

Aus dem  
Institut für Virologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Professor Dr. W. Hengel

**UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONALITÄT VON HIV-1-ENV-  
WILDTYPEN IN DER ZELLKULTUR**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Sebastian Grund

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit  
Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekanin / Dekan:

Referentin / Referent:

Korreferentin / Korreferent:

## **Abstract**

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Fusionsaktivität von HIV-1-Wildtyp-Glykoproteinen in Korezeptor-exprimierenden Zellkulturen (HeLa-T4, HeLa-T4/R5-Zellen) zu untersuchen. In einem eukaryotischen Expressionsvektor, welcher die Expression weiterer HIV-Proteine ausschließt, wurden die 2322 N-terminalen Nukleotide des env-Gens des HIV-Laborisolates pNL4-3 durch Wildtypsequenz ersetzt. Diese Sequenz entspricht nahezu dem gesamten env und war zuvor mittels eines selbst etablierten PCR-Protokolls aus infizierten peripheren Blutlymphozyten (PBL) amplifiziert worden. Nach der Transfektion zeigten sechs der sieben Plasmide, welche die Wildtypsequenz enthielten, keinerlei Fusionsaktivität, obwohl ursprünglich alle bis auf ein Isolat (P420) in der PBL-Kultur Syncytien-induzierend waren. Lediglich ein rekombinanter Wildtypvektor (P134) zeigte eine schwache Ausbildung von Syncytien, welche jedoch von der erwarteten starken Fusionsaktivität des Kontrollisolates pNL4-3 bei weitem übertroffen wurde. Mittels RIPA, IFT und Immunoblot konnte bei den Wildtypvektoren eine intrazelluläre gp160-Expression nachgewiesen werden. Eine Analyse der Nukleotidsequenzen (Sequenzierung) ergab darüber hinaus eine Konservierung der gp160-Spaltstellen aller Isolate, wodurch eine Mutation der proteolytischen Spaltstellen der klonierten Glykoproteine als Ursache für die fehlende Fusionskapazität ausgeschlossen wurde. Voruntersuchungen anderer Arbeitsgruppen zum Einfluß des V3-loops auf die Fusionskapazität von HIV-1, welche mit einem Teil der gleichen HIV-Wildisolate in einem leicht veränderten Plasmidkontext durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass die ausbleibende Syncytienbildung der Wildtypisolate nicht ausschließlich durch die V3-loop-Wildtypsequenzen erklärbar ist. Die gefundenen Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Fähigkeit von pNL4-3-env, in Korezeptor-exprimierenden HeLa-Zellen Fusionen zu bilden, eine Besonderheit von pNL4-3 ist, welche für die Mehrheit der Wildtyp-Env-Proteine nicht repräsentativ ist. Es scheinen wesentliche Unterschiede zwischen dem adaptierten Laborstamm-Env und Wildtyp-Env vorzuliegen.

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
1.1	Geschichte der humanen Retroviren.....	9
1.2	Genom und Proteine des HIV-1-Virus .....	10
1.3	Aufbau des HIV-1-Partikels.....	11
1.4	Replikationszyklus des HIV .....	12
1.5	Das HIV-Glykoprotein.....	13
1.5.1	Struktur von gp160, gp120 und gp41 .....	13
1.5.2	Proteinprozessierung des Glykoproteins im Zellapparat .....	16
1.5.3	HIV-Glykoprotein und Membranfusion.....	17
1.6	Rezeptoren und Korezeptoren des HIV-Glykoproteins .....	18
1.6.1	Der CD4-Rezeptor als Hauptrezeptor des HIV .....	18
1.6.2	Chemokin-Bindungsstellen als Korezeptoren des HIV .....	19
1.7	HIV-Subtypen.....	20
1.8	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>25</b>
2.1	HIV-Isolierung in der Zellkultur .....	25
2.1.1	Periphere Blutlymphozyten (PBL)-Kulturen .....	26
2.1.2	Makrophagenkulturen .....	27
2.1.3	Tropismus von HIV-1-Wildtyp-Isolaten.....	27
2.2	Rekombinante DNA-/RNA-Techniken.....	29
2.2.1	Etablierung eines PCR-Protokolls zur Amplifikation von HIV-1-env .....	29
2.2.2	Amplifikation von HIV-1-Wildtyp-env aus proviraler HIV-DNA .....	35
2.2.2.1	DNA-Extraktion aus Probenmaterial .....	35
2.2.2.2	PCR-Amplifikation der extrahierten DNA .....	35
2.2.3	Amplifikation von HIV-1-Wildtyp-env aus HIV-positiven Seren und Liquores .....	35
2.2.3.1	RNA-Extraktion aus Probenmaterial .....	35
2.2.3.2	Reverse Transkription und PCR der extrahierten RNA.....	35

2.2.3.2.1	Two-Step-RT-PCR.....	36
2.2.3.2.2	One-Step-RT-PCR .....	37
2.2.4	Klonierung von HIV-1-env in Expressionsplasmide, Transfektion in Zellreihen ....	37
2.2.4.1	Klonierung von env in Expressionsplasmide, Transfektion in Prokaryonten.....	37
2.2.4.2	Plasmid-DNA-Isolierung, -Reinigung und -Sequenzierung .....	40
2.2.4.3	Transfektion von HIV-1-env-Expressionsvektoren in Eukaryonten.....	40
2.2.4.4	Aufarbeitung der Zellkultur für Proteinnachweise, Transfektionseffizienz.....	41
<b>2.3</b>	<b>Syncytien-Assay und Proteinnachweise von HIV-1-Env .....</b>	<b>44</b>
2.3.1	Syncytien-Assay.....	44
2.3.2	Immunoblot (Western-Blot).....	46
2.3.3	Radioimmunopräzipitation (RIPA).....	46
2.3.4	Immunfluoreszenz (IFT) .....	47
<b>2.4</b>	<b>Subgenomische HIV-1-Expressionsvektoren.....</b>	<b>48</b>
2.4.1	pNLA1-Derivate.....	48
2.4.2	pSG-Derivate.....	50
2.4.2.1	Herstellung von pSGenvdel1BbsI als Expressionsplasmid für HIV-1- env .....	51
2.4.2.2	pSGpNLA1tat als Expressionsplasmid für HIV-1-Wildtyp-env .....	55
2.4.2.3	pSGpNLA1rev .....	56
2.4.3	pGL3 <sup>®</sup> , Lieferant des Luciferase-Gens .....	56
<b>3</b>	<b>RESULTATE .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>Amplifikation und Klonierung von HIV-1-env .....</b>	<b>58</b>
3.1.1	Etablierung der HIV-1-env-PCR am Isolat pNL4-3 .....	58
3.1.2	Amplifikation und Klonierung von Wildtyp-env aus DNA-Proben .....	60
3.1.3	Amplifikation und Klonierung von Wildtyp-env aus RNA-Proben .....	65
3.1.3.1	Two-Step-RT-PCR von HIV-1-env .....	66
3.1.3.2	One-Step-RT-PCR von HIV-1-env.....	67
3.1.4	Herstellung des Expressionsplasmids pSGenvdel1BbsI.....	68
<b>3.2</b>	<b>Sequenzierung und Analyse der HIV-1-env-Wildsequenzen .....</b>	<b>68</b>
3.2.1	Sequenz und Ladung des „V3-loops“ .....	68
3.2.2	Spaltstelle von gp 120 und gp 41 .....	70
<b>3.3</b>	<b>Funktionalität von HIV-1-Env-Wildtypen in Eukaryonten-Zellkulturen.....</b>	<b>71</b>

---

<b>3.4</b>	<b>Proteinnachweise des Env in HeLa-Zellkulturen.....</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Funktionalität von HIV-1-Env-Wildtypen in HeLa-Zellreihen.....</b>	<b>77</b>
<b>4.2</b>	<b>Methodischer Ansatz.....</b>	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>104</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
BSA	Rinderserum-Albumin
bp	Basenpaare
CA	Kapsid-Protein
CPE	cytopathischer Effekt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Env	HIV-Glykoprotein
Env	envelope, Gen des HIV-Glykoproteins
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötale Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Gp	Glykoprotein
HIV-1	Human-Immuno-Deficiency-Virus Typ 1
IL-2	Interleukin-2
LB-Medium	Luria Broth Base Medium
LTR	long terminal repeat
MA	HIV-Matrix-Protein (p17)
MHC	major histocompatibility complex
Min	Minuten
M-trope Isolate	Makrophagen-trope Isolate
NC	Nukleokapsid-Protein
NSI	nicht-Syncytien-induzierend
OD	optische Dichte
pA	Polyadenylierungssignal
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	$-\log [H^+]$
PHA-P	Phytohämagglutinin-P
Rev	HIV-1 Protein rev (regulator of virion protein expression)
RIPA	Radioimmunopräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen / min
RRE	Rev responsive element

---

RT	Reverse Transkriptase
Sec	Sekunden
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SI	Syncytien-induzierend
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SU	Oberflächen (surface) - Domäne von HIV
SV40	Simian Virus 40
SV40e	SV40 <sub>early</sub> Promotor
Tab.	Tabelle
TAR	tat-bindende Region des HIV
TE	Tris-EDTA-Puffer
TM	transmembrane Domäne von Retroviren
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V3-loop	dritte hochvariable Domäne im HIV-1 Env
vgl.	vergleiche
WB	Western-Blot (Immunblot)
ZKE	Zellkulturextrakt
ZKÜ	Zellkulturüberstand

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Geschichte der humanen Retroviren

Bereits relativ früh hatte man die humanen Retroviren als Auslöser für Tumoren und andere Krankheiten im Verdacht. Im Jahr 1977 wurden dabei erste Fortschritte gemacht, deren Grundlage die Beobachtung einer erhöhten Inzidenz von ansonsten seltenen Formen der adulten T-Zell-Leukämie auf einigen japanischen Inseln war (141). Kulturen leukämischer T-Zellen brachten dann etwas später die Entdeckung des ersten humanen Retrovirus, des Humanen-T-Zell-Leukämievirus (HTLV-1) hervor (155, 156). Im Juni 1981 wurde im Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) und New England Journal Medicine (65) erstmals über eine Häufung von *Pneumocystis carinii* Pneumonien bei zuvor gesunden jungen Männern in Los Angeles berichtet, eine Erkrankung, die bis zu diesem Zeitpunkt eine Rarität darstellte. Bis Ende 1982 wurden in den USA über 800 Fälle in mehr als 30 Staaten beschrieben. Der Arbeitsgruppe um L. Montagnier am Pariser Pasteur Institut gelang dann 1983 die erste Isolierung eines Retrovirus, das bis dahin nicht beschrieben worden war (8), wobei die Arbeitsgruppe um R. Gallo in den USA wichtige Vorarbeiten geleistet hatte. Bevor das Virus 1986 vom International Committee on taxonomy of viruses in "Human Immunodeficiency Virus (HIV)" umbenannt wurde, hatte es verschiedenste Namen erhalten, unter anderem HTLV-III. 1986 erfolgte aus Patienten in West-Afrika die Isolierung von HIV-2 (26). Da sich das Genom dieses neuen Retrovirus um mehr als 50 % von dem des bis zu diesem Zeitpunkt bekannten HIV unterschied (70), war die Einteilung der AIDS-auslösenden humanen Retroviren in HIV-1 und HIV-2 gerechtfertigt. Mit der Isolierung des Virus ging die Etablierung von Tests für den Nachweis von spezifischen Antikörpern einher. In der BRD wurde im Oktober 1985 der Ausschluß von HIV-Antikörpern bei Blutprodukten gesetzlich vorgeschrieben, sodass die Inzidenz von HIV bei den Empfängern von Blutprodukten (108) auf annähernd Null gesenkt werden konnte.

Das HIV-Glykoprotein ist Ziel intensiver Forschung, da man sich von Kenntnissen über dieses Protein weitere Einblicke in die Pathogenese der HIV-Erkrankung verspricht. Aus der Erfahrung mit der Entwicklung von Impfstoffen gegen andere Membranviren ist es bekannt, daß die Immunantwort gegen das Glykoprotein einen ganz entscheidenden Anteil am Erfolg einer Vakzine hat. Intensive Forschungsarbeit ist bereits bezüglich des Glykoproteins der Paramyxovirus- und Influenzaviren geleistet worden, wobei insbesondere die Kenntnisse in Bezug auf das Hämagglutinin (HA) des Influenza-Virus oft herangezogen werden, um unklare Aspekte des experimentell schwerer zugänglichen HIV-Glykoproteins zu erklären.

## 1.2 Genom und Proteine des HIV-1-Virus

Abb. 1 zeigt das Genom des HIV-1:

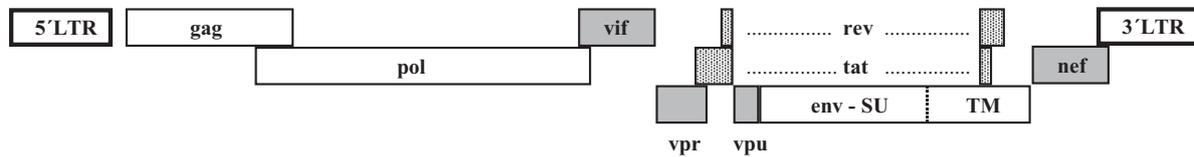


Abb. 1 Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms. Die Gene für die regulatorischen Proteine Tat und Rev sind gepunktet dargestellt, die für die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef sind grau unterlegt (modifiziert nach Fields, Virology, 3th Edition, 1996).

Für die Bildung von Viruspartikeln essentiell sind im HIV-Genom der gag-Bereich für ein Kapsid-Vorläuferprotein, welches während der Reifung spät im Replikationszyklus durch die viruseigene Protease in die Untereinheiten Matrix (MA)-, Capsid (CA)- sowie Nucleocapsid (NC) gespalten wird. Das pol-Gen, das für die Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase kodiert und der env-Bereich für das virale Glykoprotein, der weiter unten noch ausführlich beschrieben wird, sind ebenfalls unbedingt erforderlich. Ein long terminal repeat-Bereich (LTR) begrenzt sowohl vom 5'- als auch vom 3'- Ende her das Genom, wobei er am 5'-Ende als viraler Promotor fungiert, und über Bindungsstellen für virale und zelluläre Enhancer verfügt.

Das HIV gehört innerhalb der Gruppe der Retroviren zur Unterfamilie der Lentiviren (24, 64), die sich durch eine komplexe Regulation ihrer Genexpression auszeichnen, was durch das Vorhandensein von akzessorischen und regulatorischen Proteinen zum Ausdruck kommt. Das tat-Protein, welches essentiell für die Virusreplikation ist, bindet an eine am 5'LTR liegende Region mit ausgeprägter Sekundärstruktur (TAR). Auf diese Art vermehrt es die Menge an viraler RNA (35, 53, 62). Ein weiteres essentielles Protein ist das Rev, welches an die Rev-bindende Domäne (RRE, rev responsive element) der viralen RNA bindet. Somit wird die Menge einfach- und ungespleißter RNA erhöht, die die Sequenzen für die späten Proteine (u.a. die Strukturproteine) des Virus enthält (33, 49). Rev führt weiterhin zu einem effektiven Transport von ungespleißter und einfach gespleißter mRNA vom Zellkern in das Zytoplasma (50, 85, 99, 100).

Die Gruppe der akzessorischen Proteine umfasst das Vif, Vpr, Vpu und das Nef. Vif beeinflusst die Infektiosität der freigesetzten Viruspartikel in Abhängigkeit von dem Zelltyp, aus dem sie freigesetzt werden (57, 144). Ausserdem ist es erforderlich für die Replikation von HIV-1 in

primären CD4-Zellen. Für die effiziente Replikation von HIV in Makrophagen ist Vpr notwendig, ebenso für die nukleäre Lokalisation neugebildeter viraler Nukleinsäuren (73). Vpu, ein kleines integrales Membranprotein, reguliert in der infizierten Zelle den Level an CD4-Rezeptoren herunter (125, 151, 152). Über Nef ist bekannt, dass es ebenfalls zu einer Herunterregulierung des CD4-Rezeptors an der Zelloberfläche führt (60), die Infektiosität von Viruspartikeln steigert (126), und ausserdem die Reverse Transkriptase aktiviert (127).

### 1.3 Aufbau des HIV-1-Partikels

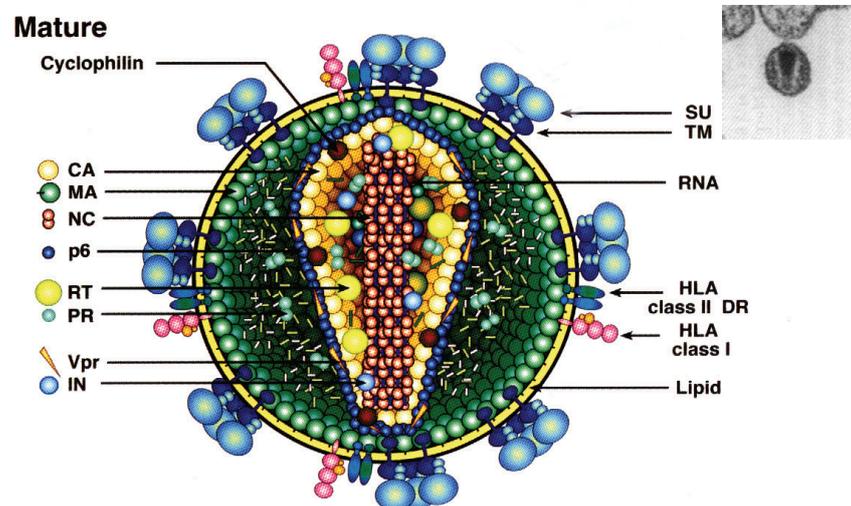


Abb. 2 Schematischer Aufbau des reifen HIV-1 Partikels. Links die im gag-Bereich kodierten Proteine CA, MA, und NC sowie die aus dem pol-Bereich stammenden Proteine RT, PR und IN. Rechts die aus dem Env-Vorläuferprotein hervorgegangenen Surface (SU)- und Transmembrane (TM)-Domänen. Als einziges akzessorisches Protein findet sich das Vpr in relevanten Mengen. Mit in das reife Partikel eingeschlossen sind zelluläre Proteine wie das Cyclophilin im Nucleocapsid sowie HLA Klasse I und II Moleküle in der Virusmembran. Rechts oben ein HIV-Partikel im Elektronenmikroskop (nach Coffin et al., *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Press 1997).

