resistance of HIV-1 to the fusion inhibitor T-20 in long-term infected patients. *AIDS* 15:935-6
- Zwick MB, Jensen R, Church S, Wang M, Stiegler G, Kunert R, Katinger H, Burton DR (2005)** Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J Virol* 79:1252-61