

**Bedeutung der *N*-Glykosylierung der
Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 für die
Infektion mit dem Humanen Immundefizienzvirus Typ-1**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Ingo Thordsen

Kiel 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Humane Immundefizienzvirus	1
1.2	Das virale Glykoprotein (gp) 120	7
1.3	Die Rezeptoren des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1	8
1.4	Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 und deren Bedeutung für die Infektion mit dem Humanen Immundefizienzvirus Typ-1	11
1.5	Die Interaktionen des Glykoproteins (gp) 120 mit den Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5	15
1.6	Das Ziel der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Chemikalien und Enzyme	18
2.2	Reaktionssysteme	21
2.3	Bakterien und Zellen	21
2.4	Verwendete Nucleinsäuren	22
2.4.1	Plasmide	22
2.4.1.1	Beschreibung des Vektors pUC Δ V3	22
2.4.1.2	Beschreibung des Vektors pNL Δ env	23
2.4.1.3	Beschreibung der verwendeten Viren	23
2.4.1.4	Beschreibung des Vektors pBABE-puro	25
2.4.2	Oligonucleotide	26
2.5	Antikörper	28
2.6	Verbrauchsmaterialien	28
2.7	Geräte	29
2.8	Lösungen	31
2.9	Molekularbiologische Methoden	34
2.9.1	Analyse und Präparation von Nucleinsäuren	34

2.9.1.1	Isolierung von Plasmiden	34
2.9.1.2	Isolierung von viraler RNA	35
2.9.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	35
2.9.1.4	Analyse von DNA mittels Restriktionsendonucleasen	36
2.9.1.5	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	36
2.9.1.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Reinigung von Oligo- nucleotiden	37
2.9.1.7	Elution von DNA aus einem Agarosegel	37
2.9.1.8	Elution von Oligonucleotiden aus einem Polyacrylamidgel	38
2.9.1.9	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	39
2.9.1.10	Fällung von DNA durch Ethanol	39
2.9.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.9.1.12	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	40
2.9.1.13	<i>nested</i> -(verschachtelte-) PCR	41
2.9.1.14	Sequenzierung von DNA	41
2.9.1.15	Lagerung von DNA	42
2.9.2	Modifikation von DNA	42
2.9.2.1	Mutagenese	42
2.9.2.2	Auffüllen der 5'-Überhänge einer DNA	43
2.9.2.3	Dephosphorylierung einer DNA	44
2.9.2.4	Ligation von DNA-Fragmenten	44
2.10	Mikrobiologische Methoden	45
2.10.1	Viren	45
2.10.1.1	Kultivierung von Viren	45
2.10.1.2	Messung der Replikationskinetik von Viren in einer Zellkultur ..	46
2.10.1.3	p24-Antigen Nachweis mittels Enzym-gebundenem Immuno- assay (ELISA)	47
2.10.1.4	Herstellung von retroviralen Helferviren	48
2.10.1.5	Lagerung von Viren	49
2.10.2	Bakterien	49
2.10.2.1	Kultivierung von Bakterien	49
2.10.2.2	Herstellung von kompetenten Bakterien	49

2.10.2.3	Transformation	50
2.10.2.4	Lagerung von Bakterien	50
2.11	Methoden der Zellkultur	51
2.11.1	Kultivierung von Zellen	51
2.11.2	Trypsinierung von adhärennten Zellen	52
2.11.3	Transfektion	52
2.11.4	Bestimmung der Zellzahl in einer Zellkultur	53
2.11.5	Herstellung von stabil transduzierten Zellen	53
2.11.6	Lyse von Zellen	54
2.11.7	Lagerung von Zellen	54
2.12	Biochemische Methoden	55
2.12.1	Herstellung von dialysiertem fötalen Kälberserum	55
2.12.2	Radioaktive Markierung von Proteinen	55
2.12.3	Immunopräzipitation von Protein	56
2.12.4	Natriumdodecylsulfat-(SDS) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
2.12.5	Western-Blot	57
2.12.6	Cytometrie	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Mutagenese des CXCR4 und des CCR5	59
3.2	Herstellung der retroviralen Vektoren	62
3.3	Stabile Expression der Corezeptoren	64
3.4	Analyse der Rezeptoraktivität der CXCR4- und CCR5-Mutanten	68
3.5	Herstellung rekombinanter Viren	70
3.5.1	Isolierung der V3-Region des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1 aus infizierten Patienten	70
3.5.2	Herstellung viraler Vektoren	72
3.5.3	Charakterisierung des Zelltropismus der rekombinanten Viren NL-718 und NL-736	74
3.6	Replikationskinetiken rekombinanter Viren	75

3.6.1	Einfluss der <i>N</i> -Glykosylierung des CXCR4 auf die Replikationskinetik rekombinanter Viren	75
3.6.2	Einfluss der <i>N</i> -Glykosylierung des CCR5 auf die Replikationskinetik rekombinanter Viren	84
4	Diskussion	91
5	Zusammenfassung	104
6	Abstract	106
7	Literaturverzeichnis	108
	Anhang	122

1 Einleitung

Zu Beginn der 80er Jahre trat in den USA bei einigen Personen erstmals ein Krankheitsbild mit schweren opportunistischen Infektionen auf (Brennan & Durack, 1981; Gottlieb *et al.*, 1981). Dieses Krankheitsbild wurde nachfolgend als erworbenes Immunschwächesyndrom (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) bezeichnet. Bald darauf konnte aus den Patienten ein neues Virus isoliert und als Erreger von AIDS identifiziert werden (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1984). Dieses Virus wurde später Humanes Immundefizienzvirus (*human immunodeficiency virus*, HIV) genannt (Coffin *et al.*, 1986). Seit dieser Zeit breitet sich HIV pandemisch aus. Zum Ende des Jahres 2001 waren weltweit etwa 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert und es sterben jährlich 3 bis 4 Millionen Menschen an den Folgen von AIDS (UNAIDS/WHO, 2001). Damit ist AIDS zu einer der bedeutendsten Infektionskrankheiten unserer Zeit geworden.

Trotz großer Anstrengungen und Fortschritte auf dem Gebiet der HIV-Forschung und der Entwicklung kombinierter Therapiemethoden ist es noch nicht gelungen, die HIV-Pandemie wirksam zu bekämpfen. Die Erforschung der molekularen Vorgänge bei der HIV-Infektion könnte die Entwicklung neuartiger Therapieformen ermöglichen.

1.1 Das Humane Immundefizienzvirus

Das Humane Immundefizienzvirus (HIV) gehört zur Familie der Retroviridae. Die Retroviren besitzen als ein Charakteristikum das Enzym Reverse Transkriptase. Mit der Reversen Transkriptase wird das einzelsträngige RNA-Genom der Retroviren in doppelsträngige DNA transkribiert. Unter den Retroviren findet man neben den Onco- und den Spumaviren auch Viren, die zu einem langsamen Krankheitsverlauf führen und daher als Lentiviren bezeichnet werden (lateinisch, *lentus* = langsam). Zu den Lentiviren werden neben HIV unter anderem auch das Affen-

Immundefizienzvirus (*simian immunodeficiency virus*, SIV), das Katzen-Immundefizienzvirus (*feline immunodeficiency virus*, FIV) und das Visna-Maedi-Virus der Schafe gezählt.

HIV infiziert *in vivo* hauptsächlich CD4 exprimierende Zellen (CD4⁺), zu denen unter anderem T-Helferzellen, Monocyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen zählen. Diese Beobachtung führte zur Identifizierung des CD4-Moleküls als Rezeptor des HIV (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984). Bald nach der Entdeckung, dass CD4 die Infektion mit HIV vermittelt, wurde beobachtet, dass die Expression von CD4 auf Maus-Zellen allein nicht ausreichte, diese Zelle mit HIV zu infizieren (Ashorn *et al.*, 1990 Clapham *et al.*, 1991; Maddon *et al.*, 1986). Maus-Zellen, die humanes CD4 exprimierten, konnten nicht mit HIV infiziert werden. Auch einige humane CD4 exprimierende Zellen wurden nicht mit HIV infiziert. Dies legte die Vermutung nahe, dass es weitere Faktoren (Cofaktoren/Corezeptoren) geben muss, die die Infektion vermitteln (siehe 1.3).

Clavel und seine Mitarbeiter isolierten 1986 aus dem Blut AIDS-kranker Patienten ein Virus, das eine Kreuzreaktivität und eine große genetische Ähnlichkeit mit SIV zeigte. Dieses Virus wurde später HIV Typ-2 (HIV-2) genannt. Somit gibt es zwei Typen des HIV. HIV-1 und HIV-2 unterscheiden sich in ihrem Genom. Außerdem zeigt HIV-2 im Vergleich mit HIV-1 einen schwächeren Krankheitsverlauf und eine längere asymptomatische Phase (eine Übersicht geben Reeves & Doms, 2002). Die genetische Verwandtschaft des HIV-1 mit SIV aus Schimpansen (*Pan troglodytes*) und des HIV-2 mit SIV aus Mangaben (*Cercocebus atys*) sowie die Ähnlichkeiten in der Genomorganisation der Viren, der Prävalenz im natürlichen Wirt, der geographischen Verbreitung und die Plausibilität der Übertragungswege sprechen für einen Ursprung der HIV-Pandemie in einer Übertragung des SIV vom Affen auf den Menschen (Zoonose; Gao *et al.*, 1999; 1999; Sharp *et al.*, 1995).

HIV-1 besitzt eine hohe genetische Variabilität. Basierend auf der Häufigkeit des Vorkommens und der geographischen Verbreitung verschiedener Isolate wird HIV-1 in die Gruppen M (*major*), O (*outlier*) und N (*new*) unterteilt (Myers *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998). Die genetische Variabilität findet sich besonders in den viralen

Hüllproteinen wieder (siehe unten). Aufgrund dieser Eigenschaft wird HIV-1 in zehn Subtypen unterteilt (A bis J und zusätzlich HIV-0).

Das infektiöse Viruspartikel des HIV-1 hat einen Durchmesser von etwa 100 nm (siehe Abb. 1). Es wird von einer doppelten Lipidmembran umgeben, die der Cytoplasmamembran der Wirtszelle entstammt. Mit dieser Membran sind die viralen Hüllproteine assoziiert. Die viralen Hüllproteine sind Glykoproteine (gp) mit einem Molekulargewicht von 41 kDa und 120 kDa. Das gp41 durchzieht als Transmembranprotein die Virushülle. Mit dem gp41 ist nicht-kovalent das gp120 assoziiert. Beide Proteine liegen als Heterotrimer in der Membran vor (Weissenhorn *et al.*, 1997). Das gp120 bindet zelluläre Rezeptoren und ist gemeinsam mit dem gp41 für den Eintritt des Virus in die Zelle von essentieller Bedeutung (Dimitrov & Broder, 1998). An der Innenseite der Virusmembran befindet sich das Matrixprotein p17, das unter anderem zur Formgebung und Stabilität des Virus beiträgt. Daneben findet man die Lateralkörper, deren Funktion noch weitgehend unbekannt ist. Im Zentrum des Viruspartikels ist das Capsid, das aus dem Capsidprotein p24 besteht. Im Inneren des Capsids befinden sich zwei Kopien des RNA-Genoms, das mit dem Nucleocapsidprotein p7 assoziiert ist. Ferner findet man die RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase, p51/66), die Protease p9 und die Integrase p38 im Capsid. Das Capsid ist mit der Virusmembran über das Link-Protein p6 verbunden (Levy, 1998).

Das etwa 9000 bp große (+)-Strang RNA-Genom des HIV-1 besitzt dieselbe Orientierung und die Charakteristika einer eukaryotischen mRNA (5'-Cap-Struktur und 3'-Poly(A)-Sequenz). Es dient bei der Replikation des Virus jedoch nicht direkt als Matrize für die Synthese von Proteinen (siehe Abb. 2). Die Reverse Transkriptase katalysiert die Synthese eines komplementären DNA-Strangs und baut gleichzeitig durch ihre Ribonuclease H-Aktivität einen Großteil der genomischen RNA ab. Danach synthetisiert die Reverse Transkriptase durch ihre DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität die doppelsträngige DNA, die durch die virale Integrase in das Genom der Wirtszellen integriert wird. In dieser Form, die als Provirus bezeichnet wird, kann das Virus jahrelang im Wirt persistieren (Latenz). Die Transkription und die Translation viraler Strukturproteine sowie akzessorischer

und regulatorischer Proteine findet nur von der integrierten viralen DNA aus statt und benötigt die Aktivierung der infizierten Zelle. Die hohe Fehlerrate während der Transkription durch die Reverse Transkriptase und der Synthese eines neuen RNA-Genoms durch die zelluläre RNA-Polymerase II trägt maßgeblich zur Variabilität des Hüllproteins gp120 bei.

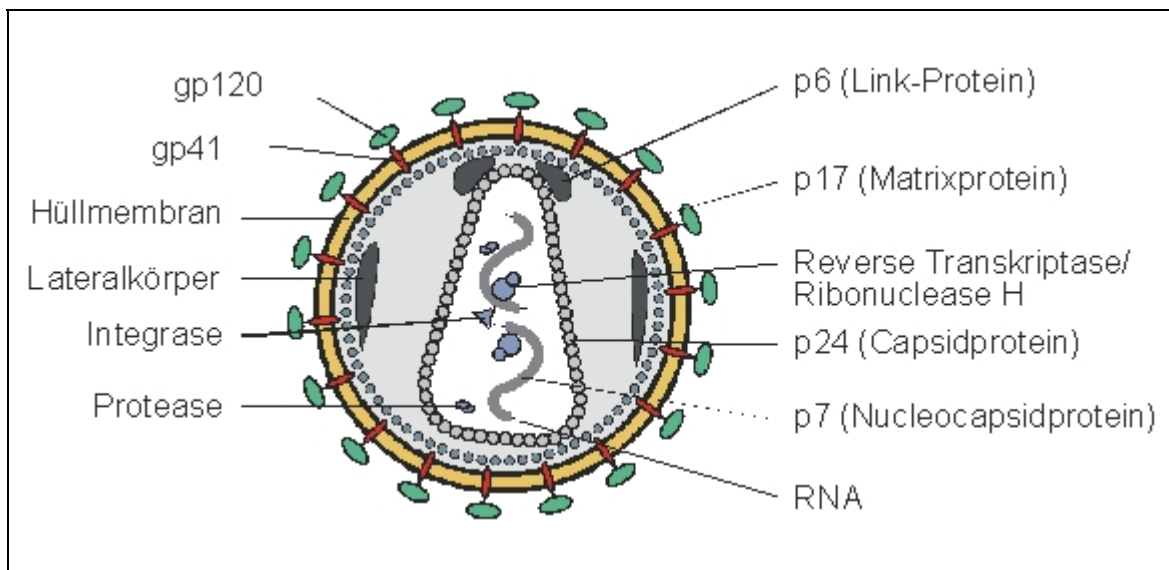


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1). Mit der Hüllmembran (gelb) assoziiert sind die viralen Hüllproteine gp41(rot) und gp120 (grün). An der Innenseite der Membran befinden sich das Matrixprotein p17 (blau) und die Lateralkörper (dunkelgrau). Das Link-Protein p6 (dunkelgrau) verbindet das Matrixprotein mit dem Capsidprotein p24 (hellgrau). Innerhalb des Capsids befinden sich zwei Kopien des viralen RNA-Genoms (grau), die mit dem Nucleocapsidprotein p7 (grau) und der Reversen Transkriptase/Ribonuclease H (blaue Kreise) assoziiert sind. Ebenfalls befinden sich die Protease (blaue Ovale) und die Integrase (blaues Dreieck) im Capsid (verändert nach Modrow & Falke, 1997).

Das Matrixprotein, das Capsidprotein, das Nucleocapsidprotein und das Link-Protein sind Produkte des *gag*-Gens (Gag-Proteine: gruppenspezifische Antigene). Die virale Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase werden von dem *pol*-Gen (Pol-Proteine: Polymerase-Proteine) codiert. Die Hüllproteine gp41 und gp120 werden als gemeinsames Vorläuferprotein gp160 vom *env*-Gen (Env-Proteine: Hüllproteine) codiert. Die Gene *gag*, *pol* und *env* werden im Provirus von Kontrollsequenzen flankiert, die als LTRs (*long terminal repeats*) bezeichnet werden. Ferner befinden sich im Genom von HIV-1 verschiedene Gene, die akzessorische und regulatorische Proteine codieren, auf die hier nicht weiter eingegangen werden kann.

Das gp160 wird im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat N-glykosyliert und dort durch eine zelluläre Furinprotease zu den Hüllproteinen gp41 und gp120 prozessiert. Diese werden durch vesikulären Transport zur Cytoplasmamembran gebracht und in die Membran eingefügt. Die translatierten viralen Proteine und die genomische RNA lagern sich in dieser Membranregion zusammen und werden als unreifes Viruspartikel aus der Zelle entlassen (Knospung). Während einiger Transkriptionsvorgänge wird die mRNA des Gag/Pol-Vorläuferproteins gebildet. Aus diesem Vorläuferprotein entsteht autokatalytisch die virale Protease, die während der Virusreifung außerhalb der Zelle durch weitere Spaltung des Vorläuferproteins die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase bildet.

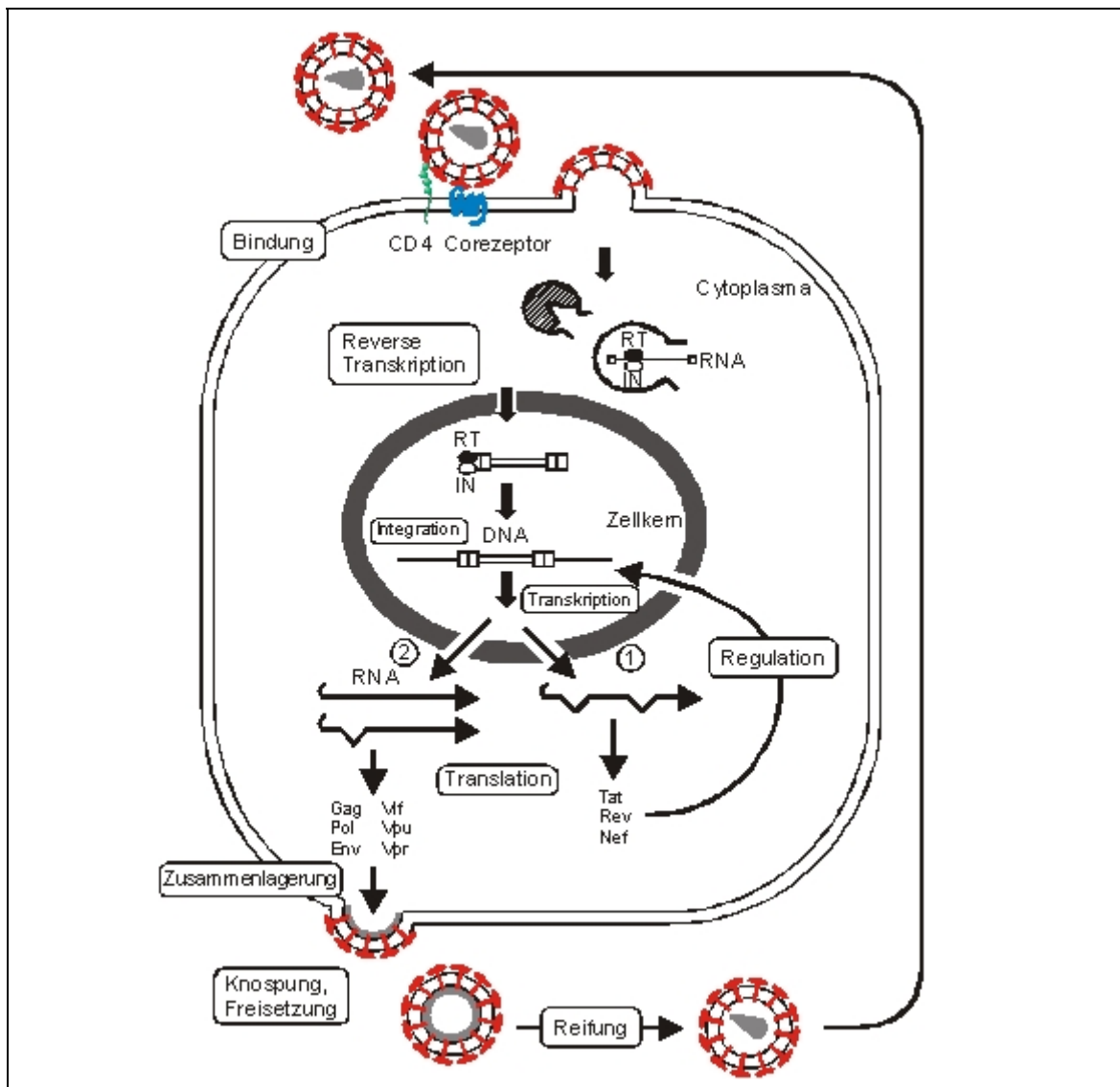


Abb. 2: Der Replikationszyklus des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1). HIV-1 bindet mit seinem trimeren gp41/gp120-Komplex (rot) an den zellulären Rezeptor CD4 (grün) und an einen Corezeptor (blau). Dies führt zur Fusion der Virus- mit der Cytoplasmamembran der Zelle. Dadurch gelangt das Capsid in die Zelle. Das RNA-Genom des Virus wird durch die Reverse Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA transkribiert und im Zellkern durch die Integrase (IN) in das Genom der Wirtszelle integriert. Durch die zelluläre RNA-Polymerase II werden in einer frühen Phase (1) mehrfach gespleißte mRNAs für regulatorische und akzessorische Proteine (Tat, Rev, Nef) transkribiert. Im weiteren Verlauf (2) werden einfach und ungespleißte mRNAs der Strukturproteine und deren Vorläufer (Gag, Pol, Env) sowie akzessorische Proteine gebildet (Vif, Vpu, Vpr). Die RNA-Polymerase II transkribiert ebenfalls das neue RNA-Genom des Virus. Die Proteine und das virale Genom lagern sich an der Cytoplasmamembran zusammen und werden durch Knospung freigesetzt. Im unreifen Viruspartikel wird das Gag/Pol-Vorläuferprotein prozessiert (Reifung) und es entsteht ein infektiöses Virus, das weitere Zellen infizieren kann (verändert nach Modrow & Falke, 1997). Die Erläuterung der verwendeten Abkürzungen befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

1.2 Das virale Glykoprotein (gp) 120

Das virale Hüllprotein gp120 besteht aus ca. 470 bis 500 Aminosäuren. Die hohe Sequenzvariabilität des gp120 ist besonders in den variablen Bereichen V1 bis V5 zu finden (siehe Abb. 3). Diese Bereiche sind von konservierten Regionen getrennt, die mit C1 bis C5 bezeichnet werden. Die Bereiche V1 bis V4 sind an ihren *N*- und *C*-terminalen Enden durch Disulfidbrücken zu Schleifen (*loops*) geformt (Leonard *et al.*, 1990). Kristallographische Analysen eines modifizierten gp120 im Komplex mit den Domänen 1 und 2 des CD4 und dem Fab-Teil (*fragment antigen binding*) eines Antikörpers zeigten, dass das gp120 eine innere und eine äußere Domäne besitzt, die durch ein viersträngiges β -Faltblatt (*bridging sheet*) verbunden sind (Kwong *et al.*, 1998).

Das HIV gp120 ist je nach Virusisolat an 20 bis 25 Positionen durch eine *N*-Glykosylierung modifiziert (Leonhard *et al.*, 1990). Die Erkennungssequenzen für eine *N*-Glykosylierung besteht aus drei Aminosäuren mit dem Motiv NXT oder NXS, wobei X jede Aminosäure außer Asparaginsäure und Prolin sein kann. Die Kohlenhydratstrukturen machen etwa 50 % des Molekulargewichts des gp120 aus (Lasky *et al.*, 1986; Mizuochi *et al.*, 1988; Geyer *et al.*, 1988). Die *N*-Glykosylierung der V3-Schleife ist für das Virus von besonderer Bedeutung. Diese *N*-Glykosylierung schützt das Virus vor der Immunabwehr des Wirts, in dem es wichtige Epitope maskiert (Schonning *et al.*, 1996). Die V3-Schleife stellt die wichtigste immunogene Region des Virus dar (*principal neutralizing domain*, Carrow *et al.*, 1991; Zwart *et al.*, 1991) und ist das Ziel neutralisierender Antikörper (Schreiber *et al.*, 1997).

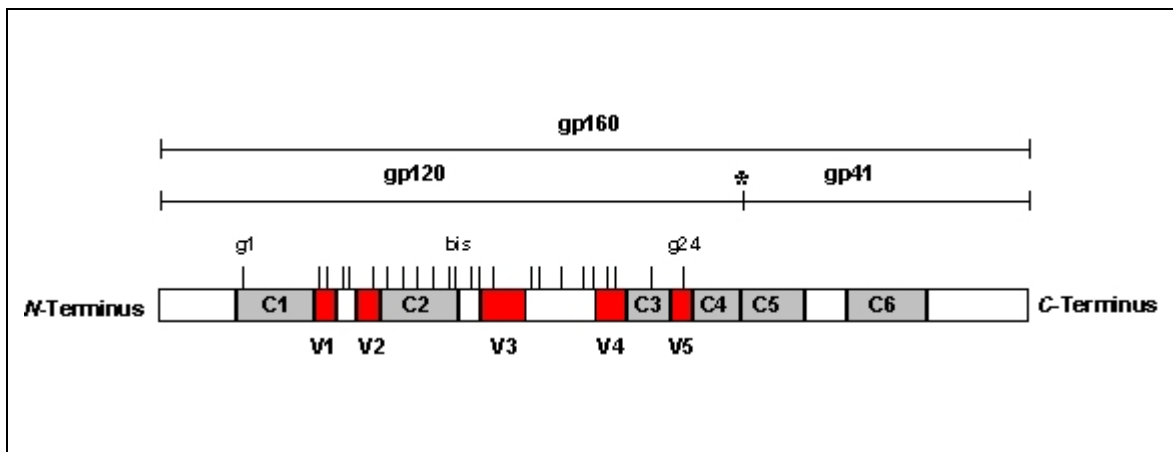


Abb. 3: Graphische Darstellung der Hüllproteine des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1 Stamm IIIB (HIV-1_{IIIB}). Das Vorläuferprotein gp160 wird durch eine zelluläre Furiinprotease in die Hüllproteine gp120 und gp41 gespalten. Die Spaltstelle ist mit einem Stern gekennzeichnet (*). Die variablen Sequenzbereiche sind als V1 bis V5 (rot) und die konservierten Bereiche als C1 bis C6 (blaugrau) bezeichnet. Die N-Glykosylierungsstellen des gp120 sind mit Strichen (I) markiert und werden, beginnend vom N-Terminus des Proteins, mit g1 bis g24 bezeichnet. Die N-Glykosylierungsstellen des gp41 sind nicht gekennzeichnet (verändert nach Modrow & Falke, 1997).

1.3 Die Rezeptoren des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1

HIV benötigt für die Infektion von Zellen im allgemeinen die Anwesenheit von CD4 auf der Oberfläche der Zellmembran. Obwohl einige Viren *in vitro* eine CD4-unabhängige Infektion von Zellen zeigten, ist deren *in vivo* Bedeutung noch unbekannt (Clapham *et al.*, 1992; Dumonceaux *et al.*, 1998; Reeves *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 2001). Die infektiösen Eigenschaften verschiedener HIV-Isolate unterscheiden sich deutlich voneinander. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass einige Viren nur Makrophagen infizieren (M-trope Viren), während andere Isolate lediglich CD4⁺-T-Zellen infizieren konnten (T-trope Viren). Andere Isolate waren in der Lage, sowohl Makrophagen als auch CD4⁺-T-Zellen zu infizieren (dualtrope Viren; Gartner *et al.*, 1986).

Feng *et al.* entdeckten 1996 eine Korrelation zwischen der Infektion mit T-tropen Viren und der Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 (Federspiel *et al.*, 1993) auf infizierten Zellen. Damit war CXCR4 als erster HIV-Corezeptor identifiziert

worden. Auf der Suche nach Inhibitoren der Interaktion zwischen HIV und der Zelle fand man heraus, dass das Chemokin SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) die Infektion von Zellen mit T-tropen Viren spezifisch inhibierte (Bleul *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996). SDF-1 ist der natürliche Ligand von CXCR4. Fünf Arbeitsgruppen beschrieben bald darauf unabhängig voneinander, die inhibitorischen Eigenschaft der Chemokine RANTES (*regulated on activation normal T cell expressed and secreted*), MIP-1 α und MIP-1 β (*macrophage inflammatory protein-#*) auf die Infektion mit M-tropen Viren (Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996). Diese Chemokine sind Liganden des Chemokinrezeptors CCR5 (Samson *et al.*, 1996), der damit als zweiter HIV-Corezeptor entdeckt wurde.

Asjo und seine Mitarbeiter beobachteten 1986, dass sich HIV-Isolate auch in ihrer Replikationskinetik voneinander unterschieden. Fenyö *et al.* (1988) konnten ebenfalls zeigen, dass T-trope Viren in einer Zellkultur schnell zu hohen Titern heranwuchsen (*rapid/high*). Dagegen erreichten die M-tropen Isolate nur langsam eine relativ geringe Virusdichte (*slow/low*). Ein weiteres Charakteristikum T-troper Viren war die Fähigkeit, in einer Zellkultur die Bildung von Synzytien (vielkernige Riesenzellen) zu induzieren (SI-Viren, *syncytium inducing*). M-trope Viren waren dazu nicht in der Lage (NSI-Viren, *non syncytium inducing*; Tersmette *et al.*, 1988). Durch Sequenzvergleiche der *env*-Gene verschiedener HIV-Isolate konnte nachgewiesen werden, dass die unterschiedlichen Eigenschaften der Viren auf Unterschiede im gp120 und dort besonders innerhalb der V3-Schleife basierten (Hwang *et al.*, 1991).

Die alte Nomenklatur der Viren (siehe oben) findet kaum noch Anwendung. Heute werden HIV-Stämme, die spezifisch CXCR4 nutzen können, als X4 Viren und Viren, die nur CCR5 nutzen können, als R5 Viren bezeichnet. Bei Viren, die beide Corezeptoren nutzen können, spricht man von R5X4 Viren. Ferner gibt es einige HIV-Stämme, die neben CXCR4 und/oder CCR5 weitere Corezeptoren nutzen können (siehe Tab. 1). Diese Viren nennt man multitrop (Berger *et al.*, 1998). Einige dieser zusätzlichen Corezeptoren gehören nicht der Chemokinrezeptorfamilie an, da sie zwar Chemokine binden, jedoch keine Signaltransduktion einleiten können. Die

in vivo Bedeutung dieser Corezeptoren ist jedoch noch unklar, da zum Beispiel Apj nicht auf CD4⁺-Zellen exprimiert wird (Puffer et al., 2000).

Mit der Virushülle sind auch verschiedene zelluläre Adhäsionsmoleküle (zum Beispiel LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen-1*) assoziiert, die ebenfalls zur Interaktion des Virus mit der Zelle beitragen können, jedoch nicht allein eine Infektion vermitteln (einen Überblick geben Clapham & McKnight, 2002).

Tab. 1: Übersicht über die Corezeptoren primater Lentiviren. Aufgeführt sind die Corezeptoren des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1 und -2 (HIV-1, -2) sowie des Affen-Immundefizienzvirus (SIV). Die Erläuterung der verwendeten Abkürzungen befindet sich im Anhang dieser Arbeit (? : nicht bekannt; zusammengestellt und verändert nach Clapham et al., 2002; Murphy et al., 2000).

Corezeptor	Ligand (beispielhaft)	Corezeptor für	Referenz
CXCR2	GRO α /CXCL1	HIV-2	Bron et al., 1997
CXCR4	SDF-1/CXCL12	HIV-1, -2, SIV	Feng et al., 1996
CXCR5	BCA-1/CXCL13	HIV-2	Kanbe et al., 1999
CCR1	HCC-1/CCL14	HIV-2, SIV	u. a. Guillon et al., 1998
CCR2b	MCP-1/CCL2	HIV-1, -2, SIV	Doranz et al., 1996
CCR3	Eotaxin/CCL11	HIV-1, -2, SIV	Choe et al., 1996
CCR4	TARC/CCL17	HIV-2	McKnight et al., 1998
CCR5	MIP-1 β /CCL4	HIV-1, -2, SIV	u. a. Deng et al., 1996
CCR8	I-309/CCL1	HIV-1, -2, SIV	Rucker et al., 1997
CCR9	TECK/CCL25	HIV-1	Choe et al., 1998
CX ₃ CR1	Fraktalkine/CX ₃ CL1	HIV-1, -2, SIV	Reeves et al., 1997
US28	?	HIV-1, -2	Pleskoff et al., 1997
Leukotriene B ₄ Rezeptor	Leukotriene B ₄	HIV-1	Owman et al., 1998
Apj	Apelin	HIV-1, -2, SIV	Choe et al., 1998
BOB/GPR15	?	HIV-1, -2, SIV	u. a. Farzan et al., 1997
Bonzo/STRL33	CXCL16	HIV-1, -2, SIV	u. a. Deng et al., 1997
GPR1	?	HIV-1, -2, SIV	Farzan et al., 1997
ChemR23	?	HIV-1, SIV	Samson et al., 1998
RDC1	?	HIV-1, -2, SIV	Shimizu et al., 2000

1.4 Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 und deren Bedeutung für die Infektion mit dem Humanen Immundefizienzvirus Typ-1

Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR, **G** **p**rotein **c**oupled **r**eceptor). Die Mitglieder dieser Gruppe sind Membranrezeptoren des Typs III. Sie besitzen eine N-terminale extrazelluläre Domäne, sieben Transmembrandomänen (α -Helices) und eine C-terminale cytoplasmatische Domäne (siehe Abb. 4). Die Transmembrandomänen sind durch drei extrazelluläre (ECL1 bis 3, **e**xtrac**e**llular **l**oop) und drei intrazelluläre Schleifen getrennt. Die intrazellulären Schleifen und der C-Terminus tragen wichtige Sequenzmotive für die Signaltransduktion und sind das Ziel zellulärer Proteinkinasen (Rodriguez-Frade *et al.*, 2002). Kristallstrukturanalysen des Rhodopsins (auch ein Mitglied der GPCR-Superfamilie) zeigten, dass sich zwischen der ECL1 und der ECL2 sowie zwischen dem N-Terminus und der ECL3 Disulfidbrücken bilden, die das Molekül zylindrisch und kompakt in der Membran orientieren (Palczewski *et al.*, 2000). CXCR4 besitzt in der N-terminalen Domäne an der Aminosäureposition 11 und im ECL2 an Position 176 ein Asparagin (N) innerhalb des Sequenzmotivs einer N-Glykosylierung. CCR5 verfügt an Position 268 im ECL3 über ein derartiges Motiv.

Die natürlichen Liganden der Chemokinrezeptoren sind die Chemokine (**chemo**attractic **cyto**kines). Chemokine sind Peptide mit 70 bis 130 Aminosäuren die von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen gebildet werden. Sie dienen unter anderem der Aktivierung von Leukocyten, der Chemotaxis von Zellen des Immunsystems, der Angiogenese und der Angiostase (eine Übersicht geben Baggiolini *et al.*, 1997). Chemokine bestehen aus einer N-terminalen Region und einer C-terminalen helicalen Domäne, die durch ein dreisträngiges β -Faltblatt voneinander getrennt sind (Crump *et al.*, 1997). Die Chemokine besitzen charakteristisch angeordnete Cysteinreste, die durch andere Aminosäurereste voneinander getrennt sein können. Liegen die Cysteinreste direkt nebeneinander, werden sie CC- oder früher α -Chemokine genannt und erhalten die nachfolgende

Bezeichnung Ligand (L). Ihre Rezeptoren (R) werden CCR genannt (Murphy *et al.*, 2000). RANTES /CCL5 ist zum Beispiel ein CC-Chemokin und sein Rezeptor ist CCR5. Sind die Cysteinreste von einer Aminosäure getrennt, handelt es sich um CXC-Chemokine (früher β -Chemokine) und CXC-Rezeptoren (zum Beispiel SDF-1/CXCL12 und CXCR4). Zwei Chemokine besitzen nur ein einziges charakteristisches Cystein (Lymphotactin-1 und -2). Diese Chemokine werden als C-(γ -) Chemokine und ihr Rezeptor als XCR1 bezeichnet, um Verwechslungen mit dem Komplementrezeptor-1 (CR1) zu vermeiden. Drei Aminosäurereste trennen die Cysteine des CX₃C-(δ -) Chemokins Fraktalkine, dessen Rezeptor CX₃CR1 ist.

Die Bindung eines Chemokins an seine(n) Rezeptor(en) erfolgt primär über den N-Terminus des Chemokins (*docking domain*). Nach konformationellen Veränderungen interagiert eine zweite Region mit dem Rezeptor (*triggering domain*) und induziert strukturelle Veränderungen des Chemokinrezeptors, der über ein gekoppeltes G-Protein die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade einleitet (Crump *et al.*, 1997; Rodriguez-Frade *et al.*, 2002).

An der Bindung der Chemokine sind sowohl der N-terminale Bereich, als auch verschiedene extrazelluläre Schleifen der Chemokinrezeptoren beteiligt. Diese Bereiche überlappen teilweise mit den Regionen, mit denen das HIV gp120 interagiert und die Infektion der Zelle einleitet (Blanpain *et al.*, 1999; Samson *et al.*, 1997). Dieser kompetitive Effekt ist unter anderem der Grund für die inhibierende Wirkung von SDF-1/CXCL12 und RANTES/CCL5 auf die Infektion mit X4 bzw. R5 Viren. Daneben führt die Bindung der Chemokine an den Rezeptor zur Internalisierung des Rezeptors, der damit dem Virus nicht mehr als Corezeptor zur Verfügung steht (Ross *et al.*, 1999; Signoret *et al.*, 2001).

CXCR4 und CCR5 werden unter anderem auf den meisten hämatopoetischen Zellen sowie auf dendritischen Zellen, vasculären Endothelzellen, Neuronen und Gliazellen exprimiert (Murphy *et al.*, 2000). Ihre Verteilung und Dichte auf den Zellen unterscheidet sich jedoch voneinander (Doms *et al.*, 2000).