Das reife HI-Virus hat einen Durchmesser von 80-120 nm, seine Dichte beträgt ca. 1,16 g/ml. Lentiviren haben ein konisch geformtes Capsid (CA), welches aus p24-Proteinen aufgebaut ist. Dieses Capsid enthält die beiden viralen Einzelstrang-RNA-Moleküle, welche wiederum mit einem Nucleocapsid (NC bestehend aus p6, p9) komplexiert sind. Umgeben wird das HIV-Partikel von einer Hüllmembran, welche der Zellmembran der ehemals infizierten Zelle entstammt. Sie wird nach innen von einer Schicht aus Matrixproteinen (MA aus p18) umgeben. Die im gag-Bereich kodierten MA-, CA- und NC-Proteine stellen mehr als 75% der Gesamt-Virusproteinmasse dar, was ungefähr 2000 Molekülen pro Viruspartikel entspricht. 5% des viralen Proteingehalts entsprechen die Produkte des pol-Gens, und die in die Virusmembran in oligomerer Form eingelagerten HIV-Env-Glykoproteine machen ca. 10% aus. Vpr ist numerisch

---

so oft wie Gag im Viruspartikel enthalten (31), und Nef soll in Mengen zwischen 5-70 Molekülen pro Viruspartikel vorhanden sein (88, 112, 146). Des Weiteren kommen zelluläre Proteine vor: Cyclophilin A (54, 55, 95, 138), Ubiquitin (116), MHC I (6) und MHC II. Das soeben beschriebene HIV-1-Partikel repräsentiert die Mehrzahl der Viren, die aus infizierten Zellen freigesetzt werden. Neben dieser Hauptform mit einem konischen Kapsid sind auch HIV-1-Partikel mit zwei oder noch mehr Kapsiden und sogar Formen mit länglichen Kapsiden beschrieben. Diese Formen sind allerdings Raritäten des HIV-1 und ihre Bedeutung ist noch weitgehend unklar. Da sich die vorliegende Arbeit jedoch gerade mit HIV-Wildtypen beschäftigt, soll die Erwähnung dieser Tatsache verdeutlichen, dass es sich beim HIV-1 per se nicht um eine Spezies aus weitgehend homogenen Vertretern handelt (weiteres dazu im Abschnitt 1.7).

#### **1.4 Replikationszyklus des HIV**

Es wird eine frühe und eine späte Phase im Replikationszyklus des HIV-1 und HIV-2 unterschieden. Die frühe Phase beginnt mit der Anbindung des Virus an die Zellrezeptoren, was die Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran zur Folge hat. Auf diese Weise wird das Nukleokapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle eingeschleust. Die doppelt vorliegende RNA des HIV wird mittels der viruseigenen Reversen Transkriptase noch im Nukleokapsid in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben, was die Voraussetzung für die provirale Integration des HIV-Genoms in die Erbsubstanz der Zelle ist. Nachdem das Nukleokapsid aufgelöst worden ist („uncoating“), wird die HIV-DNA als Nukleoproteinkomplex in den Zellkern transportiert und dort durch die virale Integrase in die Wirtszell-DNA integriert. Mit dem Vorhandensein der proviral integrierten HIV-DNA schließt die frühe Phase ab. Dieser Zustand, wo HIV-Gene in der Zelle vorhanden sind, ohne dass virales Protein gebildet wird, kann bei Retroviren längere Zeit anhalten, da mangels erkennbarem Virusprotein keine Immunreaktion erfolgt. In der späten Phase erfolgt als erstes die Transkription der viralen RNA mit den anschließenden Spleißprozessen (115). Dabei werden anfangs überwiegend die oben genannten akzessorischen und regulatorischen Virusproteine gebildet. Sowohl die Transkription als auch die Replikation der HIV-Gene erfolgen durch die zelleigene RNA Polymerase II. Die Zusammensetzung der neugebildeten unreifen Kapside und des replizierten Genoms findet an der Wirtszellmembran statt („virus assembly“). In diese werden bereits vorher virale Glykoproteine inseriert, sodass sie beim Ausstülpfen der unreifen Viren aus der Membran („budding“) zusammen mit einem Teil der Plasmamembran mitgenommen werden. Zur Erlangung der Infektiosität bewirkt die virale

---

Protease die proteolytische Spaltung der bis dahin vorhandenen Polyproteine. Insgesamt ist der Replikationszyklus des HIV, wie der vieler anderer Viren auch, insofern als ineffektiv anzusehen, dass von den tatsächlich vorhandenen Viruspartikeln nur ungefähr jeder hundertste infektiös ist.

## **1.5 Das HIV-Glykoprotein**

### **1.5.1 Struktur von gp160, gp120 und gp41**

Es ist ein Charakteristikum aller Retroviren, dass sie nur ein Glykoprotein besitzen, was somit auch für das HI-Virus gilt. Dieses Glykoprotein hat zwei wesentliche Funktionen: Zum einen die Anheftung an einen spezifischen Rezeptor der Zielzelle und zum anderen die daraufhin folgende Fusion der eigenen Virusmembran mit der Membran der Wirtszelle. Als integrales Membranprotein besitzt es eine extrazellulären Domäne (SU) und einen Transmembranteil (TM). Ähnlich dem Gag wird auch das Env als ein Vorläuferprotein synthetisiert. Dieses Glykoprotein gp 160 wird dann in die beiden Untereinheiten gp120 (SU für surface) und gp41 (TM für transmembran) gespalten (16, 56, 101, 118). Für diese Spaltung sind aber in diesem Fall im Unterschied zu den anderen HIV-Polyproteinen zelluläre Proteasen verantwortlich. Das Glykoprotein erscheint auf der Membran der infizierten Zelle bzw. Virusmembran in oligomerer Form (vergleiche 1.5.3). Ungespaltene Glykoprotein wird nur ineffizient in Viruspartikel eingefügt (16, 45). Als Glykoprotein besitzt es eine ausgeprägte Glykosylierung, welche annähernd die Hälfte seines Molekulargewichtes ausmacht. Es besitzt fast 30 Glykosylierungsstellen, wovon mehr als 80% in der gp120-Domäne liegen (92). Abb. 3 gibt Auskunft über die modellhafte Vorstellung der Assoziation der Untereinheiten des HIV-Glykoproteins auf der Membran:

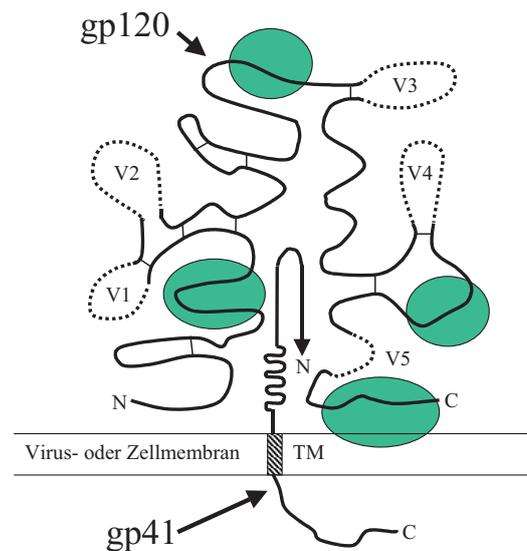


Abb. 3 Die räumlichen Struktur des HIV-Glykoproteins als theoretisches Modell. Zur Vereinfachung ist der Proteinkomplex nur als Monomer dargestellt. Hypervariable Bereiche sind mit V1-V5 bezeichnet und gestrichelt dargestellt. Die vier grün-oval gekennzeichneten Regionen markieren Interaktionspunkte des Glykoproteins mit dem CD4-Komplex auf der Zielzelle. Die Verbindungslinien an der Basis der Schleifen sind Disulfidbrücken. N = aminotermiales Ende, C = carboxyterminales Ende, TM = Transmembran-Region (nach Fields, Virology, Kapitel 60, Raven Press 1996, übernommen aus (2)).

Nach der Spaltung des Glykoproteins in die beiden Untereinheiten bleiben diese über nicht-kovalente Bindungen miteinander verbunden (74, 83). Dies führt dazu, dass ein spontanes Dissoziieren des SU-Komplexes von der TM-Domäne an der Zell- bzw. Virusoberfläche bei einem Teil der Env-Moleküle stattfindet ("Env-shedding") (12). Im Bereich des gp120 (etwa 550 Aminosäuren lang) gibt es neben konservierten Abschnitten fünf hypervariable Regionen (s. Abb. 3). Die Tertiärstruktur des gp120 zeigt neun nach außen gerichtete Schleifen ("loops"), deren jeweilige Basis durch das Vorhandensein von Disulfidbrücken ausgebildet wird. Von besonderem Interesse ist dabei die dritte variable Region, der sogenannte V3-loop (s. Abb. 4): Der V3-loop entsteht durch eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren Cys 301 und Cys 335. Trotz seiner ausgeprägt variablen Sequenz ist die Spitze des loops konserviert mit den vier Aminosäuren Gly Pro Gly Arg (GPGR). Was die Sekundärstruktur betrifft, besitzt vermutlich die Spitze eine  $\alpha$ -helikale und die umgebenden Regionen eine  $\beta$ -Faltblattstruktur (90).

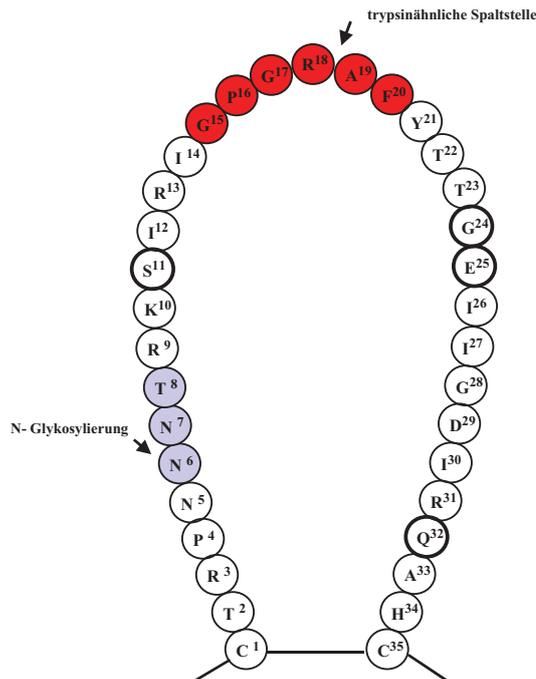


Abb. 4: Schema des "V3-loop", der dritten variablen Region des HIV-gp120. In Fett gedruckte Kreise kennzeichnen Positionen, an denen syncytieninduzierende (SI)-Isolate meist basische Aminosäuren haben. Weitere Angaben siehe Text (nach (96)).

Das GPGR-Motiv des V3-loop stellt die Hauptneutralisationsdomäne des HIV-1 dar (66, 111, 119, 124), wobei der neutralisierende Effekt streng HIV-typenspezifisch ist. Deletionen im V3-loop führen zum Ausbleiben von Membran-Fusionen (139). In Position 6-8 (s. Abb. 4) findet sich bei den meisten Isolaten eine potentielle Glykosilierungsstelle mit der Konsensussequenz N-X-S/T. Mit der Krankheitsprogression von HIV nimmt die Anzahl an basischen Mutationen im V3-loop zu, was mit vermehrter Syncytienbildung der Isolate in der Zellkultur und einem progressiven Wechsel von Makrophagen-tropen (M-tropen) zu den T-Zell-tropen (T-tropen) Eigenschaften des Virus einhergeht. Grundlage dieser Erkenntnisse sind Studien mit sequentiell gewonnenen HIV-Isolaten von Patienten (36). M-trope Isolate weisen vor allem an Position 25 entweder eine saure Aminosäure oder Alanin auf, während T-trope Isolate typischerweise an den Positionen 11, 24, 25 und 32 basische Aminosäuren besitzen (s. Abb. 4) (23, 40, 102, 128, 129). Mit diesem typischen Wechsel im Tropismus der Isolate kommt es mit der Progredienz der AIDS-Erkrankung zu einem entsprechenden Verlust an CD4<sup>+</sup> T-Zellen (7, 22, 87, 123, 137). Es gibt eine tryptinähnliche Spaltstelle an der konservierten Spitze des V3-loops (s. Abb. 4). Hier kann durch eine membranständige Serin-Protease (TL2) geschnitten werden (27, 84, 106). Vermutlich bewirkt diese Spaltung eine Konformationsänderung im Glykoprotein, die für die anschließende Fusion wichtig ist (vgl. 1.5.3). Die Bedeutung dieser potentiellen Schnittstelle ist nicht abschließend geklärt.

## 1.5.2 Proteinprozessierung des Glykoproteins im Zellapparat

Abb. 5 stellt die Proteinprozessierung des Env-Translationskomplexes vom Eintritt in das Endoplasmatische Retikulum (ER) bis zum Erscheinen des Glykoproteins auf der Zelloberfläche im zeitlichen Verlauf dar:

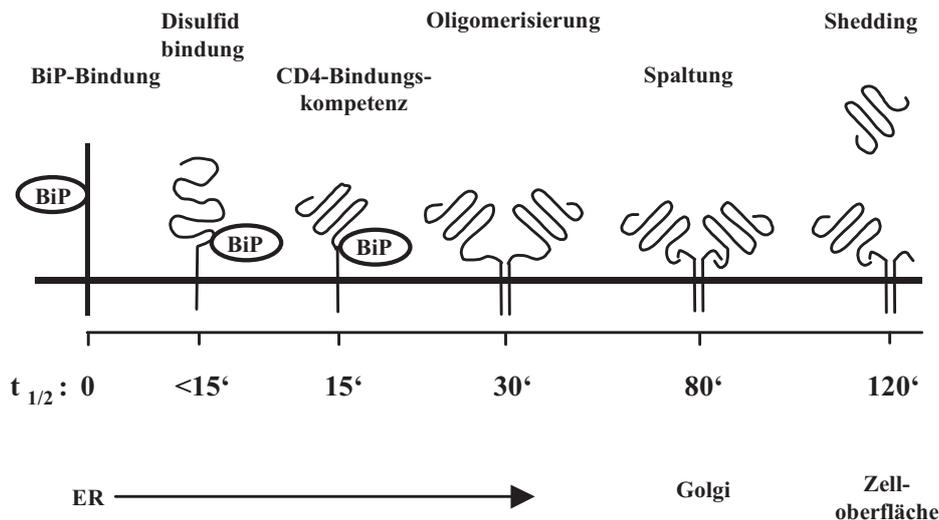


Abb. 5 Proteinprozessierung des HIV-1 Env-Glykoproteins. Auf der Zeitskala ist für jeden Schritt die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  in Minuten angegeben. Die Daten stammen aus radioaktiv-markierten pulse-chase-Experimenten. Die Verteilung der Ereignisse auf die subzellulären Kompartimente ist ganz unten zu sehen. BiP= Bindungsprotein (übernommen aus (2)).

Die Translation des HIV-Glykoproteins findet an membrangebundenen Ribosomen statt, wobei das Env als das Vorläuferprotein gp160 in ungefalteter Form in das ER eintritt (42, 89). Die spätere Ektodomäne des gp160, die die größte Masse des Proteins beinhaltet, und zu diesem Zeitpunkt schon intensiv glykosiliert, sulfatiert und palmitoyliert ist (9, 47, 52, 154), faltet sich im Lumen des ER. Dabei helfen zellulären Chaperone, u.a. des GRP78/BiP (47) und des Calreticulin (110). Das gp160 wird dann oligomerisiert (109, 114, 122) und mit mannoseichen Zuckerseitenketten ausgestattet (52, 63, 78). Falls sie bis zu diesem Zeitpunkt korrekt gefaltet wurden, verlassen die oligomere Proteine dann in Form von intrazellulären Vesikeln das ER. Sie erreichen in dieser Form den Golgi-Apparat, wo das sog. "trimming" der Zuckerseitenketten stattfindet. Im Golgi-Netzwerk erfolgt dann auch die Spaltung in die beiden Untereinheiten SU und TM (132, 150) durch eine zelleigene furinähnliche Protease (37, 71, 72). Die Spaltung wird an einer trypsinähnlichen Spaltstelle am C-terminus des gp120 mit der konservierten Sequenz Arg Glu Lys Arg (REKR) vollzogen (16, 68, 143). Die Bedeutung einer zweiten Spaltstelle einige Nukleotide vor dem REKR-Motiv mit der Sequenz Lys Ala Lys Arg (KAKR) (79, 104, 107) ist unklar (vgl. 3.2.2). Die Spaltung ist für die Infektiosität des HIV (101, 113) und für die

Syncytienbildung in infizierten Zellkulturen (133) unbedingt erforderlich. Beim HIV gelangen nur ca. 5-15 % des synthetisierten Glykoproteins bis zur Spaltung (s. Abb. 5), während der größte Teil bereits vorher dem lysosomalen Abbau erliegt (42, 47).

### 1.5.3 HIV-Glykoprotein und Membranfusion

Beim HIV ist das gp120 für die Bindung an den CD4-Rezeptor entscheidend, während das gp41 die Hauptaufgabe der Membranfusion erfüllt. Die auf dem gp41 lokalisierten, für den Fusionsprozeß entscheidenden Strukturen sind in Abb. 6 sehen zu:

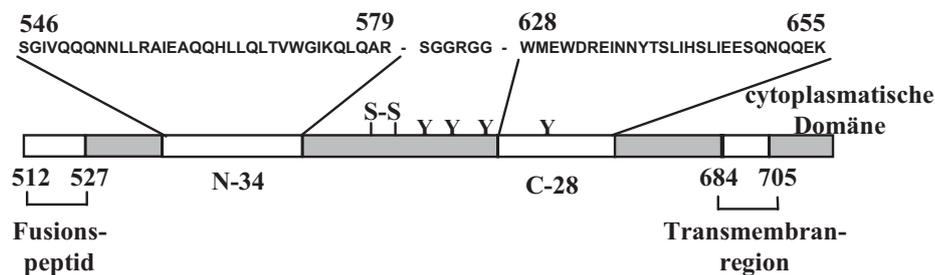


Abb. 6 Struktur des HIV gp41. Links außen der hydrophobe N-terminus (Fusionspeptid), nahe am rechten Ende die Transmembranregion, gefolgt vom cytoplasmatischen Teil. Dazwischen liegend die für den Fusionsprozeß entscheidenden  $\alpha$ -helikalen Regionen (Heptad repeat N-34 und C-28) (übernommen aus (2)).