Der Verlauf einer HIV-Infektion bis zur Entwicklung des Vollbilds AIDS ist unter anderem durch einen starken Rückgang der CD4⁺-Zellen im Blut charakterisiert. In der frühen Phase einer Infektion wurden aus dem Blut infizierter Personen lediglich R5 Viren isoliert (Connor *et al.*, 1993, Schuitemaker *et al.*, 1992). Mit dem Fortschreiten des Krankheitsbilds wurden in etwa 50 % der Fälle auch R5X4 und X4 Viren isoliert (Scarlatti *et al.*, 1997; Tersmette *et al.*, 1988, 1989). Das Auftreten von X4 Viren korrelierte mit dem Rückgang der CD4⁺-Zellen im Blut und damit mit der Progression der Krankheit (Connor *et al.*, 1994, 1997). Alle bis heute beschriebenen HIV-Isolate nutzen entweder CXCR4 und/oder CCR5 für die Infektion von Zellen. Daher determiniert die Nutzung des Corezeptors den Zelltropismus von HIV, der den Verlauf der Krankheit beeinflusst. Die V3-Schleife des gp120 bindet an die Corezeptoren CXCR4 und CCR5 und beeinflusst somit direkt die Nutzung des Corezeptors und damit den Zelltropismus von HIV (Cocchi *et al.*, 1996; Rabehi *et al.*, 1998; Sakaida *et al.* 1998).

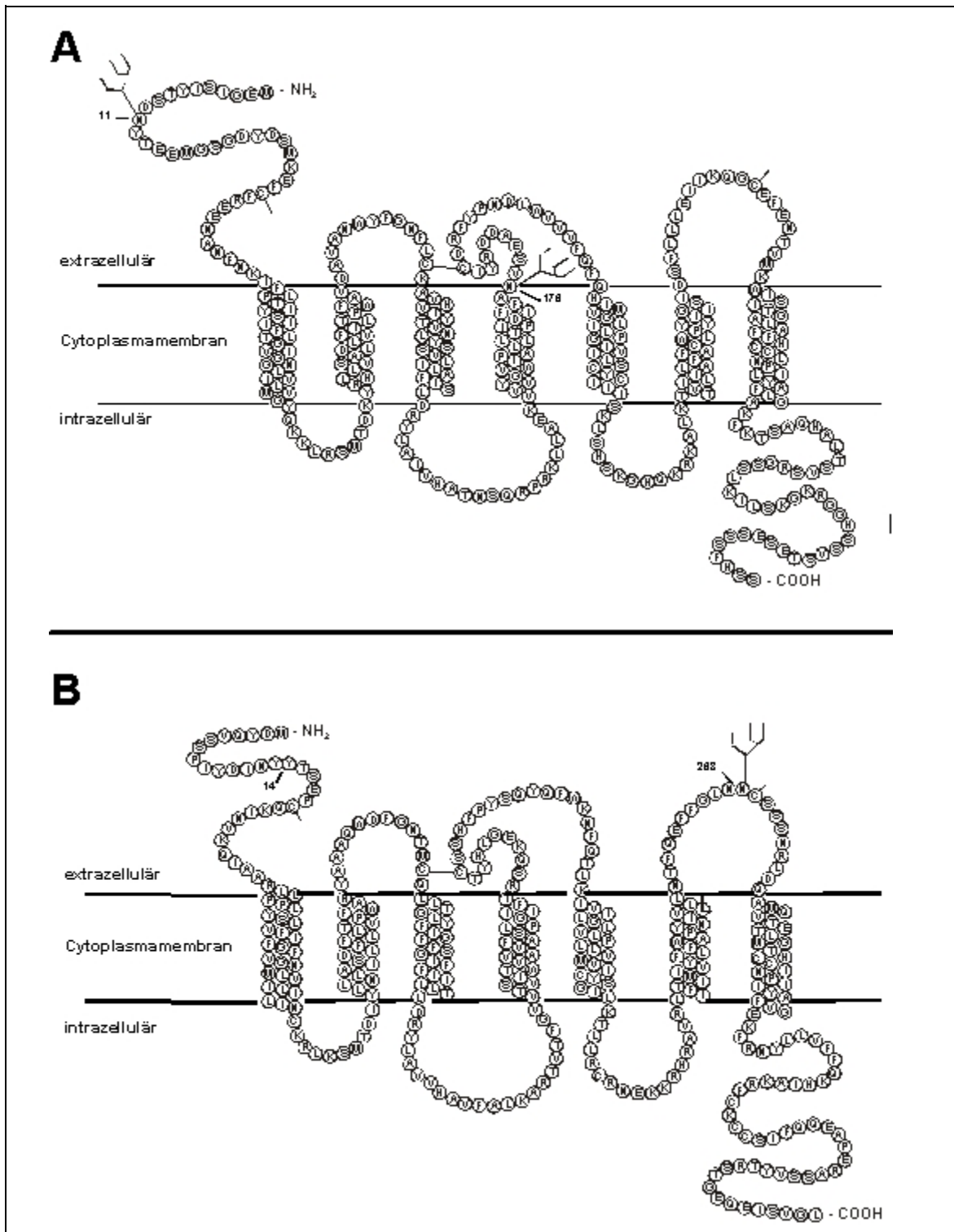


Abb. 4: Graphische Darstellung der Chemokinrezeptoren (A) CXCR4 und (B) CCR5. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz der HIV-Corezeptoren. Die Positionen wichtiger Aminosäurereste sind angegeben. Die an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligten Cysteinreste (C) sind durch Strichstrukturen (I) dargestellt. Die Positionen der potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind durch Baumstrukturen dargestellt.

1.5 Die Interaktionen des Glykoproteins (gp) 120 mit den Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5

Die Bindung des gp120 an CD4 induziert konformationelle Veränderungen im gp120, die zur Exposition konservierter Regionen an der Basis der V1/V2- und der V3-Schleifen führen (Lapham *et al.*, 1996; Trokla *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996). Diese Regionen interagieren nachfolgend mit dem Corezeptor. Die Bindung an den Corezeptor führt zu weiteren konformationellen Veränderungen und zur Exposition eines hydrophoben Fusionspeptids des gp41. Das Fusionspeptid dringt in die Membran der Zelle ein und ermöglicht die Fusion der Virus- mit der Cytoplasmamembran (Chan *et al.*, 1997; Melikyan *et al.*, 2000; Weissenhorn *et al.*, 1997). Bei den Interaktionen des HIV-1 gp120 mit den Corezeptoren CXCR4 und CCR5 spielen geladene Aminosäurereste der Proteine, insbesondere der V3-Schleife und der extrazellulären Domänen der Corezeptoren, eine wichtige Rolle. Die extrazellulären Domänen wirken dabei kooperativ zusammen. Bei diesen Interaktionen scheint es jedoch starke Unterschiede zwischen den einzelnen Viren und den Zielzellen zu geben (Clapham & McKnight, 2001; Dimitrov *et al.*, 1998; Wyatt & Sodroski, 1998).

Die Infektion von CD4⁺-Zellen mit HIV kann nicht immer auf die Expression von CXCR4 oder CCR5 zurückgeführt werden, denn einige R5 Isolate sind nicht in der Lage, Makrophagen zu infizieren (Dittmar *et al.*, 1997). Ebenso überraschend war die Beobachtung, dass einige X4 Viren keine Makrophagen, die neben CCR5 auch CXCR4 exprimieren, infizieren können (Simmons *et al.*, 1998; Valentin *et al.*, 2001). Einige R5X4 Viren sind dagegen in der Lage gewesen, diese Zellen zu infizieren (Yi *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass noch andere Mechanismen einen Einfluss auf die Infektion mit HIV haben (Baribaud & Doms, 2001).

Die Interaktionen des gp120 mit den zellulären Rezeptoren wird durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Die *N*-Glykosylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die großen Einfluss auf die Eigenschaften eines Proteins haben kann (Rademacher & Dwek, 1989). Li *et al.* (1993) zeigten, dass die

funktionelle Faltung des gp120 durch eine fehlende *N*-Glykosylierung des Proteins gestört wurde, und dass dieses gp120 nicht an CD4 binden konnte. Auch für das Fehlen einzelner *N*-Glykane im Bereich der V1/V2- und V3-Schleifen, konnte ein negativer Einfluss auf die korrekte Faltung des Proteins und auf die Replikationsfähigkeit einiger HIV-1 gezeigt werden (Lee *et al.*, 1992; Nakayama *et al.*, 1998; Ogert *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu erhöhte das Fehlen des *N*-Glykans g15 innerhalb der V3-Schleife (siehe Abb. 3) die Infektiösität einiger Viren (Li *et al.*, 2001). Diese Entdeckungen verdeutlichen den großen Einfluss der *N*-Glykane des HIV auf die Interaktion zwischen gp120 und den zellulären Rezeptoren.

Die Bedeutung der *N*-Glykosylierung der Corezeptoren für die Funktion des CXCR4 und des CCR5 sowie der Einfluss auf die Infektion mit HIV-1, ist bisher noch wenig erforscht und wird kontrovers diskutiert. BreLOT *et al.* beobachteten 1997 eine gesteigerte Infektion von CXCR4⁺-Zellen, dessen *N*-terminale *N*-Glykosylierung fehlte. In einer anderen Arbeit hatte die Eliminierung der Zuckerstrukturen des CXCR4 keinen Einfluss auf die Infektion (Picard *et al.*, 1997). Potempa *et al.* (1997) konnten dagegen eine erhöhte Infektion von Zellen, die eine fehlende *N*-Glykosylierung des CXCR4 aufwiesen, mit einem CD4-unabhängigen HIV-2 Stamm beobachten. Durch eine Eliminierung der *N*-Glykosylierungsstellen des CXCR4 konnte die Bindung des Liganden SDF-1/CXCL12 weitgehend inhibiert werden (Zhou *et al.*, 1999). Die Bindungsregionen des CXCR4 an SDF-1/CXCL12 und an gp120 überlappen teilweise. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die *N*-Glykane des CXCR4 auch die Infektion mit HIV beeinflussen können. Verstärkt wurde die Vermutung, *N*-Glykane können die Funktion von Corezeptoren verändern, durch Beobachtungen von Kuhmann und seinen Mitarbeitern (1997). Sie entdeckten einen Genpolymorphismus des CCR5 in Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*). Dieser Polymorphismus (Y14N) führt zu einer *N*-Glykosylierung im *N*-Terminus des Proteins. Zellen, die dieses mutierte Gen exprimierten, waren weder mit SIV noch mit HIV-1 zu infizieren.

1.6 Das Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der *N*-Glykosylierung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 für die Infektion mit HIV-1 zu ermitteln. Dazu war es erforderlich, die *N*-Glykosylierungsmotive des CXCR4 und des CCR5 durch ortsgerichtete Mutagenese zu eliminieren. Die mutierten Corezeptoren sollten in unterschiedlichen Zelllinien stabil exprimiert und diese Zellen nachfolgend mit Varianten des HIV-1 Stamms NL4-3 infiziert werden. Hierfür sollten rekombinante Viren verwendet werden, deren V3-Sequenz aus HIV-1 infizierten Patienten stammt und sich in der *N*-Glykosylierung der V3-Schleife unterscheiden. Abschließend sollten die Replikationseigenschaften der Viren in den hergestellten Zellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Substanz	Bezugsquelle
Adenosintriphosphat	Boehringer (Mannheim)
Acrylamid, Gel 30, Gel 40	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Life Technologies (Karlsruhe)
Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Ammoniumpersulfat	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
<i>Bam</i> HI	Boehringer (Mannheim)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
<i>Bgl</i> II	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
<i>Bst</i> EII	Boehringer (Mannheim)
Calciumchlorid	Merk (Darmstadt)
Chlorophorm	Serva (Heidelberg)
CIAP	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Cymal [®] -5	Anatrace (Maumee, USA)
Diethylformamid	Sigma (Deisenhofen)
Diethylpyrocarbonat	Sigma (Deisenhofen)
Desoxyribonucleosidtriphosphate	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Diethylpyrocarbonat	Sigma (Deisenhofen)
Dikaliumhydrogenphosphat	Merk (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid	Merk (Darmstadt)
DMEM	Life Technologies (Karlsruhe)
DMEM, Cystein- und Methionin-frei	Life Technologies (Karlsruhe)
<i>Dpn</i> I	Statagene (Heidleberg)

Dithiothreitol	Sigma (Deisenhofen)
Dynabeads/Protein-A	Dynal Biotech (Hamburg)
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Empigen BB™, 30 % (v/v)	Calbiochem (Schwalbach)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merk (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat	Sigma (Deisenhofen)
Ethanol (96%)	Merk (Darmstadt)
Formamid	Sigma (Deisenhofen)
Fötale Kälberserum	Biochrom (Gründau)
Molekulargewichtstandard, GenRuler™ 100 bp	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Molekulargewichtstandard, GenRuler™ 1 kb	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Molekulargewichtstandard, <i>prestained low range</i>	BioRad (München)
Glukose	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
H ₂ O <i>aqua ad iniectabilia</i>	Baxter (Unterschleißheim)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
HEPES	Biomol (Hamburg)
<i>Hind</i> III	Life Technologies (Karlsruhe)
Hygromycin B	Life Technologies (Karlsruhe)
IPTG	Applichem (Darmstadt)
Isoamylalkohol (96 %)	Merck (Darmstadt)
Isopropanol (96 %)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Klenow-Fragment (DNA Polymerase I)	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
LB-Medium	Sigma (Deisenhofen)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid	Merck (Darmstadt)

Methanol (96%)	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumazid	Sigma (Deisenhofen)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Natriumhypochlorid, 13% (v/v)	Roth (Karlsruhe)
<i>Nhe I</i>	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
p24-Antigen-Standard, ARP 620	Medical Research Council (London, UK)
Penicillin	Life Technologies (Karlsruhe)
Phenol/Chloroform	Sigma (Deisenhofen)
PIPES	Roth (Karlsruhe)
Polybrene [®]	Sigma (Deisenhofen)
Protease-Inhibitor <i>Cocktail</i>	Sigma (Deisenhofen)
Puromycin	Sigma (Deisenhofen)
<i>Pfu Turbo</i> [®] DNA Polymerase	Statagene (Heidelberg)
Platinum [®] <i>Taq</i> DNA Polymerase	Life Technologies (Karlsruhe)
Redivue [™] Pro-Mix [™] , Methionin und Cystein, [³⁵ S]-markiert	Amersham Pharmacia, (Buckinghamshire, UK)
<i>Sa I</i>	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Salzsäure, 37% (v/v)	Sigma (Deisenhofen)
Streptomycin	Life Technologies (Karlsruhe)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Tetramethylethyldiamin	Sigma (Deisenhofen)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
Trypsin/EDTA	Life Technologies (Karlsruhe)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Trypton	Life Technologies (Karlsruhe)

Tween-20	Serva (Heidelberg)
Xba I	Life Technologies (Karlsruhe)
X-Gal	Applichem (Darmstadt)
Xylencyanol	Serva (Heidelberg)

2.2 Reaktionssysteme

Produkt	Bezugsquelle
Alkaline Phosphatase Substrate Kit	Bio-Rad (München)
CEQ™ Dye Terminato Cycles Sequencing Kit	Beckman Coulters (Unterschleißheim)
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche (Mannheim)
NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAmp Viral RNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
SuperScript™ one-step™ RT-PCR System	Life Technologies (Karlsruhe)

2.3 Bakterien und Zellen

Bezeichnung	Bezugsquellen
<i>Escherichia coli</i> XL-1 blue	Stratagene (Heidelberg)
GHOST*	Matthias Dittmar (Heidelberg)
GHOST.CCR5 (High5)*	Matthias Dittmar (Heidelberg)
GHOST.CXCR4*	Matthias Dittmar (Heidelberg)
HeLaP4	Matthias Dittmar (Heidelberg)
Phoenix™	Garry Nolan (Stanford, USA)
U87*	Matthias Dittmar (Heidelberg)
U87.CCR5*	Matthias Dittmar (Heidelberg)
U87.CXCR4*	Matthias Dittmar (Heidelberg)

* standardisierte Indikatorzellen

2.4 Verwendete Nucleinsäuren

2.4.1 Plasmide

Bezeichnung	Bezugsquelle
pBABE-puro	Dan Littman (New York, USA)
pcDNA3.CXCR4	Matthias Dittmar (Heidelberg)
pcDNA3.CCR5	Matthias Dittmar (Heidelberg)
pGEM [®] -T	Promega (Madison, USA)
pNL4-3	Svenja Polzer (Hamburg)
pNL4-3 _(-g14, -g15)	Svenja Polzer (Hamburg)
pNL-952	Svenja Polzer (Hamburg)
pNL-952 _(-g13, -g14, -g15, -g17)	Svenja Polzer (Hamburg)
pNL-991	Svenja Polzer (Hamburg)
pNL-991 _(-g15)	Svenja Polzer (Hamburg)
pNL Δ env	Svenja Polzer (Hamburg)
pUC Δ V3	Svenja Polzer (Hamburg)

2.4.1.1 Beschreibung des Vektors pUC Δ V3

Der Vektor pUC Δ V3 wurde von Svenja Polzer (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Mittels der Restriktionsendonucleasen *BstE* II und *BamH* I wurde ein Teil des Gens für das virale Hüllprotein (Env) des CXCR4-tropen HIV-1 Stamms NL4-3 (Adachi *et al.*, 1986) in das Plasmid pUC_{HM} kloniert. Durch eine Restriktionshydrolyse mit den Enzymen *Bgl* II und *Nhe* I ließ sich der V3-Bereich aus dem so hergestellte Plasmid pUC_{env} entfernen (pUC Δ V3) und durch V3-Sequenzen eines anderen Virusstamms ersetzen (POLZER *et al.*, 2001, POLZER, 2002).

2.4.1.2 Beschreibung des Vektors pNL Δ env

Der Vektor pNL Δ env wurde von Svenja Polzer (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Dieser Vektor diente zur Herstellung von rekombinanten Viruspartikeln. Durch eine Restriktionshydrolyse mit den Enzymen *Bst*E II und *Bam*H I wurde ein Teil des Env-Gens des HIV_{NL4-3} aus dem Vektor pNL4-3-*Bst* entfernt (POLZER *et al.*, 2001, POLZER, 2002). Dieser Bereich kann durch ein *Bst* E II/*Bam* H I-Fragment des Plasmids pUCenv (siehe 2.4.1.1), bei dem der V3-Bereich durch eine geeignete Sequenzen eines anderen Virus ersetzt wurde, vervollständigt werden.

2.4.1.3 Beschreibung der verwendeten Viren

Die Viren wurden als Vektoren von Svenja Polzer (Hamburg) zur Verfügung gestellt (siehe 2.4.1). Aus den Seren HIV-1 infizierter Personen wurden verschiedene Viren isoliert, die die Bezeichnung Patientenisolat (PI)-991 bzw. PI-952 erhielten (siehe Abb. 5). Das Virus PI-991 wurde als R5 und das Virus PI-952 als R5X4 Virus charakterisiert (Müller, 1999). Der V3-Bereich des jeweiligen Virus wurde in das Plasmid pUC Δ V3 (siehe 2.4.1.1) kloniert. Nachfolgend wurden die jeweiligen env-Bereiche in den Vektor pNL4-3 Δ env (siehe 2.4.1.2) überführt (Polzer *et al.*, 2001, Polzer, 2002). Es ist besonders hervorzuheben, dass die Viruschimären den gleichen Zelltropismus aufweisen, wie das ursprüngliche Patientenisolat. Die rekombinanten Viren unterscheiden sich genetisch lediglich im V3-Bereich von dem T-Zell adaptierten HIV-1 Laborstamm NL4-3.

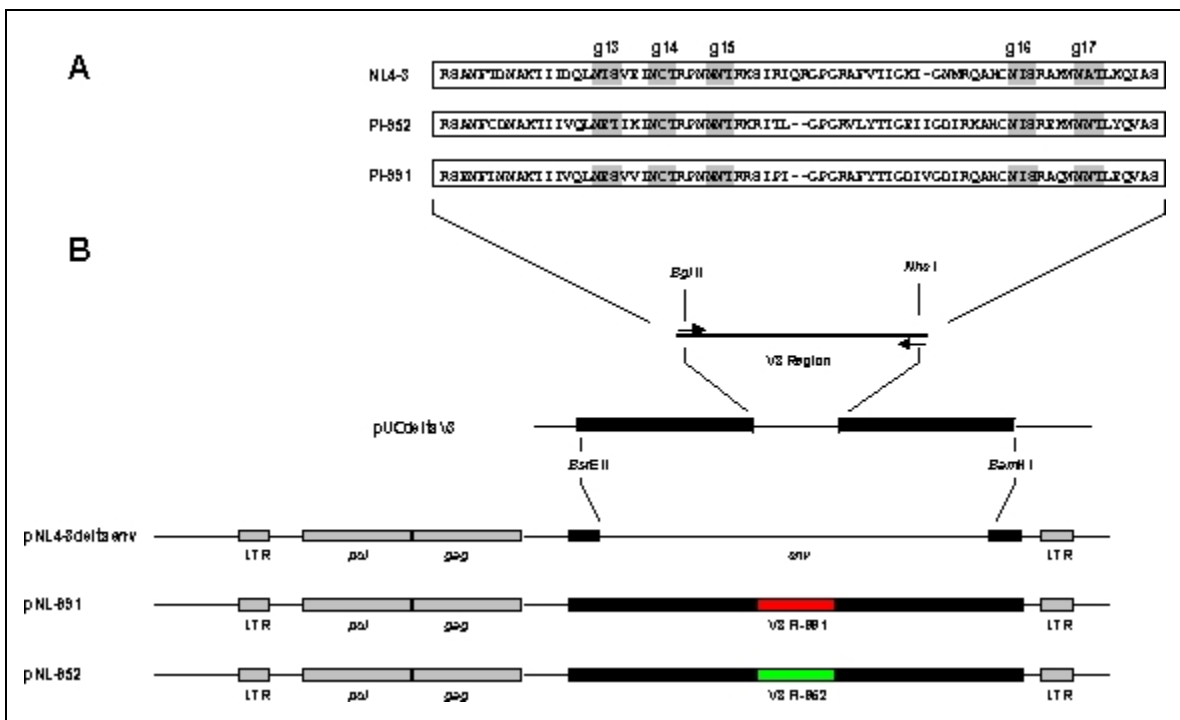


Abb. 5: Schematische Darstellung der Herstellung der Vektoren pNL-952 und pNL-991. **(A)** Vergleich der Aminosäuresequenz der V3-Region der Viren NL4-3, PI-952 und PI-991. Die Positionen wichtiger *N*-Glykosylierungsstellen sind mit g13 bis g17 bezeichnet und grau unterlegt. **(B)** Darstellung der Klonierung der Vektoren pNL-952 und pNL-991. Die V3-Region der HIV-1 Patientenisolate PI-952 und PI-991 wurden mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Oligonucleotide waren so konstruiert, dass eine Erkennungssequenz für die Enzyme *Bgl* II und *Nhe* I entstand. Durch eine Restriktionshydrolyse der PCR-Produkte und des Plasmids pUC Δ V3 mit den Enzymen *Bgl* II und *Nhe* I konnten die jeweiligen PCR-Fragmente in das Plasmid pUC Δ V3 kloniert werden. Nach einer Restriktionshydrolyse mit den Enzymen *Bst*E II und *Bam*H I wurden das jeweilige chimäre *env*-Fragment in den Vektor pNL4-3 Δ env ligiert. *env*: Env-Gen; *gag*: Gag-Gen; *pol*: Pol-Gen; LTR: *long terminal repeats*; V3: dritte variable Region.

Das virale Hüllprotein gp120 von HIV-1_{NL4-3} besitzt 24 potentielle *N*-Glykosylierungsstellen, deren Positionen ausgehend vom *N*-Terminus des Proteins mit g1 bis g24 bezeichnet werden. Durch eine ortsgerichtete Mutagenese wurden einige der in der V3-Region der Viren vorkommenden *N*-Glykosylierungssignale (g13 bis g17; siehe Abb. 6) eliminiert. Tabelle 2 fasst die in dieser Arbeit verwendeten Viren zusammen. Es ist besonders hervorzuheben, dass die Eliminierung des *N*-Glykans g15 in der V3-Schleife des Virus NL-991, zu einem Verlust des CCR5-tropen Phänotypen führte. Ebenso verlor das R5X4 Virus NL-952

seine dualtrophe Eigenschaft und war nach der Eliminierung des g15 nicht mehr in der Lage, CCR5 zu nutzen (Polzer, 2002).

Tab. 2: Darstellung der verwendeten HIV-1_{NL4-3} Chimären und deren Zelltropismus. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz der Viren im Bereich der *N*-Glykosylierungsstellen an den Positionen g13, g14, g15 und g17 des viralen Hüllproteins gp120 im Vergleich zum jeweiligen Wild-Typ des Virus. Die Eliminierung einer *N*-Glykosylierungsstelle zum Beispiel an Position 13 des Proteins wird als -g13 bezeichnet. Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz sind durch Striche (-) gekennzeichnet. Abweichungen von der Sequenz des Wild-Typ Virus sind angegeben.

Virus / Glykan	g13	g14	g15	g17	Tropismus
NL4-3	NTS	NCT	NNNT	NIS	X4
NL4-3 _(-g14, -g15)	---	Y--	GST-	---	X4
NL-952	NET	NCT	NNNT	NNT	R5X4
NL-952 _(-g13, -g14, -g15, -g17)	Q--	D-I	-Q--	Q--	X4
NL-991	NES	NCT	NNNT	NIS	R5
NL-991 _(-g15)	---	---	-Q--	---	-

Darüber hinaus wurden von Christian Eggers (Hamburg) virushaltige Seren und Proben der Spinalflüssigkeit HIV-1 infizierter Patienten zur Verfügung gestellt. Aus diesen Proben sollten im Verlauf der Arbeit verschiedene V3-Bereiche der Viren amplifiziert und in den genetischen Hintergrund des Stamms HIV-1_{NL4-3} kloniert werden.

2.4.1.4 Beschreibung des Vektors pBABE-puro

Der Vektor pBABE-puro (Morgenstern *et al.*, 1990) wurde von Dan Littman (New York, USA) zur Verfügung gestellt (siehe Abb. 6). Es handelt sich bei diesem Plasmid um einen retroviralen Vektor basierend auf dem *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV). Er dient zur Herstellung retroviraler Helferviren mit denen externe Gene in Zellen eingebracht werden können (siehe 2.10.1.4 und 2.11.5).

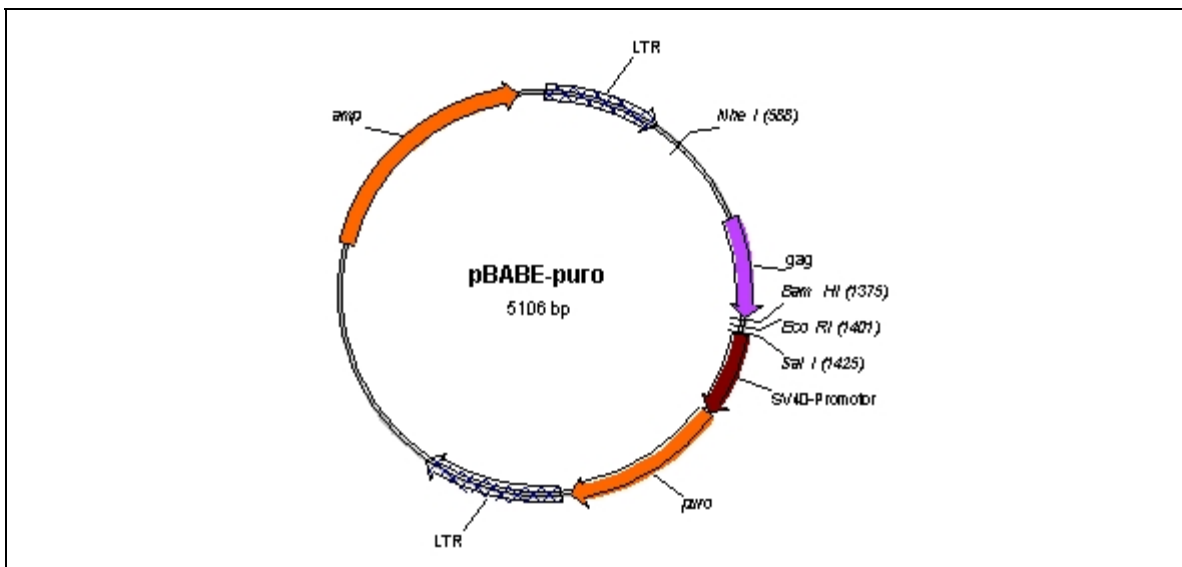


Abb. 6: Darstellung des Vektors pBABE-puro. *amp*: Gen für die Ampicillinresistenz; *gag*: Gag-Gen des *Moloney Murine Leucemia Virus* (MMLV); LTR: MMLV *long terminal repeats*; *puro*: Gen für die Puromycinresistenz; SV40-Promotor: Promotor des *Simian Virus 40*.

2.4.2 Oligonucleotide

Die verwendeten Oligonucleotide wurden von Sibylle Resemann und Heiko Hauser am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (Hamburg) hergestellt. Die Synthese wurde mit einem automatisierten Synthesegerät (Expedite 8900) durchgeführt. Nach der Herstellung der Oligonucleotide, wurde die Konzentration der Oligonucleotide in der Lösung bestimmt (siehe 2.9.1.3) und durch das Verdünnen der Lösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ eine geeignete Konzentration der Oligonucleotide hergestellt.

Bezeichnung (#) Nucleotidsequenz (5' → 3')

08724	GCC TTA GGC ATC TCC TAT GGC AGG AAG AA
08694	ATA CAT TGC TTT TCC TAC TTC CTG C
09398	TTA CAG TAG AAA AAT TCC C
09400	AAT GTC AGC ACA GTA CAA TGT AC
09401	CAG TAG AAA AAT TCC CCT CCA CAA TT
09403	GCA GAA GAA GAG GTA GTA ATT AGA
09404	CAA TTT CTG GGT CCC CTC CTG AGG
09594	GTA AAA CGA CGG CCA GT

09819 AGC TAT GCA TCC AAC GCG
09822 TGG CTA ACT AGA GAA CCC
09823 TAG CAT TTA GGT GAC AC
09975 AGG CAG GAT AAG GCC AAC C
10021 GTA TAT ACA CTA GTG ATA ACT ACG CCG AGG AAA TG
10022 CAT TTC CTC GGC GTA GTT ATC ACT AGT GTA TAT AC
10023 CAT CTT TGC CCA GGT CAG TGA GGC
10024 GCC TCA CTG ACC TGG GCA AAG ATG
10025 GCC AAC GTC GCT GAG GCA GAT G
10026 CAT CTG CCT CAG CGA CGT TGG C
10218 TCC CTT CTG GGC AGT TGA TG
10219 TTA TCC TGC CTG GTA TTG TC
10220 CTC AAG ATC CTC TCC AAA GG
10221 ATC CTC CTG ACA ATC GAT AG
10278 GAG CTA CTG CAC TGA TTC AGG CCA
10279 TGA ATA ATT GCG CTA GCT CTA ACA GG
10280 CCT GTT AGA GCT AGC GCA ATT ATT CA
10338 TGG CCT GAA TCA GTG CAG TAG CTC
10343 GCT TGT CAT GGT CAT CTG C
10449 GTA TAT ACA CTA GTG ATC AGT ACA CCG AGG AAA TG
10450 ATT TCC TCG GTG TAC TGA TCA CTA GTG TAT ATA C
10470 CAA TCT ATG ATA TCA ATA ATT ATA CAT CGG
10471 CCG ATG TAT AAT TAT TGA TAT CAT AGA TTG
10637 CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT GCC
10638 GGC AGG AAG TAG GAA AAG CAA TGT AT
10900-6 TCT TTT ACA TCT GCT GCA GCT GGA CTG A
10900-7 CCC CGG GTG GGG ATC CAT GGA TTA TAC AAG
10900-9 GGA GAA CCA GCC TGC AGC ATG GAG GGG
10900-10 CCC ACT TGA GTC CGG GAT CCA AGC CCA CAG AT
10900-11 CTT TGT CTT GCT ATG GGG AG
10900-12 CGG TGT AGT TAT CTG AAG TG
10900-17 AGT TGC TGT ATG TCT CGT GG
10900-18 CAT CTA TGC CTT TGT CGG GG

10900-19	TCC CCT TCA CAT GCA TCA AG
10900-20	CGA TCC TCC CTT TAT CCA GC
10900-21	ATT AGA TCT GAA AAT TTC ATG AAC AAT G
10900-22	AAT TTG CTA GCT ATC TGT CCT AAA GTG G
10900-26	ACC CTA ACT GAC ACA CAT TCC

2.5 Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
Anti-HIV-1-p24, D7320 (Schaf)	Biochrom (Berlin)
Anti-HIV-1-p24, Serum (Kaninchen)	H.-G. Kräusslich (Heidelberg)
Anti-hum. CCR5, Phycoerythrin, 2D7 (Maus)	PharMigen (San Diego, USA)
Anti-hum. CCR5. 2D7 (Maus)	PharMigen (San Diego, USA)
Anti-hum. CXCR4, Phycoerythrin, 12G5 (Maus)	PharMigen (San Diego, USA)
Anti-hum. CXCR4, 12G5 (Maus)	PharMigen (San Diego, USA)
Anti-Kaninchen-IgG, alkalische Phosphatase (Ziege)	Sigma-Aldrich (München)

2.6 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Abdeckfolie	Millipore (Eschborn)
Bakterienkulturschalen	Greiner (Solingen)
Blot-Papier	Amersham Lifetech (Braunschweig)
Dialyse-Schlauch, Ausschlußvolumen 10 kDa	Sigma-Aldrich (München)
Dispensertips, div.	Eppendorf (Hamburg)
Einmalspritzen, div.	Braun (Melsungen)
Einwegpipetten, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Greiner (Solingen)
Gewebekulturplatte, 6-, 48-, 96-Kavitäten	Nunc (Wiesbaden)
Gewebekulturplatte, MaxiSorb, 96-Kavitäten	Nunc (Wiesbaden)
Gewebekulturschale, \varnothing 10 cm	Nunc (Wiesbaden)
Microcon, Filter RC/YM	Millipore (Eschborn)

Nitrozellulosemembran 0,1 µm	Schleicher und Schuell (Dassel)
Pipettenspitzen, 10 µl, 1000 µl	Biozym (Hess. Oldendorf)
Pipettenspitzen, 100 µl	Roth (Karlsruhe)
PP-Röhrchen, 15 ml, 50 ml	Greiner (Solingen)
Reagenzröhrchen, PS 12 x 75 mm	IBS (Fernwald)
Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Biozym (Hess. Oldendorf)
Reaktionsgefäße, 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf(Hamburg)
Schraubdeckelröhrchen, 1,8 ml	Nunc (Wiesbaden)
Skalpell, Cutfix® 15	Braun (Tuttlingen)
Sterilfilter, 0,2 µm, 0,45 µm	Sartorius (Göttingen)
Tiefgefrieröhrchen, 1,8 ml	Nunc (Wiesbaden)
Zellkulturflaschen, 25 cm ³ , 75 cm ³	IBS (Fernwald)
Zellschaber	Greiner (Solingen)

2.7 Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Begasungswärmeschrank	Heraeus (Hamburg)
Blot-Anlage, Blot-Mini-V8.10	BioRad (München)
Centromat® BS-T, Orbitalinkubator	Braun (Melsungen)
CEQ™2000 DNA Analyse System	Beckman Coulters
Dispenser	Eppendorf (Hamburg)
Elektrophoreseanlage Mini Protean II	BioRad (München)
Elektrophoreseanlage HORIZON 58	BLR (Bethesda, USA)
Elektrophoreseanlage SE660	Hofer Phamacia
Expedite 8900	Millipore (Eschborn)
FACScan	Becton Dickinson (Heidelberg)
Horizontalschüttler KL2	Wilke und Witzler (Hamburg)
KingFisher	Thermo LabSystems (Egelsbach)
Laborwaage	Satorius (Göttingen)
Lichtmikroskop	Leitz (Wetzlar)

Magnetrührer, heizbar	Ikamag (Staufen)
Milli-Q-Plus	Millipore (Eschborn)
Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	Brand (Wertheim)
pH-Meter, CG840	Schott (Mainz)
Pipetten, Gilson, diverse	Abimed (Langenfeld)
Phosphoimager, Typhonn	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Photometer, Lambda E	MWG-Biotech (Ebersberg)
Quarzküvetten	Hellma (Jena)
Rotoren, HFA22.50, HFA14.290	Heraeus (Hamburg)
Rotor, 5094A	Hettich (Tuttlingen)
Rotor, A-4-44	Eppendorf (Hamburg)
Software, Vector NTI	InforMax (Bethesda, USA)
Spektrophotometer UV-160A	Shimadzu (Hamburg)
Thermocycler, Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer, compact	Eppendorf (Hamburg)
TLC-Platte mit Fluoreszenz-Indikator	Merck (Darmstadt)
UV-Geldokumentationsgerät	Kodak Deutschland
Videodokumentation UP-895 CE	Sony Deutschland
Vortex Gene 2	Bender und Hobein (Zürich, Schweiz)
Wärmeschrank, Modell 600	Memmert (Schwabach)
Wasserbad GFL1003	GFL (Burgwedel)
Werkbank BSB-4A	ICA Biomedicals (Eschwege)
Zentrifuge, Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge ROTANTA/R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Superfuge 22	Heraeus (Hamburg)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)
ZentrifugengefäÙe, diverse	Nalge Nunc Int. (Wiesbaden)

2.8 Lösungen

Als Lösungsmittel diente, wenn nichts anders vermerkt wurde, bidestilliertes H₂O (H₂O_{bidest.}).

Amoniumpersulfat:

Stammlösung 10 % (w/v)

Ampicillin:

Stammlösung 1 mg/ml

Auftragspuffer (SDS-PAGE), 3-fach:

1,75 ml Sammelgelpuffer; 1,5 ml Glycerin; 5 ml 10 % (w/v) SDS; 1,25 ml Bromphenolblau; 100 mM DTT

Auftragspuffer (Agarose-Gelelektrophorese), 6-fach:

30 % (v/v) Glycerin; 0,2 % (w/v) SDS; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 0,05 % (w/v) Xylencyanol in TAE

Blockierungspuffer für ELISA:

0,05 % (v/v) Tween-20; 10 % (v/v) FCS in PBS

Bromphenolblau:

Stammlösung 0,1 % (w/v) in Ethanol

DEPC-Wasser:

1 g DEPC *ad* 1 l H₂O_{bidest.}, nachfolgend autoklaviert.

DTT-Lösung:

Stammlösung 1 M; pH 5,2

Einfriermedium:

DMEM; 20 % (v/v) FCS; 10 % (v/v) DMSO

Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE):

1 M Tris-HCl; 0,45 % (w/v) Glycerin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8

Ethidiumbromid:

Stammlösung 10 mg/ml

FACS-Puffer:

1 % (v/v) FCS; 0,02 % NaN_3 in PBS

HEPES-Puffer:

1 M HEPES; pH 7,5

IPTG:

Stammlösung 6 % (w/v)

LB-Medium:

1,5 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl; ggf. Ampicillin
100 $\mu\text{g/ml}$; bei LB-Mediumplatten wurden 1,5 % (w/v) Agar zugefügt.

Lyse-Puffer:

100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 20 mM Tris (pH 7,5); 10 % (v/v) Glycerin; Protease-
Inhibitoren nach Angaben des Herstellers; 1 % (w/v) Cymal[®]-5

Natriumacetat-Puffer:

3 M NaCH_3CO_2 ; pH 4,8

Natriumhydrogencarbonat-Puffer:

150 mM NaHCO_3 ; pH 8,5

PBS-Puffer:

10 mM Na_2HPO_4 ; 130 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung:

24:23:1 (v/v/v) Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol

Polybrene[®]:

Stammlösung 1,6 mg/ml

Sammelgel (SDS-PAGE), 4 % (v/v) Acrylamid Gel 30:

3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$; 1,25 ml Sammelgelpuffer; 0,65 ml Acrylamid (Gel 30); 50 μl 10 %
(w/v) SDS; 50 μl 10 % (w/v) APS; 2,5 μl TEMED

Sammelgelpuffer, 4-fach:

0,5 M Tris-HCl; pH 6,8

SOB-Medium:

2 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl;
autoklavieren und anschließend 10 mM MgCl_2 ; 10 mM MgSO_4 zugeben.

SOC-Medium:

2 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; autoklavieren und anschließend 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 2 mM Glukose zugeben.

TAE-Puffer, 10-fach:

890 mM Tris; 5,7 % (v/v) Essigsäure; 20 mM EDTA; pH 8,0

TBE-Puffer, 5-fach:

445 mM Tris; 445 mM Borsäure; 10 mM EDTA, pH 8,0

TE-Puffer:

10 mM Tris; 0,5 mM EDTA; pH 8,0

TB-Puffer:

10 mM PIPES; 55 mM MnCl₂; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; pH 6,7 mit 5 N KOH vor der Zugabe des MnCl₂ einstellen.

Transferpuffer (Western Blot):

20 % (v/v) Methanol; 10 mM Tris; 10 mM Glycerin; pH 8,6

Trenngel (SDS-PAGE), 10 % (v/v) Acrylamid Gel 30:

3,71 ml H₂O_{bidest.}; 3,5 ml Trenngelpuffer; 1,79 ml Acrylamid (Gel 30); 100 µl 10 % (w/v) SDS; 100 µl 10 % (w/v) APS; 7,5 µl TEMED

Trenngelpuffer, 4-fach:

1,5 M Tris; pH 8,8

Trypanblau-Lösung:

0,5 % (w/v) Trypanblau; 0,9 % (w/v) NaCl in PBS

Waschpuffer:

0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS

X-Gal:

Stammlösung 300 mM in Diethylformamid

2.9 Molekularbiologische Methoden

Die in den folgenden Kapiteln verwendeten Chemikalien, Enzyme, Lösungen, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt.

2.9.1 Analyse und Präparation von Nucleinsäuren

2.9.1.1 Isolierung von Plasmiden

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien (*Escherichia coli* XL-1 blue) erfolgte modifiziert nach dem Verfahren der alkalischen Lyse (Birboim & Doly, 1979). Die Plasmid-DNA wurde aus einer LB-Bakterienkultur (siehe 2.10.2.1) mit einem Volumen von 3 ml bzw. 250 ml isoliert. Hierzu wurden die Plasmid-Präparations-Systeme "NucleoSpin Plasmid" der Firma Macherey & Nagel, bzw. "Qiagen Plasmid Maxi Kit" der Firma Qiagen dem Protokoll der Hersteller folgend verwendet.

2.9.1.2 Isolierung von viraler RNA

Die Isolierung und Reinigung viraler RNA wurde mit dem "QIAmp Viral RNA Mini Kit" der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt (modifiziert nach Boom *et al.*, 1990).

2.9.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Nucleinsäure-Konzentration und -Qualität einer Probe wurde unter anderem durch eine Photospektrometrie bestimmt. Zur Messung wurde Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm verwendet. DNA hat bei einer Wellenlänge von 260 nm ein charakteristisches Absorptionsspektrum, Protein bei 280 nm. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml, einer ssDNA-Konzentration von 40 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 33 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Durch den Quotienten der OD bei 260 nm und bei 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) lässt sich die Reinheit einer DNA-Probe bestimmen. Eine saubere DNA-Probe sollte eine OD_{260}/OD_{280} -Quotienten größer 1,8 besitzen. Zur Messung wurde die Nucleinsäure-Lösung 1:50 bis 1:100 mit TE-Puffer verdünnt und in einer Quarzküvette vermessen (Spektrophotometer UV-160A, Shimadzu).

Alternativ zur photometrischen Messung wurde die DNA-Konzentration einer Probe durch den Vergleich mit einem DNA-Größen und -Mengenstandard mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (siehe 2.9.1.5).

2.9.1.4 Analyse von DNA mittels Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen erkennen spezifisch Sequenzen innerhalb einer dsDNA und spalten diese hydrolytisch. Zum Nachweis von Plasmiden, PCR-Produkten und anderen DNA-Molekülen wurde die dsDNA mit bestimmten Restriktionsendonucleasen inkubiert. Es entstanden Fragmente, die mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.9.1.5) voneinander getrennt werden können.

Ein üblicher Reaktionsansatz unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Puffers enthielt pro μg DNA 1-5 U Enzym. Der Reaktionsansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus, Hanau) und je nach verwendetem Enzym, gewöhnlich bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1-2 h inkubiert (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989). Bei einer Hydrolyse mit zwei verschiedenen Enzymen wurde der Puffer gewählt, bei dem beide Enzyme eine hohe Aktivität zeigen.

2.9.1.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung von Nucleinsäuremolekülen unterschiedlicher Größe.

Die Trennung von DNA-Molekülen erfolgte in horizontalen 0,8-2,5 % (w/v) Agarosegelen. Dazu wurden 0,8-2,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, wurden $5\ \mu\text{l}$ Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und die Lösung in eine vorbereitete Gelelektrophoreseanlage gefüllt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht. Dadurch kann die DNA im Gel sichtbar gemacht werden. Nach dem Aushärten des Gels wurde zu den zu untersuchenden Proben $1/6$ Volumen Auftragspuffer gegeben und die Proben in die Auftragstaschen des Gels gefüllt. Die DNA wurde bei 60-100 V für 45 min bis 2,5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde das Gel nach der Elektrophorese mit UV-Licht bestrahlt und mit einer Kamera fotografiert.

2.9.1.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Reinigung von Oligonucleotiden

Zur Reinigung von synthetisierten Oligonucleotiden können Oligonucleotide unter anderem durch eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Nachfolgend müssen die Oligonucleotide aus dem Gel eluiert und entsalzt werden.

In den Raum (18 cm x 24 cm x 2 mm) zwischen zwei vorbereitete Glasplatten einer vertikalen Gelelektrophoreseanlage (Hofer Pharmacia SE660) wurde ein 15 % (w/v), denaturierendes Polyacrylamidgel (8 M Harnstoff, 75 ml Acrylamid Gel 40, 40 ml 5-fach TBE-Puffer, *ad* 200 ml H₂O_{bidest.}, 1 ml APS, 100 µl TEMED) gegossen. Sodann wurde der Kamm für die Bildung der Auftragstaschen eingeführt. Nach der erfolgten Polymerisierung des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel durch das Anlegen einer Spannung von 500 V für 30 min erwärmt. Die Oligonucleotide wurden mit einem Volumen Formamid und 1/6 Volumen Auftragspuffer (für Agarose-Gelelektrophorese) gemischt und nachfolgend in die Vertiefungen des Gels gefüllt. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 800 V über Nacht durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer diente TBE-Puffer.

2.9.1.7 Elution von DNA aus einem Agarosegel

Zur Elution von DNA aus einem Agarosegel (siehe 2.9.1.5) wurde die DNA durch die Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und die DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel gelöst. Durch die Verwendung des "NucleoSpin Extract"-Systems der Firma Macherey-Nagel konnte die DNA aus dem Gel eluiert werden (modifiziert nach Blin *et al.*, 1975). Das "NucleoSpin Extract"-System wurde unter anderem auch zur Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten verwendet.

2.9.1.8 Elution von Oligonucleotiden aus einem Polyacrylamidgel

Zur Elution von Oligonucleotiden aus einem Polyacrylamidgel (siehe 2.9.1.6) wurde das Gel auf eine TLC-Platte mit Fluoreszenz-Indikator invertiert und mit UV-Licht bestrahlt. Durch den Vergleich mit der Bromphenolblau-Bande im Gel ließen sich die Oligonucleotide als schwarze Banden identifizieren und ihre Größe beurteilen. Bei einem 15 % (w/v) Gel befindet sich die Bromphenolblau-Bande auf der Höhe eines Oligonucleotids mit ca. 15-20 b. Die entsprechende Bande wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten, in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einer sterilen Pipettenspitze zerkleinert. Zur weiteren Zerkleinerung wurden die Fragmente durch die Kanüle einer 5 ml Einwegspritze gedrückt. Die Fragmente wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit TE-Puffer überschichtet. Die Gelfragmente wurden 10 min bei -70 °C eingefroren und nachfolgend bei 50 °C aufgetaut. Sodann wurde die Probe 5 min bei 90 °C erhitzt und die Oligonucleotide während einer 16-20 stündigen Inkubation bei 37 °C aus dem Gel eluiert. Danach wurde die Probe 2 min bei 1500 min⁻¹ zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das verbleibende Gel erneut mit 200 µl TE-Puffer überschichtet und für 130 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Probe erneut zentrifugiert und die Überstände vereint (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989). Abschließend wurden

die Oligonucleotide mit Hilfe einer "Microcon-Säule RC/YM" entsalzt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ von der Säule eluiert. Der Erfolg der Elution wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.9.1.5) kontrolliert. Die Konzentration der gereinigten Oligonucleotide wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.9.1.3).

2.9.1.9 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Eine häufig angewandte Methode, um DNA von Proteinverunreinigungen zu befreien ist das Extrahieren der DNA durch Phenol.

Eine DNA-Probe wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf ein Volumen von 100-200 μl aufgefüllt, ein Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung hinzugefügt, gut gemischt und 10 min bei 13000 min^{-1} zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus, Hanau). Es bildeten sich zwei Phasen, die durch eine weiße Trennschicht aus denaturierten Proteinen voneinander getrennt waren. Die DNA-haltige obere Phase wurde abgesogen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von einem Volumen Chloroform, wurde das restliche Phenol entfernt. Die Probe wurde erneut gut gemischt, zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989). Daraufhin folgte eine DNA-Fällung durch Ethanol (siehe 2.9.1.10).

2.9.1.10 Fällung von DNA durch Ethanol

Die Fällung von DNA aus einer Probe wird dann notwendig, wenn die DNA-Konzentration einer Probe zu gering ist.

Die DNA-Probe wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ auf ein Volumen von 100-300 μl aufgefüllt und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) sowie das 2,5-fache Volumen an reinem Ethanol zugegeben. Die DNA wurde 30 min bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gefällt und anschließend mit 13000 min^{-1} bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min sedimentiert (Biofuge pico, Heraeus, Hanau). Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment mit 200 μl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde

abgenommen und die DNA bei 37 °C getrocknet. Die DNA wurde anschließend in einem geeigneten Volumen TE-Puffer gelöst (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989).

2.9.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein *in vitro* Verfahren zur Amplifikation definierter DNA-Bereiche mit Hilfe geeigneter Oligonucleotide (Mullis *et al.*, 1987, Saiki *et al.* 1988). Diese Methode wird vielfach in modifizierter Form angewendet.

Ein Reaktionsansatz enthielt gewöhnlicherweise neben der DNA 0,6 µl 25 mM MgCl₂, 0,2 µl, 10 mM dNTP-Lösung, 1 µl 10-fach Puffer, je 25 pmol der Oligonucleotide und 0,2 U *Taq* DNA Polymerase. Der Ansatz wurde mit H₂O_{bidest.} auf ein Volumen von 10 µl gebracht.

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung der DNA für 5 min bei 95 °C wurden 25 Zyklen bestehend aus der Denaturierung (30 s, 95 °C), der Hybridisierung der Oligonucleotide (30 s, 55 °C) und der Elongation der DNA (1 min/kb, 72 °C) durchlaufen. Beendet wurde die PCR mit einer 10 minütigen Elongation bei 72 °C.

2.9.1.12 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Bei der reversen Transkription wird RNA durch eine Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert. Diese Methode wurde zur reversen Transkription von viraler RNA angewandt. Dabei wurde das "SuperScript™ one-step™ RT-PCR System" der Firma Life Technologies verwendet. Dieses System erlaubt die reverse Transkription von RNA und eine nachfolgende PCR der entstandenen cDNA in einem Reaktionsansatz.

In erwärmte (45 °C) 0,2 ml Reagiergefäße wurden 15 µl einer RNA-Probe (siehe 2.9.1.2), je 25 pmol der Oligonucleotide, 25 µl Reaktionspuffer und 1 µl RT/*Taq* DNA Polymerase gegeben. Der Ansatz wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 50 µl gebracht. Die PCR wurde in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Nach der Hybridisierung des reversen Oligonucleotids

an die RNA und der Elongation der cDNA bei 37 °C für 1 h, wurde die Reverse Transkriptase durch Erhitzen der Probe (2 min, 94 °C) inaktiviert. Es folgten 35 Zyklen bestehend aus der Denaturierung (15 s, 94 °C), der Hybridisierung der Oligonucleotide (30 s, 45 °C) und der Elongation der DNA (1 min/kb, 72 °C). Beendet wurde die RT-PCR mit einer zehn minütigen Elongation bei 72 °C.

2.9.1.13 *nested*-(verschachtelte-) PCR

Die *nested*-PCR ist eine Methode, um die Spezifität und Ausbeute einer PCR zu erhöhen. Nach einer ersten PCR (siehe 2.9.1.11 und 2.9.1.12) folgt eine zweite, die *nested*-PCR. Hier werden die verwendeten Oligonucleotide so gewählt, dass sich ihre Hybridisierungsbereiche am 5'- bzw. 3'-Ende des in der ersten PCR entstandenen PCR-Produktes befinden.

Ein Reaktionsansatz enthielt 2 µl cDNA (siehe 2.9.1.12) 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 10 mM dNTP-Lösung, 5 µl 10-fach Puffer, je 25 pmol der Oligonucleotide und 0,3 U Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase. Der Ansatz wurde mit H₂O_{bidest.} auf ein Volumen von 50 µl gebracht. Die *nested*-PCR wurde in einen Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Nach einer initialen Denaturierung der DNA für 3 min bei 94 °C, wurden 35 Zyklen, bestehend aus der Denaturierung (1 min, 94 °C), der Hybridisierung der Oligonucleotide (1 min, 65 °C) und der Elongation der DNA (3 min, 72 °C), durchlaufen. Beendet wurde die PCR mit einer 20 minütigen Elongation bei 72 °C.

2.9.1.14 Sequenzierung von DNA

Die hier verwendete Sequenzierung von DNA beruht grundsätzlich auf der Didesoxymethode von Sanger *et al.* (1977). In Analogie zur PCR (siehe 2.9.1.11) werden in zyklischen Schritten (Innes *et al.*, 1988, Murrey, 1989) fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotide in die entstehenden Produkte eingebaut. Diese Didesoxynucleotide führen zum Abbruch der Polymerisation. Die so markierten Produkte können in einem Analysegerät mittels Kapillarelektrophorese getrennt und mit einem Laser detektiert werden.

Die Sequenzierung der DNA erfolgte in einem Thermocycler mit dem "CEQ™ Dye Terminator Cycles Sequencing Kit" nach Angaben aus dem Protokoll des Herstellers. Die Analyse der Produkte wurde mit einem "CEQ™2000 DNA Analyse System" durchgeführt.

2.9.1.15 Lagerung von DNA

Für die längere Lagerung von DNA wurden 10 µg DNA mit H₂O_{bidest.} auf ein Volumen von 100 µl gebracht. Nachfolgend wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5 Volumen Ethanol (96 %) hinzugefügt. Die Lösung wurde gut gemischt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Wiederverwendung der DNA wurde die Lösung 15 min bei 4 °C mit 13000 min⁻¹ zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus, Hanau) und nachfolgend mit 200 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit TE-Puffer gelöst.

2.9.2 Modifikation von DNA

2.9.2.1 Mutagenese

Die *in vitro* ortsgerichtete Mutagenese ist eine sehr nützliche Methode, gezielt Aminosäureaustausche in einem Protein einzuführen. Durch den spezifischen Austausch lassen sich unter anderem strukturelle und funktionelle Eigenschaften einer Aminosäure in einem Protein charakterisieren.

Die hier verwendete Methode der *in vitro* ortsgerichteten Mutagenese basiert im wesentlichen auf einer Methode nach Kunkel (1985). Dabei wird die dsDNA eines Plasmids durch das Erhitzen getrennt und zwei synthetisch hergestellte Oligonucleotide, die komplementäre Sequenzen aufweisen, an die nun einzelsträngige DNA gebunden. Diese Oligonucleotide sind so konstruiert, dass sie die Mutation in das Plasmid einbringen. Die verwendeten Oligonucleotide sollten einen hohen Reinheitsgrad besitzen. Ausgehend von den angelagerten Oligonucleotiden werden durch eine *in vitro* Polymerisation zwei neue DNA-Stränge

gebildet. Im weiteren Verlauf wird die parenterale DNA durch eine Restriktionshydrolyse mit dem Enzym *Dpn* I gespalten. *Dpn* I erkennt spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA (5'-Gm6ATC-3'). Da die parenterale Plasmid-DNA aus Bakterien stammt und diese methyliert bzw. hemimethyliert ist, wird nur diese erkannt und hydrolysiert. Die *in vitro* entstandenen DNA-Moleküle werden nicht gespalten. Die DNA wird in kompetente Bakterien transformiert und multipliziert. Die so mutierten Plasmide können dann aus den transformierten Bakterien isoliert werden.

Zur Durchführung der Mutagenese wurden 100 ng Plasmid-DNA mit je 125 ng der Oligonucleotide, 1,5 µl 10 mM dNTPs, 5 µl 10-fach Reaktionspuffer und 2,5 U *Pfu*Turbo® DNA Polymerase gemischt und mit H₂O_{bidest.} auf ein Volumen von 50 µl gebracht. Der Reaktionsansatz wurde stets auf Eis gehalten. Die *in vitro* Mutation wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung der DNA für 30 s bei 95 °C wurden 18 Zyklen bestehend aus der Denaturierung (30 s, 95 °C), der Hybridisierung der Oligonucleotide (1 min, 55 °C) und der Elongation der DNA (2 min/kb, 68 °C) durchlaufen.

Nach erfolgter Reaktion wurden 10 U *Dpn* I zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 15 µl des Ansatzes entnommen und die mutierte DNA in kompetente Bakterien transformiert (siehe 2.10.2.2 und 2.10.2.3).

2.9.2.2 Auffüllen der 5'-Überhänge einer DNA

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten (siehe 2.9.2.4) ist es notwendig, dass die DNA-Fragmente kompatible Enden besitzen. Durch das Auffüllen der 5'-Überhänge eines kohäsiven (*sticky ends*) dsDNA-Moleküls können glatte Enden (*blunt ends*) entstehen. Das so modifizierte DNA-Fragment lässt sich mit einem anderen dsDNA-Molekül, welches ebenfalls glatte Enden besitzt, ligieren.

Zu einer DNA-Menge von 1-5 µg wurden 1,5 µl 10 mM dNTP-Lösung, 1,5 µl Klenow-Fragment und 2 µl vom Hersteller gelieferter Reaktionspuffer gegeben. Der Ansatz wurde mit H₂O_{bidest.} auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989). Die

Reaktion wurde durch ein 10 minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 70 °C abgebrochen. Nachfolgend wurde die DNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.9.1.9) und eine Fällung mit Ethanol (siehe 2.9.1.10) gereinigt.

Das Klenow-Fragment ist das große Fragment der DNA-Polymerase I, ihm fehlt die 5'-3' Exonucleaseaktivität.

2.9.2.3 Dephosphorylierung einer DNA

DNA-Fragmente mit gleichen oder ähnlichen Enden (zum Beispiel glatte Enden) können sich unter bestimmten Bedingungen wieder miteinander verbinden (Religation). Durch ein hydrolytisches Abtrennen der 5'-Phosphatgruppe einer dsDNA lässt sich eine Religation verhindern.

Dazu wurden in einem Ansatz mit einem Volumen von 20 µl pro µg DNA 1 U alkalische Phosphatase und 2 µl vom Hersteller gelieferter Reaktionspuffer eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 1/40 Volumen 0, 2 M EDTA (pH 8,0) wurde die Reaktion gestoppt und das Enzym durch eine 15 minütige Inkubation bei 85 °C inaktiviert (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA wurde nachfolgend durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.9.1.9) und Fällung mit Ethanol (siehe 2.1.9.10) gereinigt.

2.9.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei diesem Verfahren werden zwei unterschiedliche DNA-Moleküle zu einem neuen DNA-Molekül zusammengefügt. In ein geeignetes Plasmid, dem Vektor, kann ein DNA-Fragment, das Insert, eingefügt werden. Es entsteht eine rekombinante DNA.

Bei einer Ligation ist es von Bedeutung, dass die DNA-Mengen des Vektors und des Inserts in einem bestimmten Verhältnis zueinander eingesetzt werden. Als ein Anhalt für eine Ligation mit 50 ng Vektor-DNA gilt Gleichung 1 (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989).

Gleichung 1: Gleichung zur Ermittlung der benötigten Menge (ng) eines DNA-Fragments (Insert) während einer Ligation, bei einer eingesetzte Vektor-Menge von 50 ng.

$$\frac{50 \text{ ng Vektor} \times \text{Größe des Inserts in kbp}}{\text{Größe des Vektors in kbp}} \times \frac{3}{1} = \text{ng Insert}$$

Neben den zu ligierenden DNA-Molekülen enthielt ein üblicher Reaktionsansatz 5 U T4-Ligase und 2 µl des vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffers in einem Volumen von 20 µl. Der Ansatz wurde 1 h bei 22 °C und nachfolgend über Nacht bei 15 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Ligase durch eine 10 minütige Inkubation des Ansatzes bei 75 °C inaktiviert. Nachfolgend wurden 10 µl des Ligationsansatzes in kompetente Bakterien transformiert (siehe 2.10.2.2 und 2.10.2.3).

2.10 Mikrobiologische Methoden

2.10.1 Viren

HIV-1 wird in die Risikogruppe 3 eingestuft (§ 5 Abs. 6 GenTSV). Alle Arbeiten mit aktiven Viren oder Organismen, die ein vollständiges Genom von HIV-1 trugen, wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe L3/S3 am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg durchgeführt.

2.10.1.1 Kultivierung von Viren

Für die Kultivierung von Viren wurde die entsprechende Vektor-DNA (siehe 2.4.1.3) in HelaP4 transfiziert (siehe 2.11.3) und die Kultur vier Tage in einem Begasungswärmeschrank inkubiert. Während dieser Zeit produzierten die transfizierten Zellen Viren, die ihrerseits andere Zellen infizieren und einen neuen Replikationszyklus beginnen können. Nach der Inkubation wurde der Viruskulturüberstand abgenommen, zentrifugiert (5 min, 1200 min⁻¹, ROTANTA/R, Rotor 5094A, Hettich, Tuttlingen) und der virushaltige, zellfreie Überstand in

flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert (siehe 2.10.1.5). Einmal für den Gebrauch aufgetaute Viren wurden nicht wieder eingefroren.

2.10.1.2 Messung der Replikationskinetik

von Viren in einer Zellkultur

Zur Untersuchung der Replikationskinetik bestimmter Viren auf unterschiedlichen Zelllinien wurden die Zellen von einem Kulturgefäß gelöst (siehe 2.11.2) und die Zellzahl pro ml gemittelt (siehe 2.11.4). Pro Kavität einer Gewebekulturplatte mit 96 Kavitäten wurden 3×10^3 bis 1×10^4 Zellen ausgesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium von den Zellen entfernt und je 200 µl Viruskulturüberstand (siehe 2.10.1.1) auf die Zellen gegeben. Die Viruskonzentration betrug 0,05 bis 5 ng p24-Antigen/ml (siehe 2.10.1.3). Für jede Virus-Zell-Kombination wurden doppelte bzw. dreifache Bestimmungen durchgeführt. Es folgte eine Inkubation über 18 h. In dieser Zeit konnten die Viren die Zellen infizieren. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und schließlich mit 200 µl DMEM, 5 % (v/v) FCS sowie Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml) überschichtet.

In regelmäßigen Abständen wurden je 150 µl der Kulturen entnommen und auf eine Kulturplatte (96 Kavitäten) überführt. Jede Kavität der Kulturplatte enthielt 16 µl 1 % (v/v) Empigen BB[®] in DMEM. Dieses Detergens inaktiviert die Viren durch die Destabilisierung der Hüllmembran der Viren. Die Menge an Viren in den Kulturüberständen wurde nachfolgend durch einen p24-Antigen ELISA ermittelt (siehe 2.10.1.3).

2.10.1.3 p24-Antigen Nachweis mittels Enzymgebundener Immunoassay (ELISA)

Der p24-Antigen Nachweis dient der Quantifizierung von Viruspartikeln in einer Kultur. Als Indikator wurde das HIV-Capsidprotein p24 verwendet. Die Menge der Viren in einer Kultur ist proportional zur Menge des Capsidproteins p24 (p24-Antigen Äquivalent).

Eine Kulturplatte mit 96 Kavitäten (MAXIsorp) wurde mit je 100 µl eines anti-HIV-1-p24-Antikörpers (10 µg/ml Natriumhydrogencarbonat-Puffer) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und zum Blockieren der restlichen Oberfläche der Kavitäten mit je 300 µl Blockierungspuffer befüllt. Die Platte wurde 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte einmal mit Waschpuffer gewaschen, mit je 100 µl der zu untersuchenden Kulturüberstände befüllt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Bindung des p24-Antigens an den an die Platte gebundenen Antikörper wurde die Platte sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und je Kavität 100 µl eines anti-HIV-1 Kaninchenserums (1:2000 verdünnt in Blockierungspuffer) zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte sechsmal gewaschen und je 100 µl eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-Kaninchen IgG Antikörpers (1:2000 verdünnt in Blockierungspuffer) in die Kavitäten gegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur. Die Kavitäten der Platte wurden dreimal mit Waschpuffer und schließlich dreimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Zum Nachweis des gebundenen p24-Antigens wurden je 100 µl p-Nitrophenylphosphat-Substratlösung nach Angaben des Herstellers (*Alkaline Phosphatase Substrate Kit*) in die Kavitäten gegeben. Die Reaktion wurde nach 5-10 min durch Zugabe von 100 µl 0,4 M NaOH gestoppt. Die Menge an umgesetztem Substrat, die mit der Menge an gebundenem p24-Antigen korreliert, wurde mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Durch den Vergleich mit einem standardisierten p24-Protein (200 ng/ml), welches in einer halblogarithmischen Verdünnung ebenfalls gemessen wurde, konnte die Menge an p24-Antigen in einer Viruskultur ermittelt werden.

2.10.1.4 Herstellung von retroviralen Helferviren

Die Herstellung von retroviralen Helferviren diente der Transduktion von DNA in eine Zielzelle (siehe 2.11.5). Unter Transduktion wird hier die Integration von fremder DNA in das Genom einer Zelle verstanden. Geeignete Verpackungszelllinien werden mit einem retroviralen Vektor, der das zu verpackende Gen enthält, transfiziert. Diese retroviralen Vektoren beinhalten unter anderem die LTRs und Promotoren eines Retrovirus (zum Beispiel MMLV). Die Verpackungszellen enthalten ihrerseits die ergänzenden Gene zur Komplettierung eines Retrovirus (unter anderem weitere Promotor, Replikationsursprung, *gag*, *env*, *pol*). Durch die Transfektion eines geeigneten Vektors in diese Zelllinien werden retrovirale Helferviren hergestellt, die das zu transduzierende Gen enthalten. Mit diesen retroviralen Helferviren können andere Zellen infiziert werden und das fremde Gen in die Zielzellen einbringen. Bei der Wahl der Verpackungszelllinie ist darauf zu achten, dass die Zellen ein virales Hüllprotein (Env) bilden, welches an die Zielzellen binden kann. Verpackungszelllinien, die Helferviren produzieren, die unter anderem humane und murine Zellen infizieren können, werden als amphotrop bezeichnet.

Zellen der amphotropen Verpackungszelllinie PhoenixTM (siehe 2.3) wurden von einem Kulturgefäß gelöst (siehe 2.11.2), auf eine Gewebekulturplatte mit 24 Kavitäten überführt und über Nacht kultiviert. Zur Verpackung eines Gens in retrovirale Helferviren wurde der retrovirale Vektor pBABE-puro (siehe 2.4.1.4) verwendet. PhoenixTM-Zellen wurden mit dem entsprechenden Vektorkonstrukt transfiziert (siehe 2.11.3) und in 1 ml Medium (siehe 2.11.1) drei Tage inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Kulturüberstand abgenommen und 5 min mit 1500 min⁻¹ (Zentrifuge 5804R, Rotor A-4-44, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der zentrifugierte Kulturüberstand wurde mit einem Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert.

Das Filtrat wurde entweder sofort zur Transduktion von Zielzellen eingesetzt (siehe 2.11.5) oder bei -70 °C eingefroren. Durch das Einfrieren kann sich die Effektivität einer nachfolgenden Transduktion um ca. 50 % reduzieren.

2.10.1.5 Lagerung von Viren

Für die Lagerung von Viren wurden Zellreste im Überstand einer Viruskultur (siehe 2.10.1.1) durch eine 5 minütige Zentrifugation mit 1200 min^{-1} (ROTANTA/R, Rotor 5094A, Hettich, Tuttlingen) sedimentiert. Der zellfreie Überstand wurde als 100-400 μl Aliquots in 1,8 ml Tiefgefriereröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.10.2 Bakterien

2.10.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien wurde in flüssigem LB-Medium oder auf LB-Mediumplatten ggf. unter Zugabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin durchgeführt. Bei der Kultivierung von transformierten Bakterien (siehe 2.10.2.3) mit dem Vektor pGEM-T[®] wurde IPTG (0,006 %) und X-Gal (0,3 mM) zugegeben.

Die Bakterien wurden im gefrorenen Zustand (siehe 2.10.2.4) auf eine LB-Platte gestrichen und über Nacht vereinzelt. Am folgenden Tag wurde eine Kolonie der Bakterien in 3 ml flüssiges LB-Medium überführt und ca. 16 h schüttelnd inkubiert. Die Bakteriensuspension stand nun für weitere Versuche oder zur Expansion in größeren Volumina zur Verfügung.

2.10.2.2 Herstellung von kompetenten Bakterien

Die meisten Bakterien sind nicht ohneweiteres in der Lage, fremde DNA aufzunehmen. Aus diesem Grund werden Bakterien kompetent für die Aufnahme von fremder DNA gemacht (Inoue *et al.*, 1990).

Eine Kolonie der Bakterien *Escherichia coli* XL1-blue wurde in 5 ml LB-Medium kultiviert (siehe 2.10.2.1). Am nächsten Tag wurden 2,5 ml dieser Vorkultur in 250 ml erwärmtes SOB-Medium gegeben und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in gekühlten Zentrifugenbechern sedimentiert (2500 min^{-1} , 10 min, 4°C , Suprafuge 22, Rotor HFA14.290, Heraeus, Hamburg), vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer

resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, wurden die Bakterien in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden 400 µl der Bakteriensuspension in sterile, gekühlte 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.10.2.3 Transformation

Unter Transformation wird das Einbringen einer fremden, löslichen DNA in ein Bakterium verstanden.

Zu 100 µl einer Zellsuspension kompetenter Bakterien (siehe 2.10.2.2) wurde die zu transformierende Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien 1,5 min bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert (Hitzeschock), in dieser Zeit wird die Plasmid-DNA von den kompetenten Bakterien aufgenommen. Nachfolgend wurden 750 µl erwärmtes SOC-Medium zugegeben und die Bakterien für 45 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert. Nach der Transformation wurden die Bakterien 30 s mit 13000 min^{-1} (Biofuge pico, Heraeus, Hamburg) zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen und die Zellen im verbleibenden Volumen resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien auf eine LB-Mediumplatte (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert (modifiziert nach Sambrook et al., 1989).

2.10.2.4 Lagerung von Bakterien

Zur Lagerung von Bakterien wurden 812 µl einer 3 ml Bakterienkultur (siehe 2.10.2.1) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 188 µl 80 % (v/v) Glycerin gemischt. Die Bakterien wurden sodann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.11 Methoden der Zellkultur

Die Kultur von eukaryotischen Zellen erfordert ein hohes Maß an Reinheit. Dazu gehört unter anderem das Sterilfiltrieren bzw. Autoklavieren der Medien, Lösungen und Geräte. Die Zellen wurden in einem Begasungswärmeschrank bei 37 °C und H₂O-gesättigter, 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.11.1 Kultivierung von Zellen

Eine 25 cm³ Zellkulturflasche wurde mit 10 ml DMEM, das mit 20 % (v/v) FCS und Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml) ergänzt war, befüllt. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen (siehe 2.11.6) wurden zügig durch Handwärme aufgetaut und in die vorbereitete Zellkulturflasche gegeben. Nach 4-8 h wurde das Medium durch frisches, erwärmtes Medium mit 10 % (v/v) FCS ersetzt.

Humane Osteosarcoma -Zellen (GHOST; Cecillia *et al.*, 1998; siehe 2.3) wurden in DMEM, 10 % (v/v) FCS und U87-Zellen (Deng *et al.*, 1996; siehe 2.3) in DMEM, 15 % (v/v) FCS und Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml) kultiviert. Zellen, die mit einem Corezeptor transfiziert waren, wurden durch die Zugabe von Puromycin (1 µg/ml) selektiert.

GHOST-Zellen sind stabil mit dem Gen zur Expression von humanem CD4 und einem GFP-(*green fluorescent protein*) Reportergen transfiziert. U87-Zellen tragen ebenfalls ein Gen für das humane CD4. Zur Aufrechterhaltung der Transfektion wurden die Zellen in Abständen von ca. 12 Wochen für 2 Wochen durch den Zusatz von Neomycin (CD4-Selektion; 500 µg/ml) und Hygromycin (GFP-Selektion; 100 µg/ml) selektiert.

HelaP4- (Maddon *et al.*, 1986; siehe 2.3) sowie PhoenixTM-Zellen (siehe 2.3 und 2.10.1.4) wurden in DMEM, 5 % (v/v) FCS, Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml) kultiviert. Die verwendeten HelaP4-Zellen exprimieren CD4 (T4) und die HIV-Corezeptor CXCR4 und CCR5.

2.11.2 Trypsinieren von adhärennten Zellen

Die sich teilenden, adhärennt wachsenden Zellen bedecken nach einiger Zeit die gesamte Oberfläche eines Kulturgefäßes. Dadurch werden die Eigenschaften einer Zelllinie beeinflusst. Aus diesem Grund werden Zellen ca. zweimal pro Woche mit Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes gelöst, verdünnt und in neue Kulturgefäße überführt.

Hierfür wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Kultur zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 1-3 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben, verteilt und die Zellen ca. 5 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit lösten sich die Zellen von dem Kulturgefäß. Die Zellsuspension wurde mit frischem Medium verdünnt (im allgemeinen 1:4 bis 1:8) und in ein neues Kulturgefäß überführt.

2.11.3 Transfektion

Unter Transfektion wird hier das Einbringen von fremder DNA in eine eukaryotische Zelle verstanden.

Die zu transfizierenden Zellen wurden mit Trypsin/EDTA vom Boden eines Kulturgefäßes gelöst (siehe 2.11.2), mit frischem Medium verdünnt und in ein neues Kulturgefäß überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit einem geeigneten Volumen DMEM, 0,5 % (v/v) FCS, Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml) überschichtet. Die Zellen sollten vor der Transfektion die Oberfläche des Kulturgefäßes zu ca. 80 % bewachsen haben (Konfluenz).

Für die Transfektion von Zellen wurde das "FuGENE 6" Transfektionssystem der Firma Roche den Angaben des Herstellers folgend verwendet. Zur Vorbereitung eines Transfektionsansatzes wurden 94 µl DMEM mit 6 µl "FuGENE 6" Reagenz vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden 2 µg Plasmid-DNA hinzugefügt, gemischt und der Ansatz 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Zellen 3-4 Tage in einem Begasungswärmeschrank inkubiert.

2.11.4 Bestimmung der Zellzahl in einer Zellkultur

Die Bestimmung der Zellzahl in einer Kultur wurde mit dem Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Dabei können lebende von toten Zellen unterschieden werden. Lebende Zellen sind in der Lage, den Farbstoff Trypanblau aus der Zelle zu entfernen. Tote Zellen sind dazu nicht in der Lage und erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau.

Die Zellen wurden von einem Kulturgefäß gelöst (siehe 2.11.2) und mit DMEM im Verhältnis 1:5 verdünnt. Aus dieser Zellsuspension wurden 20 µl entnommen, in 80 µl einer Trypanblau-Lösung gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 µl der gefärbten Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm) gegeben und die Zellen unter dem Lichtmikroskop gezählt. Es wurden stets 4 Großquadrate ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl pro ml wurde mit Hilfe von Gleichung 2 durchgeführt.

Gleichung 2: Gleichung zur Ermittlung der Zellzahl in einer Zellsuspension. Die Zellen wurden 1:5 verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm) gezählt.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} \times 5 \times 10^4 = \text{Zellen} \times \text{ml}^{-1}$$

2.11.5 Herstellung von stabil transfizierten Zellen

Damit Zellen ein Gen stabil exprimieren können, muss die entsprechende DNA stabil in den Zellen vorliegen. Das kann durch transfizierte Plasmide, die einen Selektionsmarker tragen oder durch fremde DNA, die im Genom der Wirtszelle integriert ist (Transduktion), geschehen. Zur Integration von fremder DNA ins Genom der Wirtszellen wurden hier retrovirale Helferviren verwendet.

Der filtrierte Kulturüberstand der retroviralen Helferviren (siehe 2.10.1.4) wurde mit DMEM im Verhältnis 1:2 verdünnt. Zusätzlich wurde dem Kulturüberstand Polybrene® (8 µg/ml) hinzugefügt. Durch die polykationischen Eigenschaften von Polybrene® werden die Virus-Rezeptor-Interaktionen verbessert und die Zellen effizienter infiziert.

Eine Zielzelllinie wurde in einer Gewebekulturplatte mit 48 Kavitäten bis zu einer Konfluenz von etwa 60 % kultiviert und mit 1 ml des Kulturüberstands überschichtet. Die Zellen wurden drei Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 2 ml DMEM, 10 % (v/v) FCS, Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml) überschichtet. Zur Selektion der transduzierten Zellen wurde der Selektionsmarker Puromycin (1 µg/ml) hinzugegeben. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 4-8 Wochen selektiert, wobei die Zellen alle drei Tage einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium überschichtet wurden.