Im Bereich des gp41 gibt es mit N-34 und C-28 zwei Regionen, die amphipathische  $\alpha$ -Helices ausbilden, und sich zu einem sechsbündeligen stabähnlichen Komplex formieren, der gp41-core-Komplex genannt wird. Dieser besitzt unter anderem eine extreme Thermostabilität (21, 38, 59). Überdies weist dieser Proteinkomplex eine hohe Proteaseresistenz (13, 94) und einen erhöhten Anteil an Leucinen auf, weshalb er anfangs als "Leucin-Zipper-Region" bezeichnet wurde (96). Ein Modell über den Fusionsprozeß beim HIV-Glykoprotein ist in Abb. 7 dargestellt:

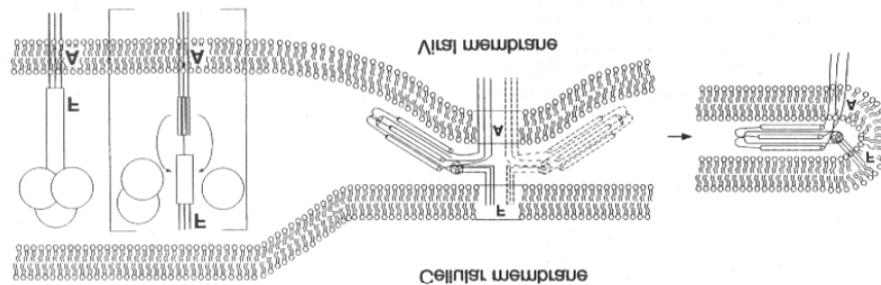


Abb. 7 Modell der Fusion der viralen Hülle mit der Zielzellmembran. Einzelheiten siehe Text. (nach Weissenhorn et al. (145), übernommen aus (2)).

---

Wenn keine Membranfusion stattfindet wird das gp41 durch Interaktion mit dem gp120 stabilisiert (s. Abb. 7, links außen, symbolisiert durch die drei Kreise) und ist im Glykoproteinkomplex verdeckt. Erfolgt nun im Rahmen der Infektion einer Zielzelle durch das HIV eine Bindung des gp120 an den CD4-Rezeptor und die Korezeptoren (s. Abb. 8), so ändert das gp120 in der Art seine Konformation, dass das gp41 in eine langgestreckte, metastabile Form überführt wird (s. Abb. 7, Modell in eckigen Klammern). Über die Bedeutung der membranständige Serin-Protease bei diesem Prozess wurde in Abschnitt 1.5.1 berichtet. Mit der Bindung des CD4 an das gp120 wird der V3-loop in räumliche Nähe zu den Korezeptoren der Zielzelle gebracht (25, 140, 153). Das hydrophobe Fusionspeptid (ein Teil des gp41, vgl. Abb. 6.) dringt anschließend in die Zellmembran ein (F in Abb. 7). Der gp41-core-Komplex (s.o.) bleibt dabei noch unbeteiligt, und erst später erfolgt der Übergang von diesem metastabilen in einen stabilen Zustand, indem die  $\alpha$ -helikalen Proteinschleifen sich ähnlich dem "rod-like"-Zustand des Influenza-Glykoproteins anordnen (10, 148). Auf welche Weise dann die endgültigen Fusion der Membranen erfolgt, ist noch weitgehend unklar. Diese membranfusionierende Eigenschaft macht man sich im Syncytien-Assay (s. 2.3.1) experimentell zu Nutze, indem in einer Zellkultur der cytopathische Effekt des HIV lichtmikroskopisch sichtbar wird, wenn die Zellen sowohl Env als auch die von HIV benutzen Rezeptoren und Korezeptoren exprimieren (s. 1.6).

## **1.6 Rezeptoren und Korezeptoren des HIV-Glykoproteins**

### **1.6.1 Der CD4-Rezeptor als Hauptrezeptor des HIV**

Der CD4-Komplex wurde 1984 als Hauptrezeptor des HIV erkannt (34, 86). Es handelt sich um ein 60 kD-Glykoprotein aus der Familie der Immunglobuline, welches für die T-Zell-Aktivierung und die immunologische Erkennung wichtig ist (20), und auf Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen zu finden ist. Abb. 8 zeigt schematisch seinen Aufbau:

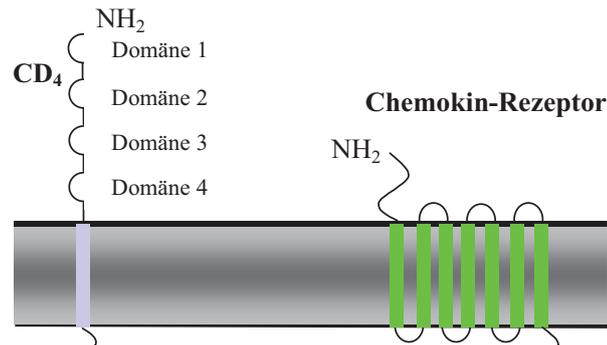


Abb. 8 Die Rezeptoren des HIV. Links der CD4-rezeptor mit seinen vier immunoglobulinähnlichen Domänen, rechts der Chemokinrezeptor (CXCR4 oder CCR5) mit sieben Zellmembran-durchspannenden Domänen (nach Coffin et al., *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Press 1997, wiedergegeben nach (2)).

Vier immunoglobulinähnlichen Domänen, je ca 12,5 nm lang, bilden den N-terminalen Teil. Das virale gp120 (Env) bindet an die Domäne 1 in hochaffiner Weise (17).

### 1.6.2 Chemokin-Bindungsstellen als Korezeptoren des HIV

HIV-Patientenisolat weisen bezüglich ihrer Anzüchtbarkeit, Replikationskinetik und Fusionsaktivität erhebliche Unterschiede auf (7, 135, 136). Der Verdacht, dass es außer dem CD4-Rezeptor noch weitere Determinanten des Zelltropismus geben musste, bestätigte sich, als man die Chemokinrezeptoren als Korezeptoren des HIV erkannte (5, 25, 39). Die beiden "klassischen Korezeptoren" sind der Chemokinrezeptor CXCR4, der vorwiegend von T-Zell-tropen HIV-Stämmen genutzt wird (11, 51), und der primär von Makrophagen-tropen Stämmen benutzte Rezeptor CCR5 (5, 44). Die natürlichen Liganden von CCR5 sind  $\beta$ -Chemokine wie MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES, die von CXCR4 sind  $\alpha$ -Chemokine wie SDF-1. Weitere HIV-Korezeptoren sind inzwischen beschrieben (u.a. CCR2, CCR3, CCR8, V28, BONZO) (19). Alle bisher entdeckten HIV-Korezeptoren besitzen eine siebenmal die Membran durchspannende Domäne (s. Abb. 8). Die Tatsache, dass Patienten mit angeborenen Deletionen im CCR5-kodierenden Bereich gegenüber einer HIV-Infektion über einen recht wirksamen Schutz verfügen und im Infektionsfall eine langsamere Progredienz aufweisen, zeigt die Bedeutung der Korezeptoren für den Replikationszyklus des HIV (117). Auf Grund ihrer Eigenschaft, in der Lymphozytenkultur (CD4-positiv), welche als Korezeptor lediglich über CXCR4 verfügt, Syncytien zu bilden, werden die einzelnen HIV-Isolate als Syncytien-induzierend (SI-Isolate) und nicht-Syncytien-induzierend (NSI-Isolate) eingeteilt. Diese Unterteilung spielt für die vorliegende Arbeit eine entscheidende Rolle (vgl. 2.1 und 2.3.1). Folgerichtig sind die T-tropen Isolate weitgehend SI-Isolate, die M-tropen dagegen nicht-Syncytien-induzierend. Das Vorhandensein von dual-trope Isolaten, die mehrere Klassen von Chemokinrezeptoren benutzen,

---

ist beschrieben. Der bereits im Abschnitt 1.5.1 erwähnte Tropismuswandel der HI-Viren im Verlauf der AIDS-Erkrankung, der einem Wechsel vom M-tropen zum T-tropen Typus bzw. von NSI- zu SI-Isolaten entspricht (136), kann über spezifische Mutationen im V3-loop erklärt werden. Das gp120 passt sich im Laufe der Erkrankung offenbar an einen anderen Korezeptor an.

## 1.7 HIV-Subtypen

Ein Virus unterliegt innerhalb seines Wirts zum Teil einem enormen Selektionsdruck. Es gibt wahrscheinlich in der gesamten Natur kein anderes System, welches eine so hohe Rekombinationsgeschwindigkeit aufweist wie die Retroviren (28, 29, 77). Der Begriff einer "Virusspezies" darf nicht zu der Annahme verleiten, es handele sich bei den Vertretern dieser Art um genetisch weitgehend homogene Virionen. Man subsummiert im allgemeinen retrovirale Isolate unter dem Begriff einer Art, wenn mehr als 80 - 90 % ihrer Nukleotide oder über 90 % der Aminosäuresequenz identisch sind (wiedergegeben in (30)). Eine Ausnahme bilden dabei die Gene pro und pol, die auch innerhalb ein und derselben Spezies eine höhere Variabilität aufweisen. Des Weiteren sollten die Vertreter einer Spezies den gleichen natürlichen Wirt infizieren. Auf der Grundlage der Nukleotidsequenz des pol-Gens werden bei den Lentiviren der Primaten, welche eine Untergruppe der Retroviren darstellt, die auch HIV enthält, 5 verschiedene Spezies unterschieden (75): HIV-1/SIV<sub>cpz</sub>, HIV-2/SIV<sub>smm</sub>, SIV<sub>agm</sub>, SIV<sub>mnd</sub> und SIV<sub>syk</sub> (SIV = simian-immuno-deficiency-virus, cpz = chimpanzee, smm = sooty mangabey monkey, agm = African green monkey, mnd = mandrill monkey, syk = sykey monkey). Die verschiedenen Spezies von SIV haben dabei verschiedenen Affenarten als natürliche Wirte, die hauptsächlich in Afrika südlich der Sahara beheimatet sind, und an der retroviralen Infektion nicht erkranken (61). Auch aus asiatischen Makakenaffen sind SIV-Typen isoliert worden (SIV<sub>mac</sub>) (61). Vertreter der einzelnen Arten haben in ihrer Reversen Transkriptase (kodiert im pol-Gen) eine Aminosäurenübereinstimmung von 55 - 60 % und sind damit genetisch zueinander wesentlich ähnlicher als im Vergleich zu Isolaten anderer Spezies. Es wird vor diesem Hintergrund die nicht selbstverständliche Tatsache deutlich, dass sich beispielsweise HIV-1- und HIV-2-Isolate weit weniger ähneln als diejenigen von HIV-1 und SIV<sub>cpz</sub> (81) (vgl. Abb. 9).

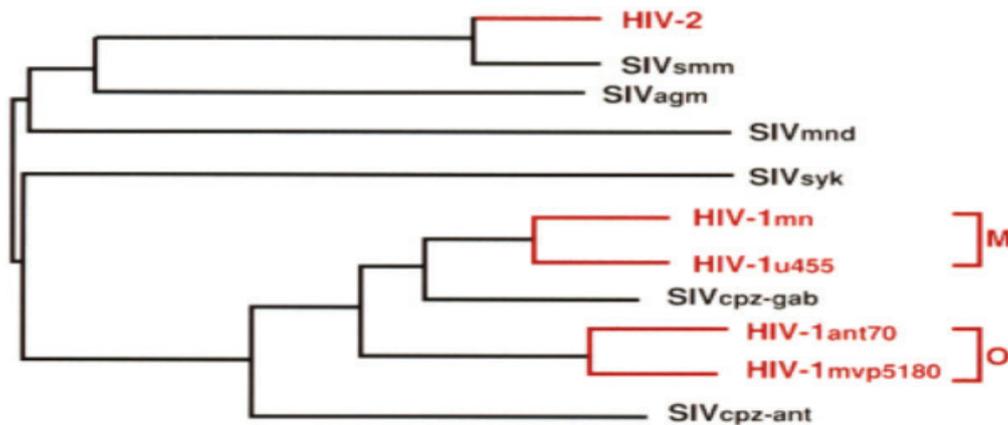


Abb. 9 Phylogenese der Lentiviren von Primaten. Aufgrund einer Sequenzanalyse des pol-Gens sind bisher 5 Arten definiert. SIV = simian-immuno-deficiency-virus, cpz = chimpanzee, smm = sooty mangabay monkey, agm = African green monkey, mnd = mandrill monkey, syk = sykes monkey. Innerhalb einer Spezies haben die Isolate eine gleiche Genomorganisation und besitzen eine höhere Sequenzübereinstimmung als im Vergleich zu anderen Arten. Menschliche Isolate in rot (übernommen aus Coffin et al., *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Press 1997).

Innerhalb von HIV ist HIV-1 gegenüber HIV-2 die weitaus verbreitetere Spezies (anstelle von Spezies wird auch von Typen gesprochen). HIV-2 kommt hauptsächlich in Westafrika vor, und zeichnet sich durch eine geringere Infektiosität und bezüglich der Entstehung von Aids durch eine längere Inkubationsperiode als HIV-1 aus. Da sich die vorliegende Arbeit nur mit HIV-1-Subtypen befasst, wird in der Folge nur noch auf die Einteilung dieser Virusspezies eingegangen:

Es gibt 2 Hauptgruppen von HIV-1, nämlich die Gruppe M (M für "main"), welche für die Mehrheit der HIV-Infektionen weltweit verantwortlich ist, und die O-Gruppe (O für "outgroup"), die relativ klein ist, und in Kamerun, Gabon und Frankreich vorkommt (69, 142). Die Gruppe M kann wiederum in neun verschiedene Subtypen unterteilt werden (A bis I) (147). Dies macht deutlich, dass trotz der hohen Mutationsrate des HIV-1-Genoms keine Varianz der Viruseigenschaften über ein beliebig grosses Spektrum vorhanden ist, sondern eine Einteilung in Subtypen von verhältnismäßig hoher Übereinstimmung möglich ist. Hierbei unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen der gp120-SU-Domäne innerhalb eines Subtyps (z.B. zwei Isolate vom Subtyp A) in einer Grössenordnung von 5 - 20 % und zwischen zwei verschiedenen Subtypen (z.B. Subtyp A und B) von 30 - 40 % (wiedergegeben in (30)). Die verschiedenen Subtypen von HIV-1 sind nicht gleichmässig auf dem Globus verteilt (93), in Nordamerika und Europa herrscht vor allem der Subtyp B vor, in Nordtailand beispielsweise der Subtyp E (vgl. Abb. 10).

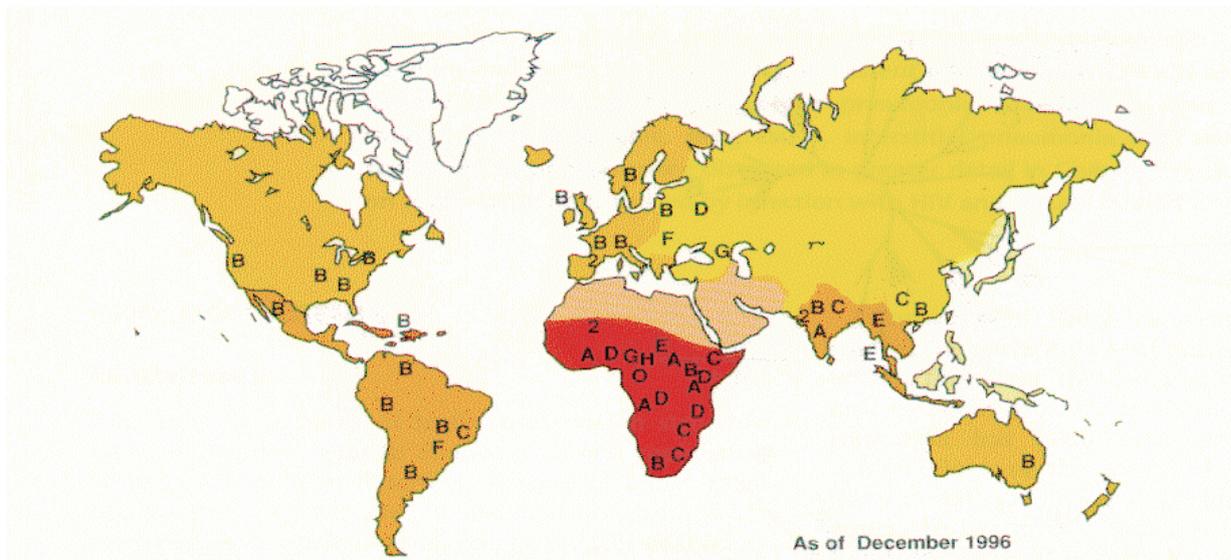


Abb. 10 Weltweite Verteilung der HIV-1-Subtypen und Vorkommen von HIV-2. Gleichzeitig dargestellt ist die Prävalenz von HIV im Jahr 1996, wobei mit zunehmender Dunkelheit der Farbe die Prävalenz zunimmt: rot: 1.7% (Afrika südlich der Sahara), dunkelorange: 0.6 % (z.B. Südamerika), mittelorange: 0.3 % (USA, Europa), beige: 0.1 % (Nordafrika, mittlerer Osten), hellorange: 0.015 % (z.B. Asien), gelb: 0.01 % (z.B. Südpazifik). (Daten des Joint United Nations Programm on HIV/AIDS, übernommen aus Coffin et al., *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Press 1997)

Aufgrund der hohen Rate an HIV-Replikation im infizierten Patienten (76) und der hohen Rate an Fehlern, die dabei auftreten, existieren in ein- und demselben Patienten zur gleichen Zeit viele verschiedene HIV-Isolate mit einer grossen Heterogenität von Nukleotid- und Proteinsequenzen (120).