2.11.6 Lyse von Zellen

Die Lyse von Zellen wurde in einer Gewebekulturschale (\varnothing 10 cm) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen (siehe 2.12.2) mit 1 ml Lyse-Puffer überschichtet und 30 min auf Eis lysiert, dabei wurden die Zellen alle 5 min geschwenkt. Nach dieser Zeit wurden das Lysat 30 min bei 4 °C mit 13000 min⁻¹ (Biofuge pico, Heraeus, Hamburg) zentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis verwahrt.

2.11.7 Lagerung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung von Zellen wurden die Zellen vom Boden eines 75 cm³ Kulturgefäßes gelöst (siehe 2.11.2). Durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 4 °C mit 13000 min⁻¹ (Zentrifuge 5804R, Rotor A-4-44, Eppendorf, Hamburg) wurden die Zellen sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 5 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden als 1 ml Aliquotes in 1,8 ml Tiefgefriereröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.12 Biochemische Methoden

2.12.1 Herstellung von dialysiertem fötalen Kälberserum

In fötalem Kälberserum (FCS) befinden sich unter anderem freie Aminosäuren, die den effizienten Einbau von radioaktiv-markierten Aminosäuren während der Biosynthese eines Proteins (siehe 2.12.2) stören könnten. Durch eine Dialyse können freie Aminosäuren aus dem FCS entfernt werden.

Ein Dialyse-Schlauch mit einem Ausschlussvermögen von 10 kDa wurde über Nacht in 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ unter Zugabe von 1 mM EDTA inkubiert. Anschließend wurde der Schlauch mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen, an einem Ende verknotet, mit FCS befüllt und das andere Ende mit einer Schlauchklemme geschlossen. Das FCS wurde 3 h in 1 l PBS dialysiert, wobei das PBS jede Stunde gewechselt wurde. Die Dialyse des FCS wurde über Nacht in 2 l PBS fortgesetzt.

2.12.2 Radioaktive Markierung von Proteinen

Die radioaktive Markierung diente dem Nachweis von biosynthetisierten Proteinen.

Eine Zelllinie wurde in einer Gewebekulturschale (\varnothing 10 cm) bis zu einer Konfluenz von 90-100 % kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen 1 h in Methionin- und Cystein-freiem DMEM kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen in 4 ml DMEM, ergänzt mit 10 % (v/v) dialysiertem FCS (siehe 2.12.1) und 270 μCi [^{35}S]-Methionin und [^{35}S]-Cystein, für 24 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis verwahrt.

2.12.3 Immunopräzipitation von Protein

Die Immunopräzipitation diente der Reinigung von radioaktiv markierten Proteinen aus Zellysaten.

Zu 700 µl eines Zellysats (siehe 2.11.6) wurden 0,7 µg eines für das radioaktiv-markierte Protein (siehe 2.12.2) spezifischen Antikörpers gegeben und 1 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden 20 µl magnetisierte Dynabeads/Protein-A zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Die Dynabeads, an denen die Protein-Antikörper-Komplexe gekoppelt waren, wurden mit einem Magneten aus der Lösung entfernt. Anschließend wurden die Dynabeads sechsmal mit Lyse-Puffer in einem halbautomatischen Mikotiterplattenwaschgerät (KingFischer, Thermo LabSystems, Egelsbach) gewaschen. Danach wurden die Dynabeads in 50 µl Lyse-Puffer aufgenommen und 1/3 Volumen Auftragspuffer (für SDS-PAGE) zugegeben. Durch eine Inkubation der Probe für 1 h bei 55 °C wurden die Protein-Antikörper-Komplexe von den Dynabeads gelöst. Die Dynabeads wurden mit einem Magneten aus der Lösung entfernt. Es folgte eine Analyse der Proteine durch eine SDS-PAGE (siehe 2.12.4).

2.12.4 Natriumdodecylsulfat-(SDS-) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Trennung von Proteinen aus einem Gemisch und dient der Bestimmung des Molekulargewichts eines Proteins. Die SDS-PAGE wurde modifiziert nach einer Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Zur besseren Trennung der Proteine wurde eine Kombination aus einem 4 % (v/v) Sammelgel und einem 10 % (v/v) Trenngel gewählt.

Das Trenngel wurde sofort nach der Zugabe von TEMED und APS luftblasenfrei zwischen die Glasscheiben einer vorbereiteten Gelelektrophoreseanlage gegossen. Zur Bildung einer glatten Oberfläche wurde das Trenngel mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ überschichtet. Nach der Polymerisierung des Gels wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel luftblasenfrei auf das Trenngel gegeben. Dann wurde der Kamm für die Bildung der Auftragstaschen eingeführt. Nach der Polymerisierung des Sammelgels wurde der Kamm

entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer gestellt. Die Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer befüllt und die vorbereiteten Proben (siehe 2.12.3) in die Auftragstaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde mit einem Strom von 30 mA (bei Verwendung von zwei Gelen pro Kammer) durchgeführt, wobei die Spannung von anfänglich ca. 80 V auf etwa 200 V stieg. Die Elektrophorese wurde solange durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

2.12.5 Western-Blot

Ein Western-Blot (Towbin et al., 1979; Burnette 1981) wird direkt nach einer SDS-PAGE durchgeführt. Hierbei werden die elektrophoretisch getrennten Proteine aus einem Gel auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran übertragen.

Das Polyacrylamidgel (siehe 2.12.4) wurde dafür auf eine mit Transferpuffer angefeuchtete Nitrozellulosemembran gelegt. Auf beide Seiten wurden drei Lagen mit Transferpuffer angefeuchtetes Blot-Papier und Blot-Pads gelegt und das Ganze in eine mit Transferpuffer gefüllte Blot-Anlage gestellt. Beim Blotten ist darauf zu achten, dass sich die Nitrozellulosemembran zwischen dem Gel und der Kathode der Anlage befindet. Beim Blotten von zwei Gelen wurde ein Strom von 90 mA über einen Zeitraum von 1,5 h verwendet. Die Banden eines gefärbten Molekulargewichtstandards dienen später der Ermittlung des Molekulargewichts der Proteine. Die Analyse des Blots wurde mit einem Phosphorimager durchgeführt.

2.12.6 Cytometrie

Durch die cytometrische Messung mittels einer FACScan-Analyse kann die Zelloberflächenexpression eines Proteins nachgewiesen werden.

Eine Kultur adhärenter Zellen wurde vom Boden eines Kulturgefäßes gelöst (siehe 2.11.2). Die Zellen wurden in ein Reagenzröhrchen überführt und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurden die Zellen 5 min mit 1200 min^{-1} (Rotor Zentrifuge 5804R, Rotor A-4-44, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Die Zellen wurden in FACS-Puffer suspendiert und die Zellzahl pro ml bestimmt (siehe 2.11.4). Zu 1×10^6 Zellen wurden $20 \mu\text{l}$ eines mit Phycoerythrin markierten Antikörpers (siehe 2.5) gegeben und 30 min auf Eis bei Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 1 ml FACS-Puffer suspendiert. Die Analyse der Zelloberflächenexpression des Proteins wurde mit einem FACScan der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Mutagenese des CXCR4 und des CCR5

Für die Mutagenese wurde die Wild-Typ (WT)-DNA der HIV-1 Corezeptoren CXCR4 und CCR5 im Vektorsystem pcDNA3 verwendet (siehe 2.4.1). Die Vektoren wurden in kompetente Bakterien (siehe 2.10.2.2) des Typs *Escherichia coli* XL1-blue transformiert (siehe 2.10.2.3), kultiviert und nachfolgend aus den Bakterien isoliert (siehe 2.9.1.1).

Die *N*-Glykosylierungsmotive des CXCR4 (siehe Abb. 4) wurden durch ortsgerichtete Mutagenese (siehe 2.9.2.1) entweder allein oder in Kombination miteinander eliminiert. Dazu wurden die Aminosäuren der *N*-Glykosylierungssignale an den Positionen Asparagin (N)- 11 bzw. Threonin (T)- 13 und N176 bzw. Serin (S)- 178 durch Glutamin (Q) bzw. Alanin (A) substituiert (N11Q, T13A, N176Q, S178A und N11Q/N176Q). Mit dieser Methode wurde ebenfalls das *N*-Glykosylierungssignal des CCR5 (siehe Abb. 4) eliminiert (N268Q bzw. S270A) oder ein zusätzliches *N*-Glykosylierungsmotiv, durch den Austausch von Tyrosin (Y) nach Asparagin an der Position 14 (Y14N), in den *N*-Terminus des Proteins eingefügt. Die unterschiedlichen Mutanten des CCR5 wurden ebenfalls kombiniert (Y14N/N268Q). Die zur Herstellung der Mutanten verwendeten Oligonucleotide wurden mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.9.1.6 und 2.9.1.8) gereinigt. Die Tabelle 3 fasst die hergestellten Mutanten des CXCR4 und des CCR5 zusammen und gibt die verwendeten Oligonucleotide an.

Die mutierten Vektoren wurden in kompetente Bakterien transformiert und später aus den kultivierten Bakterien isoliert. Nachfolgend wurde die DNA des CXCR4WT und dessen Mutanten sowie der CCR5-Varianten im Vektorsystem pcDNA3 sequenziert (siehe 2.9.1.14). Dadurch konnte überprüft werden, dass die spezifischen Mutationen eingefügt worden waren und sich keine ungewollten Mutation in der DNA ergeben hatten. Zur Sequenzierung der CXCR4-Varianten wurden die Oligonucleotide 09822, 10218, 10219, 10220, 10900-17 und 09823 verwendet (siehe 2.4.2). Für die Sequenzierung der CCR5-Varianten wurden die Oligonucleotide 09822, 10221, 10343, 10900-18, 10900-19 und 09823 verwendet.

Tab. 3: Zusammenfassung der hergestellten Mutanten des CXCR4 und des CCR5 sowie der zur Mutagenese verwendeten Oligonucleotide. Die Sequenz der Oligonucleotide ist in Kapitel 2.4.2 aufgeführt. Die Erläuterung der verwendeten Abkürzungen befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

hergestellte Mutanten	verwendete Oligonucleotide (#)
CXCR4N11Q	10449 und 10450
CXCR4T13A	10021 und 10022
CXCR4N176Q	10023 und 10024
CXCR4S178A	10025 und 10026
CXCR4N11Q/N176Q	10449, 10450, 10023 und 10024
CCR5Y14N	10470 und 10471
CCR5N268Q	10338 und 10278
CCR5S270A	10279 und 10280
CCR5Y14N/N268Q	10470, 10471, 10338 und 10278

Die DNA-Sequenzierung und die Translation in die Aminosäuresequenz der CXCR4- und der CCR5-Mutanten zeigten die eingefügten Mutationen (siehe Abb. 7). Es wurden keine weiteren Abweichungen von der Aminosäuresequenz des CXCR4 (Acc.-Nr. P30991) in der Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) gefunden. Zusätzlich wurde eine weitere Mutation im Wild-Typ und in den hergestellten Mutanten des CCR5 gefunden. Der Vergleich mit der Sequenz des CCR5 (Acc.-Nr. P51681) zeigte in allen pcDNA3.CCR5-Molekülen einen Nucleotidaustausch, der zu einem Aminosäureaustausch an der Position 166 führte (F166L). Diese Mutation in der vierten Transmembranregion des CCR5 könnte ein natürlicher Polymorphismus des Rezeptors sein, da CCR5 in unterschiedlichen Polymorphismen vorkommt (Zhang *et al.*, 1997). Es ist nicht zu erwarten, dass diese Mutation die Eigenschaft des CCR5 verändert, da es sich sowohl bei Phenylalanin (F) als auch bei Leucin (L) um eine hydrophobe Aminosäure handelt.

A1	CXCR4	1	11	21	MEGISIYTS	NYTEEMGSGD	YDSMREPCFR	
	CXCR4WT				MEGISIYTS	NYTEEMGSGD	YDSMREPCFR	
	CXCR4N11Q				MEGISIYTS	QYTEEMGSGD	YDSMREPCFR	
	CXCR4T13A				MEGISIYTS	NYREEMGSGD	YDSMREPCFR	
	CXCR4N176Q				MEGISIYTS	NYTEEMGSGD	YDSMREPCFR	
	CXCR4S178A				MEGISIYTS	NYTEEMGSGD	YDSMREPCFR	
	CXCR4N11Q/N176Q				MEGISIYTS	QYTEEMGSGD	YDSMREPCFR	
A2	CXCR4	171	176	181	191	DFIFANVSEA	DDRYICDRFY	PMDLWVVVFQ
	CXCR4WT					DFIFANVSEA	DDRYICDRFY	PMDLWVVVFQ
	CXCR4N11Q					DFIFANVSEA	DDRYICDRFY	PMDLWVVVFQ
	CXCR4T13A					DFIFANVSEA	DDRYICDRFY	PMDLWVVVFQ
	CXCR4N176Q					DFIFANVSEA	DDRYICDRFY	PMDLWVVVFQ
	CXCR4S178A					DFIFANVSEA	DDRYICDRFY	PMDLWVVVFQ
	CXCR4N11Q/N176Q					DFIFANVSEA	DDRYICDRFY	PMDLWVVVFQ
B1	CCR5	1	14	21	MDYQVSSPIY	DINYYTSEPC	QRINVRQIAA	
	CCR5WT				MDYQVSSPIY	DINYYTSEPC	QRINVRQIAA	
	CCR5Y14N				MDYQVSSPIY	DINNYTSEPC	QRINVRQIAA	
	CCR5N268Q				MDYQVSSPIY	DINYYTSEPC	QRINVRQIAA	
	CCR5S270A				MDYQVSSPIY	DINYYTSEPC	QRINVRQIAA	
	CCR5Y14N/N268Q				MDYQVSSPIY	DINNYTSEPC	QRINVRQIAA	
B2	CCR5	261	268	271	281	QEFFGLNCS	SSNRLDQAMQ	VTETLGMTHCC
	CCR5WT					QEFFGLNCS	SSNRLDQAMQ	VTETLGMTHCC
	CCR5Y14N					QEFFGLNCS	SSNRLDQAMQ	VTETLGMTHCC
	CCR5N268Q					QEFFGLNCS	SSNRLDQAMQ	VTETLGMTHCC
	CCR5S270A					QEFFGLNCS	SSNRLDQAMQ	VTETLGMTHCC
	CCR5Y14N/N268Q					QEFFGLNCS	SSNRLDQAMQ	VTETLGMTHCC

Abb. 7: Aminosäuresequenz des CXCR4 und des CCR5 sowie deren Mutanten. Gezeigt ist ein Ausschnitt der Sequenz des Wild-Typs (WT) (A) des CXCR4 und (B) des CCR5 und deren Mutanten, im Vergleich mit der Originalsequenz des CXCR4 (Acc.-Nr. P30991) bzw. des CCR5 (Acc.-Nr. P51681). Dargestellt sind die Bereiche um die N-Glykosylierungssignale des CXCR4 an den Positionen (A1) 11-13 (NYT) und (A2) 176-178 (NVS) sowie des CCR5 an den Positionen (B1) 14 (NYT) und (B2) 268-270 (NCS). Die N-Glykosylierungssignale bzw. wichtige Bereiche sind grau unterlegt. Abweichungen sind hervorgehoben. Die Erläuterung der verwendeten Aminosäuresymbole befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

3.2 Herstellung der retroviralen Vektoren

Zur Transduktion der DNA der Corezeptoren CXCR4 und CCR5 sowie deren Mutanten (siehe 3.1) musste die DNA aus dem Vektor pcDNA3 in den retroviralen Vektor pBABE-puro (siehe 2.4.1.4) überführt werden.

Dazu wurde die DNA der CXCR4-Varianten durch eine Restriktionshydrolyse (siehe 2.9.1.4) mit dem Enzym *Eco* RI aus dem Vektor pcDNA3 isoliert (siehe 2.9.1.5 und 2.9.1.7). Zur Vorbereitung der Subklonierung wurde der Vektor pBABE-puro mit dem Enzym *Eco* RI geöffnet und die 5'-Phosphatgruppe der DNA entfernt (siehe 2.9.2.3), dadurch konnte eine Religation des Vektors verhindert werden. Anschließend wurde die isolierte DNA der CXCR4-Varianten in den Vektor pBABE-puro ligiert (siehe 2.9.2.4). Dann wurde die ligierte DNA in kompetente Bakterien transformiert und später aus den kultivierten Bakterien isoliert (siehe 2.10.2.3 und 2.9.1.1).

Die DNA der pcDNA3.CCR5-Varianten wurde mit dem Enzym *Xba* I hydrolytisch gespalten und die 5'-Überhänge der DNA aufgefüllt (siehe 2.9.2.2), wodurch die DNA glatte Enden erhielt. Nachfolgend wurde die DNA mit dem Enzym *Bam* HI hydrolysiert und das entstandene DNA-Fragment aus dem Vektor pcDNA3 isoliert. Für die Subklonierung wurde der Vektor pBABE-puro mit dem Enzym *Sal* I geöffnet und die DNA durch das Auffüllen der 5'-Überhänge geglättet. Nachfolgend wurde der Vektor mit dem Enzym *Bam* HI hydrolysiert und gereinigt (siehe 2.9.1.9). Durch diese Vorgehensweise entstand ein Vektor, der am 3'-Ende eine offene *Bam* HI-Schnittstelle und am 5'-Ende ein glattes Ende besaß. Die isolierten DNA-Fragmente der CCR5-Varianten besaßen dazu komplementäre Enden und wurden in den vorbereiteten Vektor pBABE-puro ligiert. Anschließend wurden die Vektorkonstrukte in kompetente Bakterien transformiert und später isoliert.

Die Restriktionshydrolyse der hergestellten Vektoren mit den Enzymen *Bam* HI und *Bst* XI sollte im Falle einer erfolgreichen Subklonierung der CCR5-Varianten ein DNA-Fragment von etwa 1260 bp ergeben. Die Hydrolyse der pBABE-puro.CXCR4-Varianten sollte im Falle einer erfolgreichen Subklonierung zu Fragmenten mit etwa 580 bp und 910 bp führen. Die Abbildung 8 zeigt das Ergebnis der Subklonierung.

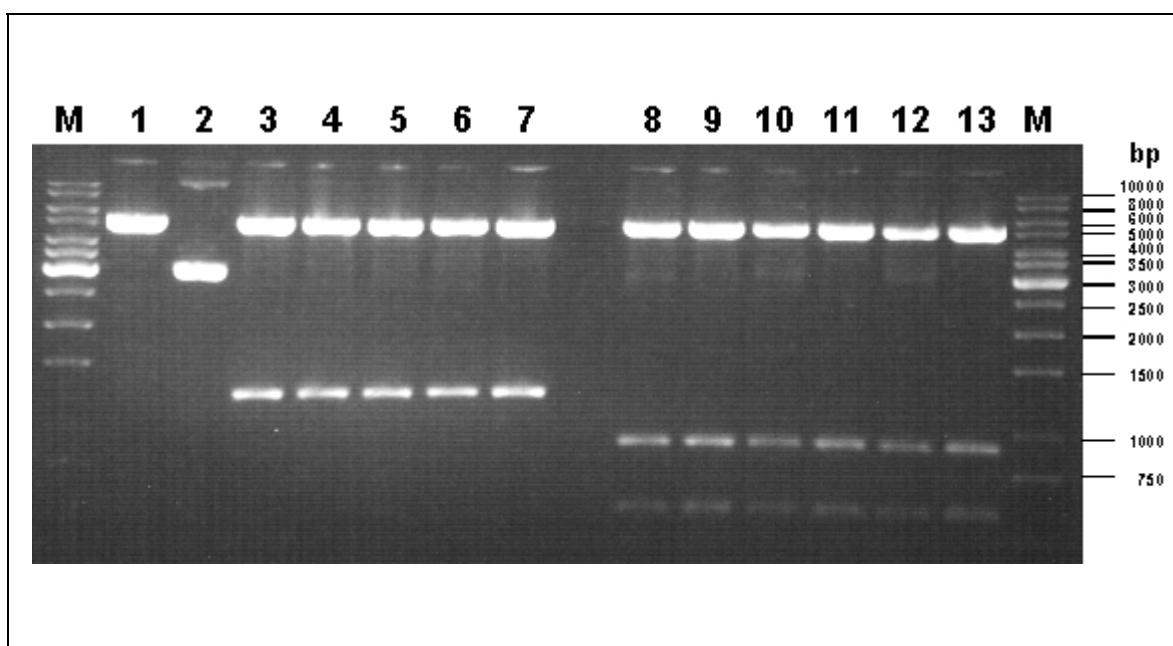


Abb. 8: Agarose-Gelelektrophorese (0,8 % w/v) der retroviralen Vektoren pBABE-puro.CXCR4 und pBABE-puro.CCR5 sowie deren Mutanten. Die Vektoren wurden mit den Restriktionsendonucleasen *Bam* HI und *Bst* XI hydrolysiert. **Bahn M:** Molekulargewichtstandard, 1 kb; **Bahn 1:** pBABE-puro; **Bahn 2:** pBABE-puro, ohne Enzym; **Bahn 3:** CCR5WT; **Bahn 4:** CCR5Y14N; **Bahn 5:** CCR5N268Q; **Bahn 6:** CCR5S270A; **Bahn 7:** CCR5Y14N/N268Q; **Bahn 8:** CXCR4WT; **Bahn 9:** CXCR4N11Q; **Bahn 10:** CXCR4T13A; **Bahn 11:** CXCR4N176Q; **Bahn 12:** CXCR4S178A; **Bahn 13:** CXCR4N11Q/N176Q.

Sämtliche Corezeptorvarianten wurden erfolgreich in den Vektor pBABE-puro ligiert. Zur weiteren Kontrolle der hergestellten Vektoren wurden die DNA der Corezeptoren erneut sequenziert (siehe 2.9.1.14). Für die DNA-Sequenzierung der pBABE-puro.CXCR4-Varianten wurden die Oligonucleotide 10900-20, 10218, 10219, 10220, 10900-17 und 10900-26 verwendet (siehe 2.4.2). Für die Sequenzierung der pBABE-puro.CCR5-Varianten wurden die Oligonucleotide 10900-20, 10221, 10343, 10900-18, 10900-19 und 10900-26 verwendet. Die DNA-Sequenz der Corezeptoren zeigte erneut die in Kapitel 3.1 festgestellten Mutationen, weitere Mutationen wurden nicht beobachtet (Ergebnis nicht gezeigt).

Die hergestellten Vektoren pBABE-puro.CXCR4WT und pBABE-puro.CCR5WT sowie deren Mutanten standen für die Herstellung retroviraler Helferviren und der Transduktion der Gene der Corezeptoren in geeignete Zielzellen zur Verfügung.

3.3 Stabile Expression der Corezeptoren

Die hergestellten retroviralen Vektoren des Wild-Typs des CXCR4 und des CCR5 sowie deren Mutanten (siehe 3.2) wurden in amphotrope Verpackungszellen (Phoenix™) transfiziert (siehe 2.11.3). Dies diente der Herstellung retroviralen Helferviren (siehe 2.10.1.4), mit denen das Gen der hergestellten Corezeptorvarianten in geeignete Zielzellen transduziert wurde (siehe 2.11.5). Als Zielzellen wurden GHOST- und U87-Zellen verwendet, die den HIV-Rezeptor CD4 konstitutiv exprimieren (siehe 2.11.1).

Die Expression der transduzierten Corezeptorvarianten auf der Oberfläche der Zielzellen wurde cytometrisch durch eine FACScan-Analyse überprüft (siehe 2.12.6). Für den Nachweis der Expression der Corezeptoren wurden die Phycoerythrin-markierten monoklonalen Antikörper 12G5 (CXCR4) und 2D7 (CCR5) verwendet (siehe 2.5). Diese Antikörper erkennen konformative Epitope innerhalb der extrazellulären Domänen der Corezeptoren (Endres *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997).

Der Vergleich der Expression der CXCR4-Mutanten mit dem Wild-Typ auf der Zelloberfläche von stabil transduzierten GHOST-Zellen zeigte, dass die hergestellten CXCR4-Varianten exprimiert wurden (siehe Abb. 9A). Die Mutanten, bei denen die N-terminale N-Glykosylierung eliminiert wurde (N11Q, T13A und N11Q/N176Q), zeigten eine leicht verminderte Expression (76 %, 80 %, bzw. 85 %) im Vergleich zum Wild-Typ. Die einzelne Eliminierung der N-Glykosylierung im ECL2 des CXCR4 (N176Q, S178A) hatte keinen negativen Einfluss auf die Expression (104 %, 97 %).

Die Expression der CXCR4-Varianten in stabil transduzierten U87-Zellen war dagegen uneinheitlich (siehe Abb. 9B). Die Mutanten CXCR4N11Q, -T13A und die Doppelmutante CXCR4N11Q/N176Q wurden im Vergleich zum CXCR4WT deutlich geringer exprimiert (49 %, 66 %, bzw. 16 %). Die einzelne Eliminierung des N-Glykans im ECL2 hatte auch in den transduzierten U87-Zellen wenig Einfluss auf die Expression (N176Q, 86 %, bzw. S178A, 116 %).

Die Expression der CCR5-Mutanten in stabil transduzierten GHOST-Zellen wich kaum von der des Wild-Typs ab (siehe Abb. 10A; 100 % bis 117 %). Die Expression

der CCR5-Mutanten in U87-Zellen differierte jedoch im Vergleich zum Wild-Typ-Molekül (siehe Abb. 10B). CCR5N268Q erreichte lediglich 64 %, während die Mutante CCR5S270A 106 % der Expression des Wild-Typs zeigte. Die Doppelmutante CCR5Y14N/N268Q erreichte hingegen 158 % der Expression des CCR5WT. Das Einfügen einer zusätzlichen *N*-Glykosylierungsstelle in den *N*-Terminus des CCR5 (Y14N) veränderte die Zelloberflächenexpression des Corezeptors nicht (109 %).

Die Daten zeigten, dass die Expression der Corezeptormutanten in den transduzierten GHOST-Zellen generell vergleichbar mit der der Wild-Typ-Moleküle war. Die Expression der Mutanten des CXCR4 und des CCR5 in den transduzierten U87-Zellen wich zum Teil deutlich von der der Wild-Typen ab. Aus diesem Grund wurde in einigen Versuchen auf die Verwendung der U87-Zellen verzichtet.

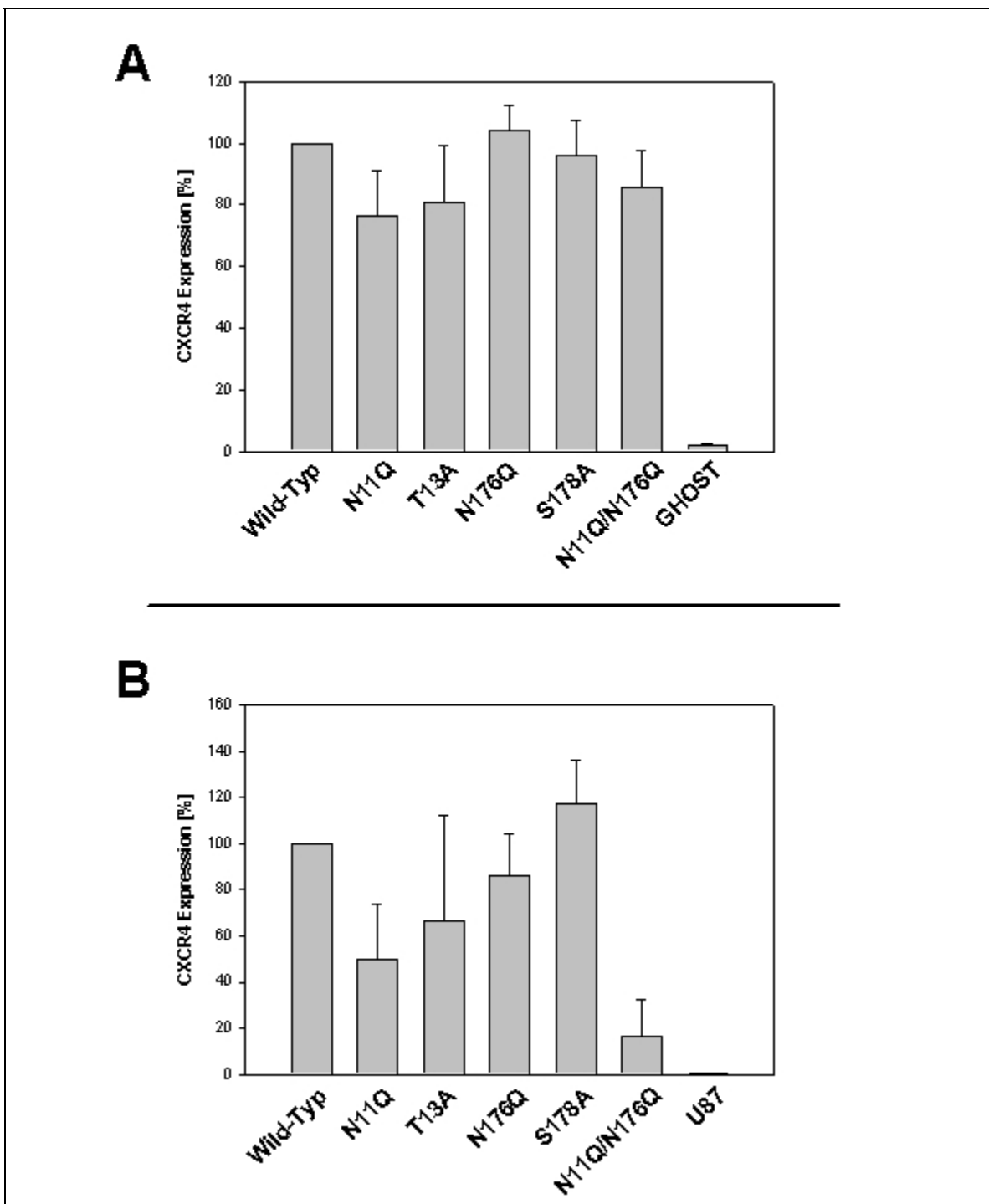


Abb. 9: Vergleich der Expression des CXCR4 und dessen Mutanten. Die Expression des Wild-Typs (WT) des CXCR4 und dessen Mutanten auf der Zelloberfläche stabil transduzierter **(A)** GHOST-Zellen und **(B)** U87-Zellen wurde cytometrisch mit einem FACScan untersucht. Zum Nachweis wurde der Phycoerythrin-markierte Antikörper 12G5 verwendet. Die gezeigten Daten basieren auf vier unabhängig voneinander durchgeführten Analysen, die im Abstand von 4-5 Wochen erfolgten. Die gemittelte Fluoreszenzaktivität des CXCR4WT wurde gleich 100 % gesetzt. Als Kontrolle dienen nicht-transduzierte GHOST- bzw. U87-Zellen.

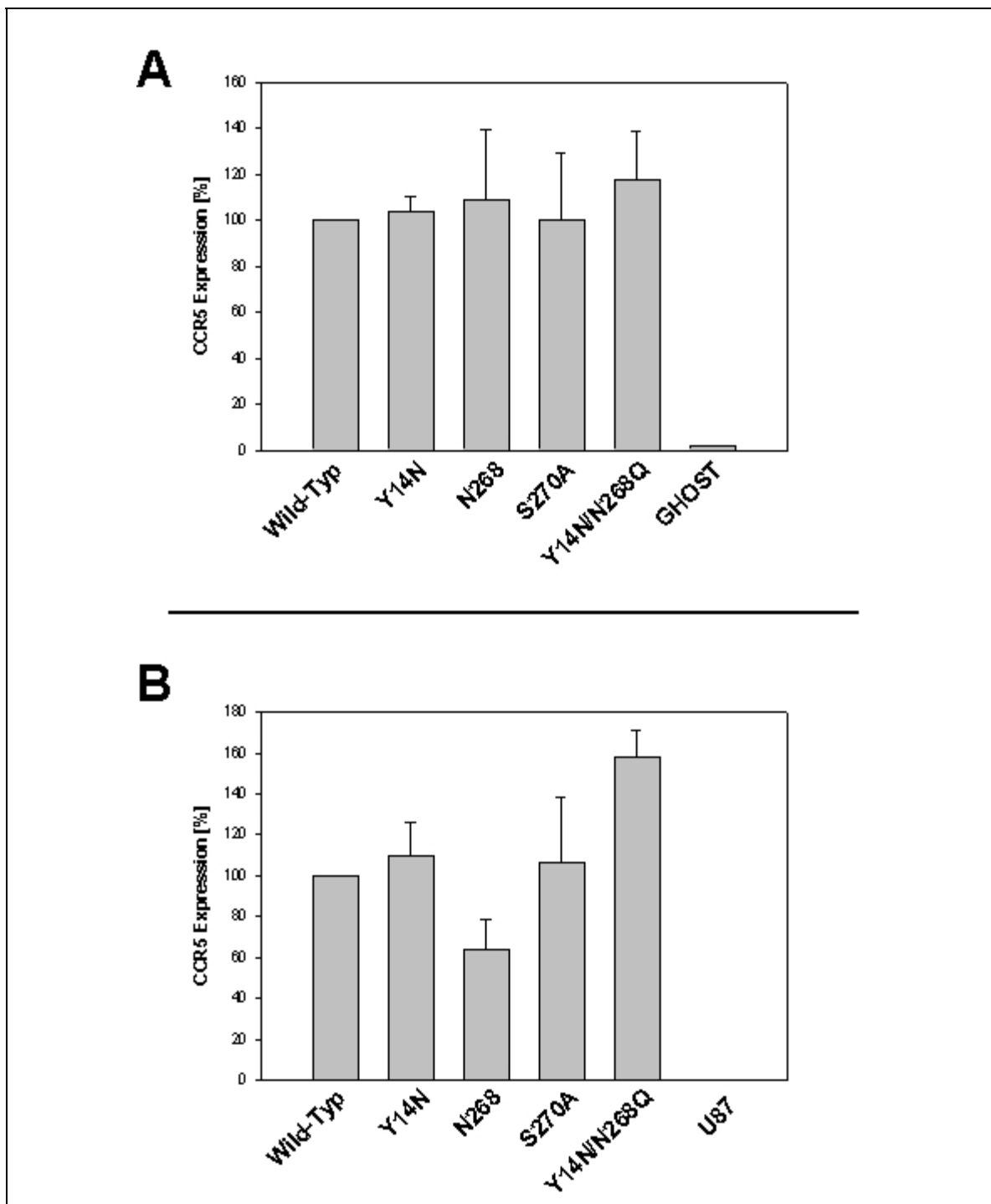


Abb. 10 : Vergleich der Expression des CCR5 und dessen Mutanten. Die Expression des Wild-Typs (WT) des CCR5 und dessen Mutanten auf der Zelloberfläche stabil transduzierter **(A)** GHOST-Zellen und **(B)** U87-Zellen wurde cytometrisch mit einem FACScan untersucht. Zum Nachweis wurde der Phycoerythrin-markierte Antikörper 2D7 verwendet. Die gezeigten Daten basieren auf vier unabhängig voneinander durchgeführten Analysen, die im Abstand von 4-5 Wochen erfolgten. Die gemittelte Fluoreszenzaktivität des CCR5WT wurde gleich 100 % gesetzt. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte GHOST- bzw. U87-Zellen.

3.4 Rezeptoraktivität der CXCR4- und CCR5-Mutanten

Die Funktionalität der Chemokinrezeptoren lässt sich durch die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach der Bindung der Liganden SDF-1 α (CXCR4) und MIP-1 β (CCR5) überprüfen. Die Versuche wurden von Markus Voßmann (Hamburg) in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Hubertus Köller an der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die hergestellten GHOST-Zellen (siehe 3.3) zeigten nach der Zugabe der Chemokine SDF-1 α bzw. MIP-1 β keine Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (siehe Abb. 11). Die Aktivierung durch ATP führte dagegen zu einem deutlichen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in allen getesteten Zellen. ATP aktiviert über einen ATP-bindenden Rezeptor eine andere intrazelluläre Signalkaskade, die zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium führt. Die Rezeptoraktivität in transduzierten U87-Zellen wurde nicht untersucht, da die Expression der Rezeptoren in diesen Zellen uneinheitlich war (siehe Abb. 9B und 10B).

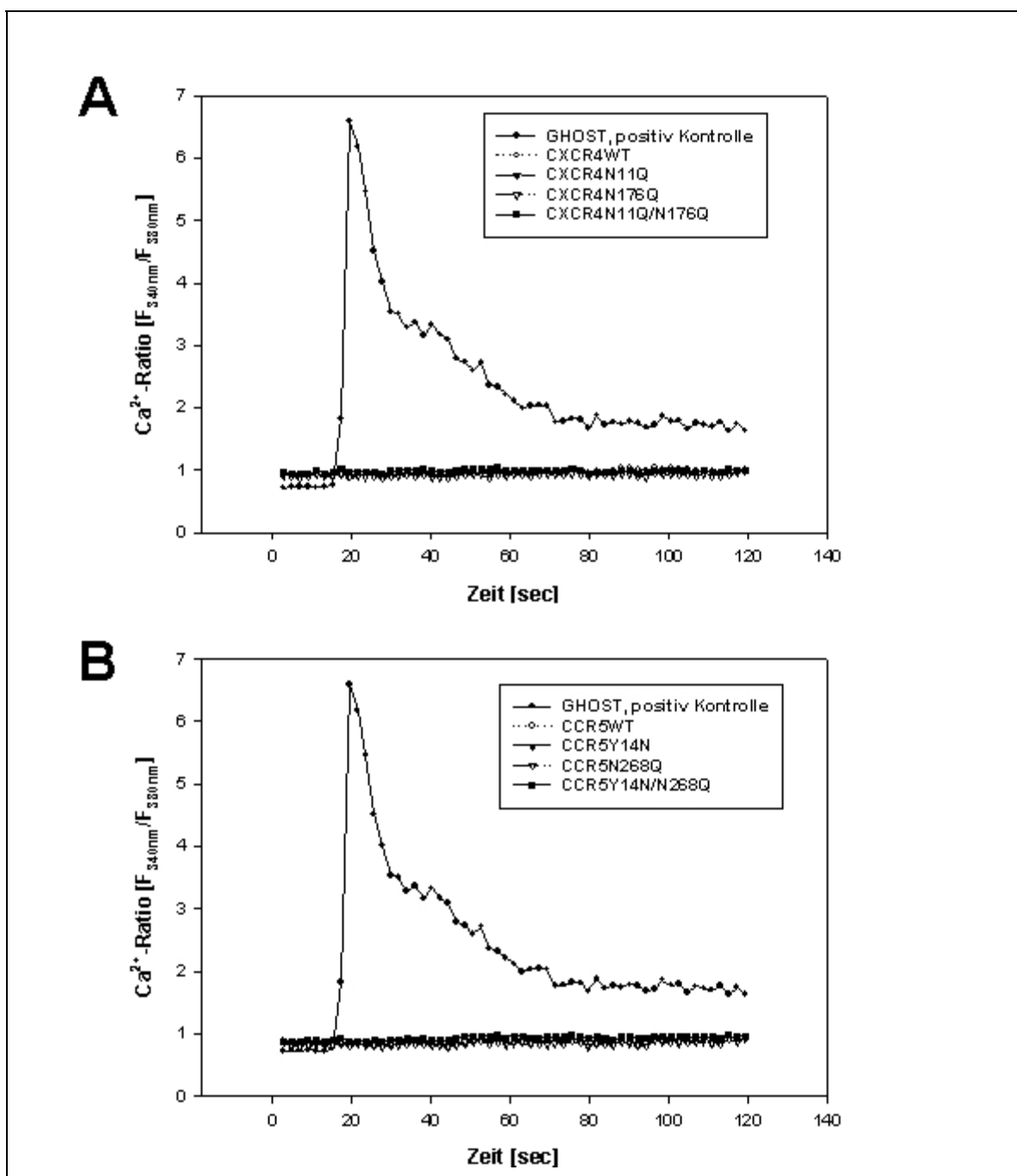


Abb. 11: Analyse der Rezeptoraktivität der Chemokinrezeptoren **(A)** CXCR4 und **(B)** CCR5 sowie deren Mutanten. Die Funktionalität des Wild-Typs (WT) des CXCR4 und des CCR5 und deren Mutanten wurde durch die Aktivierung mit den Liganden SDF-1 α (CXCR4) und MIP-1 β (CCR5) überprüft. Für die Messung wurden stabil transduzierte GHOST-Zellen verwendet. Die Zellen wurden 1 h mit Fura-2AM (5 μ M) inkubiert. Nachfolgend wurden 100 ng/ml SDF-1 α bzw. MIP-1 β zugegeben und der Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration anhand des Quotienten der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 340 nm und 380 nm bestimmt (CCD Kamera System, Merlin, Chromaphore, Duisburg). Als positive Kontrolle wurden nicht-transduzierte GHOST-Zellen mit 1 mM ATP aktiviert (Köller *et al.*, 2001).