## 1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

HIV-Wildisolate, welche aus infizierten Patienten isoliert wurden, zeigen nach ihrer in vitro-Anzüchtung eine ausgeprägte biologische Heterogenität bezüglich ihres Zelltropismus, ihrer Replikationseffizienz und ihrer Fusionskapazität in verschiedenen Zellreihen. Hierbei können auf der Grundlage der Zellen, in welchen sie sich in vitro replizieren können, zwei verschiedenen Typen von HIV-Isolaten unterschieden werden: Die T-tropen Viren, welche sich vorwiegend in T-Zelllinien replizieren, benutzen neben dem CD4-Molekül als dem Hauptrezeptor des HIV den CXCR4-Korezeptor, bilden in PBL-Kulturen Syncytien aus und werden deshalb als Syncytien-induzierend (SI) bezeichnet. Im Gegensatz hierzu benutzen die Makrophagen-(M)-tropen Isolate den CCR5-Korezeptor, weisen meistens keine Fusionsaktivität auf, und werden daher nicht-Syncytien-induzierend (NSI) genannt. In vielen vorausgehenden Arbeiten ist bereits versucht worden, Regionen innerhalb des env-Gens zu identifizieren, die den Zelltropismus und die cytopathischen Eigenschaften des HIV-Glykoproteins bestimmen. Viele dieser Untersuchungen

---

fokussierten sich innerhalb des Env auf den Einfluß des V3-loops auf die genannten Charakteristika von HIV-Isolaten, welche ihm eine Bedeutung für die Fusion des Virus mit der Zellmembran zuweisen (14, 66, 111, 119, 124, 139, vgl. 1.5.1). Die genannten Arbeiten zeigen aber auch, dass zusätzlich zum V3-loop noch weitere unbekannte Faktoren die Fusionskapazität von HIV-Isolaten beeinflussen müssen. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Phänotyp (SI / NSI, Spaltbarkeit des Glykoproteins) des nahezu gesamten Env von HIV-Wildtypen in HeLa-Zellkulturen zu untersuchen und sie hierbei mit der des Laborstamms pNL4-3 zu vergleichen. Für die vorliegende Arbeit standen als Ausgangsmaterial verschiedene HIV-Wildisolate zur Verfügung, welche aus HIV-positiven Patienten der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf isoliert und in PBL-Kulturen angezüchtet worden waren (3). Im Rahmen dieser Arbeit war der Phänotyp dieser Isolate bereits in verschiedenen Zellkulturen untersucht worden. Hierbei zeigte sich, dass in der PBL-Kultur syncytien-induzierende Wildsolate *als vollständige Viruspartikel* auf HeLa-T4-Zellen übertragbar waren, in diesen jedoch keine Fusionskapazität mehr besaßen. Für pNL4-3 wurde gezeigt, dass dessen env-Sequenz für sich alleine eine Syncytienbildung als Zeichen des cytopathischen Effekts des HIV bewirkt, wenn diese in einen Expressionsvektor (pNLA1) hineinkloniert und nach dessen transienter Transfektion in HeLa-T4-Zellen von diesen exprimiert wird (2). Es stellt sich die Frage, wie sich die env-Sequenzen der Wildisolate unabhängig vom restlichen HIV-Genom in HeLa-T4-Zellen bezüglich ihrer Fusionskapazität verhalten. Sollten diese ebenso wie ihre vollständigen Viruspartikel keine Fusionsaktivität in HeLaT4-Zellen besitzen, könnte man folgern, dass es Unterschiede gibt zwischen den von uns klonierten env-Sequenzen und dem Laborstamm pNL4-3, welche für die Fusogenität von HIV-1 in HeLa-Zellkulturen von Bedeutung sind, obwohl sowohl unsere Wildisolate als auch der Laborstamm der Klassifizierung „SI“ entsprechen. Dies ließe die Schlußfolgerung zu, dass es sich bei den vielfach verwendeten laboradaptierten HIV-Stämmen um artifizielle Sonderformen von SI-Isolaten handeln könnte, die Rückschlüsse auf natürliche SI-Isolate nur bedingt zulassen würden. Hierfür soll ein PCR-Protokoll erarbeitet werden, welches in der Lage ist, die env-Wildsequenzen aus den o.g. PBLs in einer Länge von ca. 2400 Nukleotiden zu amplifizieren, was dem gesamten env bis auf ein kurzes Stück des gp41-C-Terminus entspricht. Anschließend sollen die amplifizierten Genabschnitte in einen (in der vorliegenden Arbeit konstruierten) Expressionsvektor hineinkloniert werden, welcher env als einziges HIV-Protein exprimiert, um den Einfluß zusätzlicher Bereiche des HIV-Genoms auszuschließen. Es wird zusätzlich zu zeigen sein, dass die klonierten env-Sequenzen in den HeLa-Zellen auf Proteinebene exprimiert werden, und eine Spaltung der gp160-Vorläuferproteine erfolgen kann.

---

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit geschaffen wird, mittels eines neuen PCR-Protokolls den größten Teil des env-Gens zu amplifizieren, kann über die primäre Zielsetzung dieser Arbeit hinaus der Versuch erfolgen, diesen Genabschnitt auch aus HIV-positiven Seren und Liquores zu amplifizieren, und somit weitere HIV-Wildsequenzen zu untersuchen. Hierfür ist zusätzlich die Etablierung eines geeigneten Systems aus RNA-Extraktion und Reverser Transkription erforderlich. Sollte dies gelingen, könnten diese Sequenzen ebenfalls in das Klonierungssystem, welches in der vorliegenden Arbeit aufgebaut wird, eingebracht und ihr Funktionalität in HeLa-Zellkulturen analysiert werden. Anhand der beobachteten Fusionsaktivität und durch Analyse markanter Sequenzbereiche dieser Klone (insbesondere der V3-Loop-Sequenzen) könnte dann beurteilt werden, ob die amplifizierten Bereiche SI- oder NSI-Isolaten entstammen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 HIV-Isolierung in der Zellkultur**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stammen die HIV-DNA-Substrate für diese Doktorarbeit aus Vorarbeiten des damaligen Instituts für medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Düsseldorf ((2, 3), s. 1.8). Deshalb wird die Methodik der Virusisolierung hier nur kurz dargestellt, und darauf hingewiesen, dass sie nicht Teil der vorliegenden Arbeit war (3). Das Kapitel 2.1 soll darstellen, wie die Proben hergestellt wurden, in denen die HIV-env-Wildsequenzen als DNA-Substrate proviral integriert vorlagen (vgl. Tab. 1). Bei den o.g. Vorarbeiten wurden HIV-Wildtypen in einer Zellkultur isoliert und ihr jeweiliger Zelltropismus (d. h. ihr Korezeptorgebrauch) über Passageversuche in verschiedene Zelllinien ermittelt. Für die Erstisolierung der HIV-Isolate wurden Kulturen von peripheren Blutlymphozyten (PBL) und primären Makrophagen in Form von buffy coats (auf einem Ficoll-Gradient) aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Düsseldorf benutzt. Die Abb. 11 und die Abschnitte 2.1.1 und 2.1.2 stellen die verwendete Methodik dar, der Abschnitt 2.1.3 zeigt die Ergebnisse der Virusisolierung und den Zelltropismus der jeweiligen HIV-Isolate.

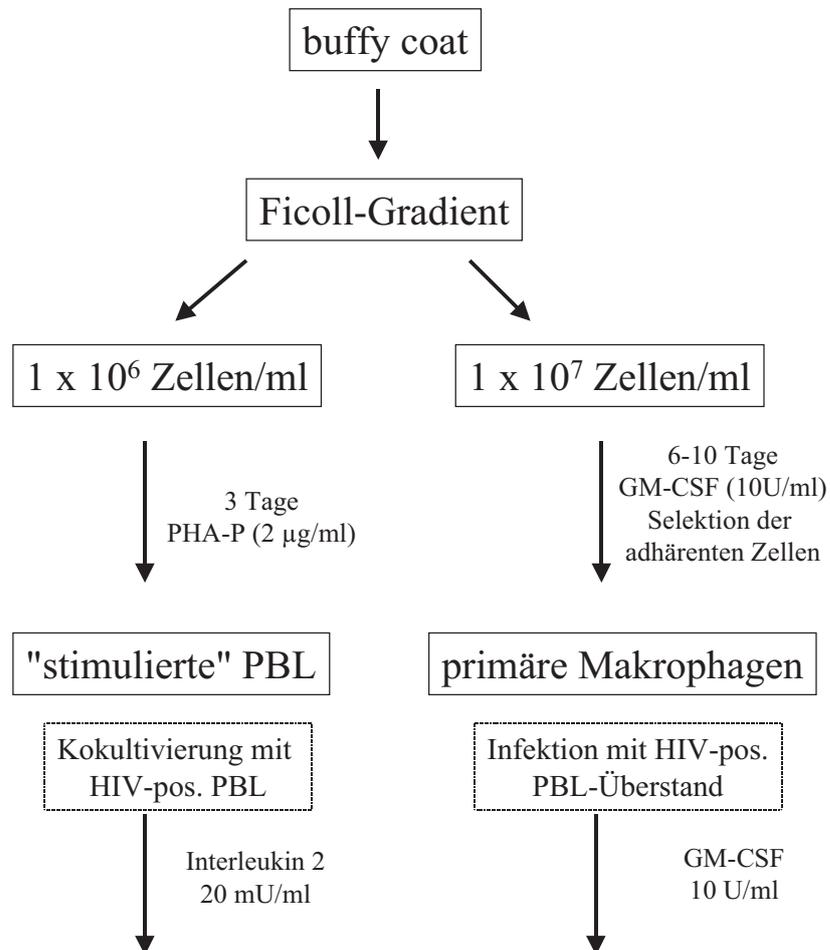


Abb. 11 Schematische Darstellung der HIV-Isolierung in PBL und primären Makrophagen (wiedergegeben aus (3)).

### 2.1.1 Periphere Blutlymphozyten (PBL)-Kulturen

HIV-negative Spenderlymphozyten (aus dem Ficoll-Gradient), die drei Tage mit Phytohämagglutinin-P (PHA-P) (2 µg/ml) in RPMI-1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert worden waren, wurden in RPMI-1640 (10% FKS) und Humanem Interleukin-2 (IL-2, 20 mU/ml) mit HIV-positiven PBLs von Patienten der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf kokultiviert. Es wurde sowohl täglich im Hinblick auf Syncytienbildung mikroskopiert als auch zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel vorgenommen und der entnommene Überstand auf das Vorhandensein von p24-Ag im ELISA (p24 core profile ELISA, Dupont) untersucht. Eine Zellzahlbestimmung und die Reduzierung der Kultur auf  $2 \times 10^6$  Zellen wurde wöchentlich durchgeführt, und es wurde dieselbe Anzahl frischer, stimulierter PBL hinzugegeben. Die Kulturen wurden über maximal 3 Wochen gehalten. Trat ein cytopathischer Effekt (CPE) in Form von Syncytienbildung auf oder wurde p24-Ag im Zellkulturüberstand nachgewiesen,

wurde die Kultur als positiv beurteilt und der Zellkulturüberstand für spätere Versuche tiefgefroren.

Kulturen, die Syncytienbildung zeigten, wurden als SI-Isolate (Syncytien-induzierend) klassifiziert. Trat kein CPE in den ersten 10 Tage auf, wurden die Isolate bei Nachweis von p24-Ag als NSI-Isolate (nicht-Syncytien-induzierend) eingestuft (vgl. Tab. 1 in Abschnitt 2.1.3, Spalte PBL<sup>a</sup>). Es wurde weiterhin getestet, ob der zellfreie Kulturüberstand eines Isolats aus der soeben beschriebenen Kokultivierung in einer zweiten Passage auf frische, stimulierte PBLs übertragbar ist (vgl. Tab. 1, Spalte PBL<sup>b</sup>). Der Erfolg dieses Infektionsversuchs wurde durch das Auftreten von Syncytien bestätigt bzw. durch ihr Ausbleiben zunächst verneint. Trat ein CPE auf, oder wurde ohne diesen Effekt p24-Ag im Zellkulturüberstand nachgewiesen, wurde die Probe als zellfrei-transmissibel (übertragbar) klassifiziert. Darüber hinaus wurde bei dieser zweiten Passage immer der Versuch unternommen, nach vorheriger DNA-Extraktion die proviral integrierte HIV-DNA mittels PCR nachzuweisen. Bei positivem PCR-Signal wurden das Isolat ebenfalls als zellfrei transmissibel aufgefasst (näheres zur hier verwendeten PCR-Technik bei (3)). Dieser zweite Infektionsversuch mit zellfreiem Kulturüberstand wurde dann weiterhin bei der CD4+, CXCR4+ Zelllinie HeLa-T4<sup>+</sup> (98), der CD4+, CXCR4+, CCR5+ Zelllinie PM1 (97) und den damals im eigenen Labor isolierten CD4+, CCR5+ primären Makrophagen durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.1.2 und 2.1.3).

### **2.1.2 Makrophagenkulturen**

Zur Gewinnung von primären Makrophagenkulturen wurden die über Ficoll-Gradienten gewonnenen mononukleären Zellen zur Selektion mit Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF, Roche Diagnostics, 10 U/ml) inkubiert (10-fach höhere Zelldichte als bei der Lymphozytenkultur, s. Abb. 11). In den nächsten 10 Tagen wurde der Kulturüberstand schrittweise durch frisches Medium ersetzt. Dann wurde zellfreier Kulturüberstand aus den ersten PBL-Passagen (vgl. Kokultivierung in Abschnitt 2.1.1) direkt auf die primäre Makrophagenkultur gegeben. Für weitere 14 Tage wurden die Zellen regelmäßig mikroskopiert und ein p24-Ag-Test aus dem Zellkulturüberstand durchgeführt. Als positiv wurde eine Passage dann angesehen, wenn zwei aufeinanderfolgende p24-Ag-Tests jeweils ein positives Signal von mindestens dem doppelten Wert des cut-offs aufwiesen (vgl. Tab. 1).

### **2.1.3 Tropismus von HIV-1-Wildtyp-Isolaten**

Tab. 1 zeigt den Tropismus der isolierten HIV-Wildtypen in der Kokultivierung mit PBL bzw. der zweiten Passage von zellfreiem Kulturüberstand auf PBLs (vgl. 2.1.1), die CD4+, CXCR4+

Zelllinie HeLa-T4<sup>+</sup> (98), die CD4<sup>+</sup>, CCR5<sup>+</sup> primären Makrophagen und die CD4<sup>+</sup>, CXCR4<sup>+</sup>, CCR5<sup>+</sup> Zelllinie PM1 (97).

Isolat	PBL <sup>a</sup>	PBL <sup>b</sup>	HeLa-T4 <sup>+c</sup>	Makrophagen <sup>c</sup>	PM1 <sup>c</sup>	Tropismus
SI-230	3+	2+	+	-	+	T-trop
SI-127	3+	3+	+	-	+	T-trop
SI-134	3+	3+	+	-	+	T-trop
SI-153	3+	3+	+	-	+	T-trop
SI-168	3+	3+	+	+	+	dual-trop
SI-215	2+	3+	+	-	+	T-trop
SI-440	2+	3+	+	-	+	T-trop
NSI-402	1+	1+	+	+	+	dual-trop
NSI-146	1+	1+	+	+	+	dual-trop
NSI-420	0	0	+	+	+	dual-trop
NSI-470	0	0	-	-	-	NK
NSI-461	0	0	-	+	+	M-trop
NSI-465	0	0	-	+	+	M-trop

Tab. 1 Tropismus der von PD Dr. med. Ortwin Adams zur Verfügung gestellten HIV-Isolate. <sup>a</sup>Kokultivierung von HIV<sup>+</sup>-PBL mit HIV<sup>-</sup>-PBL 3+, sehr viele grosse Syncytien, 2+, viele Syncytien, 1+, wenige Syncytien, 0, keine Syncytien (keine cytopathischer Effekt) jedoch p24-Ag +, <sup>b</sup>Übertragbarkeit des Zellkulturüberstands aus <sup>a</sup> auf PBLs (HIV-Replikation mit Mikroskopie (CPE), p24-Ag-Nachweis oder PCR getestet), Bewertungsstandard wie unter <sup>a,c</sup> Übertragbarkeit des Zellkulturüberstands aus <sup>a</sup> auf HeLa-T4<sup>+</sup> (IFT zum HIV-Nachweis), Makrophagen und PM1-Zellen (jeweils p24-Ag-Test), +, Zellkulturüberstand aus <sup>a</sup> übertragbar, -, nicht übertragbar, NK, nicht klassifizierbar (modifiziert nach (3)).

Die in Tab. 1 dargestellten HIV-1-Wildtypisolate wurden als Substrate für die Amplifikation des jeweiligen env-Gens mittels PCR verwendet (vgl. 2.2.2). Die Amplifikation dieser DNA-Isolate erfolgte ausschließlich aus HIV-positiven PBLs. Es finden sich neben T- und M-tropen auch dual-trope Isolate, welche sowohl den CXCR4- als auch den CCR5-Korezeptor benutzen können. Sie sind zur Infektion aller aufgeführten Zellreihen in der Lage. Prinzipiell sind die entscheidenden Informationen zum Korezeptorgebrauch der einzelnen Wildtypisolate (und damit deren Fähigkeit, in eine Zielzelle einzudringen) sowie deren Fusionkapazität der Tabelle 1 zu entnehmen. Eine genaue Analyse dieser Zusammenhänge findet sich in (3), woraus diese

Ergebnisse übernommen wurden. Es sei betont, dass kein Wildisolat nach Übertragung von zellfreien Viruskulturüberstand auf HeLa-T4-Zellen eine Fusionsaktivität aufwies, auch wenn sie ursprünglich in PBL syncytien-induzierend (SI) waren.

## 2.2 Rekombinante DNA-/RNA-Techniken

### 2.2.1 Etablierung eines PCR-Protokolls zur Amplifikation von HIV-1-env

Das Aufstellen eines geeigneten PCR-Protokolls, das in der Lage ist, die Vielfalt der verschiedenen HIV-Sequenzen über eine Länge von ca. 2400 Nukleotiden zu amplifizieren (die genaue Nukleotidzahl hängt vom jeweiligen HIV-Isolat ab, s. u.), stellte methodisch von Anfang an die Hauptproblematik dieser Arbeit dar. Da sich das Problem stellte, welches HIV-Isolat man stellvertretend für alle HIV-Quasispezies als Meßplatte für ein erfolgreiches PCR-Protokoll nehmen sollte, entschieden wir uns für das Plasmid pNLA1 (134), welches ein cDNA-Derivat von pNL4-3 darstellt (1). Die experimentelle Optimierung der PCR erfolgte an dem leicht modifizierten Plasmid pNLA1nef (s. 2.4.1). Hierfür wurde eine zehnfache Verdünnungsreihe dieses Vektors in Minimal sterile buffer (MTE: 1 mM Tris-HCl pH 8,0 und 0,01 mM EDTA in sterilem aqua dest.) hergestellt, um Aussagen zur Sensibilität der etablierten PCR treffen zu können. Nachdem die PCR anhand des Isolats pNL4-3 auf DNA-Ebene etabliert worden war (Ergebnisse s. 3.1.1), folgte deren Anwendung auf die HIV-Wildisolate. Hierbei musste das PCR-Protokoll teilweise wiederum modifiziert werden, insbesondere beim Versuch der zusätzlichen Amplifikation von HIV-RNA. In diesem Abschnitt wird zunächst die experimentelle Optimierung der env-PCR anhand des Plasmids pNLA1nef beschrieben und dabei besonderes Augenmerk auf die Auswahl der Primer gelegt. Auf die Besonderheiten der Amplifikation der HIV-Wildisolate wird in Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3 eingegangen.

Die Amplifikation führten wir in dem Cycler GeneAmp PCR System 9600 der Firma Perkin Elmer durch. Für die env-PCR bei pNLA1nef wurden 3 verschiedene Polymerasen getestet: 1) Die Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Part. No. N801-0060). 2) Die Pwo-Polymerase<sup>®</sup> (Roche, Nr. 1644947), die neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität ("proof-reading-activity") besitzt, wodurch weniger Lesefehler bei der Amplifikation erfolgen (vgl. Tab. 2). Sie wurde ursprünglich aus dem hyperthermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus woesei* isoliert, und wird heute mit Hilfe eines rekombinanten *E. coli* hergestellt. 3) Der Expand<sup>™</sup> High Fidelity PCR System enzyme mix (Boehringer Mannheim, Nr. 1732650), eine Mischung aus

Taq- und Pwo-Polymerase. Für eine möglichst fehlerfreie PCR-Amplifikation wurden somit Enzyme mit niedriger Fehlerrate verwendet (vgl. Tab. 2):

DNA-Polymerase	5'-3' Exonuclease-Aktivität	3'-5' Exonuclease-Aktivität	Prozessivität <sup>a</sup>	maximale Produktlänge (kb) <sup>b</sup>	Fehlerrate (10 <sup>-6</sup> ) <sup>c</sup>	Bis 2 kb <sup>d</sup>	2-5 kb <sup>d</sup>
Taq	+	-	50	3	26	++	(+)
Pwo	-	+	20-30	3	3,2	++	(+)
Expand High Fidelity PCR System	+	+	50	5	8,5	+++	+++

Tab. 2 Charakteristika von DNA-Polymerasen: <sup>a</sup> Anzahl von Nukleotiden, die ein Polymerasemolekül an eine DNA-Kopie anhängen kann, bis es von der DNA-Vorlage dissoziiert, <sup>b</sup> Maximale Fragmentlänge, die von einem humanen DNA-Template amplifiziert werden kann, <sup>c</sup> Fehlerrate (mit Lacl-assay kalkuliert), <sup>d</sup> Leistungsfähigkeit des Enzyms bis zur angegebenen PCR-Fragmentlänge: - = keine, (+) = gering, + = vorhanden, ++ = viel, +++ = sehr viel (wiedergegeben aus (131))

Darüber hinaus wurden in verschiedenen PCR-Versuchsprotokollen auch die anderen Bestandteile der PCR-Reaktionslösung sowohl als solche ausgetauscht, als auch in ihrem quantitativen Anteil am PCR-Master-Mix variiert. Die verwendeten Primerpaare (s. u.) wurden in ihrer Konzentration im Versuchsansatz ebenso variiert wie die o.g. verschiedenen Polymerasen, die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration des PCR-Puffers, die Menge an zugesetzten Desoxyribonukleotidphosphaten (dNTP, PCR Nucleotide Mix, Boehringer Mannheim Corp. USA 1581295) und die Menge der als Template eingesetzten Ziel-DNA. Auch mit den Amplifikationsparametern der PCR (Zeiten und Temperaturen von Denaturierung, Primer-Annealing und Extension) wurde experimentiert. Darüber hinaus wurde versucht, die Amplifikation und Klonierung des env nicht in einem sondern in zwei Fragmenten durchzuführen (s.u.).

Besonderes Augenmerk ist der Auswahl der Primer (synthetisiert und bezogen von der Firma Pharmacia, s. Tab. 3) zu widmen, weil von diesen die weitere Klonierungsstrategie abhing. Je nachdem, welche Primer zur Anwendung kamen, wurden die amplifizierten env-Fragmente in verschiedene HIV-Expressionsvektoren hineinkloniert (vgl. 2.2.4.1 und 2.4.2). Dies liegt daran, dass die Amplifikate durch die Verwendung verschiedener Primersequenzen auch mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen an ihren Enden geschnitten werden müssen. Der

---

Expressionsvektor, in den ein Amplifikat hineinkloniert wird, muss im gewünschten Bereich über die gleichen Schnittstellen für Restriktionsenzyme verfügen. Des Weiteren war bei der Auswahl eines Primers zu berücksichtigen, dass dieser nicht nur an die Zielsequenz des Isolats pNL4-3 binden musste, sondern letztlich für die PCR bei verschiedenen HIV-1-Isolaten benutzt werden sollte. Deshalb wurden die in Mitteleuropa gängigen HIV-1-Sequenzen (Subtyp B, vgl. 1.7) in einem Alignment daraufhin untersucht, ob der gewünschte Primer auf die Mehrzahl der bekannten Wildtypsequenzen passt. Beim Vorliegen zu vieler Basenaustausche („mismatch“) wurde der Primer entsprechend angepasst. Dieses Vorgehen führte naturgemäß zu Primern, die einen Kompromiss bezüglich der zu amplifizierenden HIV-Isolate darstellen. Zur besseren Übersichtlichkeit über die verschiedenen PCR-Strategien sowie die verwendeten Primer, welche nun näher beschrieben werden, dienen Abb. 12 und Tab. 3:

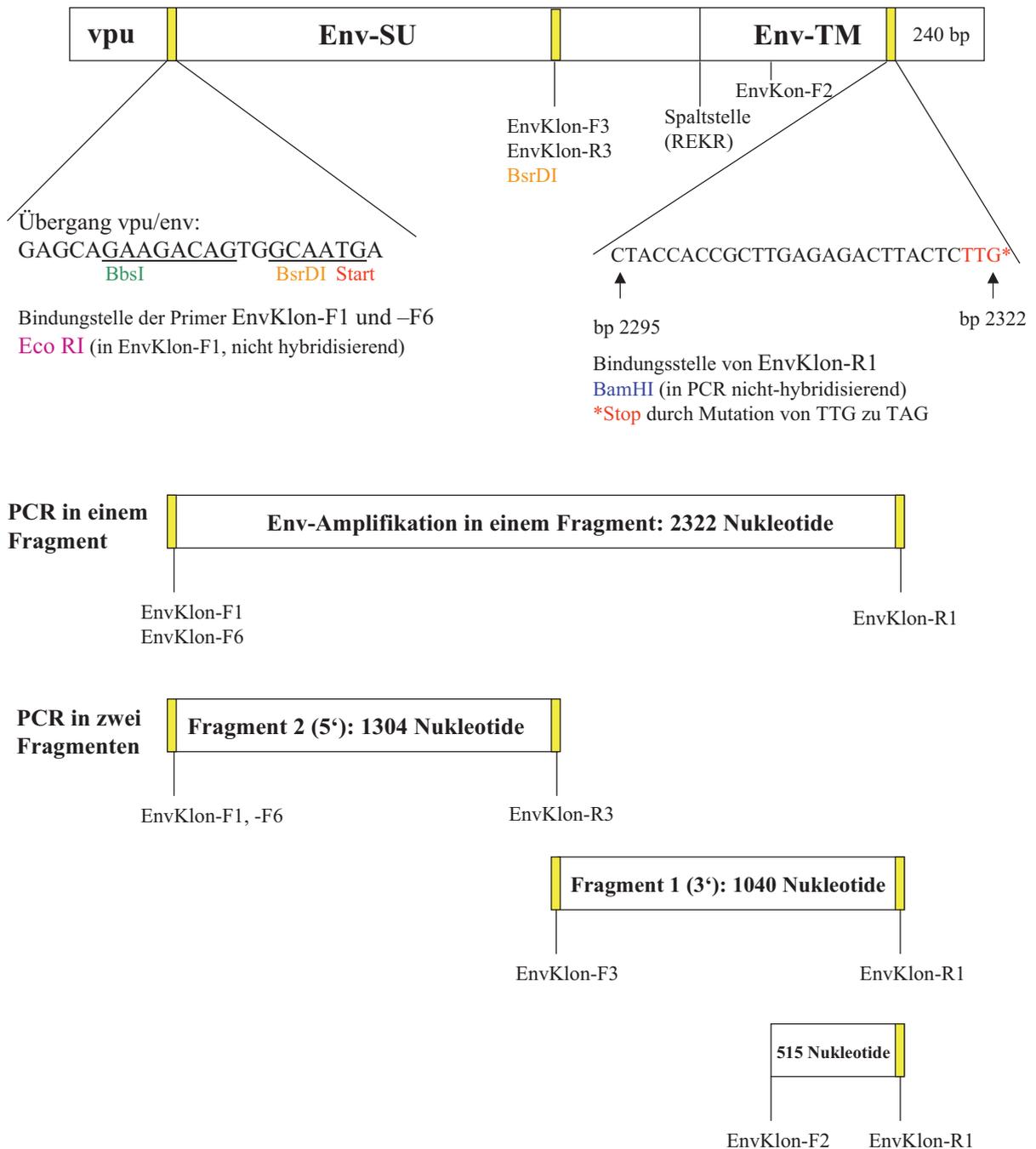


Abb. 12 PCR-Amplifikation des HIV-1-env über eine Länge von 2323 Nukleotiden (bei pNL4-3). Dargestellt sind die Bindungsstellen der Primer sowie die Schnittstellen der Restriktionsenzyme. Zu sehen sind weiterhin die verschiedenen PCR-Strategien: Amplifikation des env in einem und in zwei Fragmenten. Ein kurzes Amplifikat von 515 Nukleotiden diente als Kontrolle dafür, ob eine ausreichende Menge an DNA-Substrat für eine env-PCR vorlag. Einzelheiten siehe Text.

Alle hier gemachten Angaben zu Nukleotidnummern und Fragmentlängen beziehen sich auf die Sequenz des HIV-1-Isolats pNL4-3, wenn dessen Positiv-Strang-DNA in Richtung von 5' nach 3' gelesen wird. Um die Angaben nachvollziehbar zu machen, wird hierbei das Startcodon des env als Bezugspunkt herangezogen. Die entsprechenden Sequenzen sind bei den einzelnen HIV-1-Wildisolaten stets verschieden und können aus Platzgründen nicht erwähnt werden.

Primer	Sequenz	Bindungs- stelle	Ausrichtung	Restriktions- enzyme
EnvKlon-F1	GGAATTCGAGCAGAAG ACAGTGCAATGA	Übergang vpu / env	5' -> 3'	Eco RI, BbsI, BsrDI, Start
EnvKlon-F2	CCACTG/ACTGTGCCTT GGAA	1808 – 1826	5' -> 3'	
EnvKlon-F3	GTAGGAAAAGCAATGT ATGCCCC	1282 – 1304	5' -> 3'	BsrDI
EnvKlon-F6	AGCAGAAGACAGTGGC AATGA	Übergang vpu / env	5' -> 3'	BbsI, BsrDI, Start
EnvKlon-R1	CTACCACCGCTTGAGA GACTTACTCTAG GGATCCG	2296 – 2322	3' -> 5'	Bam HI, Stop
EnvKlon-R3	GTAGGAAAAGCAATGT ATGCCCC	1282 – 1304	3' -> 5'	BsrDI

Tab. 3 Dargestellt sind die Primer, welche zur Amplifikation von HIV-1-env in PCR und RT verwendet wurden. Die angegebenen Sequenzen (auch die der 3'-Primer) und Primerbindungsstellen beziehen sich auf die Nukleotidfolge des Isolats pNL4-3, wenn dessen + -Strang-DNA in Richtung von 5' nach 3' gelesen wird. Der Bezugspunkt ist jeweils das Startcodon von env. Unterstrichen: Schnittstellen von Restriktionsenzymen (verschiedene Farben), rot: Start- (ATG) oder Stopcodon (TAG). Einzelheiten siehe Text.

Der 5'-Primer der env-PCR wurde so in den Übergang von vpu zu env gelegt, dass sein größter Teil im C-Terminus des vpu liegt und seine Sequenz mit dem Startcodon (ATG) des env, gefolgt von einem weiteren Nukleotid Adenin, abschließt. Die Primer EnvKlon-F1 und EnvKlon-F6 sind hierbei sehr ähnlich und schließen eine sich im vpu befindende Schnittstelle für BbsI ein (6 – 13 bp upstream vom env-ATG). Die Schnittstelle für BsrDI spielt nur bei der Klonierung in zwei Fragmenten eine Rolle (s. u. und 2.2.4.1). Der letztgenannte ist lediglich etwas kürzer, wobei er vor dem env-ATG an die letzten 17 bp des vpu bindet. EnvKlon-F1 unterscheidet sich hiervon dadurch, dass seine Bindungsstelle 18 Nukleotide des vpu umfasst, und dass er an seinem eigenen 5'-Ende eine nicht hybridisierende Schnittstelle für Eco RI mitführt. Der Primer EnvKlon-F6 wurde konstruiert, weil angenommen wurde, dass sich die nicht hybridisierende EcoRI-Schnittstelle in EnvKlon-F1 evtl. negativ auf das PCR-Amplifikationsergebnis auswirken könnte. Wurde mit EnvKlon-F6 amplifiziert, was bei den meisten Isolaten der Fall war, konnte das gewonnene Fragment an seinem 5'-Ende nur mit BbsI geschnitten werden, weil die durch EnvKlon-F1 geschaffene zusätzliche Schnittstelle für Eco RI dann nicht vorhanden war (vgl.

2.2.4.1, 2.4.2 und Tab. 3). Erwähnt sei auch, dass sich innerhalb beider Primer vor dem Startcodon des env eine Schnittstelle für BsrDI befindet, welche auch im vpu-Gen des Isolats pNL4-3 vorhanden ist. Dies erwies sich als problematisch, wenn, wie unten beschrieben, das env in zwei Fragmenten kloniert werden sollte (vgl. 2.2.4.1). Als 3'-Primer wurde, mit Ausnahme der Zwei-Fragment-Strategie, immer EnvKlon-R1 verwendet (Bindungsstelle bei bp 2295 bis 2322). Die Nukleotidfolge TTG (bp 2320 – 2322) wird durch diesen Primer gezielt zu einem Stopcodon (TAG) mutiert, um die Proteinexpression der env-Fragmente an dieser Stelle zu unterbrechen (s. Abb. 12). Ähnlich wie bei EnvKlon-F1 wird auch hier durch eine Sequenz am Ende des Primers, welche nicht hybridisiert, eine Restriktionsschnittstelle geschaffen, in diesem Fall jedoch für das Enzym Bam HI. Durch die bisher genannten Primer EnvKlon-F1, –F6 und –R1 wird das env-Fragment (beim Isolat pNL4-3) über eine Länge von 2322 Nukleotiden amplifiziert, was den grössten Teil des env darstellt. Nicht Teil der Amplifikation ist lediglich ein Fragment von 240 bp, welches sich in der intrazellulären Domäne des gp 41 befindet (eine hochvariable Gensequenz.)

Neben der gerade beschriebenen Strategie, mit einer PCR den gewünschten env-Abschnitt in einem Fragment zu amplifizieren, wurde durch die Verwendung der Primer EnvKlon-F3 und –R3 eine Möglichkeit geschaffen, den o.g. env-Bereich in zwei getrennten Teilen zu klonieren. Die Bindungsstelle für EnvKlon-F3 und –R3 befindet sich beim Isolat pNL4-3 zwischen den Nukleotiden 1282 und 1304. Die Sequenzen dieser Primer sind zueinander revers komplementär und schließen eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BsrDI ein (bp 1291-1296). Eine Amplifikation erfolgte hier mit zwei verschiedenen Primerpaaren: Das 3'-Fragment (Fragment 1, bp 1282-2322 mit EnvKlon-F3 und –R1, das 5'-Fragment (Fragment 2, bp 1–1304) mit EnvKlon-F1 und –R3 (s. Abb. 12). Die weitere Klonierungsprozedur dieser Fragmente und deren Problematik ist in 2.2.4.1 beschrieben. Sie wurde nur für das Isolat P168 benutzt. Der Primer EnvKlon-F2, welcher bei den bp 1808 bis 1826 bindet, wurde gelegentlich als 5'-Primer benutzt, um in Kombination mit EnvKlon-R1 ein kurzes Fragment von 515 Nukleotiden Länge zu erhalten. Hiermit konnte u. a. kontrolliert werden, ob eine Extraktion von HIV-DNA (s. 2.2.2.1) genug Substrat geliefert hat und eine PCR aus diesem DNA-Material erfolgen kann. Eine Klonierung dieses Amplifikats erfolgte nicht. Zu beachten ist hier, dass dieser Primer in zwei verschiedenen Sequenzen vorliegt: Das (von seinem 5'-Ende aus gelesen) sechste Nukleotid ist entweder Guanin oder Adenin. Beide Versionen dieses Primers wurden zu je 50 % in den PCR-Mastermix aufgenommen. Dies geschah deshalb, weil sich bei der Konzeption dieses Primers in Bezug auf das Alignment der HIV-1-Wildisolate des Subtyps B zeigte, dass an dieser Stelle überwiegend entweder ein A oder ein G vorliegt.