3.5 Herstellung rekombinanter Viren

Zur Untersuchung des Einflusses der *N*-Glykosylierung der Corezeptoren auf die Infektion mit HIV-1 sollte die Replikationseigenschaft rekombinant hergestellter Viruschimären analysiert werden. Dafür sollten neben den bereits beschriebenen Viren (siehe 2.4.1.3) weitere rekombinante Viren hergestellt werden, deren V3-Region aus Patienten stammt, und die sich auf natürliche Weise in der *N*-Glykosylierung der V3-Schleife unterscheiden.

3.5.1 Isolierung der V3-Region des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1 aus infizierten Patienten

Aus 280 µl des Serums und des *Liquor cerebrospinalis* verschiedener HIV-1 infizierter Patienten (siehe 2.4.1.3) wurde die virale RNA isoliert (siehe 2.9.1.2) und der V3-Bereich mittels einer RT-PCR (siehe 2.9.1.12) amplifiziert. Für die RT-PCR wurden die Oligonucleotide 09400 und 09401 verwendet (siehe 2.4.2). Nach der Reinigung der RT-PCR-Produkte (siehe 2.9.1.7) wurde eine *nested*-PCR (siehe 2.9.1.13) durchgeführt, um die Ausbeute an viraler cDNA zu erhöhen. Für die *nested*-PCR wurden die Oligonucleotide 09403 und 09404 verwendet.

Die gereinigten PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM[®]-T kloniert (siehe 2.9.2.4). Danach wurde die Vektor-DNA aus den Klonen transformierter Bakterien isoliert (siehe 2.9.1.1) und mit den Oligonucleotiden 09594 und 09819 sequenziert (siehe 2.9.1.14). Insgesamt wurden je zwei Serum- und zwei Liquorproben aus drei Patienten untersucht und ca. 300 V3-Sequenzen analysiert. Es wurde lediglich in einer Sequenz (PI-736) ein Nucleotidaustausch gefunden, der zur Eliminierung des g15-Zuckers innerhalb der V3-Schleife führte (siehe Abb. 12).

klonierter V3-Bereich

	g13	g14	g15	g16	g17	g18
Consensus B	EEVVRSENEFDNAKTIIVQLNESEVEMCTRFNNTRKSIHIGFGRFYTTIGLDIRQARGNISRAKWNNTLKQIVKRLREQFGNNKTIIVFNQSSG					
PI-757	-----MN-----	---T-I---T-V---V-----L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-755	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-754	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-752	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-732	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-739	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-738	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-736	-----MN-----	---T-I---T-V---D-----L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-724	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-R---T-----E-----K-QP---				
PI-722	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-R---T-----E-----K-QP---				
PI-721	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-R---T-----E-----K-QP---				
PI-718	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-716	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-R---T-----E-----K-QP---				
PI-714	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-713	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-710	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				
PI-77	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-R---T-----E-----K-QP---				
PI-72	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-R---T-----E-----K-QP---				
PI-71	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--TA-G---T-----E-----K-QP---				
PI-726	-----MN-----	---T-I---T-V---L-----N-----L-SEQ--T-G---T-----E-----K-QP---				

Abb. 12: Vergleich der Aminosäuresequenz unterschiedlicher V3-Regionen des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1. Die virale RNA wurde aus dem Serum eines HIV-1 infizierten Patienten isoliert und mit einer RT-PCR und einer nachfolgenden *nested*-PCR amplifiziert. Danach wurden die entstandenen PCR-Produkte in den Vektor pGEM-T[®] kloniert und die DNA sequenziert. Exemplarisch ist der Vergleich der V3-Region verschiedener HIV-1-Spezies eines Patienten, mit der Consensussequenz des HIV-1 Subtyps B (*Los Alamos National Laboratory, HIV Data Base*) gezeigt. Die *N*-Glykosylierungsstellen (g13 bis g18) sind hervorgehoben. Die Sequenz der V3-Schleife ist grau unterlegt. Dargestellt ist ebenfalls der später in den viralen Vektor pNL4-3*env* klonierte V3-Bereich der Patientenisolat (PI)-736 und PI-718 (hervorgehoben). Identische Aminosäuren sind durch Striche (-) dargestellt. Die Erläuterung der verwendeten Abkürzungen befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

3.5.2 Herstellung viraler Vektoren

Die V3-Region des PI-736 (g15 fehlt) und die des PI-718 (g15 vorhanden; siehe Abb. 12) im Vektor pGEM-T[®] (siehe 3.5.1) wurde mit den Oligonucleotiden 10900-21 und 10900-22 amplifiziert. Durch die Verwendung dieser Oligonucleotide wurde am 5'-Ende der PCR-Produkte die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bgl* II und am 3'-Ende für *Nhe* I eingefügt. Die PCR-Produkte wurden gereinigt (siehe 2.9.1.7), mit den Enzymen *Bgl* II sowie *Nhe* I hydrolysiert (siehe 2.9.1.4) und erneut von Proteinverunreinigungen befreit. Die präparierte V3-Region der Patientenisolate besteht aus etwa 220 bp (siehe Abb. 13). Nun konnten die DNA-Fragmente der V3-Region in den mit *Bgl* II und *Nhe* I geöffneten Vektor pUCΔV3 (siehe 2.4.1.1) kloniert werden (siehe 2.9.2.4). Nach der Isolierung der Vektoren aus transformierten Bakterien wurden die Vektoren mit den Enzymen *BstE* II und *Bam* HI hydrolysiert, die entstandenen rekombinanten *env*-Fragmente isoliert (siehe 2.9.1.7; Abb. 13) und in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor pNL4-3Δ*env* kloniert. Das Vorgehen bei der Herstellung rekombinanter Vektoren ist in Abbildung 5 des Kapitels 2.4.1.3 dargestellt.

Nach der Isolierung der Vektor-DNA aus transformierten Bakterien wurde die 5'- und 3'-Region der klonierten rekombinanten *env*-Gene sequenziert (siehe 2.9.1.14). Für die DNA-Sequenzierung wurden die Oligonucleotide 08724 und 08694 verwendet (siehe 2.4.2). Die Sequenzierung der klonierten V3-Regionen erfolgte mit den Oligonucleotiden 09402 und 09401. Das Ergebnis der DNA-Sequenzierung der hergestellten viralen Vektoren pNL-736 und pNL-718 bestätigte den Erfolg der Klonierung (Daten nicht gezeigt).

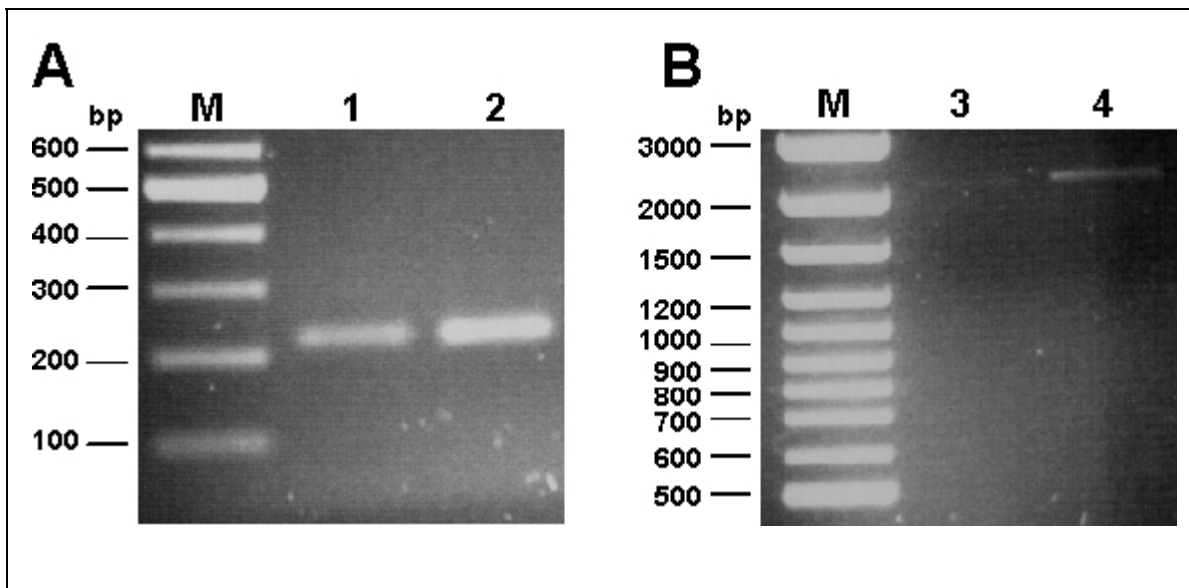


Abb. 13: Agarose-Gelelektrophorese (1 % w/v) der präparierten DNA der **(A)** V3-Region und der **(B)** rekombinanten *env*-Fragmente des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1. Aus dem Serum eines HIV-1 infizierten Patienten wurde die virale RNA isoliert und die V3-Region der Viren mittels einer RT-PCR und einer nachfolgenden *nested*-PCR amplifiziert. Danach wurde die DNA der V3-Region in den Vektor pGEM-T[®] kloniert. Nach einer erneuten PCR der klonierten V3-Region der HIV-1 Patienten isolate (PI)-736 und -718 wurden die PCR-Produkte in den Vektor pUC18ΔV3 überführt. Dieser Vektor beinhaltet einen großen Teil des *env*-Gens des HIV-1 Stamms NL4-3, das durch die V3-Region der Patienten isolate weitgehend vervollständigt wurde. Durch eine Restriktionshydrolyse wurden die rekombinanten *env*-Fragmente aus dem Vektor gelöst und nachfolgend gereinigt. **Bahn M:** Molekulargewichtstandard, 100 bp bzw. 1 kb; **Bahn 1:** V3-Region des PI-736; **Bahn 2:** V3-Region des PI-718; **Bahn 3:** rekombinantes *env*-Fragment des NL-736; **Bahn 4:** rekombinantes *env*-Fragment des NL-718.

3.5.3 Charakterisierung des Zelltropismus der rekombinanten Viren NL-718 und NL-736

Die rekombinant hergestellten Vektoren pNL-718 und pNL-736 (siehe 3.5.2) wurden zur Kultivierung der Viren in HelaP4-Zellen transfiziert (siehe 2.10.1.1). Zur Charakterisierung des Zelltropismus der Viren NL-736 und NL-718 wurden GHOST- und U87-Indikatorzellen mit den Viren infiziert (siehe 2.10.1.2). Die Abbildung 14 macht deutlich, dass es sich bei den rekombinanten Viren NL-718 und NL-736 um R5X4-dualtrophe Viren handelt. Auffallend ist die relativ hohe Konzentration der Viren (75 ng p24-Antigen/ml), die nach zehn Tagen zu einer deutlichen Infektion der Indikatorzellen geführt hatte.

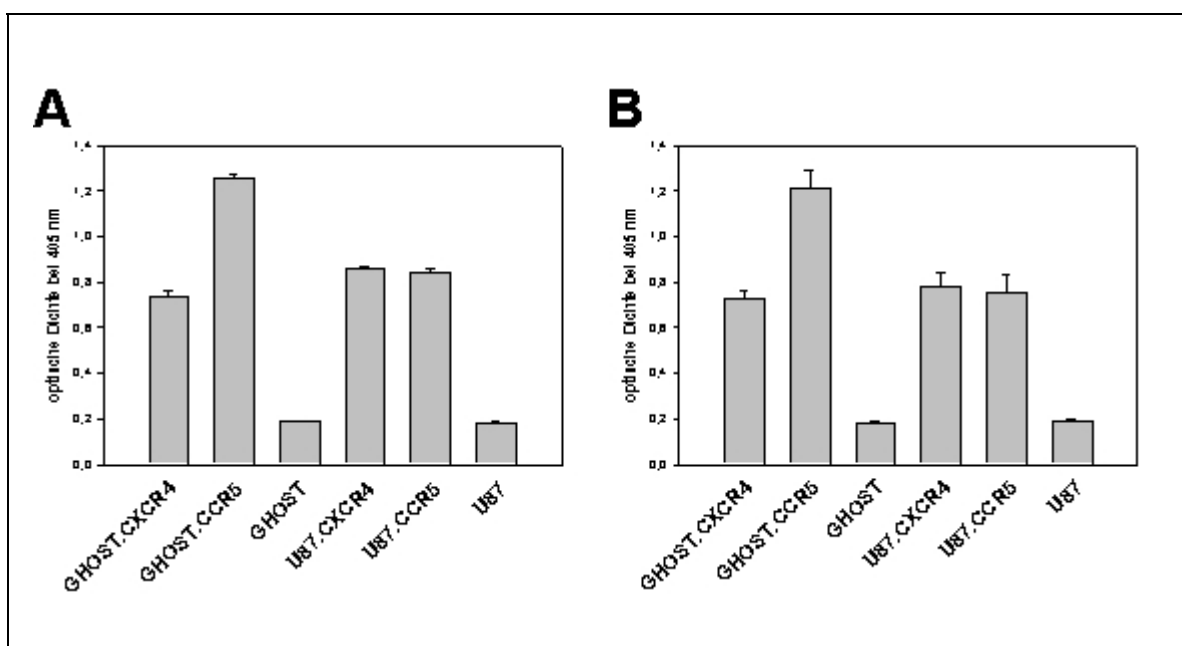


Abb. 14: Charakterisierung des Zelltropismus der rekombinanten Viren (A) NL-718 und (B) NL-736. Der V3-Bereich des HIV-Patientenisolats PI-736 wurde in den viralen Vektor pNL4-3Δenv kloniert. Zur Charakterisierung des Zelltropismus der Viren wurden GHOST- und U87-Indikatorzellen mit NL-718 bzw. NL-736 infiziert (je 75 ng p24-Antigen/ml) und die Zellen zehn Tage inkubiert. Die Menge an produzierten Viren im Zellkulturüberstand wurde mit einem p24-Antigen ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt.

3.6 Replikationskinetiken rekombinanter Viren in Corezeptor-exprimierenden Zellen

Für die Untersuchung des Einflusses der *N*-Glykosylierung der Corezeptoren CXCR4 und CCR5 auf die Infektion mit HIV-1 wurden Zellen, die unterschiedliche Varianten der Corezeptoren exprimierten, mit verschiedenen Viruschimären des Stamms HIV-1_{NL4-3} infiziert.

Die Viren (siehe 2.4.1.3 und 3.5.3) wurden in HelaP4-Zellen kultiviert (siehe 2.10.1.1), und die Menge an produzierten Viren im Kulturüberstand der Zellen bestimmt (siehe 2.10.1.3). Nachfolgend wurden GHOST- und U87-Zellen (siehe 3.6.1 und 3.6.2), die stabil mit einzelnen Varianten der Corezeptoren transduziert waren (siehe 3.3), mit den rekombinanten Viren infiziert und die Replikation der Viren in regelmäßigen Abständen dokumentiert (siehe 2.10.1.2).

3.6.1 Einfluss der *N*-Glykosylierung des CXCR4 auf die Replikationskinetik rekombinanter Viren

Die X4 Viren NL4-3 und NL4-3_(-g14,-g15) zeigten nach sechs bzw. vier Tagen eine deutliche Replikation in CXCR4⁺-GHOST-Zellen (siehe Abb. 15). Dabei unterschied sich die Replikationskinetik der Viren in den transduzierten Zellen kaum voneinander. GHOST-Zellen, die nicht mit einer der CXCR4-Varianten transduziert worden waren, wurden nicht von den verwendeten Viren infiziert. Die unterschiedliche Glykosylierung der Viren und der Corezeptoren führte nicht zu einer veränderten Replikation der Viren in den transduzierten Zellen.

Die R5X4 Viruschimäre NL-952 und die nicht-glykosylierte CXCR4-trope Variante NL-952_(-g13,-g14,-g15,-g17) infizierten dagegen die Varianten der CXCR4⁺-GHOST-Zellen mit unterschiedlichen Kinetiken (siehe Abb. 16). Die GHOST-Zellen, die *N*-terminal nicht-glykosylierten CXCR4 exprimierten (N11Q, T13A und N11Q/N176Q), wurden interessanterweise früher infiziert. Die Viren replizierten sich daher bereits am zweiten Tag nach der Infektion. Das Fehlen des *N*-Glykans im ECL2 beeinflusste die Infektion der Zellen mit den Viren nicht. Auch in diesem Versuch hatte das Fehlen des Zuckers

g15 in der V3-Schleife keinen Einfluss auf die Infektion der Zellen, die unterschiedlich glykosylierten CXCR4 exprimierten.

Erwartungsgemäß waren die R5 Viren NL-991 und die an Position g15 nicht-glykosylierte Variante NL-991_(-g15) nicht in der Lage, CXCR4⁺-GHOST-Zellen zu infizieren (siehe Abb. 17). Auch eine höhere Viruskonzentration (25 ng/ml) führte zu keiner Infektion der Zellen (Daten nicht gezeigt).

Mit Ausnahme des CXCR4N11Q/N176Q wurden die CXCR4⁺-U87-Zellen mit den Viren NL4-3 und NL4-3_(-g14,-g15) gleichermaßen gut infiziert (siehe Abb. 18). Das Fehlen des Zuckers g15 in der V3-Schleife hatte auch hier keine Bedeutung für die Infektion der Zellen oder für die Replikation der Viren. Bemerkenswert war jedoch, dass die Mutante CXCR4N11Q/N176Q nicht als Corezeptor genutzt werden konnte. Verglichen mit CXCR4WT wurde diese Mutante im geringen Maße exprimiert (16 %). Diese geringe Expression der Mutante CXCR4N11Q/N176Q verhinderte vermutlich die Infektion der Zellen.

Das Virus NL-952 und die nicht-glykosylierte Variante NL-952_(-g13,-g14,-g15,-g17) zeigten eine deutliche Infektion der Zellen und die gleichen Replikationskinetiken in den CXCR4⁺-U87-Zellen (siehe Abb. 19). Auch diese Viren konnten CXCR4N11Q/N176Q nicht als Corezeptor nutzen. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass diese Viren in den CXCR4⁺-U87-Zellen, die den *N*-terminal nicht-glykosylierten Corezeptor exprimierten, die gleichen Replikationskinetiken besaßen, wie in den Zellen, die den Wild-Typ exprimierten. Die unterschiedliche Glykosylierung des Corezeptor hatte hier, anders als in den GHOST-Zellen (siehe Abb. 16), keinen Einfluss auf die Infektion.

Das CCR5-trope Virus NL-991 war nicht in der Lage, sich in CXCR4⁺-U87-Zellen zu replizieren (siehe Abb. 20A). Weder die Eliminierung der potentiellen *N*-Glykosylierungsstelle im ECL3, noch das Einfügen einer solchen in den *N*-Terminus des Proteins ermöglichte eine Infektion der Zellen. Dies galt auch für die nicht-glykosylierte Virusvariante NL-991_(-g15) (siehe Abb. 20B).

Die Ergebnisse zeigten, dass die *N*-Glykosylierungsstelle im ECL2 des CXCR4 keinen Einfluss auf die Infektion von GHOST- und U87-Zellen hatte. Die Eliminierung der

N-terminalen Glykosylierung führte dagegen zu einer deutlichen Steigerung der Infektion von GHOST-Zellen durch ein R5X4 Virus. Diese Steigerung der Infektion konnte in infizierten U87-Zellen nicht beobachtet werden.

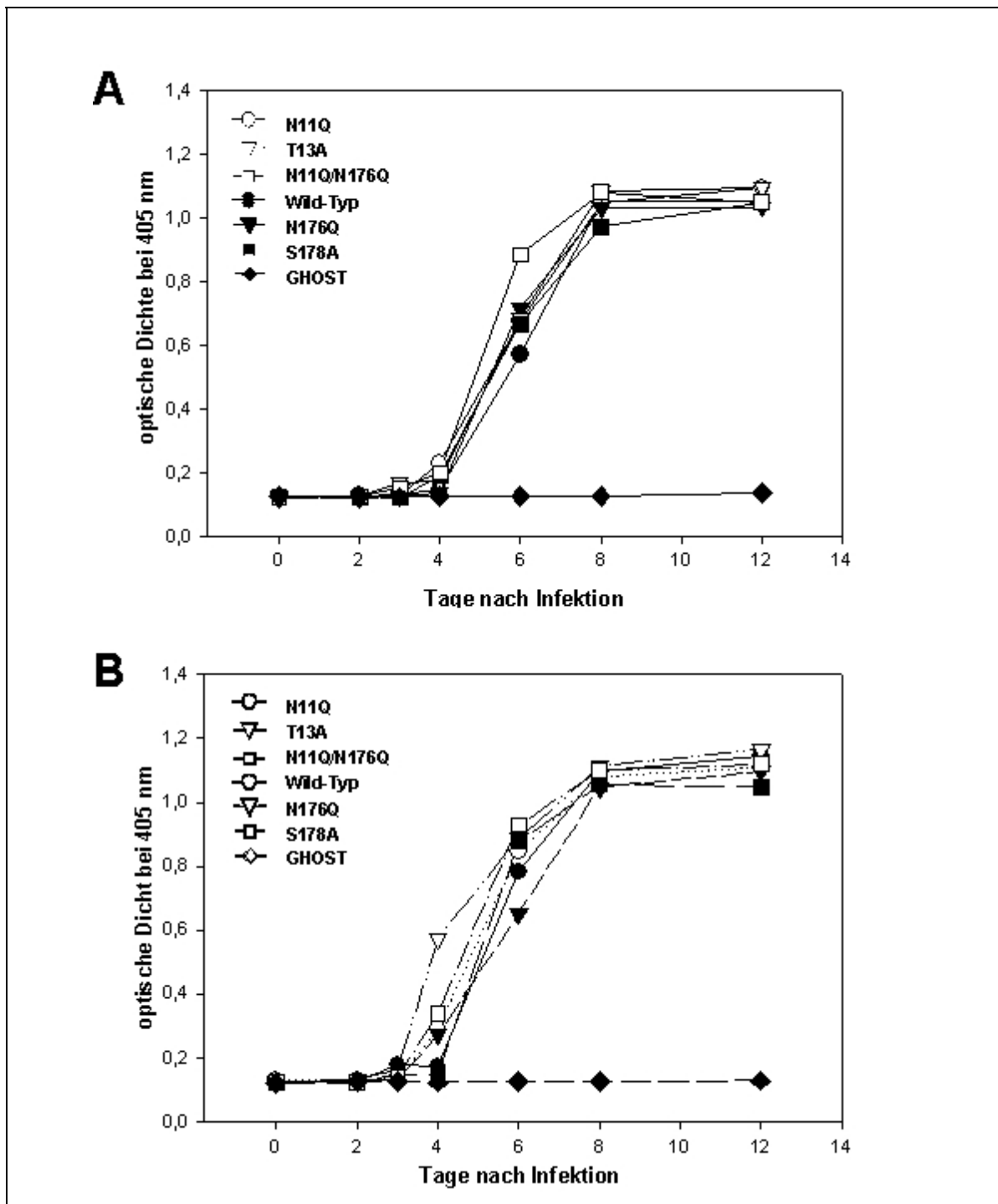


Abb. 15: Replikationskinetik der Viren (A) NL4-3 und (B) NL4-3_(-g14,-g15) in CXCR4 exprimierenden GHOST-Zellen. GHOST-Zellen (3×10^3 Zellen) wurden stabil mit dem Wild-Typ oder mit Mutanten des CXCR4 transduziert und mit den Viren infiziert (je 0,25 ng p24-Antigen/ml). Die produzierte Virusmenge wurde in regelmäßigen Abständen durch einen p24-Antigen-ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte GHOST-Zellen verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen.

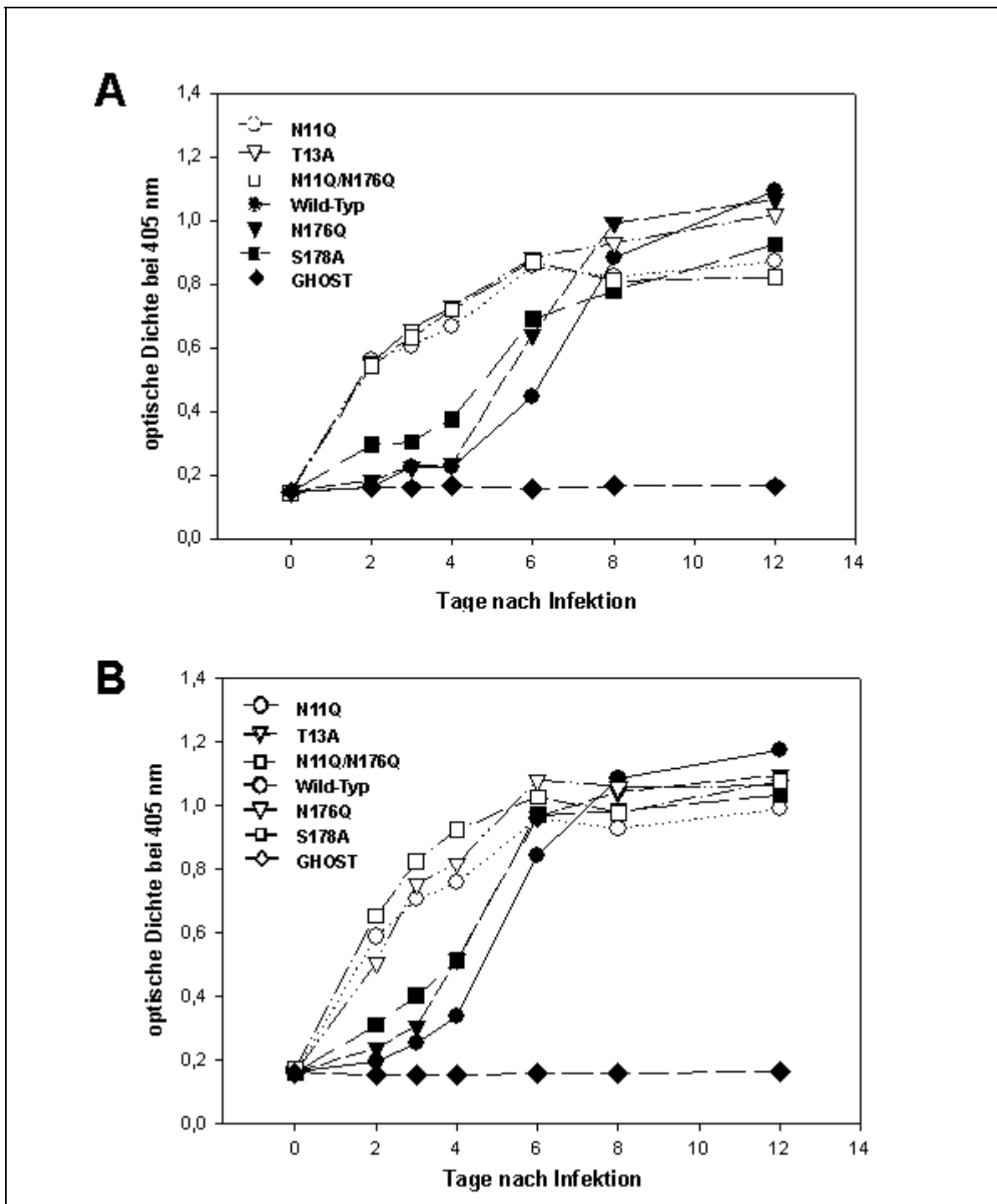


Abb. 16: Replikationskinetik der Viren (A) NL-952 und (B) NL-952_(-g13,-g14,-g15,-g17) in CXCR4 exprimierenden GHOST-Zellen. GHOST-Zellen (3×10^3 Zellen) wurden stabil mit dem Wild-Typ oder mit Mutanten des CXCR4 transduziert und mit den Viren infiziert (je 2,5 ng p24-Antigen/ml). Die produzierte Virusmenge wurde in regelmäßigen Abständen durch einen p24-Antigen-ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte GHOST-Zellen verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen.

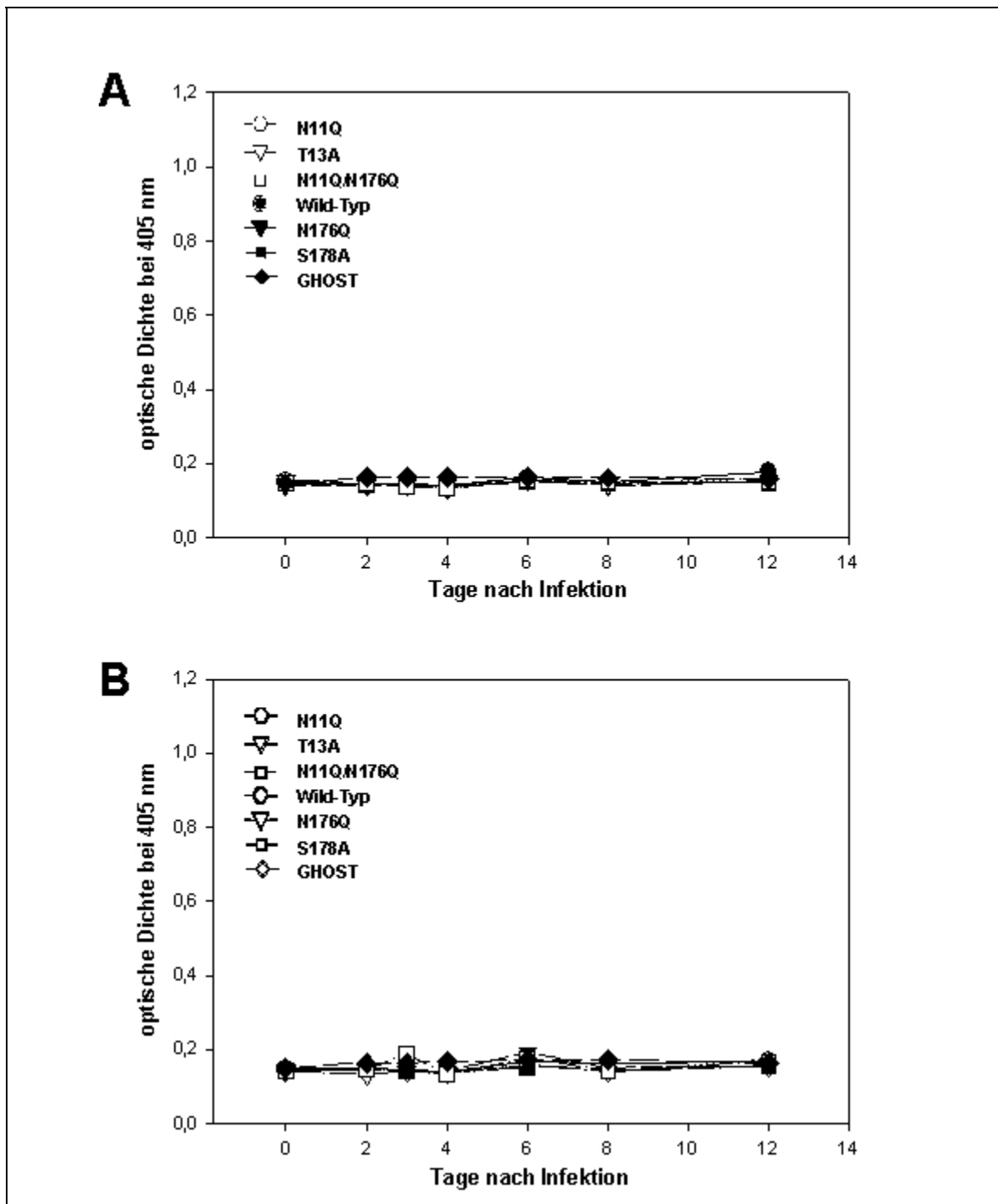


Abb. 17: Replikationskinetik der Viren (A) NL-991 und (B) NL-991_(g15) in CXCR4 exprimierenden GHOST-Zellen. GHOST-Zellen (3×10^3 Zellen) wurden stabil mit dem Wild-Typ oder mit Mutanten des CXCR4 transduziert und mit den Viren infiziert (je 2,5 ng p24-Antigen/ml). Die produzierte Virusmenge wurde in regelmäßigen Abständen durch einen p24-Antigen-ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte GHOST-Zellen verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen.

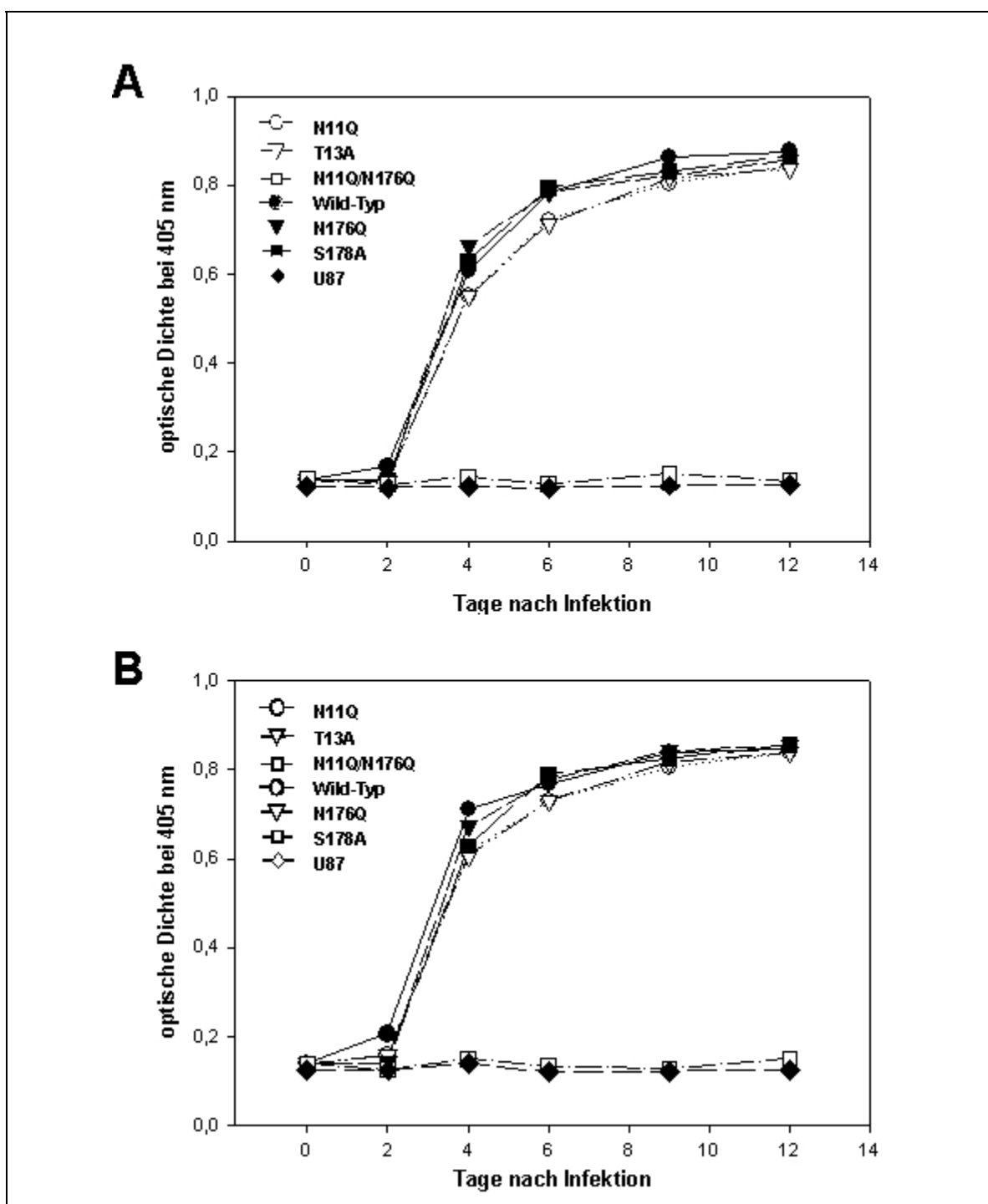


Abb. 18: Replikationskinetik der Viren (A) NL4-3 und (B) NL4-3_(-g14,-g15) in CXCR4 exprimierenden U87-Zellen. U87-Zellen (1×10^4 Zellen) wurden stabil mit dem Wild-Typ oder mit Mutanten des CXCR4 transduziert und mit den Viren infiziert (je 0,25 ng p24-Antigen/ml). Die produzierte Virusmenge wurde in regelmäßigen Abständen durch einen p24-Antigen-ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte U87-Zellen verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen.