---

## **2.2.2 Amplifikation von HIV-1-Wildtyp-env aus proviraler HIV-DNA**

### ***2.2.2.1 DNA-Extraktion aus Probenmaterial***

Bei den HIV-Isolaten, die proviral integriert in infizierten Zellen vorlagen (s. Tab. 1), erfolgte die DNA-Extraktion durch Proteinase K-Verdau (82) mit anschließender alkoholischer DNA-Fällung. Zur DNA-Extraktion und anschließenden Amplifikation wurden hierbei ausschließlich periphere Blutlymphozyten (PBLs) verwendet (vgl. 2.1.3).

### ***2.2.2.2 PCR-Amplifikation der extrahierten DNA***

Vor der PCR erfolgte ein Erhitzungsschritt von 15 min bei 95 °C zur Inaktivierung der Proteinase K. Daraufhin wurde das PCR-Standardprotokoll, welches anhand des Isolats pNLA1nef etabliert worden war (s. 2.2.1), auf die einzelnen HIV-1-Wildtypgenome angewendet und deren env-Gen amplifiziert. Hierbei kamen die in 2.2.1 genannten unterschiedlichen PCR-Strategien zur Anwendung.

## **2.2.3 Amplifikation von HIV-1-Wildtyp-env aus HIV-positiven Seren und Liquores**

### ***2.2.3.1 RNA-Extraktion aus Probenmaterial***

Bei dem zusätzlichen Versuch, das env aus HIV-RNA (in Serum oder Liquor) zu amplifizieren, wurde eine Extraktion auf der Grundlage der Adsorption von RNA an Silikapartikel durchgeführt ("Boom-Extraktion", Nuclisens<sup>®</sup>, Organon, (15)). Alternativ versuchten wir auch eine RNA-Extraktion mit dem Pureskript<sup>®</sup> RNA Isolation Kit der Firma Gentra, welches sich zur RNA-Isolierung einer Salz-Präzipitationsmethode unter Zusatz von RNase-Inhibitoren bedient.

### ***2.2.3.2 Reverse Transkription und PCR der extrahierten RNA***

Für die erfolgreiche Amplifikation von HIV-RNA aus dem Serum oder dem Liquor von infizierten Partienten ist nach einer unspezifischen RNA-Extraktion (s. Abschnitt 2.2.3.1) eine Reverse Transkription der Ziel-RNA in cDNA erforderlich, welche dann das Template für die anschließende PCR darstellt (RT-PCR, Reverse Transkription und anschließende PCR). Hierbei sind für diese beiden Schritte grundsätzlich zwei verschiedene Verfahrensweisen möglich:

- A) Die Reverse Transkription und die PCR erfolgen als zwei von einander unabhängige Prozeduren zeitlich nach einander, sog. "**two-step-RT-PCR-protocols**" (vgl. 2.2.3.2.1).

**B) B)** In einem "**one-step-RT-PCR-protocol**" erfolgen Reverse Transkription und PCR in ein- und demselben Versuchsansatz (vgl. 2.2.3.2.2).

Beide Prozeduren wurden in dieser Arbeit ausprobiert, wobei verschiedene Enzyme bzw. Enzymkombinationen aus Reversen Transkriptasen und Polymerasen zum Einsatz kamen. Unabhängig davon, welcher von beiden Versuchsansätzen verfolgt wird, treten hierbei Schwierigkeiten auf, welche in 4.2 ausführlich geschildert werden. Voraussetzung für die Lösung dieser Probleme ist ein leistungsfähiges PCR-Protokoll, welches anhand des subgenomischen HIV-1-Plasmids pNLA1nef etabliert wurde (vgl. 2.2.1). Sofern es sich um ein „two-step-protocol“ (s. 2.2.3.2.1) handelte, wurde dieses optimierte PCR-Protokoll einer wie auch immer gearteten RT nachgeschaltet. Der „one-step-Ansatz“ (s. 2.2.3.2.2), welcher ebenfalls getestet wurde, verfügt über eine eigene Methodik. Auch die Amplifikation des env aus HIV-RNA wurde sowohl in einem als auch in zwei Fragmenten ausprobiert (s. 3.1.3). Die Amplifikation von HIV-RNA-Wildtyp-Isolaten stellte in soweit eine besondere Herausforderung dar, als für eine Optimierung der RT-Reaktion kein geeignetes Standardsystem ähnlich pNLA1nef (für die PCR auf DNA-Ebene) zur Verfügung stand. Es war notwendig, in zahlreichen Versuchen die RT-Reaktion in ihrer Kombination mit der anschließenden PCR so einzustellen, dass die Amplifikation der HIV-Wildtyp-RNA gelingt. Hierfür wurden, ähnlich der PCR-Optimierung (s. 2.2.1), verschiedene methodischen Strategien getestet, welche ebenfalls dem Abschnitt 4.2 zu entnehmen sind. Als 3'-Primer wurde sowohl in RT als auch PCR immer EnvKlon-R1 verwendet.

#### **2.2.3.2.1 Two-Step-RT-PCR**

Hierbei wurden vier verschiedene Reverse Transkriptasen ausprobiert, welche alle mit dem Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System enzyme mix (Boehringer Mannheim, Nr. 1732650) als Teil des optimierten PCR-Protokolls (s. 2.2.1 und 3.1.1) kombiniert wurden: 1) C-therm. Polymerase for Reverse Transcription in Two-Step RT-PCR (Roche, No. 2016311), eine Reverse Transkriptase (RT), die anstelle von Mangan Magnesiumionen als Cofaktor benutzt, was zu einer geringeren Fehlerrate bei der cDNA-Synthese führt (105). 2) Superscript<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (GibcoBRL<sup>®</sup>, Cat. No.18064-014), welche einem E. coli entstammt, der das pol-Gen des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) exprimiert, bei welchem durch gezielte Mutation die intrinsische RNase H-Aktivität ausgeschaltet wurde (80). Reverse Transkriptasen sind generell multifunktionelle Moleküle mit drei verschiedenen Enzymaktivitäten: einer RNA-abhängige DNA-Polymerase, einer RNA-DNA-Hybrid-abhängige Exoribonuklease (RNase H, dient der Degradierung der RNA nach der RT) und einer DNA-

abhängige DNA-Polymerase. Von diesen drei Teilfunktionen werden die ersten beiden für die *in vitro* cDNA-Einzelstrangsynthese benutzt. 3) Omniscript™ RT Kit (Qiagen Cat. No. 205111) und 4) Sensiscript™ RT Kit (Qiagen Cat. No. 205211). Die beiden letzten Enzyme sind grundsätzlich ähnlich. Sie unterscheiden sich lediglich darin, dass Sensiscript™ zur cDNA-Erststrangsynthese bei einer RNA-Ausgangsmenge von < 50 ng und Omniscript™ für Mengen > 50 ng RNA konstruiert wurde. (Die RNA-Menge entspricht jeweils der Gesamtmenge an RNA, d.h. rRNA, mRNA, Carrier-RNA und viraler RNA.)

#### **2.2.3.2.2 One-Step-RT-PCR**

Für ein „one-step-protocol“ wurde das Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Cat. No. 210212) verwendet, welches sich für die Reverse Transkription einer Kombination aus Omniscript™ RT und Sensiscript™ RT bedient (s.o.). Die anschließende DNA-Amplifikation durch die HotStarTaq DNA-Polymerase, einer modifizierten Form der rekombinanten 94 kDa Taq Polymerase von Qiagen, erfolgt als sog. „hot-start-PCR“. Dies bedeutet, dass in *einem* Reaktionsgefäß nach beendeter Reverser Transkription sowohl Omniscript™ als auch Sensiscript™ durch einen Erhitzungsschritt (15 min, 95 °C) inaktiviert werden. Gleichzeitig wird durch diesen Temperaturanstieg die HotStarTaq DNA-Polymerase aktiviert. Da diese bei niedrigeren Temperaturen inaktiv ist, wird zuvor eine ungewollte unspezifische Amplifikation von DNA verhindert. Das Protokoll und die Amplifikationsparameter für diese RT-PCR entsprachen in der Regel denen des Handbuchs des o. g. RT-PCR Kits.

### **2.2.4 Klonierung von HIV-1-env in Expressionsplasmide, Transfektion in Zellreihen**

#### **2.2.4.1 Klonierung von env in Expressionsplasmide, Transfektion in Prokaryonten**

Die Extraktion der HIV-DNA mit anschließender PCR führt zur Vermehrung einer HIV-Wildtyp-Sequenz, welche nahezu dem gesamten env des zugehörigen HIV-Wildtyp-Isolats entspricht (s. 2.2.1). Im Anschluß daran musste dieses Fragment in einen Expressionsvektor hineinkloniert werden. Dazu wurden die Wildtyp-env-Amplifikate mittels eines Phenol-Chloroform-Protokolls extrahiert, mit denselben Restriktionsenzymen wie der Vektor verdaut, elektrophoretisch in Low-Melt-Agarose® (Low melting temperature agarose, FMC® BioProducts, Cat. No. 50080, Rockland, Maine, USA) aufgetrennt und im Anschluss daran durch T4-DNA-Ligase® (Roche, Nr. 481220) mit dem gewünschten Plasmid ligiert. Wie bereits in 2.2.1 dargestellt, bestimmt die Sequenz der Primer, mit denen die PCR erfolgte, mit welchen Restriktionsenzymen ein amplifiziertes Fragment geschnitten werden kann. Aus der Tab. 3 im

Abschnitt 2.2.1 und den Ausführungen in jenem Kapitel ist ersichtlich, dass das 5'-Ende des env-Fragments nur dann mit Eco RI geschnitten werden kann, wenn die PCR hier mit EnvKlon-F1 erfolgte. Wurde hingegen EnvKlon-F6 verwendet (was meistens der Fall war), stand nur BbsI als Schnitzzym zur Verfügung. Als Expressionsvektor sollte das Plasmid pSGenvdel1 benutzt werden (vgl. 2.4.2 und 2.4.2.1), indem das hierin enthaltene env (des Isolats pNL4-3) gegen die amplifizierte Wildtyp-env-Fragmente auszutauschen war. pSGenvdel1 verfügt jedoch am N-Terminus des env nur über eine Eco RI-Schnittstelle. Mit BbsI kann hier nicht geschnitten werden, was aber, wie gesagt, meistens erforderlich war. Dieses Problem wurde gelöst, indem die 18 C-terminalen bp des vpu aus dem Plasmid pNLA1 (s. 2.4.1) vor das Startcodon des env in pSGenvdel1 hineinkloniert wurden (Teil der vorliegenden Arbeit, s. 2.4.2.1 und 3.1.4). Das auf diese Weise neu entstandene Plasmid erhielt den Namen pSGenvdel1BbsI. Es kann innerhalb von vpu vor dem Startcodon des env mit Eco RI und BbsI (und BsrDI) geschnitten werden. In den meisten Fällen erfolgte die Klonierung von HIV-1-Wildtyp-env in einem Fragment in diesen Expressionsvektor hinein (s. 2.4.2). Der Verdau erfolgte dann mit BbsI am 5'-Ende und Bam HI am 3'-Ende des env jeweils beim Amplifikat und im Expressionsplasmid. Wurde mit EnvKlon-F1 amplifiziert, konnte auch mit Eco RI geschnitten werden. Die Struktur des Plasmids pSGenvdel1BbsI ist in 2.4.2.1 dargestellt.

Das Isolat P168 ist ein Sonderfall, weil dessen Amplifikation, wie in 2.2.1 beschrieben, in zwei Fragmenten erfolgte. Die PCR bediente sich hierbei der Primer EnvKlon-F1, -R1, -F3 und -R3 (vgl. 2.2.1). Am N-Terminus des 5'-Fragments (Fragment 2) wurde mit Eco RI und am C-Terminus des 3'-Fragments mit BamHI geschnitten. Sowohl das 3'-Ende des 5'-Fragments als auch das 5'-Ende des 3'-Fragments wurden mit BsrDI geschnitten (vgl. Abb. 12 und Tab. 3 in 2.2.1). (Zur Problematik hierbei s.u.!) Die beiden env-Fragmente wurden in das Plasmid pSGpNLA1tat hineinkloniert. Dies liegt daran, dass P168 das erste Wildtyp-env-Amplifikat war, welches amplifiziert werden konnte. Das Konstrukt pSGenvdel1BbsI wurde erst später erzeugt. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war noch nicht abzusehen, dass später mit EnvKlon-F6 amplifiziert werden sollte, und damit pSGenvdel1BbsI als Derivat des pSGenvdel1 für die Klonierung notwendig wurde. Am Anfang der Experimente bestand die Absicht, das Wildtyp-env gegen das tat (beim Isolat pNL4-3 271 bp lang) in pSGpNLA1tat auszutauschen (vgl. 2.4.2.2). Der gedankliche Hintergrund hierfür ist, dass tat und env nach einem Restriktionsverdau in einer Agarose-Gel-Elektrophorese auf Grund ihrer unterschiedlichen Länge voneinander zu unterscheiden sind. Sollte es beim Restriktionsverdau vor der Ligation der Fragmente passiert sein, dass der Expressionsvektor nur partiell verdaut wurde, kann dann das auf diese Weise im Plasmid verbliebene tat, nach Transfektion der Vektoren in Prokaryonten,

durch den erneuten Verdau derer Plasmide mit den gleichen Restriktionsenzymen von einem klonierten env unterschieden werden. Bei Verwendung von pSGenvdel1BbsI als Expressionsplasmid besteht diese Möglichkeit nicht, da die hierin enthaltene env-Sequenz des Isolats pNL4-3 in ihrer Länge (2250 Nukleotide, vgl. 2.4.2.1) nicht sicher von der der env-Wildsequenzen (die Länge ist hier jeweils verschieden) unterschieden werden kann. Wie in diesem Fall zwischen dem Isolat pNL4-3 und den Wildisolaten differenziert wurde, ist weiter unten und in 2.2.4.2 beschrieben.

Als problematisch erwies sich die Klonierung von HIV-1-Wildtyp-env in zwei Fragmenten, weil das Enzym BsrDI, welches für den Restriktionsverdau in diesem Fall verwendet wurde (s.o.), ein vielschneidendes Enzym ist, dessen Schnittsequenz (GCAATGNN|N) die Nukleotidfolge ATG einbezieht. Diese Sequenz findet sich nicht nur innerhalb der Primer EnvKlon-F3 und -R3, sondern auch in EnvKlon-F1 und -F6, also am 5'-Ende des amplifizierten Bereichs im Übergang von vpu zu env (vgl. Abb. 12 und Tab. 3 in 2.2.1). Der Restriktionsverdau des amplifizierten 5'-Fragments (Fragment 2) sollte, wie bereits gesagt, mit BsrDI und Eco RI erfolgen. BsrDI schnitt aber folgerichtig nicht nur am C-Terminus dieses Fragments, sondern auch vor dem ATG des env, und entfernte somit das Startcodon. Die Klonierung gelang nur durch einen Partialverdau des Fragments 2, bei dem BsrDI am C-Terminus und Eco RI am N-Terminus des Fragments 2 schnitt. Ein Verdau am 5'-Ende mit BsrDI durfte nicht erfolgen. Das Plasmid pSGpNLA1tat wurde mit Eco RI (am N-Terminus des env) und Bam HI (am C-Terminus) geschnitten (vgl. 2.4.2.2).

Wie in 2.4.2 zu sehen, ist es für die Proteinexpression von env belanglos, ob dieses in pSGenvdel1BbsI oder pSGpNLA1tat hineinkloniert wurde. In beiden Fällen liefert der 5'-Primer das Start- und der 3'-Primer das Stopcodon. Beide DNA-Plasmide enthalten einen "origin of replication" (ori), um die Replikation im E. coli zu ermöglichen, und das  $\beta$ -Lactamase-Gen (Ampicillinresistenz, amp<sup>®</sup>), um eine prokaryotischen Selektion zu erzielen. Eine Expression anderer HIV-Proteine als des env findet nicht statt (vgl. 2.4.2). Als Prokaryont wurde der E.coli-Stamm DH5 $\alpha$ F'IQ (Life Technologies) verwendet, der seine Transformationskompetenz durch Vorbehandlung mit Hexaminocobaltchlorid und DMSO erworben hat (121). Die Transfektion wurde als 90sec-Hitze/Kälteschritt mit darauf folgender Bebrütung eines LB-Agars (Luria Broth Agar, GibcoBRL, Cat. No. 22700-025) unter dem Zusatz von Ampicillin durchgeführt. Waren nach erfolgreicher Transfektion über Nacht Kolonien gewachsen, wurden sie angepickt und in LB-Medium (Luria Broth Base-Medium, GibcoBRL, Cat. No. 12795-027, Ampicillin, 50  $\mu$ g/ml) erneut über Nacht im Bakterienschüttler inkubiert. Die Extraktion der rekombinanten Vektoren aus den Bakterienkulturen gelang mittels alkalischer Lyse (121). Um herauszufinden, ob es sich

bei einem Plasmid um einen HIV-Wildtyp oder den Laborstamm pNL4-3 handelte, erfolgte ein Restriktionsverdau mit verschiedenen (z. T. vielschneidenden) Enzymen, und die Analyse der entstandenen Fragmente in einem Agarosegel (Biozym DNA Agarose, Artikel-Nr. 870055) mit Ethidiumbromid-Zusatz (10 mg/ml) unter einem UV-Schirm. Beim Isolat P168, welches in zwei Fragmenten kloniert wurde, konnte hierbei das ursprünglich im Expressionsvektor enthaltene tat von env besonders gut unterschieden werden (s.o.). Zur Abschätzung der Fragmentlänge eines PCR-Amplifikats bzw. eines verdauten env-Abschnitts wurde stets ein Kb-Leiter mitaufgetrennt (1 Kb DNA Extension Ladder, GIBCOBRL, Cat. No. 10511-012).

#### ***2.2.4.2 Plasmid-DNA-Isolierung, -Reinigung und -Sequenzierung***

Die Reinigung der Plasmide erfolgte über eine Anionenaustauscher-Säule (Quiagen<sup>®</sup>, Plasmid Maxi Kit No. 12162). 150 ml LB-Medium lieferten dabei ungefähr 200-500 µg DNA. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit der Plasmide wurden diese in TE-Puffer (Tris-EDTA) 1:200 verdünnt und ihre optische Dichte (OD) in einem Photometer (Pharmacia LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer) bei 260 und 280 nm bestimmt. Es wurde darauf geachtet, daß der Quotient aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub>, welcher die DNA-Reinheit anzeigt, bei ca. 1,8 liegt (was reiner DNA entspricht). Die OD<sub>260</sub> entspricht der Konzentration an DNA. Um bei den später durchgeführten Transfektionen der Expressionsvektoren in Eukaryonten (s. 2.2.4.3) eine quantitativ einheitliche Plasmidmenge pro Isolat einsetzen zu können, wurden die Vektoren alle auf eine DNA-Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

Zur Differenzierung zwischen pNL4-3 und HIV-1-Wildtypen wurde erneut mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und das entstandene Fragmentmuster im Agarosegel (Biozym DNA Agarose, Artikel-Nr. 870055) unter UV-Licht analysiert (vgl. 2.2.4.1). Des Weiteren wurden sowohl der V3-Loop als auch die Spaltstelle des gp160 bezüglich ihrer Nukleotidfolgen im BMFZ (Biomedizinisches Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) sequenziert. Weiteren Aufschluß über Struktur und Funktion des Wildtyp-Env lieferte sein Verhalten im Syncytien-Assay der Zellkultur und den Proteinnachweisen (s. Abschnitt 2.3).

#### ***2.2.4.3 Transfektion von HIV-1-env-Expressionsvektoren in Eukaryonten***

Die Transfektion der hergestellten HIV-1-env-Wildtyp-Expressionsvektoren erfolgte in drei verschiedene Subtypen der HeLa-Zelllinie, welche auf ihrer Zelloberfläche jeweils einen unterschiedlichen Rezeptorstatus aufweisen: 1) HeLa-Zellen (CD4-negativ), 2) HeLaT4 (CD4- und CXCR4-positiv) und 3) HeLaT4R5 (CD4-, CXCR4- und CCR5-positiv). HeLa-Zellen sind humane Zervixkarzinomzellen, in welche die Gene für die o. g. Rezeptoren stabil integriert

wurden. Durch zusätzliche Einklonierung eines Geneticin-Resistenzgens kann eine Selektion gegenüber diesem Antibiotikum in der Zellkultur erfolgen. Die Transfektion erfolgte jeweils in der Absicht, im Anschluß daran die Zellkultur auf das Vorhandensein von Syncytien zu testen (bei HeLaT4 und HeLaT4R5), und Proteinnachweise des Env aus verschiedenen Kompartimenten der Zellkultur zu führen (s. 2.3). Das Transfektionsprotokoll in die o.g. Zellreihen ist grundsätzlich beim Syncytien-Assay (2.3.1), Immunblot (2.3.2) und IFT (2.3.4) gleich und wird in der Folge beschrieben. Eine Ausnahme bildet lediglich der RIPA, dessen Methodik dem Abschnitt 2.3.3 zu entnehmen ist.

Für die Transfektion der rekombinanten Plasmide in Eukaryonten wurden jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen/cup in 6-Loch-Platten (9,6 cm<sup>2</sup> Fläche/cup) über Nacht kultiviert. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel, woraufhin einige Stunden später die Transfektion durchgeführt wurde. Wir benutzten nicht-liposomale Transfektionsreagenzien (FuGENE 6 Transfection reagent<sup>®</sup>, Roche No. 1814443) und setzten jeweils 5 µg Plasmid-DNA/Ansatz (in einer Konzentration von je 1 µg/µl, s. 2.2.4.2) ein.

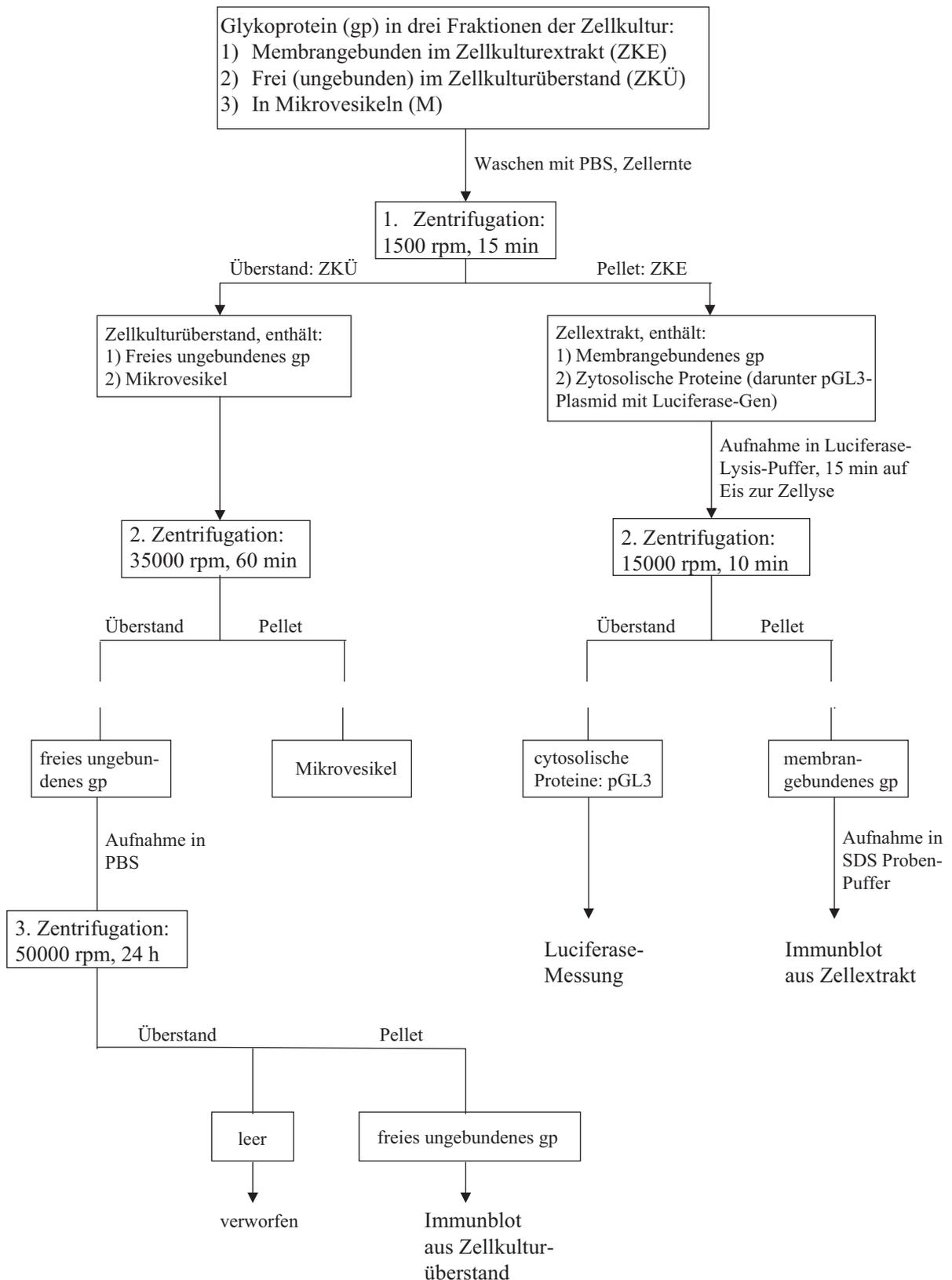
Es wurden zwei Plasmide kotransfiziert: 1) Durch die Kotransfektion von 0,2 µg des Plasmids pGL3<sup>®</sup> (Promega, pGL3-Control Vector, Cat. No. E1741, vgl. 2.4.3), welches für das Luciferase-Gen des *Photinus pyralis* kodiert, und das entsprechende Protein unter der Kontrolle des SV40<sub>early</sub> Promotors exprimiert (SV40e) (4), konnte die Transfektionseffizienz gemessen werden (vgl. 2.2.4.4). Eine solche Messung geschah aber nur im Rahmen des Syncytien-Assays und des Immunblots (s. 2.2.4.4, 2.3). 2) Das ebenfalls kotransfizierte Plasmid pSGrev (vgl. 2.4.2.3) war erforderlich, um eine Proteinexpression von env zu ermöglichen (vgl. 1.2).

Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pSGenvdell transfiziert, welches in 2.4.2.1 beschrieben ist. Als Negativkontrolle bedienten wir uns des Vektors pSGBK, welcher keine HIV-Proteine exprimiert, jedoch in seiner Struktur ebenfalls der Reihe der pSG-Plasmide angehört. Diese Kontrollen wurden beim Syncytien-Assay sowie den Proteinnachweisen des Env in der Zellkultur mitgeführt.

#### ***2.2.4.4 Aufarbeitung der Zellkultur für Proteinnachweise, Transfektionseffizienz***

Nachdem die Zellen transfiziert worden waren, war es grundsätzlich immer möglich, einen Syncytien-Assay (s. 2.3.1) durchzuführen. Immunfluoreszenznachweise wurden im Anschluß daran nur aus Zellkulturextrakt (ZKE) durchgeführt, wofür in diesem Fall dann lediglich ein Zentrifugationsschritt der geernteten Zellen erforderlich war (s. 2.3.4). Eine Messung der Transfektionseffizienz erfolgte hierbei nicht. RIPAs wurden nach der Transfektion aus ZKE und

Zellkulturüberstand (ZKÜ) angefertigt. Hierbei ist die genaue Verfahrensweise dem Abschnitt 2.3.3 zu entnehmen. Proteinnachweise durch Western-Blots wurden aus Zellkulturextrakt und Zellkulturüberstand geführt. Hierfür mussten die Zellen in der in Abb. 13 beschriebenen Art und Weise aufgearbeitet werden:



---

Abb. 13 Ernte und Aufarbeitung der Zellkultur für Immunblots. Einzelheiten siehe Text.

Nach Waschen mit PBS und Ernte der Zellen (mit einem Zellkratzer, ebenfalls in PBS) wurde der Inhalt jedes Zellkultur-Cups zentrifugiert (1500 rpm, 15 min). Der auf diese Weise gewonnene Zellkulturüberstand wurde in ein separates Reaktionsgefäß überführt und in der Folge getrennt vom Zellkulturextrakt verarbeitet, welcher nach dieser Zentrifugation im Pellet zu finden war: 1) Zellkulturextrakt: Das Pellet enthielt die membrangebundene Glykoproteinfraktion und cytosolische Proteine (darunter auch das pGL3<sup>®</sup>-Plasmid, Promega, pGL3-Control Vector, Cat. No. E1741, welches für das Luciferase-Gen kodiert, vgl. 2.2.4.3). Es wurde in Luciferase-Puffer (Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer, Promega, Cat. No. E4030) aufgenommen, hierin auf Eis 15 min zur Zellyse inkubiert, und anschließend zentrifugiert (15000 rpm, 10 min). Der Überstand enthielt die cytosolische Fraktion der Zellen und diente der Messung der Luciferase-Aktivität (und damit der Transfektionseffizienz, s.u.) in einem Luminometer (Pharmacia LKB Ultraspec Plus Spectrophotometer). Das Sediment lieferte die membrangebundenen Glykoproteine und wurde in SDS-PAGE-Probenpuffer (70 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerol, 5% Mercaptoethanol, Bromphenolblau) (91) aufgenommen. Nach einem Hitzeschritt (3 min, 95 °C) erfolgte hieraus der Immunblot des Zellextrakts. Zu beachten ist, dass die Glykoproteine, welche hierbei detektiert werden, zwar somit an Membranen gebunden sein müssen, dies aber nichts darüber aussagt, ob es sich dabei um die Zellmembran oder Membranen im Zellinneren (z.B. im Endoplasmatischen Retikulum (ER)) handelt. 2) Zellkulturüberstand: Hierin waren das freie, ungebundene Glykoprotein und die Mikrovesikel zu finden. Zur Trennung dieser beiden Fraktionen der Zellkultur wurde 60 min bei 35000 rpm zentrifugiert. Das Pellet, welches die Mikrovesikel enthielt, wurde in ROTI-Load-Puffer (Carl Roth GmbH & Co., Roti<sup>®</sup> Load 1, 4x-konzentriert, Art. K929.1) aufgenommen. Der Überstand (freies Glykoprotein) wurde zur erneuten Reinigung 24 Stunden bei 50000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und ebenfalls ROTI-Load-Puffer auf die sedimentierten Glykoproteine gegeben. Somit stand das freie, nicht-membrangebundene Glykoprotein zum Proteinnachweis zur Verfügung. Ein Proteinnachweis aus der Mikrovesikelfraktion erfolgte nicht.

Die Messung der Luciferaseaktivität (s.o.) erfolgte in der Einheit relative light units (RLU). Die hierbei ausgesandte Biolumineszenz wurde 5 sec nach Zugabe des Luciferasesubstrats über einen Zeitraum von 15 sec gemessen. Da es in der vorliegenden Arbeit notwendig war, die Proteinexpression von HIV-1-Env verschiedener Wildtyp-Isolate in der Zellkultur *quantitativ* untereinander und mit der des HIV-1-Laborisolats pNL4-3 zu vergleichen, wurden die Werte der Transfektionseffizienz beim Western-Blot berücksichtigt. Die Templatemengen der einzelnen

---

Isolate wurden für die Immunoblots mengenmäßig geeicht, sodass die gemessene Proteinmenge von der Transfektionseffizienz unabhängig wurde. Der Immunblot stellt in der vorliegenden Arbeit das einzige Verfahren dar, mit dem die Proteinexpression verschiedener HIV-1-Isolate in der Zellkultur *quantitativ* gemessen und verglichen werden kann. In den anderen Proteinnachweisverfahren (IFT und RIPA) erfolgte keine Luciferasemessung, wodurch lediglich ein qualitativer Proteinnachweis möglich ist. Der Syncytien-Assay beinhaltet zwar eine Messung der Transfektionseffizienz (im Rahmen des anschließenden Western-Blots), er ist jedoch durch die Art seiner Auswertung ein semiquantitatives Verfahren (s. 2.3.1). Auf die Tatsache, dass die Mengen der bei der Transfektion eingesetzten Plasmid-DNA einheitlich waren, wurde bereits in den Abschnitten 2.2.4.2 und 2.2.4.3 hingewiesen.

## **2.3 Syncytien-Assay und Proteinnachweise von HIV-1-Env**

### **2.3.1 Syncytien-Assay**

Das Phänomen der Membranfusion zwischen einem HIV-1-Partikel und einer CD4-positiven Zielzelle wurde im Abschnitt 1.5.3 beschrieben. Auch auf die Syncytienbildung in Zellkulturen als cytopathischer Effekt (CPE) des HIV wurde bereits eingegangen (s. 1.6.2). Sie erfolgt durch die Proteinexpression von Env in einer mit HIV infizierten (bzw. HIV-env-transfizierten) Zelle und die Prozessierung des Glykoproteins bis zum Erscheinen von gp 120 und gp 41 auf der Zelloberfläche (s. 1.5.2). Anschließend fusionieren die Zellen durch die Verschmelzung des HIV-Hüllproteins der eine Zelle mit dem HIV-Rezeptor (CD4, CXCR4) der anderen Zelle. Dieses Ereignis ist in Abb. 14 anhand des Plasmids pNLA1 zu verfolgen, welches in HeLaT4 - Zellen transfiziert wurde:

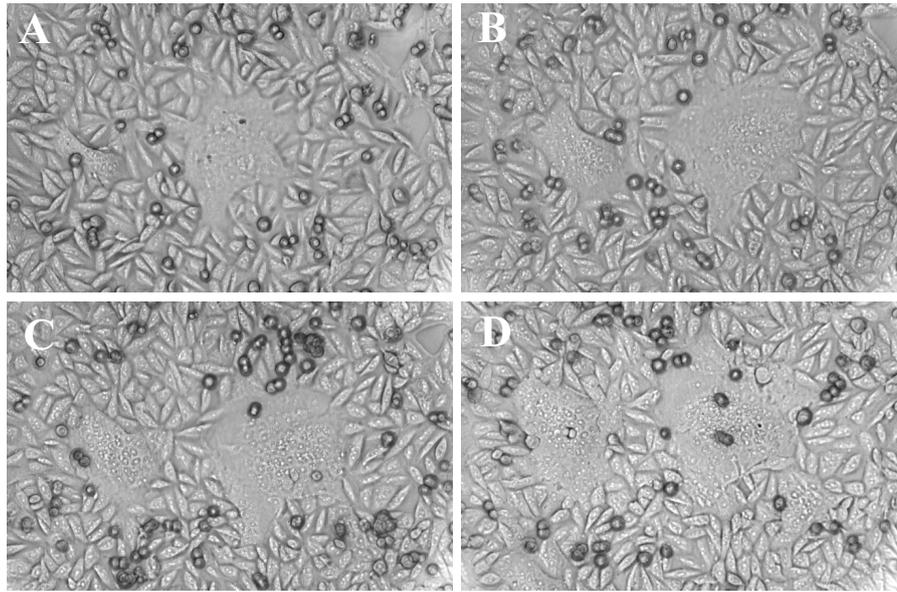


Abb. 14 Entwicklung von Syncytien nach Transfektion des Vektors pNLA1 in HeLa-T4<sup>+</sup> - Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. A. nach 19 Stunden, B. nach 22 Stunden, C. nach 25 Stunden, D. nach 28 Stunden (wiedergegeben aus (2))

Die Ausbildung von Syncytien kann nur in solchen Zellen erfolgen, welche die oben genannten HIV-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche ausbilden. Von den in 2.2.4.3 genannten Zellreihen, in welche die Transfektion der HIV-1-Expressionsvektoren erfolgte, nämlich HeLa-Zellen (CD4-negativ), HeLaT4 (CD4-, CXCR4-positiv) und HeLaT4R5 (CD4-, CXCR4-, CCR5-positiv), erfüllen nur die beiden letztgenannten dieses Kriterium. Die Stärke der Fusionsaktivität korreliert einerseits mit der Menge der Proteinexpression und andererseits mit der Funktionalität des jeweiligen Env-Isolats. Daher war das Ausmaß der Syncytienbildung bei den einzelnen HIV-1-Wildtyp-Isolaten von besonderem Interesse. Die Menge an Riesenzellen wurde beurteilt, indem ihr Auftreten bzw. Ausbleiben nach folgender Skalierung bewertet wurde: 0 = keine, + = wenige, ++ = viele, +++ = sehr viele große Syncytien. Eine genaue Auszählung der Zellfusionen erfolgte nicht, da es für die Aussagekraft der Experimente nicht erforderlich war. Eine semiquantitative Abschätzung der Fusionsaktivität eines Isolats im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle (vgl. 2.2.4.3) genügte hierfür. Die Transfektionseffizienz in Form der Luciferase-Werte wurde nach der Zellernte im Rahmen der Aufarbeitung der Zellen für den Immunblot (s. 2.2.4.4) bestimmt, und bei der Bewertung der Fusionskapazität der Isolate berücksichtigt. Hiermit ist es u. a. möglich, auszuschließen, dass ein Ausbleiben von Riesenzellen durch eine zu geringe Transfektionseffizienz bedingt ist. Eine arithmetische Normierung der beobachteten Syncytienbildung auf diese Werte erfolgte auf Grund der o.g. Skalierung nicht.