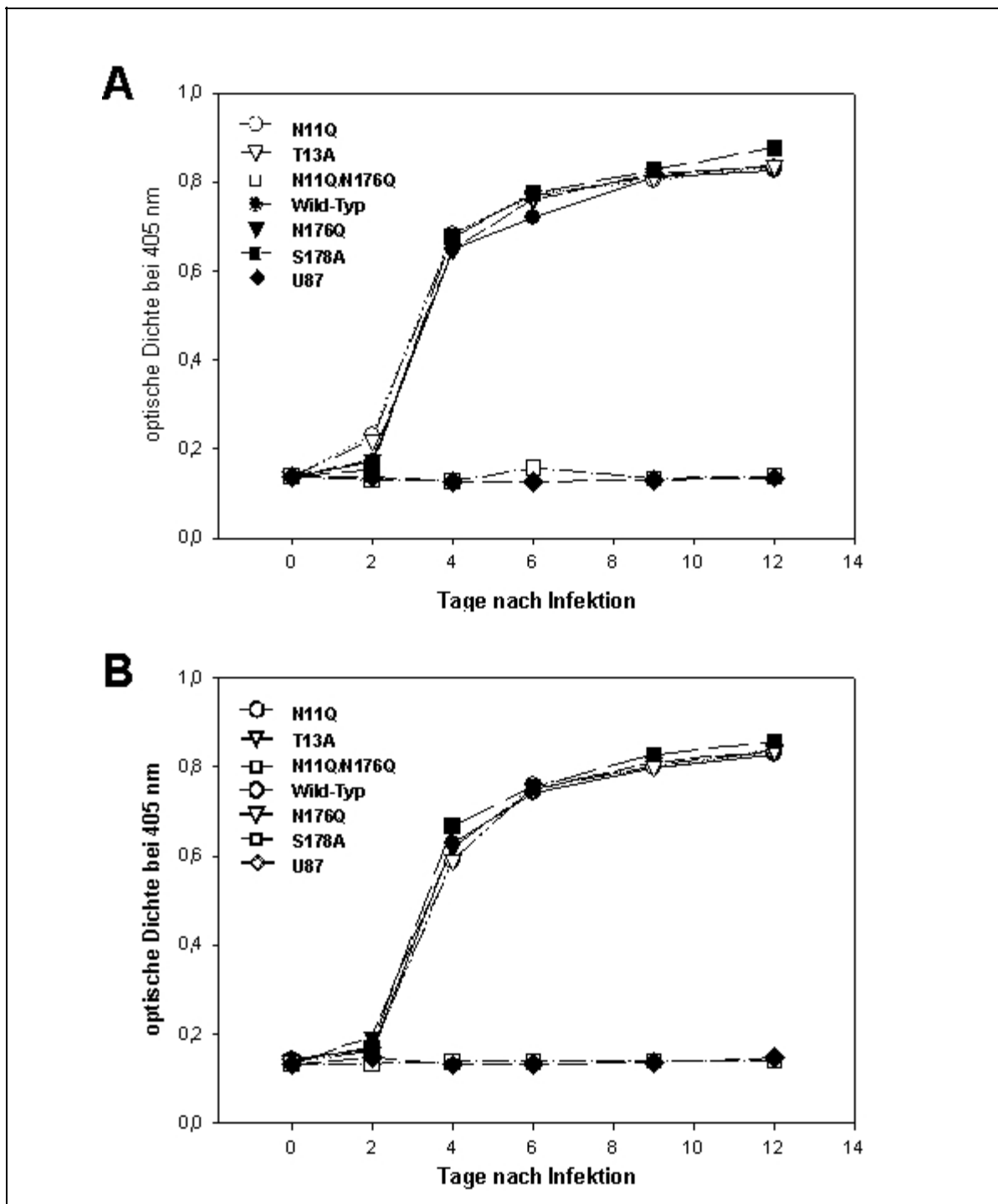


Abb. 19: Replikationskinetik der Viren (A) NL-952 und (B) NL-952_(-g13-g14-g15-g17) in CXCR4 exprimierenden U87-Zellen. U87-Zellen (1×10^4 Zellen) wurden stabil mit dem Wild-Typ oder mit Mutanten des CXCR4 transduziert und mit den Viren infiziert (je 2,5 ng p24-Antigen/ml). Die produzierte Virusmenge wurde in regelmäßigen Abständen durch einen p24-Antigen-ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte U87-Zellen verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen.

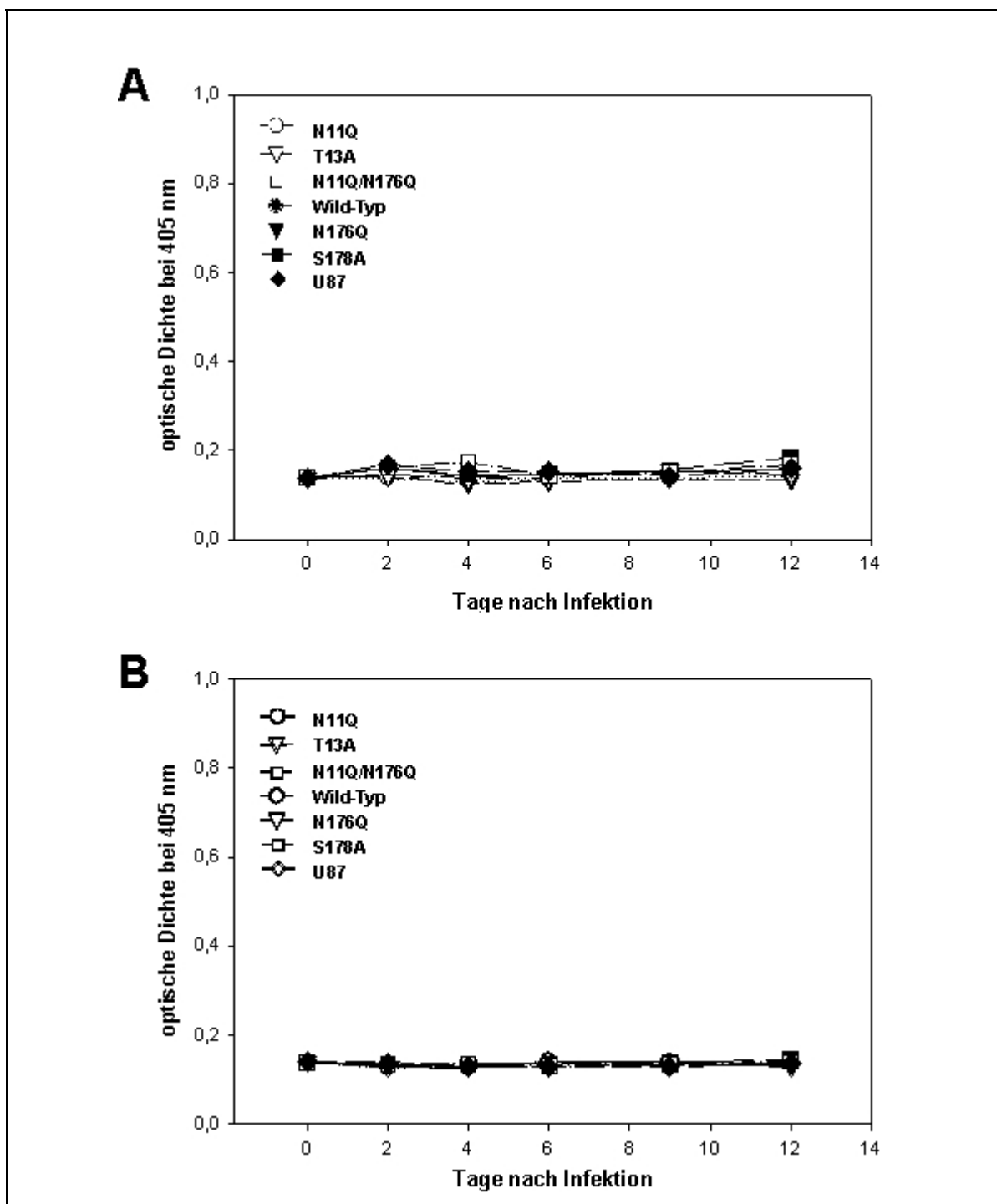


Abb. 20: Replikationskinetik der Viren (A) NL-991 und (B) NL-991_(-g15) in CXCR4 exprimierenden U87-Zellen. U87-Zellen (1×10^4 Zellen) wurden stabil mit dem Wild-Typ oder mit Mutanten des CXCR4 transduziert und mit den Viren infiziert (je 2,5 ng p24-Antigen/ml). Die produzierte Virusmenge wurde in regelmäßigen Abständen durch einen p24-Antigen-ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte U87-Zellen verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen.

3.6.2 Einfluss der *N*-Glykosylierung des CCR5 auf die Replikationskinetik rekombinanter Viren

Das X4 Virus NL4-3 konnte keine der Glykomutanten des CCR5 als Corezeptor für die Infektion von GHOST-Zellen nutzen (siehe Abb. 21A). Die Eliminierung des *N*-Glykans g15 des Virus NL4-3 (NL4-3_(-g14,-g15)) führte ebenfalls zu keiner Infektion von CCR5⁺-Zellen (siehe Abb. 21B).

Das R5X4 Virus NL-952 infizierte CCR5⁺-GHOST-Zellen erwartungsgemäß (siehe Abb. 22A). Die Eliminierung des Zuckers g15 führte zu einer Veränderung des Tropismus des Virus (CXCR4-trop), das nachfolgend nicht mehr in der Lage war, sich in CCR5⁺-GHOST-Zellen zu replizieren (siehe Abb. 22B).

Die unterschiedliche *N*-Glykosylierung im ECL3 des CCR5 hatte keinen Einfluss auf die Infektion von GHOST-Zellen mit dem R5 Virus NL-991 (siehe Abb. 23A). Interessanterweise inhibierte die zusätzliche potentielle *N*-Glykosylierungsstelle im *N*-Terminus (Y14N) des Corezeptors die Infektion der Zellen vollständig. Die Eliminierung des *N*-Glykans g15 innerhalb der V3-Schleife führte zu einem völligen Verlust der Eigenschaft des Virus, CCR5⁺-Zellen zu infizieren (siehe Abb. 23B).

Der Verlauf der Replikationskinetik des Virus NL-952 in den CCR5⁺-U87-Zellen variierte geringfügig (siehe Abb. 24A). Es wurde jedoch deutlich, dass die unterschiedliche Glykosylierung in der ECL3 des Corezeptors keinen Einfluss auf die Infektion hatte. Auch hier wurde die Infektion der Zellen durch das Einfügen eines *N*-Glykans in den *N*-Terminus des CCR5 vollständig inhibiert. Erwartungsgemäß konnte das X4 Virus NL-952_(-g13,-g14,-g15,-g17) keine der CCR5-Varianten als Corezeptor für die Infektion nutzen (siehe Abb. 24B). Auf die Infektion von CCR5⁺-U87-Zellen mit den Viren NL4-3 und NL4-3_(-g14,-g15) wurde verzichtet, da nicht zu erwarten war, dass diese X4 Viren CCR5 nutzen können.

Ein ähnliches Bild ergab die Infektion von CCR5⁺-U87-Zellen mit dem Virus NL-991 und dessen nicht-glykosylierter Mutante (siehe Abb. 25). Die Abweichungen der Replikationskinetiken sind auch hier vermutlich auf die unterschiedliche Expression der Corezeptormutanten in den transduzierten U87-Zellen zurückzuführen und erlaubten daher nur bedingte Aussagen über den Einfluss der *N*-Glykane der Corezeptoren auf die Infektion mit HIV-1.

Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass die *N*-Glykosylierungsstelle im ECL3 des CCR5 keinen Einfluss auf die Infektion der Zellen hatte. Das Einfügen einer zusätzlichen *N*-Glykosylierungsstelle in den *N*-Terminus des CCR5 inhibierte die Infektion der Zellen vollständig. Auch in diesen Versuchen wurde die unterschiedliche Infektion von GHOST- und U87-Zellen mit den gleichen Viren deutlich.

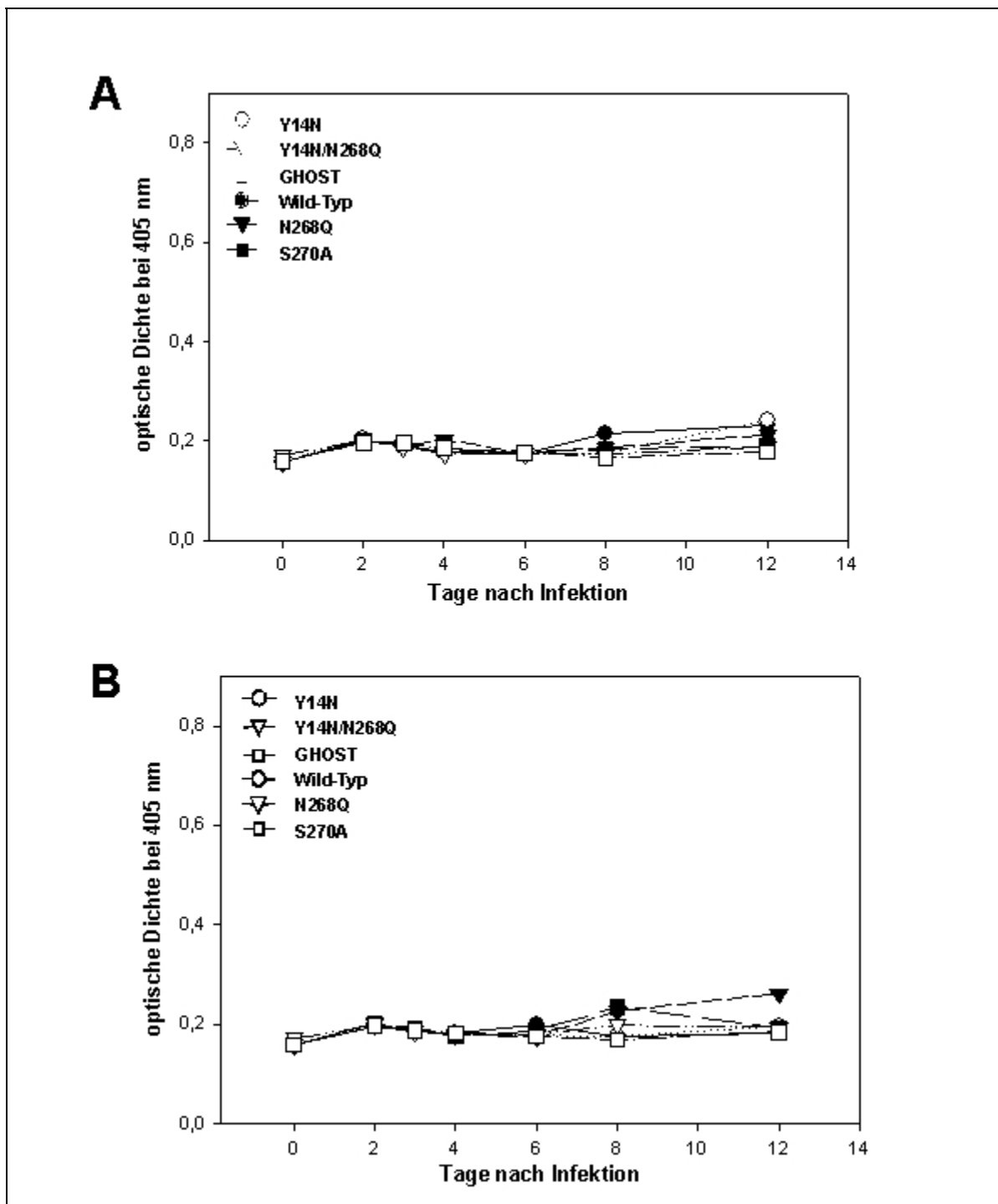


Abb. 21: Replikationskinetik der Viren (A) NL4-3 und (B) NL4-3_(-g14,-g15) in CCR5 exprimierenden GHOST-Zellen. GHOST-Zellen (3×10^3 Zellen) wurden stabil mit dem Wild-Typ oder mit Mutanten des CCR5 transduziert und mit den Viren infiziert (je 2,5 ng p24-Antigen/ml). Die produzierte Virusmenge wurde in regelmäßigen Abständen durch einen p24-Antigen-ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte GHOST-Zellen verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen.

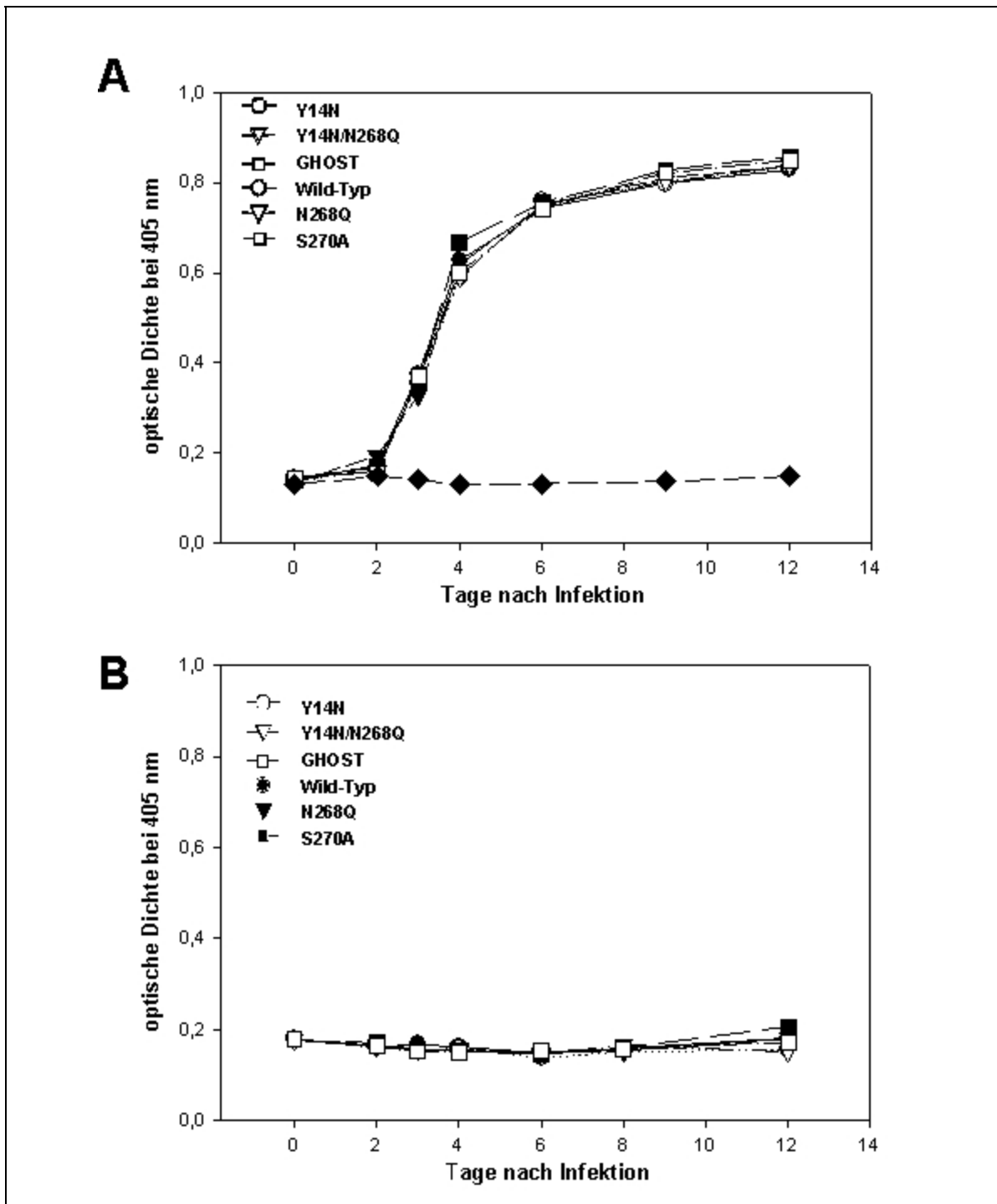


Abb. 22: Replikationskinetik der Viren (A) NL-952 und (B) NL-952_(-g13,-g14,-g15,-g17) in CCR5 exprimierenden GHOST-Zellen. GHOST-Zellen (3×10^3 Zellen) wurden stabil mit dem Wild-Typ oder mit Mutanten des CCR5 transduziert und mit den Viren infiziert (je 2,5 ng p24-Antigen/ml). Die produzierte Virusmenge wurde in regelmäßigen Abständen durch einen p24-Antigen-ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte GHOST-Zellen verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen.

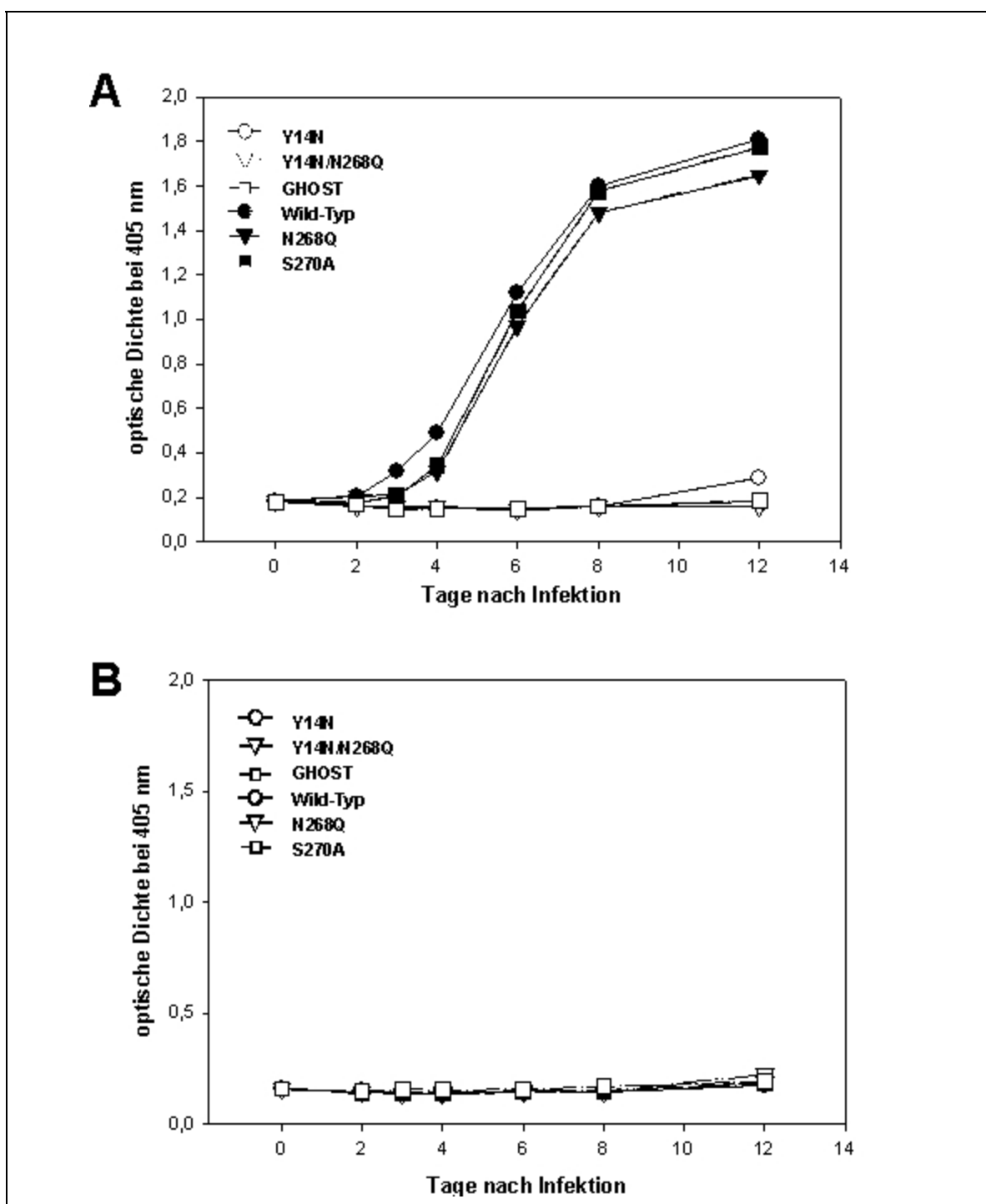


Abb. 23: Replikationskinetik der Viren (A) NL-991 und (B) NL-991_(-g15) in CCR5 exprimierenden GHOST-Zellen. GHOST-Zellen (3×10^3 Zellen) wurden stabil mit dem Wild-Typ oder mit Mutanten des CCR5 transduziert und mit den Viren infiziert (je 2,5 ng p24-Antigen/ml). Die produzierte Virusmenge wurde in regelmäßigen Abständen durch einen p24-Antigen-ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte GHOST-Zellen verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen.

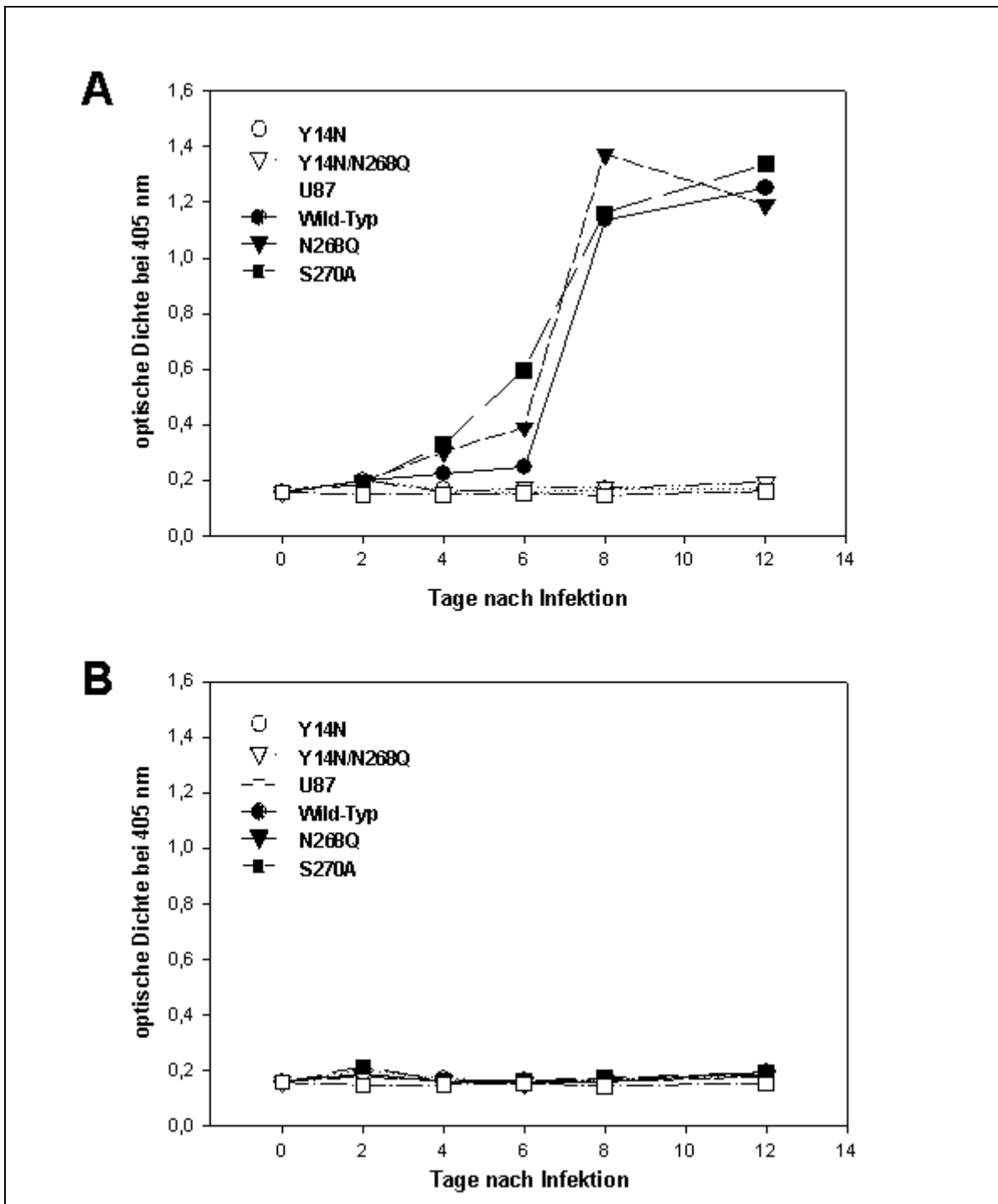


Abb. 24: Replikationskinetik der Viren **(A)** NL-952 und **(B)** NL-952_(-g13,-g14,-g15,-g17) in CCR5 exprimierenden U87-Zellen. U87-Zellen (1×10^4 Zellen) wurden stabil mit dem Wild-Typ oder mit Mutanten des CCR5 transduziert und mit den Viren infiziert (je 2,5 ng p24-Antigen/ml). Die produzierte Virusmenge wurde in regelmäßigen Abständen durch einen p24-Antigen-ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte U87-Zellen verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen.

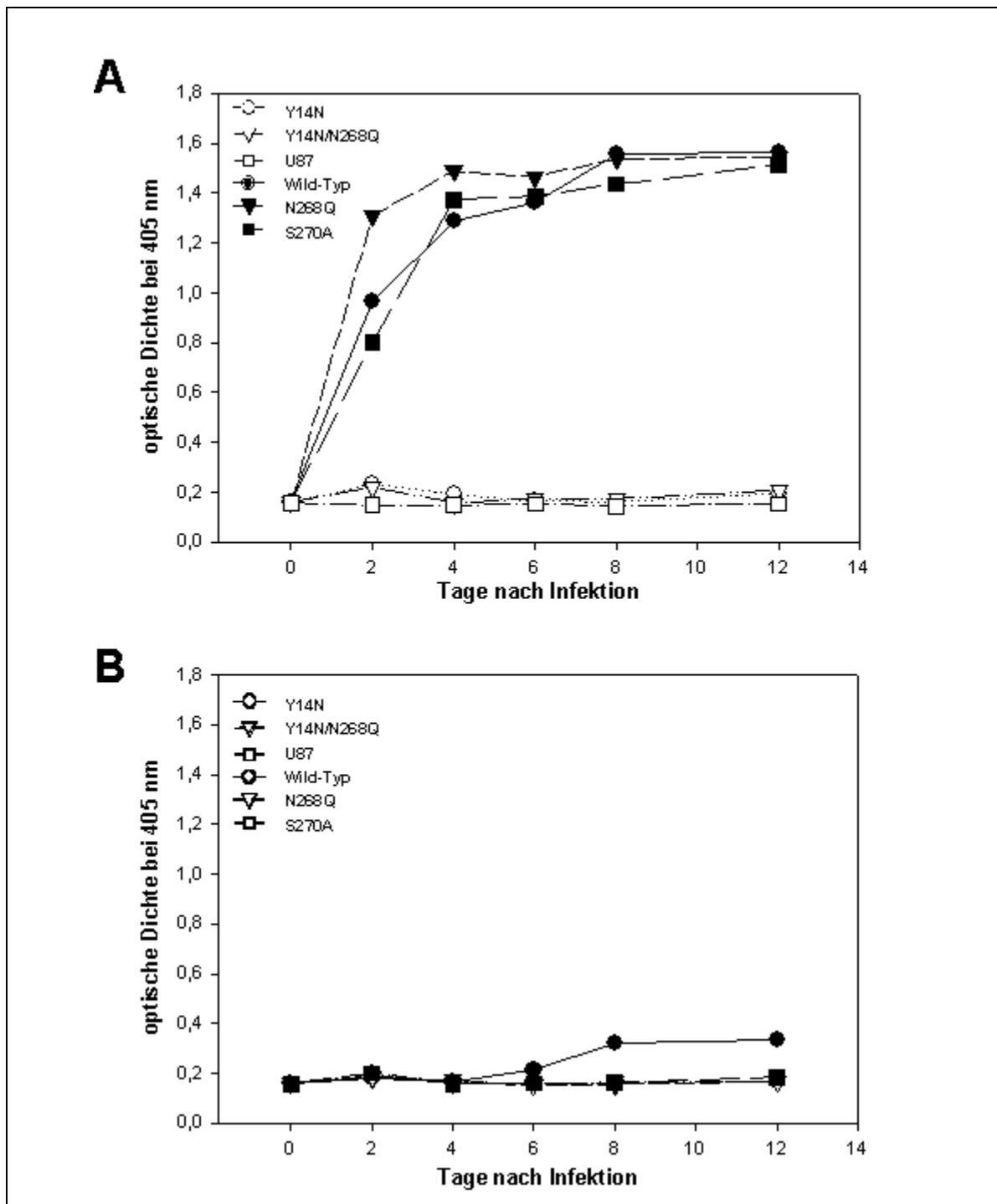


Abb. 25: Replikationskinetik der Viren **(A)** NL-991 und **(B)** NL-991_(-g15) in CCR5 exprimierenden U87-Zellen. U87-Zellen (1×10^4 Zellen) wurden stabil mit dem Wild-Typ oder mit Mutanten des CCR5 transduziert und mit den Viren infiziert (je 2,5 ng p24-Antigen/ml). Die produzierte Virusmenge wurde in regelmäßigen Abständen durch einen p24-Antigen-ELISA anhand der optischen Dichte bei 405 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte U87-Zellen verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen.

4 Diskussion

Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 sind Corezeptoren des HIV-1. In der frühen Phase der HIV-Infektion findet man im Blut infizierter Personen lediglich CCR5-trope Viren. Die Progression der Infektion bis zur Etablierung des Vollbilds AIDS korreliert mit dem Rückgang der CD4⁺-Zellen und dem Nachweis von R5X4-dualtroper und CXCR4-troper Viren im Blut (Scarlatti *et al.*, 1997). Die Mechanismen, die zum Wechsel des Tropismus von HIV-1 führen sind noch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der *N*-Glykosylierung des CXCR4 und des CCR5 für die Infektion mit HIV-1 untersucht. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Fehlen der *N*-Glykosylierung im *N*-Terminus (Position N11) des CXCR4 zu einer verstärkten Infektion von GHOST-Zellen mit einem R5X4-dualtrophen Virus (NL-952) führte. Die verstärkte Infektion von Zellen könnte ein Selektionsvorteil für R5X4 Viren bedeuten, und daher die Entstehung von CXCR4-adaptierten Viren fördern. Ferner wurde gezeigt, dass durch die Mutation Y14N ein zusätzliches *N*-Glykan in den *N*-Terminus des CCR5 eingefügt wird und dies die Infektion von Zellen mit HIV-1 vollständig inhibierte. Die Mutation Y14N ist ein Polymorphismus des CCR5, der bei Affen zur Ausbildung einer Resistenz gegen eine Infektion mit SIV und HIV führte (siehe 1.5). Die potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen an den Positionen N176 (CXCR4) und N268 (CCR5) hatten dagegen keinen Einfluss auf die Infektion.

Die molekularen Interaktionen bei einer HIV-Infektion sind von sehr komplexer Natur und werden von den Konformationen der beteiligten Moleküle sowie der Rezeptordichte und der Affinität des Corezeptors zum Virus beeinflusst (Doms, 2001). CXCR4 und CCR5 kommen in unterschiedlichen Konformationen vor, die die Affinität zu den Liganden und zum Virus beeinflussen (Baribaud *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999). Dabei interagieren mehrere gp120-, CD4- und Corezeptor-Moleküle miteinander: (i) Das gp120 liegt als trimeres Heterodimer (gp120 und gp41) in der Virushülle vor, (ii) der gp120/gp41-Komplex benötigt für die Bindung an die Zelle die Interaktion mit mindestens drei CD4-Molekülen und nachfolgend (iii) die Wechselwirkung mit etwa sechs Corezeptor-Molekülen (Doms,

2001; Kuhmann *et al.*, 2000; Layne *et al.*, 1990). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Zellsystem verwendet, denn in der Membran der verwendeten CD4⁺-Zellen liegen die Corezeptoren in ihrer nativen Konformation vor. Die Virus-Rezeptor-Interaktionen können daher zu den für die Infektion essentiellen Konformationsänderungen der beteiligten Moleküle führen. Nur mit diesem komplexen System lässt sich die Bedeutung der N-Glykosylierung der Corezeptoren für die Infektion untersuchen.

Es ist leicht vorstellbar, dass posttranslationale Modifikationen der beteiligten Moleküle zu strukturellen oder konformationellen Veränderungen führen, die große Auswirkungen auf diese Interaktionen haben können. Die N-Glykosylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die für die Bindung des SDF-1/CXCL12 an CXCR4 von essentieller Bedeutung ist (Zhou *et al.*, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Interaktionen zwischen einigen HIV-Isolaten und den Corezeptoren zur rezeptorspezifische Signaltransduktion führte (Arthos *et al.*, 2000). In der Arbeit wurde vermutet, dass die eingeleitete Signaltransduktion für die effektive Infektion von Zellen mit HIV notwendig sei. Die Verbindung der Notwendigkeit einer funktionsfähigen Signalübertragung der Corezeptoren mit einer effektiven Infektion wird seitdem kontrovers diskutiert. Die Eigenschaft des CXCR4 und des CCR5, die Signaltransduktion einzuleiten, korreliert jedoch nicht zwingend mit der effektiven Infektion von Zellen. Keine der hergestellten transduzierten GHOST-Zellen war nach der Applikation der Liganden in der Lage, intrazelluläres Calcium freizusetzen (siehe Abb. 11). Die Zellen ließen sich aber effektiv mit HIV-1 infizieren (siehe 3.6.1 und 3.6.2). Die hier verwendeten GHOST-Zellen scheinen nicht über die notwendigen Komponenten der intrazellulären Signalkaskade zu verfügen, da auch der Wild-Typ der beiden Corezeptoren nach der Applikation eines spezifischen Chemokins keine Signaltransduktion einleiten konnte. Die gezeigten Ergebnisse bestätigen die Daten von Gosling *et al.* (1997), die nach der Unterbindung der Signaltransduktion des CCR5 die effektive Infektion der Zellen mit R5 Viren beobachteten.

Neben der *N*-Glykosylierung werden die Corezeptoren durch weitere posttranslationale Modifikationen verändert, zu denen die Phosphorylierung (Orsini *et al.*, 1999), die Sulfatierung (Farzan *et al.*, 1999) und die *O*-Glykosylierung (Bannert *et al.*, 2001) zählen. Ob diese Modifikationen jedoch die Konformation der Corezeptoren direkt oder indirekt beeinflussen, müssten weiterführende Arbeiten zeigen. Interessant ist die Überlegung, dass diese posttranslationalen Modifikationen die Dimerisierung der Corezeptoren beeinflussen, und dass die Dimerisierung der Rezeptoren für die Infektion und die Bindung der Liganden notwendig sein könnte (Baribaud & Doms, 2001). CXCR4 und CCR5 werden bei einer Immunpräzipitation der Rezeptoren aus Zelllysaten zum Teil als Homodimer präzipitiert (Farzan *et al.*, 1999; Chabot *et al.*, 2000). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Deglykosylierung von CD4⁺- und CXCR4⁺-Zellen zu einer verminderten Infektion der Zellen mit HIV-1 führte (Malenbaum *et al.*, 2002). Dies wurde auf die Inhibition der Heterodimerisierung zwischen CD4 und CXCR4 oder der Homodimerisierung von CXCR4 zurückgeführt. Offensichtlich sind *N*-Glykane auch bei diesen Prozessen von Bedeutung.

Polzer *et al.* (2001, 2002) zeigten, dass die Eliminierung des *N*-Glykans innerhalb der V3-Schleife des X4 Virus HIV-1_{NL4-3} zu einer stärkeren Infektion von GHOST-Zellen führte. Der Austausch der V3-Region des HIV-1_{NL4-3} mit der V3-Region eines R5X4 bzw. R5 Patientenisolats führte zur Übertragung des Phänotyps auf die hergestellten rekombinanten Viren NL-952 (R5X4) und NL-991 (R5). Ferner hatte die Eliminierung des Zuckers g15 in der V3-Schleife den Wechsel des Tropismus des R5X4 Virus NL-952 zur Folge, das nach der Eliminierung CXCR4-monotrop war. Das Fehlen des Zuckers führte bei NL-991 zum völligen Verlust der Fähigkeit, Zellen zu infizieren. Eigene Arbeiten bestätigten diese Daten zum großen Teil und zeigten weiter, dass der Tropismus der Viren NL4-3 und NL-991 sowie deren nicht-glykosylierte Mutanten nicht von den *N*-Glykanen des CXCR4 und des CCR5 beeinflusst wurde (siehe 3.6.1 und 3.6.2). Die Ergebnisse von Polzer *et al.* (2001, 2002) zeigten eindrucksvoll die Bedeutung der *N*-Glykosylierung der V3-Region für die Infektion mit HIV-1 und gaben weitere Hinweise für den Einfluss der *N*-Glykosylierung des gp120 bei der Entstehung CXCR4-troper Viren.

Der Austausch der V3-Schleife verschiedener Viren mit HIV-1_{NL4-3} ist eine anerkannte und elegante Methode, den Einfluss der V3-Region auf die Infektion zu untersuchen (Dittmar *et al.*, 2001; Trouplin *et al.*, 2001). Vieles spricht dafür, dass die V3-Region direkt an den Corezeptor bindet: (i) Rekombinante Viren, deren V3-Schleife fehlte, waren nicht infektiös (Cao *et al.*, 1977). (ii) Die Infektion von HIV konnte durch V3-Peptide inhibiert werden, die direkt an den Corezeptor banden (Sakaida *et al.*, 1998). (iii) Der Austausch der V3-Schleife eines X4 Virus gegen Sequenzen des SDF-1/CXCL12 führte zu infektiösen X4 Viren, (iv) das Einfügen von Sequenzen des MIP-1 α /CCL5 in ein X4 Virus führte zum CCR5-tropen Phänotyp des rekombinanten Virus (Yonezawa *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass HIV-1_{NL4-3} Zellen unabhängig von der Konformation des CXCR4 infiziert (Baribaud *et al.*, 2001), machen HIV-1_{NL4-3} zu einem idealen Virus für die Untersuchung des Einflusses der *N*-Glykane der Corezeptoren auf die Infektion mit HIV-1.

Das sich der Tropismus eines Virus durch den Austausch der V3-Region auf ein anderes Virus übertragen lässt, wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Nach der Übertragung der V3-Region der Viren PI-718 und PI-736 in das Virus NL4-3, besaßen die rekombinanten Viren NL-718 und NL-736 den R5X4-dualtropen Phänotyp (siehe Abb. 14). Die GHOST- und U87-Indikatorzellen zeigten nach zehn Tagen eine deutliche Infektion mit den Viren NL-718 und NL-736, die zur Analyse des viralen Phänotyps geeignet war. Dabei war die eingesetzte Viruskonzentration (75 ng p24-Antigen/ml) relativ hoch. Daraus lässt sich schließen, dass die infektiöse Dosis der Viren pro Virus-Antigenäquivalent (TCID₅₀/ng p24-Antigen) gering war. Die Expression der Corezeptoren in den hergestellten transduzierten Zellen war im Vergleich mit den Indikatorzellen relativ gering. Diese geringe Infektiösität der Viren NL-718 und NL-736 in Kombination mit der geringen Expression der Corezeptoren verhinderte vermutlich die Infektion der transduzierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Eine wichtige Entdeckung zur Analyse der Bedeutung der *N*-Glykosylierung der Corezeptoren bei der Entstehung CXCR4-troper Viren machten kürzlich Donald J. Chabot und seine Mitarbeiter (2000). Sie eliminierten das *N*-terminale *N*-Glykan N11 des CXCR4 und beobachteten die Infektion dieser CXCR4⁺-Zellen mit einigen R5 Viren. In der Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die *N*-Glykane eines Corezeptors den

Tropismus eines R5 Virus verändern. Die Erweiterung der Corezeptornutzung und der damit verbundenen Ausdehnung der potentiellen Zielzellen, könnte ein Schritt bei der Entstehung von X4 Viren sein. Die Eliminierung des *N*-Glykosylierungssignals im ECL2 (Position N176) führte dagegen zu keiner Infektion mit den untersuchten R5 Viren. Die Infektion von CXCR4⁺-Zellen mit dem R5 Virus NL-991 konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden (siehe Abb. 17). Die Substitution der V3-Region des CXCR4-adaptierten Virus NL4-3 mit der eines R5 Patientenisolats (PI-991) reichte nicht aus, um den nicht-glykosylierten CXCR4 nutzen zu können. Chabot *et al.* (2000) verwendeten für ihre Versuche jedoch keine rekombinanten Viren, daher ist möglich, dass weitere Bereiche außerhalb der V3-Region der R5 Viren mit dem Corezeptor interagierten (zum Beispiel die V1/V2-Region). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass in der vorliegenden Arbeit keine Infektion der CXCR4⁺-Zellen, denen das Glykan N11 des Corezeptors fehlte, mit dem verwendeten rekombinanten R5 Virus beobachtet wurde. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Viren besitzen außerhalb der V3-Region den genetisch gleichen Hintergrund des CXCR4-adaptierten Virus NL4-3. Dies ist ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von rekombinanten Viren, denn daher lassen sich die Beobachtungen auf spezielle Regionen der beteiligten Moleküle zurückführen. Diese Ergebnisse geben weitere Hinweise, für eine Beteiligung unterschiedlicher Regionen des gp120 bei der Ausprägung des viralen Tropismus.

Die Analyse der tatsächlich genutzten *N*-Glykosylierungssignale des CXCR4 ergab, dass CXCR4 in GHOST-Zellen lediglich im *N*-Terminus *N*-glykosyliert wird (Chabot *et al.*, 2000). Daraufhin wurden eigene Untersuchungen nicht weiter fortgeführt. Die Nutzung der *N*-Glykosylierung in U87-Zellen wurde nicht untersucht, da die Expression der Glykomutanten stark voneinander abwich (siehe Abb. 9B und 10B). Die unterschiedliche Expression der Corezeptoren deutet auf unterschiedliche Eigenschaften der GHOST- und U87-Zellen bei der Prozessierung von Glykoproteinen hin. Der Einfluss der Glykosylierung auf die Faltung und die Prozessierung von Proteinen ist abhängig vom Zelltyp und wurde in früheren Arbeiten bereits gezeigt (Rands *et al.*, 1990; Rudd *et al.*, 1994). Die eigenen Daten zeigten weiter, dass die Replikationskinetiken des R5X4 Virus NL-952 und dessen nicht-glykosylierte X4 Mutante in GHOST-Zellen, die den Wild-Typ oder eine der im ECL2 nicht-glykosylierten Mutanten (N176Q, S178A) des

CXCR4 exprimierten, annähernd den gleich Verlauf besaßen (siehe Abb. 17). Das deutete darauf hin, dass diese *N*-Glykosylierungsstelle entweder keinen Einfluss auf die Infektion hatte oder nicht genutzt wurde. Die *N*-Glykosylierungsstelle N176 befindet sich in unmittelbarer Nähe zur Cytoplasmamembran und ist daher schwer zugänglich für eine enzymatische Modifikation. Der β_2 -adrenerge Rezeptor, auch ein 7-Transmembranrezeptor, wird ebenfalls auf Grund der Unzugänglichkeit einiger Glykosylierungsstellen unterschiedlich glykosyliert (Rands *et al.*, 1990). Damit bestätigen die eigenen Daten die Ergebnisse von Chabot *et al.* (2000). Die Replikationskinetiken des Virus NL-952 in Zellen, die *N*-terminal nicht-glykosyliertes CXCR4 exprimierten (N11Q, T13A oder N11Q/N176Q), ergab ein deutlich anderes Bild. Die Virusmenge in diesen Kulturen lag bereits am dritten Tag nach der Infektion etwa 300 % über der Virusmenge der Kulturen, die den *N*-terminal glykosylierten Corezeptor exprimierten. Daraus lässt sich schließen, dass das R5X4 Virus NL-952 und dessen nicht-glykosylierte X4 Mutante die Zellen effektiver infizierten. Diese Entdeckung könnte ein weiterer Mechanismus bei der Entwicklung von X4 Viren aus R5X4-dualtropen Viren sein. Die Analyse der Replikationskinetik eines Virus ist eine gute Methode, um Aussagen über die Virus-Corezeptor-Interaktionen machen zu können (Dimitrov *et al.*, 1993). Die effektive Infektion von Zellen führt nach etwa 48-72 h zum Austritt von infektiösen Viren und ist proportional zur Anzahl der infizierten Zellen. Die Anzahl der initial infizierten Zellen ist ein Maß für die Infektiosität eines Virus oder das Potential eines Corezeptors.

Die unterschiedliche Infektion der Zellen kann nicht auf eine unterschiedlich starke Expression der mutierten Corezeptoren zurückgeführt werden, da alle CXCR4- und CCR5-Varianten in GHOST-Zellen etwa im gleichen Maße exprimiert wurden (siehe Abb. 9A und 10B). Die zum Teil großen Unterschiede in der Expression der Corezeptoren in U87-Zellen sind nicht auf eine verminderte Affinität der verwendeten monoklonalen Antikörper 12G7 (CXCR4) und 2D7 (CCR5) zurückzuführen. Diese Antikörper erkennen verschiedene Konformationen der Corezeptoren und werden nicht von der *N*-Glykosylierung der Moleküle beeinflusst (Baribaud *et al.*, 2001; Farzan *et al.*, 1999; Picard *et al.*, 1997). Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede der Expression der Corezeptoren in GHOST- und U87-Zellen beruhen somit nicht auf einer verminderten Affinität der Antikörper zu den unterschiedlich glykosylierten Corezeptoren, sondern weitgehend

auf den zelltypspezifischen Differenzen der Expression unterschiedlich *N*-glykosylierter Corezeptoren.

Die Corezeptoreigenschaften des CXCR4 und des CCR5 können bereits durch einzelne Mutationen in der Aminosäuresequenz verändert werden (Blanpain *et al.*, 1999; Brelot *et al.*, 2000; Chabot *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurde bei der Eliminierung der *N*-Glykosylierungssignale (NXT/S) nicht nur das an der Bindung der Zuckerstrukturen beteiligte Asparagin sondern in weiteren Mutanten das Serin bzw. Threonin substituiert, um die *N*-Glykosylierung zu verhindern. Die zur Substitution verwendeten Aminosäuren Glutamin und Alanin (Glutamin für Asparagin und Alanin für Serin bzw. Threonin) verändern die physikalischen und chemischen Eigenschaften eines Proteins kaum und waren daher für die ortsgerichtete Mutagenese der Corezeptoren geeignet. Diese Methode ermöglichte es, die beobachteten Effekte auf das Fehlen der *N*-Glykosylierung zurückzuführen und nicht auf den Austausch der Aminosäure .

Die Bindung des gp120 an CD4 induziert konformationelle Änderungen im gp120, die zur Exposition geladener Aminosäurereste führt und die Bindung an den Corezeptor vermittelt (elektrostatistische Wechselwirkung; Kwong *et al.*, 1998; Wyatt *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1996). Vergleicht man die V3-Regionen der verwendeten Viren NL4-3, NL-952 und NL-991, fällt die unterschiedliche Netto-Ladung der V3-Regionen auf (siehe Tab. 4). Das X4 Virus HIV-1_{NL4-3} besitzt zwölf positiv-geladene Lysin- bzw. Argininreste (5K/7R) sowie drei negativ-geladene Asparaginsäure- bzw. Glutaminsäurereste (2D/1E) und daher eine Netto-Ladung von +9. Das R5X4 Virus NL-952 verfügt über eine Netto-Ladung von +7 und NL-991 (CCR5-trop) besitzt eine relativ geringe positive Ladung (+2). Auch wenn die Grenzen fließend sind, ist es allgemein anerkannt, dass eine Netto-Ladung der V3-Schleife von +7 bis +9 mit dem CXCR4-Tropismus eines Virus korreliert. Eine Netto-Ladung von +2 bis +3 führt zum CCR5-tropen Phänotyp. Viele Viren tragen eine Netto-Ladung zwischen diesen beiden Werten und können aus diesem Grund sowohl CXCR4 als auch CCR5 nutzen (Donaldson *et al.*, 1994; Chesebro *et al.*, 1996). Daher kann der Austausch einer Aminosäure, der zu einer Änderung der Ladung in der V3-Region führt, zu einem Wechsel des viralen Phänotyps führen (DeJong *et al.*, 1992). Die Eliminierung der *N*-Glykosylierung der hier verwendeten Viren wurde durch den Austausch von Asparagin nach Glutamin hervorgerufen und beeinflusst nicht die Ladungsverhältnisse

in der V3-Region. Die Zuckerstrukturen könnten jedoch Ladungen maskieren und/oder durch endständige Sialinsäuren zur Gesamtladung der V3-Region beitragen (Polzer, 2002). Eine ähnliche Funktion könnte den *N*-Glykanen der Corezeptoren zukommen, denn auch dort kann eine Veränderung der Netto-Ladung der extrazellulären Domänen die Corezeptoreigenschaft ändern (Chabot *et al.*, 1999).

Tab. 4: Vergleich der Ladungsverhältnisse der verwendeten Viren und der Corezeptoren CXCR4 sowie CCR5. Angegeben ist die Anzahl der in der V3-Region der Viren und den extrazellulären Domänen der Corezeptoren vorkommenden Ladungen. Die Aminosäuren Lysin und Arginin tragen zur positiven Ladung (+), Asparaginsäure und Glutaminsäure zur negativen Ladung (-) der Moleküle bei.

	(+)-Ladung	(-)-Ladung	Netto-Ladung	Tropismus
NL4-3	12	3	+9	X4
NL-952	11	5	+7	R5X4
NL-991	7	5	+2	R5
CXCR4	8	19	-11	-
CCR5	8	7	+1	-

Fasst man die in dieser Arbeit gezeigten Daten und die Ergebnisse anderer Arbeiten zusammen, könnte sich für den Einfluss der *N*-Glykosylierung des CXCR4 und des CCR5 auf die Infektion mit HIV-1 folgendes Modell ergeben: Betrachtet man die Anzahl der geladenen Aminosäuren in den extrazellulären Domänen des CXCR4 und des CCR5 (siehe Abb. 26) wird deutlich, dass die hohe Anzahl negativ-geladener Aminosäuren des CXCR4 (-19) die Interaktion mit den positiv-geladenen Aminosäuren der Viren NL4-3 (+12) und NL-952 (+11) begünstigt (elektrostatische Wechselwirkungen). Eine relativ hohe Anzahl negativ-geladener Aminosäurereste könnte für die Bindung an den positiv-geladenen CCR5 notwendig sein. Das R5 Virus NL-991 verfügt über fünf negative Ladungen. NL-952 besitzt elf positiv-geladene und fünf negativ-geladene Aminosäuren und daher die Eigenschaft, beide Corezeptoren zu nutzen. Entfernt man das *N*-Glykan in der V3-Schleife des Virus NL-952 könnten positiv-geladene Aminosäuren demaskiert werden, die die Gesamtladung der an der Bindung des Corezeptors beteiligten Bereiche erhöhen (positivieren). Dadurch werden die Interaktionen mit dem positiv-geladenen

CCR5 gestört und der Wechsel vom R5X4- zum X4-Tropismus des Virus verursacht (Polzer *et al.*, 2002).

Das *N*-Glykan N11 des CXCR4 befindet sich in der Nähe der Aminosäuren E14, -15 und -32, die für die Bindung von HIV-1 notwendig sind (Chabot *et al.*, 1999). Die kompakte Konformation des CXCR4 in der Zellmembran bringt die extrazellulären Domänen in eine enge räumliche Nähe zueinander (Chabot *et al.*, 2000). Daher können auch andere funktionell wichtige Aminosäuren (zum Beispiel D97) kooperativ an der Bindung von Viren beteiligt sein. Die Demaskierung dieser stark negativ-geladenen Domänen des CXCR4 durch die Eliminierung des *N*-Glykans N11 könnte zur Exposition positiv-geladener Aminosäuren in den extrazellulären Domänen führen, die die exponierte Gesamtladung des CXCR4 erhöhen. Daher könnten die negativ-geladenen Aminosäuren der V3-Region des NL-952 zur Steigerung der Affinität zu dem demaskierten Corezeptor beitragen (siehe Abb. 27). Dies ermöglichte die effizientere Infektion der Zellen. Die Anzahl der negativ-geladenen Aminosäuren des NL-952 ist offensichtlich ausreichend hoch, um auch nach der Eliminierung des Zuckers in der V3-Region verstärkt mit dem demaskierten Corezeptor zu interagieren. Die Demaskierung des CXCR4 hatte dagegen keinen Einfluss auf die Infektion mit dem R5 Virus NL-991 und dem X4 Virus NL4-3. Die relativ niedrige Anzahl an positiv-geladenen Aminosäuren in der V3-Region des NL-991 ist nicht ausreichend, um CXCR4⁺-Zellen zu infizieren. Die Exposition der negativ-geladenen Oberfläche des CXCR4, mit oder ohne N11, ist für die Interaktion mit der niedrig-geladenen V3-Region (+2) des Virus von Nachteil. NL4-3 verfügt hingegen über zu wenig negative Ladungen und kann daher nicht verbessert mit dem demaskierten CXCR4 interagieren (Thordsen *et al.*, 2002).

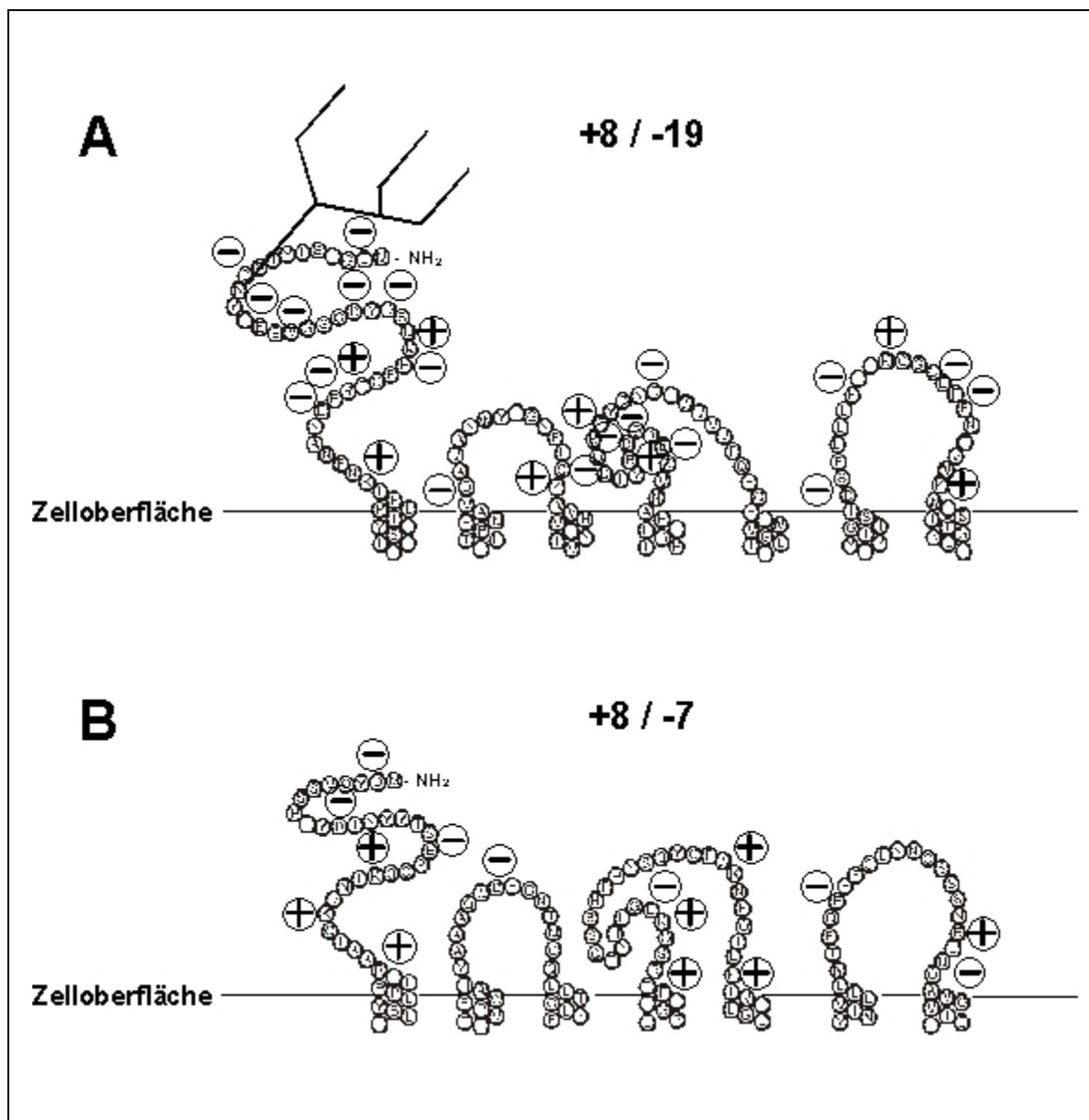


Abb. 26: Darstellung der Ladungsverteilung in den extrazellulären Domänen des (A) CXCR4 und des (B) CCR5. Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E) tragen zur negativen Ladung (-), Arginin (R) und Lysin (K) tragen zur positiven Ladung (+) der Proteine bei. Der Vergleich der Ladungsverteilung in den extrazellulären Domänen des CXCR4 und des CCR5 zeigt die deutlich höhere Anzahl an negativen Ladungen in den Domänen des CXCR4. Die Ladungen werden durch die kompakte Struktur der Corezeptoren in eine enge räumliche Nähe zueinander geführt (hier nicht darstellbar) und tragen kooperativ zur Bindung an das virale Hüllprotein gp120 des HIV-1 bei. Die Kohlenhydratseitenkette des CXCR4 könnte positiv-geladene Aminosäurereste in den extrazellulären Domänen maskieren und die Interaktion mit HIV-1 beeinflussen.

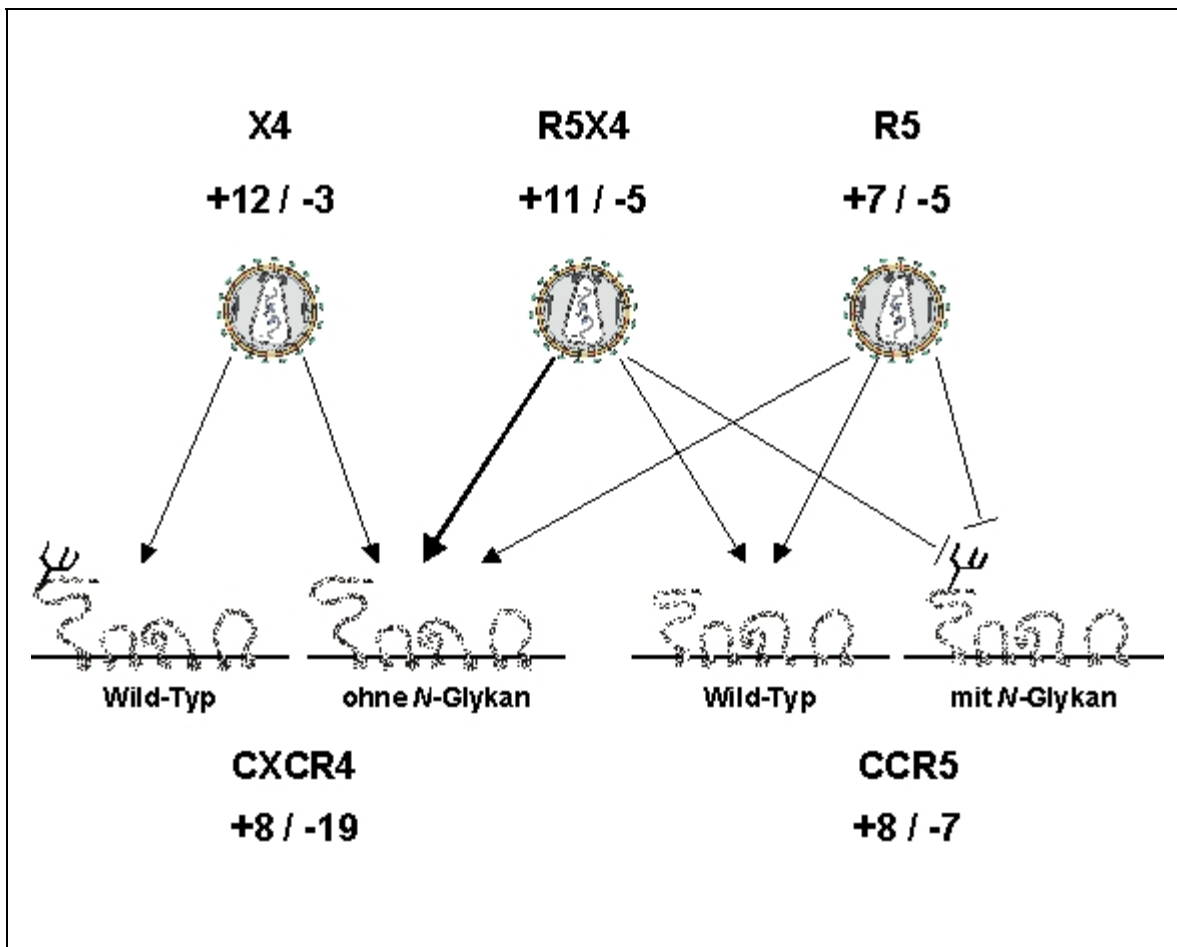


Abb. 27: Hypothetisches Modell der Bedeutung der *N*-Glykosylierung des CXCR4 und des CCR5 für die Infektion mit HIV-1. In Abhängigkeit vom Zelltyp könnten die Corezeptoren unterschiedliche *N*-Glykane aufweisen. Diese Unterschiede könnten die Mikroheterogenität der Oligosaccharide oder die Nutzung der potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen betreffen. Die Eliminierung des *N*-Glykans N11 im *N*-Terminus des CXCR4 könnte zur Demaskierung von positiv-geladenen Aminosäureresten in den extrazellulären Domänen führen (linker Teil der Abbildung). Dadurch erhöht sich die Gesamtladung der exponierten Bereiche des Corezeptors und die Interaktion mit negativ-geladenen Resten in der V3-Region des R5X4-dualtropen Virus (NL-952) wird verstärkt. Dies führt zur effizienteren Infektion durch das R5X4-Virus. Die geringere negative Ladung des X4 Virus (NL4-3) reicht für die verstärkte Bindung an den demaskierten Corezeptor nicht aus (Thordsen *et al.*, 2002). Das Fehlen des Glykans N11 demaskiert ebenfalls Regionen, die von einigen CCR5-adaptierten Viren erkannt werden und für die Infektion der Zellen ausreichen (Chabot *et al.*, 2000). Diese Mechanismen könnten zur effizienteren Infektion von CXCR4⁺-Zellen durch R5 und R5X4 Viren führen und die Entstehung der virulenten X4 Viren forcieren. Durch die Mutation Y14N entsteht ein zusätzliches *N*-Glykan im *N*-Terminus des CCR5 (rechter Teil der Abbildung). Dieses *N*-Glykan könnte negativ-geladene Aminosäurereste und Sulfatgruppen maskieren, die für die Interaktionen mit der positiv-geladenen V3-Region der R5 Viren (NL-991, +2) erforderlich sind. Dadurch wird die Infektion der Zellen mit HIV-1 vollständig inhibiert.

Die Tyrosinreste im *N*-Terminus des CCR5 werden sulfatiert und tragen zur negativen Gesamtladung der Domäne bei. Diese Sulfatgruppen sind an der Bindung von R5 Viren beteiligt. Die Eliminierung einzelner Tyrosinreste führt lediglich zu einer verminderten Infektion von CCR5⁺-Zellen mit R5 Viren (Farzan et al., 1998). Die in der vorliegenden und in anderen Arbeiten (Kuhmann et al., 1997, 2000) beobachtete vollständige Inhibition der Infektion von Zellen durch die Mutation Y14N im CCR5, kann aus diesem Grund nicht allein auf die Substitution des Tyrosins-14 zurückgeführt werden. Vielmehr könnte das zusätzliche *N*-Glykan (N14) andere funktionell bedeutende Aminosäuren (zum Beispiel Y3, -10, -15) der Domäne maskieren. Der *N*-Terminus des CCR5 wird *O*-glykosyliert. Diese *O*-Glykane werden ebenfalls sulfatiert und tragen mit ihrer negativen Ladung zur Bindung von Viren bei (Bannert et al., 2002). Es ist daher möglich, dass das *N*-Glykan N14 auch diese Strukturen maskiert und die Bindung der Viren inhibiert wird, da *N*-Glykane verglichen mit *O*-Glykanen eine erheblich größere räumliche Struktur aufweisen.

Diese Darstellung und die in dieser Arbeit gezeigten Daten werfen die Frage auf, ob es *in vivo* unterschiedlich glykosylierte Formen der Corezeptoren gibt. Studien von Baribaud et al. (2001) zeigten, dass CXCR4 und CCR5 in unterschiedlichen Konformationen auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Diese Unterschiede in der räumlichen Struktur sind zelltypspezifisch. Die *N*-Glykosylierung eines Proteins ist eine posttranslationale Modifikation, die nicht nur zelltypspezifisch, sondern auch abhängig vom Aktivitätszustand der Zelle ist (Paulson et al., 1989; Rudd et al., 1994). CXCR4 und CCR5 werden in einer Vielzahl verschiedener Gewebe und Zelltypen des Körpers exprimiert, die die Zuckerstrukturen der Corezeptoren auf unterschiedlichste Weise modifizieren könnten. Dies wurde für die *N*-Glykosylierung eines anderen 7-Transmembranrezeptors, dem Calciumrezeptor, bereits gezeigt (Ray et al., 1997, 1998). Auch CXCR2, ein Rezeptor des IL-8/CXCL1 und ein Corezeptor für einige Stämme des HIV-2 (Bron et al., 1997), wird in unterschiedlichen Glykoformen exprimiert (Ludwig et al., 2000). CXCR2 besitzt auf der Zelloberfläche *N*-Glykane vom komplexen Typ, während in der Zelle mannosereiche und hybride Kohlenhydrate an das Protein gebunden werden. Die Bedeutung der unterschiedlichen Glykosylierung des CXCR2 ist jedoch noch nicht erkannt. Der HIV-Corezeptor CCR2b ist ebenfalls glykosyliert, jedoch ist

die Bedeutung der *N*-Glykosylierung für die Infektion noch nicht untersucht worden (Preobrazhensky et al., 2000). Diese Beispiele zeigen, dass Rezeptoren, die für die Infektion mit HIV relevant sind, *N*-glykosyliert werden und in unterschiedlichen Glykoformen exprimiert werden können. Eine interessante Hypothese zur Interaktion von Kohlenhydrat- und Proteinstrukturen stellte Ten Feizi vor (2000). In diesem Modell könnten Veränderungen in der Aminosäuresequenz oder unterschiedliche Konformationen eines Proteins die räumliche Struktur eines gegebenen Oligosaccharids beeinflussen. Feizi nannte dies den "Phänotyp" eines Glykans. Eine veränderte Konformation des Zuckers könnte die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen. Würden die unterschiedlichen Konformationen des CXCR4 die räumliche Struktur des *N*-Glykans N11 verändern, könnte es zu einer Änderung der Affinität des Corezeptor zum gp120 kommen, die die Interaktionen des gp120 mit dem CXCR4 beeinflusst.

In der vorliegenden Dissertation wurde erstmals gezeigt, dass die Eliminierung der *N*-Glykosylierung der *N*-terminalen Domäne des HIV-Corezeptors CXCR4, zu einer deutlichen Steigerung der Infektion von Zellen mit dem R5X4 Virus NL-952 führte. Die Schwächung des Immunsystems infizierter Personen durch das HIV-1 vermindert den Druck auf das Virus, sich dem Immunsystem des Wirts entziehen zu müssen. Die Selektion bestimmter HIV-Varianten basiert daher vermehrt auf einer Steigerung der Infektion von Zellen. Die erhöhte Infektion von Zellen durch R5X4 Viren stellt deshalb einen Selektionsvorteil für diese Viren dar und kann zur Entwicklung der schneller replizierenden und virulenteren CXCR4-adaptierten Viren beitragen. Mit dieser Arbeit konnte ein weiterer Hinweis erbracht werden, dass eine Veränderung der *N*-Glykosylierung des CXCR4 die Entstehung von X4 Viren begünstigen kann und zum Wechsel des viralen Tropismus beiträgt. Zukünftige Arbeiten müssen zeigen, ob es im Körper des Menschen unterschiedlichen Glykoformen des CXCR4 oder des CCR5 gibt, die den Tropismus des Virus und die Infektion mit HIV-1 *in vivo* beeinflussen. Die Kenntnisse über Bedeutung der *N*-Glykane bei den molekularen Interaktionen zwischen HIV-1 und den Corezeptoren erweitert unser Wissen im Kampf gegen AIDS.

5 Zusammenfassung

HIV-1 benötigt für die Infektion von Zellen die Bindung des viralen gp120 an den zellulären Rezeptor CD4 und die Interaktion mit den Corezeptoren CXCR4 oder CCR5. Zu Beginn der HIV-Infektion findet man in infizierten Personen CCR5-trope Viren (R5 Viren). Der Ausbruch der Krankheit AIDS korreliert mit dem Auftreten von R5X4-dualtrophen und X4 Viren. Die Bindung des gp120 an CXCR4 und CCR5 wird durch *N*-Glykane beeinflusst, die die Infektiosität und den Zelltropismus des Virus verändern können.

In dieser Dissertation wurde die Bedeutung der *N*-Glykane der Corezeptoren CXCR4 und CCR5 für die Infektion mit HIV-1 untersucht. Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden die *N*-Glykosylierungssignale (NXT/S) des CXCR4 an den Aminosäurepositionen 11-13 und 176-178 entweder alleine oder in Kombination miteinander eliminiert (N11A, T13A, N176Q, S178A und N11A/N176Q). Ferner wurde die potentielle *N*-Glykosylierungsstelle des CCR5 an der Position 268 substituiert und/oder ein zusätzliches *N*-Glykosylierungssignal in den *N*-Terminus des CCR5 eingefügt (N268Q, S270A, Y14N und Y14N/N268Q). Die Glykosylierungsvarianten des CXCR4 und CCR5 wurden in GHOST- und U87-Zellen stabil exprimiert und die Zellen anschließend mit verschiedenen Varianten des HIV-1_{NL4-3} infiziert. Für die Infektion wurden rekombinante Viren eingesetzt, die sich in der V3-Region und in ihrem Tropismus voneinander unterschieden (R5, R5X4 und X4 Viren). Zusätzlich wurden in dieser Arbeit zwei weitere Virusvarianten kloniert (NL-718 und NL-736), deren V3-Region aus einem infizierten Patienten stammt und in das Virus NL4-3 überführt wurde. Anschließend wurde die Corezeptornutzung der rekombinanten Viren NL-718 und NL-736 in einem Zellkultursystem untersucht. In den Infektionsstudien wurde gezeigt:

- (i) Das Einfügen eines *N*-Glykans in den *N*-Terminus des CCR5 (Y14N bzw. Y14N/N268Q) führte zum völligen Verlust der HIV-1 Corezeptoreigenschaften.

-
- (ii) Das Fehlen des *N*-terminalen *N*-Glykans des CXCR4 (N11Q, T13A bzw. N11Q/N176Q) führte zu einer erhöhten Permissivität der GHOST-Zellen für das R5X4-dualtrophe Virus NL-952.
 - (iii) Das Fehlen des *N*-Glykosylierungssignal an der Position 176-178 des CXCR4 (N176A bzw. S178A) und an der Position 268-270 des CCR5 (N268Q bzw. S270A) hatte keinen Einfluss auf die Infektion der Zellen.
 - (iv) Das sich der virale Tropismus eines Virus durch den Austausch der V3-Region auf ein anderes übertragen lässt. Die hergestellten rekombinanten Viren NL-718 und NL-736 waren R5X4-dualtrop. Die *N*-Glykosylierung der V3-Schleife hatte keinen Einfluss auf den Tropismus der Viren.

Der Austausch der V3-Regionen verschiedener Viren ist eine geeignete Methode, den Zelltropismus eines Virus und die Interaktionen der V3-Region mit den Corezeptoren zu untersuchen. Die *N*-Glykosylierung der Corezeptoren spielt dabei eine wichtige Rolle. Eine veränderte *N*-Glykosylierung des CXCR4 stellt einen Selektionsvorteil für die Entwicklung von R5X4 Viren dar und kann daher zu einem Wechsel des viralen Tropismus führen. Damit kann die *N*-terminale Glykosylierung des CXCR4 von großer Bedeutung für die Pathogenese der HIV-Infektion sein.

6 Abstract

Infection with human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) requires binding of viral envelope glycoprotein (gp) 120 to the primary receptor CD4 and interaction with the coreceptors CXCR4 or CCR5. In the early state of infection R5 viruses are predominant. In the late state of infection AIDS progression is correlated with emergence of R5X4 and X4 viruses. Binding of gp120 to CCR5 and CXCR4 is influenced by N-linked glycans leading to enhanced infectivity and changes in coreceptor usage.

In the present study the role of N-linked glycans on CXCR4 and CCR5 for infection with HIV-1 was investigated. Using site-directed mutagenesis the recognition site for N-linked glycans (NXT/S) at position 11-13 and 176-178 of CXCR4 was eliminated, either alone or in combination (N11Q, T13A, N176Q, S178A or N11Q/N176Q). Further, the potential N-linked glycosylation site at position 268-270 of CCR5 was eliminated and/or an additional N-linked glycan was introduced into the N-terminal domain at position 14 (N268Q, S270A, Y14N or Y14N/N268Q). Mutant coreceptors were stably expressed in GHOST and U87 cells and cells were infected with various constructs of HIV-1_{NL4-3}, differing in V3 loop sequence and coreceptor usage (R5, R5X4 or X4). In addition, two recombinant viruses were constructed (NL-718 and NL-736) by exchanging the V3 loop of HIV-1_{NL4-3} with the V3 loop of primary isolates. To determine the coreceptor usage of NL-718 and NL-736, indicator cells were infected. The infection studies have shown:

- (i) The introduction of an N-linked glycan in the N-terminal domain of CCR5 (Y14N or Y14N/N268Q) led to the complete loss of HIV-1 coreceptor function.
- (ii) The lack of the N-terminal glycan of CXCR4 (N11Q, T13A or N11Q/N176Q) led to enhanced permissiveness of GHOST cells for R5X4 virus NL-952.

-
- (iii) The lack of the N-linked glycan at position 176 of CXCR4 (N176Q or S178A) and at position 268 of CCR5 (N268Q or S270A) did not effect the infection of cells.
 - (iv) The exchange of the V3 loop was sufficient for transferring viral tropism. The resulting viruses NL-718 and NL-736 showed R5X4 dualtropism. N-linked glycans of the V3 loop had no influence on viral tropism of NL-718 and NL-736.

Transferring the V3 loop of viruses is a suitable method to investigate the viral tropism and the interactions of the V3 loop with HIV-1 coreceptors. N-linked glycans of CXCR4 and CCR5 are of particular importance for these interactions. A modified N-glycosylation at the N-terminal domain of CXCR4 is an advantage for R5X4 viruses and might lead to the development of X4 viruses. Thus, the N-terminal glycosylation of CXCR4 might be of importance for HIV infection and for AIDS pathogenesis.

7 Literaturverzeichnis

- Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A., und Martin, M.A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* **59**, 284-291.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C.C., Feng, Y., Kennedy, P.E., Murphy, P.M., und Berger, E.A. (1996) CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958.
- Arthos, J., Rubbert, A., Rabin, R.L., Cicala, C., Machado, E., Wildt, K., Hanbach, M., Steenbeke, T.D., Swofford, R., Farber, J.M., und Fauci, A.S. (2000) CCR5 signal transduction in macrophages by human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus envelopes. *J Virol* **74**, 6418-6424.
- Ashorn, P.A., Berger, E.A., und Moss, B. (1990) Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein/CD4-mediated fusion of nonprimate cells with human cells. *J Virol* **64**, 2149-2156.
- Asjo, B., Morfeldt-Manson, L., Albert, J., Biberfeld, G., Karlsson, A., Lidman, K., und Fenyo, E.M. (1986) Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* **2**, 660-662.
- Baggiolini, M., Dewald, B., und Moser, B. (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* **15**, 675-705.
- Bannert, N., Craig, S., Farzan, M., Sogah, D., Santo, N.V., Choe, H., und Sodroski, J. (2001) Sialylated O-glycans and sulfated tyrosines in the NH₂-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines. *J Exp Med* **194 (11)**, 1661-73.
- Baribaud, F. und Doms, R.W. (2001) The impact of chemokine receptor conformational heterogeneity on HIV infection. *Cell Mol Biol* **47 (4)**, 653-60. Baribaud, F., Edwards, T.G., Sharron, M., Brelot, A., Heveker, N., Price, K., Mortari, F., Alizon, M., Tsang, M., und Doms, R.W. (2001) Antigenically distinct conformations of CXCR4. *J Virol* **75**, 8957-67.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., und Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.

- Berger, E.A., Doms, R.W., Fenyo, E.M., Korber, B.T., Littman, D.R., Moore, J.P., Sattentau, Q.J., Schuitemaker, H., Sodroski, J., und Weiss, R.A. (1998) A new classification for HIV-1 [letter]. *Nature* **391**, 240.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blanpain, C., Doranz, B.J., Vakili, J., Rucker, J., Govaerts, C., Baik, S.S., Lorthioir, O., Migeotte, I., Libert, F., Baleux, F., Vassart, G., Doms, R.W., und Parmentier, M. (1999) Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 env protein. *J Biol Chem* **274**, 34719-34727.
- Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., und Springer, T.A. (1996) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**, 829-833.
- Blin, N., von Gabain, A., und Bujard, H. (1975) Isolation of large molecular weight DNA from agarose gels for further digestion by restriction enzymes. *FEBS Lett.* **53**, 84-86.
- Boom, R., Sol, C., und Wertheim-van Dillen, P. (1990) Rapid purification of ribosomal RNAs from neutral agarose gels. *Nucleic Acids Res* **18**, 2195.
- Brelot, A., Heveker, N., Pleskoff, O., Sol, N., und Alizon, M. (1997) Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. *J Virol* **71**, 4744-4751.
- Brelot, A., Heveker, N., Montes, M., und Alizon, M. (2000) Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities. *J Biol Chem* *May* **23**;
- Brennan, R.O. und Durack, D.T. (1981) Gay compromise syndrome. *Lancet* **2**, 1338-1339.
- Bron, R., Klasse, P.J., Wilkinson, D., Clapham, P.R., Pelchen-Matthews, A., Power, C., Wells, T.N., Kim, J., Peiper, S.C., Hoxie, J.A., und Marsh, M. (1997) Promiscuous use of CC and CXC chemokine receptors in cell-to-cell fusion mediated by a human immunodeficiency virus type 2 envelope protein. *J. Virol.* **71**, 8405-8415.
- Carrow, E.W., Vujcic, L.K., Glass, W.L., Seamon, K.B., Rastogi, S.C., Hendry, R.M., Boulos, R., Nzila, N., und Quinnan, G.V., Jr. (1991) High prevalence of antibodies to the gp120 V3 region principal neutralizing determinant of HIV-1 MN in sera from Africa and the Americas. *Aids Res Hum Retroviruses* **7**, 831-838.

- Cecilia, D., Kewalramani, V.N., O'Leary, J., Volsky, B., Nyambi, P., Burda, S., Xu, S., Littman, D.R., und Zolla-Pazner, S. (1998) Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates in the context of coreceptor usage. *J Virol* **72**, 6988-6996.
- Chabot, D.J., Zhang, P.F., Quinnan, G.V., und Broder, C.C. (1999) Mutagenesis of CXCR4 identifies important domains for human immunodeficiency virus type 1 X4 isolate envelope-mediated membrane fusion and virus entry and reveals cryptic coreceptor activity for R5 isolates. *J Virol* **73**, 6598-6609.
- Chabot, D.J., Chen, H., Dimitrov, D.S., und Broder, C.C. (2000) N-linked glycosylation of CXCR4 masks coreceptor function for CCR5- dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* **74** (9), 4404-4413.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., und Kim, P.S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273.
- Chesebro, B., Wehrly, K., Nishio, J., und Perrym an, S. (1996) Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virol* **70**, 9055-9059.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., und Sodroski, J. (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148.
- Choe, H., Farzan, M., Konkel, M., Martin, K., Sun, Y., Marcon, L., Cayabyab, M., Berman, M., Dorf, M.E., Gerard, N., Gerard, C., und Sodroski, J. (1998) The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 6113-6118.
- Clapham, P.R., Blanc, D., und Weiss, R.A. (1991) Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by simian immunodeficiency virus. *Virology* **181**, 703-715.
- Clapham, P.R., McKnight, A., und Weiss, R.A. (1992) Human immunodeficiency virus type 2 infection and fusion of CD4-negative human cell lines: induction and enhancement by soluble CD4. *J Virol* **66**, 3531-3537.
- Clapham, P.R. und McKnight, A. (2002) Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J.Gen.Virol.* **83**, 1809-1829.
- Clapham, P. und McKnight, A. (2001) HIV-1 receptors and cell tropism. *Br Med Bull* **58**:43-59.

- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., und . (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343-346.
- Cocchi, F. , DeVico, A., Garzino-Demo, A. Cara, A., Gallo, R., und Lusso, P. (1996) The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* **2**, 1244-7.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H. und Vogt, P. (1986) Human immunodeficiency viruses. *Science* **232**, 697.
- Connor, R.I., Notermans, D.W., Mohri, H., Cao, Y., und Ho, D.D. (1993) Biological cloning of functionally diverse quasispecies of HIV-1. *Aids Res Hum Retroviruses* **9**, 541-546.
- Connor, R.I. und Ho, D.D. (1994) Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J Virol* **68**, 4400-4408.
- Connor, R.I., Sheridan, K.E., Ceradini, D., Choe, S., und Landau, N.R. (1997) Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp.Med.* **185**, 621-628.
- Crump, M., Gong, J., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J., Baggiolini, M., Sykes, B. und Clark-Lewis, I. (1997) Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *Embo J* **16**, 6996-7007.
- Dalgleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., und Weiss, R.A. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767.
- De Jong, J.J., De Ronde, A., Keulen, W., Tersmette, M., und Goudsmit, J. (1992) Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* **66**, 6777-6780.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di, M.P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R., und Landau, N.R. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of hiv-1 [see comments]. *Nature* **381**, 661-666.
- Deng, H.K., Unutmaz, D., Kewalramani, V.N., und Littman, D.R. (1997) Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**, 296-300.

- Dimitrov, D.S., Willey, R.L., Sato, H., Chang, L.J., Blumenthal, R., und Martin, M.A. (1993) Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. *J Virol* **67**, 2182-2190.
- Dimitrov, D.S., Xiao, X., Chabot, D.J., und Broder, C.C. (1998) HIV coreceptors. *J Membr Biol* **166**, 75-90.
- Dittmar, M.T., McKnight, A., Simmons, G., Clapham, P.R., Weiss, R.A., und Simmonds, P. (1997) HIV-1 tropism and co-receptor use [letter]. *Nature* **385**, 495-496.
- Doms, R.W. und Moore, J.P. (2000) HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J Cell Biol* **151**, 9-14.
- Doms, R.W. (2001) Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in hiv-1 infection. *Virology* **276** (2), 229-237.
- Donaldson, Y.K., Bell, J.E., Holmes, E.C., Hughes, E.S., Brown, H.K., und Simmonds, P. (1994) In vivo distribution and cytopathology of variants of human immunodeficiency virus type 1 showing restricted sequence variability in the V3 loop. *J Virol* **68**, 5991-6005.
- Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G., und Doms, R.W. (1996) A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**, 1149-1158.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P., und Paxton, W.A. (1996) HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673.
- Dumonceaux, J., Nisole, S., Chanel, C., Quivet, L., Amara, A., Baleux, F., Briand, P., und Hazan, U. (1998) Spontaneous mutations in the env gene of the human immunodeficiency virus type 1 NDK isolate are associated with a CD4-independent entry phenotype. *J Virol* **72**, 512-519.
- Endres, M.J., Clapham, P.R., Marsh, M., Ahuja, M., Turner, J.D., McKnight, A., Thomas, J.F., Stoebenau-Haggarty, B., Choe, S., Vance, P.J., Wells, T.N., Power, C.A., Sutterwala, S.S., Doms, R.W., Landau, N.R., und Hoxie, J.A. (1996) CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* **87**, 745-756.
- Farzan, M., Choe, H., Martin, K., Marcon, L., Hofmann, W., Karlsson, G., Sun, Y., Barrett, P., Marchand, N., Sullivan, N., Gerard, N., Gerard, C., und Sodroski, J. (1997) Two orphan seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection. *J Exp.Med.* **186**, 405-411. Farzan, M., Choe, H., Vaca, L., Martin, K., Sun, Y., Desjardins, E., Ruffing, N., Wu, L., Wyatt, R., Gerard, N., Gerard, C., und Sodroski, J. (1998) A tyrosine-rich region in the N-terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5. *J Virol* **72**, 1160-1164.

- Farzan, M., Mirzabekov, T., Kolchinsky, P., Wyatt, R., Cayabyab, M., Gerard, N.P., Gerard, C., Sodroski, J., und Choe, H. (1999) Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* **96**, 667-676.
- Federspiel, B., Melhado, I.G., Duncan, A.M., Delaney, A., Schappert, K., Clark-Lewis, I., und Jirik, F.R. (1993) Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics* **16**, 707-712.
- Feizi, T. (2000) Glycobiology of AIDS. In: *Carbohydrates in Chemistry and Biology*. Part II, Vol. 4. Ernst, B., Hart, G.W. und Sinaÿ, P. (Hrsg), 850-866.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., und Berger, E.A. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* **272**, 872-877.
- Fenyo, E.M., Morfeldt-Manson, L., Chiodi, F., Lind, B., von Gegerfelt, A., Albert, J., Olausson, E., und Asjo, B. (1988) Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol* **62**, 4414-4419.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J. und Safai, B. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M., und Hahn, B.H. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**, 436-441.
- Gartner, S., McDonald, R.A., Hunter, E.A., Bouwman, F., Liu, Y., und Popovic, M. (1997) Gp120 sequence variation in brain and in T-lymphocyte human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *J Hum Virol* **1**, 3-18.
- Geyer, H., Holschbach, C., Hunsmann, G., und Schneider, J. (1988) Carbohydrates of human immunodeficiency virus. structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. *J Biol Chem* **263**, 11760-11767.
- Gottlieb, G.J., Ragaz, A., Vogel, J.V., Friedman-Kien, A., Rywlin, A.M., Weiner, E.A., und Ackerman, A.B. (1981) A preliminary communication on extensively disseminated Kaposi's sarcoma in young homosexual men. *Am.J Dermatopathol.* **3**, 111-114.
- Guillon, C., van der Ende, M.E., Boers, P.H., Gruters, R.A., Schutten, M., und Osterhaus, A.D. (1998) Coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 2 primary isolates and biological clones is broad and does not correlate with their syncytium-inducing capacities. *J Virol* **72**, 6260-6263.

- Hwang, S.S., Boyle, T.J., Lyerly, H.K., und Cullen, B.R. (1991) Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**, 71-74.
- Innis, M.S., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., und Brown, M.A. (1992) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Biotechnology* **24**, 6-10.
- Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Kanbe, K., Shimizu, N., Soda, Y., Takagishi, K., und Hoshino, H. (1999) A CXC chemokine receptor, CXCR5/BLR1, is a novel and specific coreceptor for human immunodeficiency virus type 2. *Virology* **265**, 264-273.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C., und Montagnier, L. (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-768.
- Köller, H., Schaal, H., Freund, M., Garrido, S.R., von Giesen, H.J., Ott, M., Rosenbaum, C., und Arendt, G. (2001) HIV-1 protein Tat reduces the glutamate-induced intracellular Ca²⁺ increase in cultured cortical astrocytes. *Eur.J Neurosci.* **14**, 1793-1799.
- Kuhmann, S.E., Platt, E.J., Kozak, S.L., und Kabat, D. (1997) Polymorphisms in the CCR5 genes of african green monkeys and mice implicate specific amino acids in infections by simian and human immunodeficiency viruses. *J Virol* **71**, 8642-8656.
- Kuhmann, S.E., Platt, E.J., Kozak, S.L., und Kabat, D. (2000) Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**, 7005-7015.
- Kunkel, T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 488-492.
- Kwong, P., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R., Sodroski, J., und Hendrickson, W.A. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648-59.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lapham, C.K., Ouyang, J., Chandrasekhar, B., Nguyen, N.Y., Dimitrov, D.S., und Golding, H. (1996) Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* **274**, 602-605.

- Lasky, L.A., Groopman, J.E., Fennie, C.W., Benz, P.M., Capon, D.J., Dowbenko, D.J., Nakamura, G.R., Nunes, W.M., Renz, M.E., und Berman, P.W. (1986) Neutralization of the AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein. *Science* **233**, 209-212.
- Layne, S.P., Merges, M.J., Dembo, M., Spouge, J.L., und Nara, P.L. (1990) HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection. *Nature* **346**, 277-279.
- Lee, M.K., Heaton, J., und Cho, M.W. (1999) Identification of determinants of interaction between CXCR4 and gp120 of a dual-tropic HIV-1DH12 isolate. *Virology* **257**, 290-296.
- Lee, W.R., Syu, W.J., Du, B., Matsuda, M., Tan, S., Wolf, A., Essex, M., und Lee, T.H. (1992) Nonrandom distribution of gp120 N-linked glycosylation sites important for infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2213-2217.
- Leonard, C.K., Spellman, M.W., Riddle, L., Harris, R.J., Thomas, J.N., und Gregory, T.J. (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**, 10373-10382.
- Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M., und Oshiro, L.S. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**, 840-842.
- Levy, J.A. (1998) HIV and the Pathogenesis of AIDS. Second Edition, ASM Press, Washington D. C., USA.
- Li, Y., Luo, L., Rasool, N., und Kang, C.Y. (1993) Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J Virol* **67**, 584-588.
- Li, Y., Rey-Cuille, M.A., und Hu, S.L. (2001) Short communication: N-linked glycosylation in the V3 region of hiv type 1 surface antigen modulates coreceptor usage in viral infection. *Aids Res Hum Retroviruses* 2001 Nov 1;17(16):1473-9. **17**, 1473-1479.
- Ludwig, A., Ehlert, J.E., Flad, H.D., und Brandt, E. (2000) Identification of distinct surface-expressed and intracellular CXC-chemokine receptor 2 glycoforms in neutrophils: N-glycosylation is essential for maintenance of receptor surface expression. *J.Immunol.* **165**, 1044-1052.
- Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A., und Axel, R. (1986) The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**, 333-348.

- Malenbaum, S.E., Yang, D., Cavacini, L., Posner, M., Robinson, J., und Cheng-Mayer, C. (2000) The N-terminal v3 loop glycan modulates the interaction of clade a and b human immunodeficiency virus type 1 envelopes with cd4 and chemokine receptors. *J Virol* **74** (23):11008-16.
- McKnight, A., Dittmar, M.T., Moniz-Periera, J., Ariyoshi, K., Reeves, J.D., Hibbitts, S., Whitby, D., Aarons, E., Proudfoot, A.E., Whittle, H., und Clapham, P.R. (1998) A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4. *J Virol* **72**, 4065-4071.
- Melikyan, G.B., Markosyan, R.M., Hemmati, H., Delmedico, M.K., Lambert, D.M., und Cohen, F.S. (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**, 413-423.
- Mizuochi, T., Spellman, M.W., Larkin, M., Solomon, J., Basa, L.J., und Feizi, T. (1988) Carbohydrate structures of the human-immunodeficiency-virus (HIV) recombinant envelope glycoprotein gp120 produced in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem.J.* **254**, 599-603.
- Modrow, S. & Falke, D. (1997) Molekulare Virologie. Spektrum Verlag GmbH, Heidelberg.
- Morgenstern, J.P. und Land, H. (1990) Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper- free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**, 3587-3596.
- Müller, H. (1999) Geno- und Phänotypische Charakterisierung von neutralisationsresistenten HIV-1 Patientenisolaten und deren Bedeutung für den Verlauf der Erkrankung. Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Bremen.
- Mullis, K. und Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Murphy, P., Baggiolini, M., Charo, I., Hebert, C., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L., Oppenheim, J., und Power, C.A. (2000) International union of pharmacology. XXII. nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52** (1), 145-76.
- Murray, V. (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **17**, 8889.
- Nakayama, E.E., Shioda, T., Tatsumi, M., Xin, X., Yu, D., Ohgimoto, S., Kato, A., Sakai, Y., Ohnishi, Y., und Nagai, Y. (1998) Importance of the N-glycan in the V3 loop of HIV-1 envelope protein for CXCR4- but not CCR5-dependent fusion. *FEBS Lett* **426**, 367-372.

- Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., Loetscher, M., Baggiolini, M., und Moser, B. (1996) The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **382**, 833-835.
- Ogert, R.A., Lee, M.K., Ross, W., Buckler-White, A., Martin, M.A., und Cho, M.W. (2001) N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J Virol* **75**, 5998-6006.
- Orsini, M.J., Parent, J.L., Mundell, S.J., Benovic, J.L., und Marchese, A. (1999) Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol. Chem.* **274**, 31076-31086.
- Owman, C., Garzino-Demo, A., Cocchi, F., Popovic, M., Sabirsh, A., und Gallo, R.C. (1998) The leukotriene B4 receptor functions as a novel type of coreceptor mediating entry of primary HIV-1 isolates into CD4-positive cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 9530-9534.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le, T., I, Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., und Miyano, M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745.
- Paulson, J.C. (1989) Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem. Sci.* **14**, 272-276.
- Picard, L., Wilkinson, D.A., McKnight, A., Gray, P.W., Hoxie, J.A., Clapham, P.R., und Weiss, R.A. (1997) Role of the amino-terminal extracellular domain of CXCR-4 in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Virology* **231**, 105-111.
- Pleskoff, O., Treboute, C., Brelot, A., Heveker, N., Seman, M., und Alizon, M. (1997) Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* **276**, 1874-1878.
- Polzer, S., Dittmar, M.T., Schmitz, H., Meyer, B., Muller, H., Krausslich, H.G., und 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**), 11-19.
- Polzer, S. (2002) Bedeutung von N-Glykanen im V3-Bereich des HIV-1 Hüllproteins gp120 für die Korezeptornutzung und Neutralisierbarkeit von HIV-1. Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- Polzer, S., Dittmar, M., Schmitz, H. und Schreiber, M. (2002) The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism and neutralisation. *Virology* (im Druck).

- Potempa, S., Picard, L., Reeves, J.D., Wilkinson, D., Weiss, R.A., und Talbot, S.J. (1997) CD4-independent infection by human immunodeficiency virus type 2 strain ROD/B: the role of the N-terminal domain of CXCR-4 in fusion and entry. *J. Virol.* **71**, 4419-4424.
- Preobrazhensky, A.A., Dragan, S., Kawano, T., Gavrilin, M.A., Gulina, I.V., Chakravarty, L., und Kolattukudy, P.E. (2000) Monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2B is a glycoprotein that has tyrosine sulfation in a conserved extracellular N-terminal region. *J. Immunol.* **165**, 5295-5303.
- Puffer, B.A., Sharron, M., Coughlan, C.M., Baribaud, F., McManus, C.M., Lee, B., David, J., Price, K., Horuk, R., Tsang, M., und Doms, R.W. (2000) Expression and coreceptor function of APJ for primate immunodeficiency viruses. *Virology* **276**, 435-444.
- Rabehi, L., Seddiki, N., Benjouad, A., Gluckman, J., und Gattegno, L. (1998) Interaction of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein V3 loop with CCR5 and CD4 at the membrane of human primary macrophages. *Aids Res Hum Retroviruses* **14**, 1605-15.
- Rademacher, T.W. und Dwek, R.A. (1989) The role of oligosaccharides in modifying protein function. *Ciba Found. Symp.* **145**, 241-255.
- Rands, E., Candelore, M.R., Cheung, A.H., Hill, W.S., Strader, C.D., und Dixon, R.A. (1990) Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. *J. Biol. Chem.* **265**, 10759-10764.
- Ray, K., Fan, G.F., Goldsmith, P.K., und Spiegel, A.M. (1997) The carboxyl terminus of the human calcium receptor. Requirements for cell-surface expression and signal transduction. *J Biol. Chem.* **272**, 31355-31361.
- Ray, K., Clapp, P., Goldsmith, P.K., und Spiegel, A.M. (1998) Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. *J Biol. Chem.* **273**, 34558-34567.
- Reeves, J.D., McKnight, A., Potempa, S., Simmons, G., Gray, P.W., Power, C.A., Wells, T., Weiss, R.A., und Talbot, S.J. (1997) CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): use of the 7-transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3, and V28 for entry. *Virology* **231**, 130-134.
- Reeves, J.D., Hibbitts, S., Simmons, G., McKnight, A., Azevedo-Pereira, J.M., Moniz-Pereira, J., und Clapham, P.R. (1999) Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo. *J Virol* **73**, 7795-7804.
- Reeves, J.D. und Doms, R.W. (2002) Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen. Virol* **83**, 1253-1265.
- Rodriguez-Frade, J., Mellado, M.A., und Martinez-A, C. (2002) Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol* **22**, 612-7.

- Ross, T.M., Oran, A.E., und Cullen, B.R. (1999) Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr.Biol.* **9**, 613-621.
- Rudd, P.M., Joao, H.C., Coghil, E., Fiten, P., Saunders, M.R., Opdenakker, G., und Dwek, R.A. (1994) Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme. *Biochemistry* **33**, 17-22.
- Saha, K., Zhang, J., Gupta, A., Dave, R., Yimen, M., und Zerhouni, B. (2001) Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor. *Nat.Med.* **7**, 65-72.
- Saiki, R., Bugawan, T., Horn, G., Mullis, K., und Erlich, H.A. (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and hla-dq alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**, 163-6.
- Sakaida, H., Hori, T., Yonezawa, A., Sato, A., Isaka, Y., Yoshie, O., Hattori, T., und Uchiyama, T. (1998) T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J Virol* **72**, 9763-9770.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. N. Ford, C. Nolan und M. Ferguson, eds. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G., und Parmentier, M. (1996) Molecular cloning and functional expression of a new human CC- chemokine receptor gene. *Biochemistry* **35**, 3362-3367.
- Samson, M., LaRosa, G., Libert, F., Paindavoine, P., Detheux, M., Vassart, G., und Parmentier, M. (1997) The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J Biol.Chem.* **272**, 24934-24941.
- Samson, M., Edinger, A.L., Stordeur, P., Rucker, J., Verhasselt, V., Sharron, M., Govaerts, C., Mollereau, C., Vassart, G., Doms, R.W., und Parmentier, M. (1998) ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur.J Immunol.* **28**, 1689-1700.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* **24**, 104-108.
- Scarlatti, G., Tresoldi, E., Bjorndal, A., Fredriksson, R., Colognesi, C., Deng, H.K., Malnati, M.S., Plebani, A., Siccardi, A.G., Littman, D.R., Fenyo, E.M., und Lusso, P. (1997) In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat.Med.* **3**, 1259-1265.
- Schonning, K., Jansson, B., Olofsson, S., und Hansen, J.E. (1996) Rapid selection for an N-linked oligosaccharide by monoclonal antibodies directed against the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen.Virol* **77 (4)**, 753-758.

- Schreiber, M., Wachsmuth, C., Muller, H., Odemuyiwa, S., Schmitz, H., Meyer, S., Meyer, B., und Schneider-Mergener, J. (1997) The V3-directed immune response in natural human immunodeficiency virus type 1 infection is predominantly directed against a variable, discontinuous epitope presented by the gp120 V3 domain. *J Virol* **71**, 9198-9205.
- Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, N.A., Dercksen, M.W., de Goede, R.E., van Steenwijk, R.P., Lange, J.M., Schattenkerk, J.K., Miedema, F., und Tersmette, M. (1992) Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population. *J. Virol.* **66**, 1354-1360.
- Sharp, P.M., Robertson, D.L., und Hahn, B.H. (1995) Cross-species transmission and recombination of 'AIDS' viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **349**, 41-47.
- Shimizu, N., Soda, Y., Kanbe, K., Liu, H.Y., Mukai, R., Kitamura, T., und Hoshino, H. (2000) A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **74**, 619-626.
- Signoret, N., Pelchen-Matthews, A., Mack, M., Proudfoot, A.E., und Marsh, M. (2001) Endocytosis and recycling of the hiv coreceptor CCR5. *J Cell Biol* **151** (6), 1281-1294.
- Simmons, G., Reeves, J.D., McKnight, A., Dejuq, N., Hibbitts, S., Power, C.A., Aarons, E., Schols, D., De, C.E., Proudfoot, A.E., und Clapham, P.R. (1998) CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *J Virol* **72**, 8453-8457.
- Strizki, J., Turner, J., Collman, R., Hoxie, J., und Gonzalez-Scarano, F. (1997) A monoclonal antibody (12G5) directed against CXCR-4 inhibits infection with the dual-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolate HIV-1(89.6) but not the T-tropic isolate HIV-1(HXB). *J Virol* **71**, 5678-83.
- Tersmette, M., de Goede, R.E., Al, B.J., Winkel, I.N., Gruters, R.A., Cuypers, H.T., Huisman, H.G., und Miedema, F. (1988) Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J. Virol.* **62**, 2026-2032.
- Tersmette, M., Gruters, R.A., de Wolf, F., de Goede, R.E., Lange, J.M., Schellekens, P.T., Goudsmit, J., Huisman, H.G., und Miedema, F. (1989) Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J. Virol.* **63**, 2118-2125.
- Thordsen, I., Polzer, S. und Schreiber, M. (2002) Infection of cells expressing CXCR4 mutants lacking N-glycosylation at the N-terminal extracellular domain is enhanced for R5X4-dualtropic human immunodeficiency virus type-1. *BMC Infectious Diseases* (im Druck).

- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Allaway, G.P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P.J., und Moore, J.P. (1996) CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **384**, 184-187.
- Trouplin, V., Salvatori, F., Cappello, F., Obry, V., Brelot, A., Heveker, N., Alizon, M., Scarlatti, G., Clavel, F., und Mammano, F. (2001) Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J Virol* **75**, 251-259.
- Valente, S.T., Chanel, C., Dumonceaux, J., Olivier, R., Marullo, S., Briand, P., und Hazan, U. (2001) Cxcr4 is down-regulated in cells infected with the CD4- independent x4 human immunodeficiency virus type 1 isolate M7MDK. *J Virol* **75**, 439-447.
- UNAIDS/WHO (2001) AIDS epidemic update December 2001. UNAIDS/01.74EWHO/CDC/CSR/NCS2001.2. ISBN 92-9173-132-3.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J., und Wiley, D.C. (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-430.
- Wu, L., Gerard, N.P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A.A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C., und Sodroski, J. (1996) CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179-183.
- Wyatt, R., Kwong, P.D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson, W.A., und Sodroski, J.G. (1998) The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705-711.
- Wyatt, R. und Sodroski, J. (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-1888.
- Yi, Y., Rana, S., Turner, J.D., Gaddis, N., und Collman, R.G. (1998) CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5-independent infection by dual-tropic but not T-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 772-777.
- Yonezawa, A., Hori, T., Takaori-Kondo, A., Morita, R., und Uchiyama, T. (2001) Replacement of the V3 region of gp120 with SDF-1 preserves the infectivity of T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75** (9), 4258-4267.
- Zhou, H. und Tai, H.H. (1999) Characterization of recombinant human cxcr4 in insect cells: role of extracellular domains and n-glycosylation in ligand binding. *Arch Biochem Biophys* **369**, 267-276.
- Zwart, G., Langedijk, H., van der, H.L., De Jong, J.J., Wolfs, T.F., Ramautarsing, C., Bakker, M., De Ronde, A., und Goudsmit, J. (1991) Immunodominance and antigenic variation of the principal neutralization domain of HIV-1. *Virology* **181**, 481-489.

Anhang 1: **Abkürzungen und Schreibweisen**

Aufgeführt sind häufig verwendete Abkürzungen und Schreibweisen. Allgemeine Schreibweisen sowie und physikalische Größen und Einheiten sind nicht erläutert.

<i>ad</i>	zu
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
Acc.-Nr.	<i>Accession</i> -Nummer
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrom</i>
amp	Ampicillin
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
BCA-#	<i>B cell-activating chemokine</i> -#
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CCR/L	CC-(β)-Chemokinrezeptor bzw -Ligand
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy desoxyribonucleic acid</i>
CIAP	<i>calf intestine alkalic phosphatase</i>
CXCR/L	CXC-(α)-Ckemokinrezeptor bzw. Ligand
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
div.	diverse
DMEM	<i>Dubleco's Modified Egle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol

dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
ECL	<i>extracellular loop</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzym-linked Immunosorbent Assay</i>
Env, <i>env</i>	<i>envelope</i> Protein bzw Gen
<i>et al.</i>	lateinisch: <i>et alii</i> , und andere
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Gag, <i>gag</i>	<i>group specific antigen</i> , virales Strukturprotein bzw. Gen
GenTSV	Gentechniksicherheitsverordnung
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GHOST	humane Osteosarcomazelllinie, ggf. stabil transfiziert mit einem Corezeptor (zum Beispiel GHOST.CXCR4)
gp	Glykoprotein
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>
GRO	<i>growth-related oncogene</i>
HCC-#	<i>hemofiltrate CC chemokine-#</i>
HeLa	human Cervixkarzinomzelllinie
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HIV	Humane Immundefizienzvirus
ICAM-#	<i>intracellular adhesion molecule-#</i>
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani
LFA-#	<i>lymphocyte function-associated antigen-#</i>
LTR	<i>long terminal repeats</i>
M	Molar
min	Minute
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
MIP-#	<i>macrophage inflammatory protein-#</i>
MCP-#	<i>monocyte chemoattractant protein-#</i>
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>

mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
N11Q	Aminosäureaustausch an Position 11 eines Proteins von Asparagin nach Glutamin (beispielhaft)
Nef, <i>nef</i>	<i>negative factor</i> , Protein bzw. Gen
neo	Neomycin
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]
puro	Puromycin
pH	lateinisch: <i>pondus hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PI	Patientenisolat
Pol, <i>pol</i>	Polymerase, Vorläuferprotein bzw. Gen der viralen Polymerase, Reversen Transkriptase und Integrase
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
RANTES	<i>regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>
Rev	<i>regulator of expression of virion proteins</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonucleinsäure
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
SDF-#	<i>stromal cell-derived factor-#</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

TARC	<i>thymus- and activation-related chemokine</i>
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCID ₅₀	<i>tissue culture infectious dose</i> : Volumen (ml) einer viralen Lösung bei der 50 % der Zellen einer Kultur infiziert werden
TE	Tris-EDTA
TECK	<i>thymus-expressed chemokine</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TCL	<i>thin layer chromatography</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i>
U87	humane, embryonale Nierenzelllinie, ggf. stabil transfiziert mit einem Corezeptor (z. B. U87.CXCR4)
UTR	<i>untranslated regions</i>
UV	Ultraviolett
V3	variable Region (hier, dritte)
Vif	<i>viral infectivity factor</i>
Vpr	<i>viral protein r</i>
Vpu	<i>viral protein u</i>
WT	Wild-Typ
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Anhang 2: Aminosäuren

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

Anhang 3: Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Schematischer Aufbau des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1 . . .	4
Abb. 2:	Der Replikationszyklus des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1 . . .	6
Abb. 3:	Graphische Darstellung der Hüllproteine des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1	8
Abb. 4:	Graphische Darstellung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5	14
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Herstellung der Vektoren pNL-952 und pNL-991	24
Abb. 6:	Darstellung des Vektors pBABE-puro	26
Abb. 7:	Aminosäuresequenz des CXCR4 und des CCR5 sowie deren Mutanten	62
Abb. 8:	Agarose-Gelelektrophorese der retroviralen Vektoren pBABE-puro.CXCR4 und pBABE-puro.CCR5	63
Abb. 9:	Vergleich der Expression des CXCR4 und dessen Mutanten	66
Abb. 10:	Vergleich der Expression des CCR5 und dessen Mutanten	67
Abb. 11:	Analyse der Rezeptoraktivität der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5	69
Abb. 12:	Vergleich der Aminosäuresequenz unterschiedlicher V3-Regionen des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1	71
Abb. 13:	Agarose-Gelelektrophorese der präparierten DNA der V3-Region und der rekombinanten <i>env</i> -Fragmente des Humanen Immundefizienzvirus Typ-1	73
Abb. 14:	Charakterisierung des Zelltropismus der rekombinanten Viren NL-718 und NL-736	74
Abb. 15:	Replikationskinetik der Viren NL4-3 und NL4-3 _(-g14, -g15) in CXCR4 exprimierenden GHOST-Zellen	78
Abb. 16:	Replikationskinetik der Viren NL-952 und NL952 _(-g13, -g14, -g15, -g17) in CXCR4 exprimierenden GHOST-Zellen	79

Abb. 17: Replikationskinetik der Viren NL-991 und NL-991 _(-g15) in CXCR4 exprimierenden GHOST-Zellen	80
Abb. 18: Replikationskinetik der Viren NL4-3 und NL4-3 _(-g14, -g15) in CXCR4 exprimierenden U87-Zellen	81
Abb. 19: Replikationskinetik der Viren NL-952 und NL952 _(-g13, -g14, -g15, -g17) in CXCR4 exprimierenden U87-Zellen	82
Abb. 20: Replikationskinetik der Viren NL-991 und NL-991 _(-g15) in CXCR4 exprimierenden U87-Zellen	83
Abb. 21: Replikationskinetik der Viren NL4-3 und NL4-3 _(-g14, -g15) in CCR5 exprimierenden GHOST-Zellen	86
Abb. 22: Replikationskinetik der Viren NL-952 und NL952 _(-g13, -g14, -g15, -g17) in CCR5 exprimierenden GHOST-Zellen	87
Abb. 23: Replikationskinetik der Viren NL-991 und NL-991 _(-g15) in CCR5 exprimierenden GHOST-Zellen	88
Abb. 24: Replikationskinetik der Viren NL-952 und NL952 _(-g13, -g14, -g15, -g17) in CCR5 exprimierenden U87-Zellen	89
Abb. 25: Replikationskinetik der Viren NL-991 und NL-991 _(-g15) in CCR5 exprimierenden U87-Zellen	90
Abb. 26: Darstellung der Ladungsverteilung in den extrazellulären Domänen des CXCR4 und des CCR5	100
Abb. 27: Hypothetisches Modell der Bedeutung der <i>N</i> -Glykosylierung des CXCR4 und des CCR5	101
Tab. 1: Übersicht über die Corezeptoren primater Lentiviren	10
Tab. 2: Darstellung der verwendeten HIV-1 _{NL4-3} Chimären und deren Zelltropismus	25
Tab. 3: Zusammenfassung der hergestellten Mutanten des CXCR4 und des CCR560
Tab. 4: Vergleich der Ladungsverhältnisse der verwendeten Viren und der Corezeptoren CXCR4 und CCR5	98

Anhang 4: Veröffentlichungen

Thordsen, I., Polzer, S., Schreiber, M. (2002) Infection of cells expressing CXCR4 mutants lacking N-glycosylation at the N-terminal extracellular domain is enhanced for R5X4-dualtropic human immunodeficiency virus type-1. *BMC Infectious Diseases* (im Druck).

Thordsen, I., Polzer, S., Schreiber, M. (2002). Importance of the N-glycan pattern of HIV-1 coreceptors CXCR4 and CCR5 for viral replication. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Erlangen (Vortrag).

Thordsen, I., Polzer, S., Schreiber, M. (2001). Influence of N-glycosylation of HIV-1 coreceptor CXCR4 on viral replication. Symposium of the Resource Center Glycostructures in Biological Systems - Synthesis and Function. Hamburg (Poster).

Hauser, H., Thordsen, I., Dietrich, M., Schmitz, H., terMeulen, J., Schreiber, M. (2002). Frequency of V3-loop sequences showing the lack of N-linked glycosylation sites in HIV-1 clades A, C and B and in characterized viral strains and primary isolates. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Erlangen (Poster).