### 2.3.2 Immunoblot (Western-Blot)

Western-Blots (WB) wurden aus Zellkulturextrakt und Zellkulturüberstand durchgeführt. Die Aufarbeitung dieser Fraktionen der Zellkultur ist in 2.2.4.4 beschrieben. Für die Immunoblot-Analyse erfolgte die Zellernte 40 h nach Transfektion. Es folgte eine Elektrophorese in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel, bevor anschließend die Proteine auf eine modifizierte Nitrozellulose-Membran überführt wurden (Immobilon<sup>TM</sup>-P Transfer Membrane, Cat. No. IPVH00010, Pore Size 0,45 µm). Freie Bindungsstellen der Membran wurden durch dreistündige Inkubation (bei Raumtemperatur) mit Blockierungsreagenz (10 % Milchpulver + 0,1 % Tween in PBS) geblockt. Die spezifische Protein-Detektion erfolgte durch Inkubation mit HIV-1 spezifischen monoklonalen Antikörpern über 1 h (anti-gp120, No. 87-133/026, Behring, Sommerville, NJ; anti-gp41, Chessie 8, freundlich zur Verfügung gestellt von V. Bosch, Heidelberg). Danach wurde die Membran einmal mit PBS und zweimal mit einem Waschpuffer (0,5 % Tween in PBS) gewaschen, bevor sie mit dem Zweitantikörper (Anti-mouse Ig, Horseradish Peroxidase linked F(ab')<sub>2</sub> fragment (from sheep), American Pharmacia, Biotech UK Limited, NA9310) wiederum für 60 min inkubiert wurde. Die durch Zusatz von Peroxidasesubstrat (ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents, RPN2106) hervorgerufene Chemilumineszenz wurde anschließend auf speziellem Fotopapier (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> High performance chemiluminescence film, amersham pharmacia, Biotech UK Limited, RPN3103K) zur Darstellung gebracht. Auf die Bedeutung des Immunoblots als einzige von uns verwendete Methode zur *quantitativen* Beurteilung der Expression von HIV-1-Proteinen wurde bereits in 2.2.4.4 eingegangen.

### 2.3.3 Radioimmunopräzipitation (RIPA)

RIPAs zum Nachweis von HIV-1-Proteinen konnten mit der hier geschilderten Methodik sowohl aus Zellkulturextrakt (ZKE) als auch aus Zellkulturüberstand (ZKÜ) durchgeführt werden. Wie bereits in 2.2.4.3 erwähnt, verlief die Transfektion der HIV-Expressionsplasmide für die RIPA anders als bei den anderen Proteinnachweisverfahren. Subkonfluente Zellen (ca. 3 x 10<sup>5</sup>/cup) in L6-Platten (9,6 cm<sup>2</sup> pro cup) wurden mit 2 µg Plasmid transfiziert. 40 Stunden nach Transfektion wurde das Medium entfernt und für 60 min durch Methionin/Cystein-freies Medium ersetzt (sog. „Hungermedium“). Danach wurden 250 µCi [<sup>35</sup>S]Methionin-Cystein-Mix (Pro-Mix<sup>TM</sup>, Amersham-Buchler Braunschweig, Cat. No. SJQ 0079, (70% L-[<sup>35</sup>S] Methionin + 30 % L-[<sup>35</sup>S] Cystein) ebenfalls für 60 min zugegeben ("pulse"). Nach Entfernung dieser Markierungslösung wurden die Zellen mit Pufferlösung gewaschen und für zwei Stunden Dulbecco's MEM ohne

Serumzusatz zugegeben ("chase"). Das weitere Verfahren hing davon ab, ob Zellkulturextrakt oder Zellkulturüberstand untersucht wurde. Bei ZKE wurden das letztgenannte Medium entfernt und die Zellen lysiert (0,15M NaCl, 1% Natrium-Deoxycholat, 1% Triton X-100, 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS), 1µg/ml Aprotinin, 1µg/ml Leupeptin, 100 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in 10 mM Tris-Cl, pH 7,4). Anschließend wurde das Zelllysate nach Zugabe der polyklonalen Antikörper (s.u.) mit einer Suspension von Protein-A-Agarose (Roche, Cat-No. 1719408) adsorbiert. Hiernach wurde jeweils dreimal zentrifugiert und in 1% Triton X-100, 0,1 % SDS in 10 mM Tris-Cl, pH 7,4 gewaschen. Eine Trennung der cytosolischen Proteine von den Membranproteinen erfolgte somit, im Gegensatz zur Aufarbeitung der Zellen für den Western-Blot, nicht. Bei ZKÜ wurden zuerst 200 µl Medium zur Beseitigung von Zellresten 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und dann der Überstand durch Zugabe von Tris-HCl auf pH 7,4 eingestellt. Hier erfolgte keine Adsorption an Protein-A-Agarose. Durch dieses Verfahren wird die sich im ZKÜ befindliche Mikrosomalfraktion nicht von der des freien Glykoproteins getrennt, was jedoch für den Immunoblot geschah (vgl. 2.2.4.4). Die Immunpräzipitation erfolgte sowohl bei ZKE als auch bei ZKÜ mit humanen HIV-1 positive Seren, die von Patienten der Düsseldorfer Universität stammten. Diese waren im Immunoblot (New-LAV-Blot<sup>®</sup>, Pasteur) vorgetestet worden (nicht Teil dieser Arbeit). Bei der Auswahl der HIV-Seren wurde dabei auf eine starke Reaktivität mit HIV-1-Env und eine schwache Bindung an zelluläre Proteinen geachtet. Es handelt sich bei der RIPA grundsätzlich um einen Proteinnachweis mit polyklonalen Antikörpern (im Gegensatz zu Western Blot und IFT, welche mit monoklonalen Antikörpern erfolgen). Die Präzipitate wurden in SDS-PAGE-Probenpuffer überführt und durch Zusatz von 5% Mercaptoethanol und Inkubation bei 95 °C für 5 min reduzierenden Bedingungen ausgesetzt. Die Elektrophorese wurde in 10% SDS-Polyacrylamidgel durchgeführt. Es erfolgte eine Behandlung der Gele mit Amplify<sup>™</sup> sowie deren Trocknung, bevor auf ihnen bei -70 °C 2-4 Tage lang ein Röntgen-Film (Hyperfilm-MP<sup>™</sup>) exponiert wurde. Bei der RIPA erfolgte keine Messung der Transfektionseffizienz (vgl. 2.2.4.3 und 2.2.4.4). Es sind durch dieses Verfahren folglich keine quantitativen Aussagen zur Expression von HIV-Proteinen möglich. Qualitative Nachweise von Proteinen in Zellkulturextrakt oder -überstand sind jedoch möglich.

#### **2.3.4 Immunfluoreszenz (IFT)**

IFTs wurden nur von HIV-1-Glykoproteinen im Zellkulturextrakt durchgeführt, welche in der folgenden Art und Weise gewonnen und weiterverwendet wurden: Die Zellen wurden 40

---

Stunden nach Transfektion mit Trypsin abgelöst, in PBS überführt und zentrifugiert (10 min, 4000 rpm). Der Überstand wurde bis auf 50 µl verworfen, und die Zelldichte somit auf ca.  $2 \times 10^4$  Zellen/µl eingestellt. Je 2 µl einer Kultur wurden auf das Loch eines Objektträgers aufgetragen. Anschließend wurde im Lichtmikroskop kontrolliert, ob die Zellen nicht hyperkonfluent waren. Der Objektträger wurde anschließend luftgetrocknet, 5 min in eiskaltem Methanol fixiert, und daraufhin nach erneuter Trocknung verwendet bzw. bei 4 °C zwischengelagert. Zum spezifischen Proteinnachweis des gp 120 oder gp 41 wurde, wie beim Immunoblot (vgl. 2.3.2), mit monoklonalen Antikörpern inkubiert (60 min bei 37 °C). Welche Antikörper dies im Einzelnen waren, ist der Tab. 10 im Abschnitt 3.4 zu entnehmen. Nach einem Waschschrift mit PBS und Lufttrocknung erfolgte die Reaktion mit dem Zweitantikörper (Anti-Mouse IgG FITC Conjugate F(ab')<sub>2</sub> fragment of sheep antibody, Sigma F-2883 (2 ml)). Im Anschluß an erneutes Waschen und Trocknen wurde im Immunfluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, West Germany) bei 480 nm Anregungslicht auf das Auftreten von Fluoreszenz untersucht. In der hier beschriebenen Art und Weise liefert der IFT als Nachweismethode von HIV-Proteinen nur qualitative Aussagen, weil bei der Gewinnung des Zellkulturüberstands keine Messung der Luciferaseaktivität erfolgte, und die beobachtete Fluoreszenz der detektierten HIV-Proteine daher nicht in Relation zur Transfektionseffizienz gesetzt werden konnte. Quantitative Aussagen zur Proteinexpression sind hier nicht möglich. Darüber hinaus ist der IFT in der hier beschriebenen Form eine Nachweismethode von intrazellulärem Protein, unabhängig davon, in welchem Zellkompartiment sich dieses befindet. Es läßt sich somit mittels dieser Methode nichts darüber aussagen, ob sich das Glykoprotein in der Zellmembran befindet oder beispielsweise im Cytosol.

## **2.4 Subgenomische HIV-1-Expressionsvektoren**

In der vorliegenden Arbeit wurde mit subgenomische HIV-1-Expressionsvektoren experimentiert, welche durch Deletionen ihre Infektiosität verloren haben. Lediglich die zur Amplifikation unbekannter env-Sequenzen verwendeten HIV-positiven Seren und Liquores (s. 2.2.3) stellten eine potentielle Infektionsquelle dar.

### **2.4.1 pNLA1-Derivate**

Das Konstrukt pNLA1 (134) (s. Abb. 15) ist ein subgenomisches cDNA-Derivat des HIV-1-Isolats pNL4-3 (1), dem das erste Intron und damit der gag- und pol-Bereich fehlt. Es kann somit



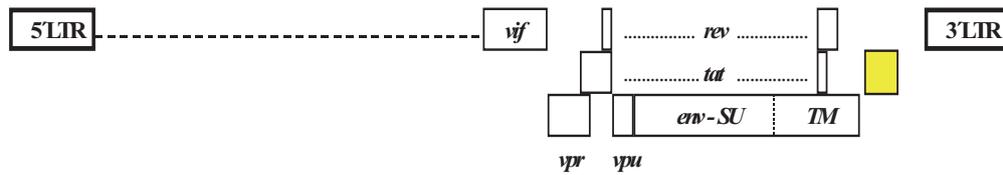


Abb. 16 Das Plasmid pNLA1nef als Derivat des pNLA1. Der gelbe Kasten zeigt das deletierte nef. Einzelheiten siehe Text.

Es ist besonders zu bemerken, dass das Plasmid pNLA1nef über vpu verfügt. Dies ist deshalb wichtig, weil die Bindungsstelle des 5' Primers der PCR, welche zur Amplifikation von env durchgeführt wurde, im C-terminalen Bereich des vpu liegt. Eine Darstellung der Primer und ihrer Bindungsstellen findet sich in 2.2.1. Nach erfolgreicher Amplifikation der env-Sequenz von pNLA1nef diente dieses Plasmid des weiteren als Positivkontrolle bei der PCR von HIV-1-Wildtypisolaten (s. 3.1.2 und 3.1.3). An dieser Stelle sei erwähnt, dass die env-Sequenz des Isolats pNL4-3, welche im Plasmid pNLA1 in einer Länge von 2562 Nukleotiden vorliegt, an der Stelle zwischen den Basenpaare (bp) 2245 und 2250 eine natürliche Schnittstelle für BamHI aufweist, welche das C-terminale Ende des env im Plasmid pSGenvdel1 darstellt (vgl. 2.4.2.1, Abb. 15 und Abb. 17). Der 3'-Primer der env-PCR EnvKlon-R1 (vgl. 2.2.1), erzeugt eine weitere BamHI-Schnittstelle hinter dem Nukleotid 2322 (gerechnet vom ATG des env bei pNLA1), d. h. 77 Nukleotide weiter C-terminal. Bei der Klonierung des env in Expressionsvektoren (s. 2.2.4.1) konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass die o. g. natürliche BamHI-Schnittstelle in der Regel nicht vorliegt, weil hierfür HIV-Wildtypen amplifiziert wurden, und die bekannten HIV-1-Isolaten des Subtyps B (außer pNL4-3) diese Schnittstelle nicht besitzen. Somit sollten hierdurch beim Restriktionsverdau mit BamHI keine kürzeren Fragmente als gewollt entstehen. Dass das Vorliegen der genannten Schnittstelle bei einzelnen HIV-Quasispezies zu Klonierungsproblemen führen kann, war jedoch nicht auszuschließen vgl. 3.1.2.

#### 2.4.2 pSG-Derivate

Nach Amplifikation der env-Sequenzen der verschiedenen HIV-1-Isolate wurden diese in Expressionsvektoren hineinkloniert. Welche Expressionsplasmide hierfür herangezogen wurden, hing davon ab, welche Primer bei der PCR des env benutzt wurden. Dies sowie die Methodik und Problematik der verschiedenen Klonierungswege (Ein-Fragment- versus Zwei-Fragment-Klonierung) werden in den Abschnitten 2.2.1 und 2.2.4.1 dargestellt. Zusammenfassend kann man sagen, dass sechs der sieben klonierten HIV-1-Wildtyp-env-Sequenzen in das Plasmid

---

pSGenvdel1BbsI eingefügt wurden. Nur für die Klonierung des Isolats P168 wurde der Vektor pSGpNLA1tat benutzt. Die Gemeinsamkeiten beider Plasmide werden nun dargestellt, bevor in 2.4.2.1 und 2.4.2.2 getrennt auf die Besonderheiten beider Vektoren eingegangen wird. Beide Expressionsvektoren benutzen anstelle des viruseigenen LTR-Promotors (vgl. pNLA1 in 2.4.1) den SV40<sub>early</sub> Promotor (SV40e), den T7 Phagenpromotor (T7) und die Polyadenylierungsstelle des SV40 t-Antigens. Im Unterschied zum viruseigenen LTR braucht der SV40<sub>early</sub> Promotor kein Tat für eine effektive Proteinexpression. Dies ist wichtig, weil aus methodischen Gründen Wert darauf gelegt wurde, dass Env das einzige HIV-Protein ist, welches von den Expressionsvektoren gebildet wird. Somit spielt es für die Expression und Funktionalität von Env keine Rolle, in welchen von beiden Vektoren ein env-Wildfragment hineinkloniert wurde. Enthalten ist weiterhin jeweils ein "origin of replication" (ori), um die Replikation in E. coli zu ermöglichen, und das  $\beta$ -Lactamase-Gen (Ampicillinresistenz, amp<sup>®</sup>), um eine prokaryotischen Selektion zu erzielen (vgl. 2.2.4.1).

#### ***2.4.2.1 Herstellung von pSGenvdel1BbsI als Expressionsplasmid für HIV-1- env***

Es wurde bereits erwähnt, dass auf Grund der Amplifikation des env mit EnvKlon-F6 als 5'-Primer das Expressionsplasmid pSGenvdel1BbsI als Derivat des Vektors pSGenvdel1 erzeugt werden musste (s. 2.2.4.1). Die Klonierung dieses Konstrukt ist Teil der vorliegenden Arbeit gewesen. Wie sie erfolgte, wird in der Folge dargestellt (vgl. Abb. 17, Abb. 18 und Abb. 19): Das Plasmid pSGenvdel1 (s. Abb. 17) enthält als einziges HIV-kodierendes Gen den größten Teil des env des Isolats pNL4-3 in einer Länge von 2250 Nukleotiden. Es kann an dessen 5'-Ende vor dem Startcodon mit Eco RI und am 3'-Ende mit Bam HI geschnitten werden. Wie bereits in 2.4.1 erwähnt, liegt die BamHI-Schnittstelle am 3'-Ende natürlicherweise in der env-Sequenz des Isolats pNL4-3 vor. Sie stellt in diesem Plasmid das 3'-Ende des env dar, wodurch dieses 312 Nukleotide kürzer ist als im Plasmid pNLA1 (vgl. 2.4.1). Um die Proteinexpression des env vor der Schnittstelle für BamHI enden zu lassen, wurde hier ein Stopcodon eingebaut (nicht Teil dieser Arbeit).

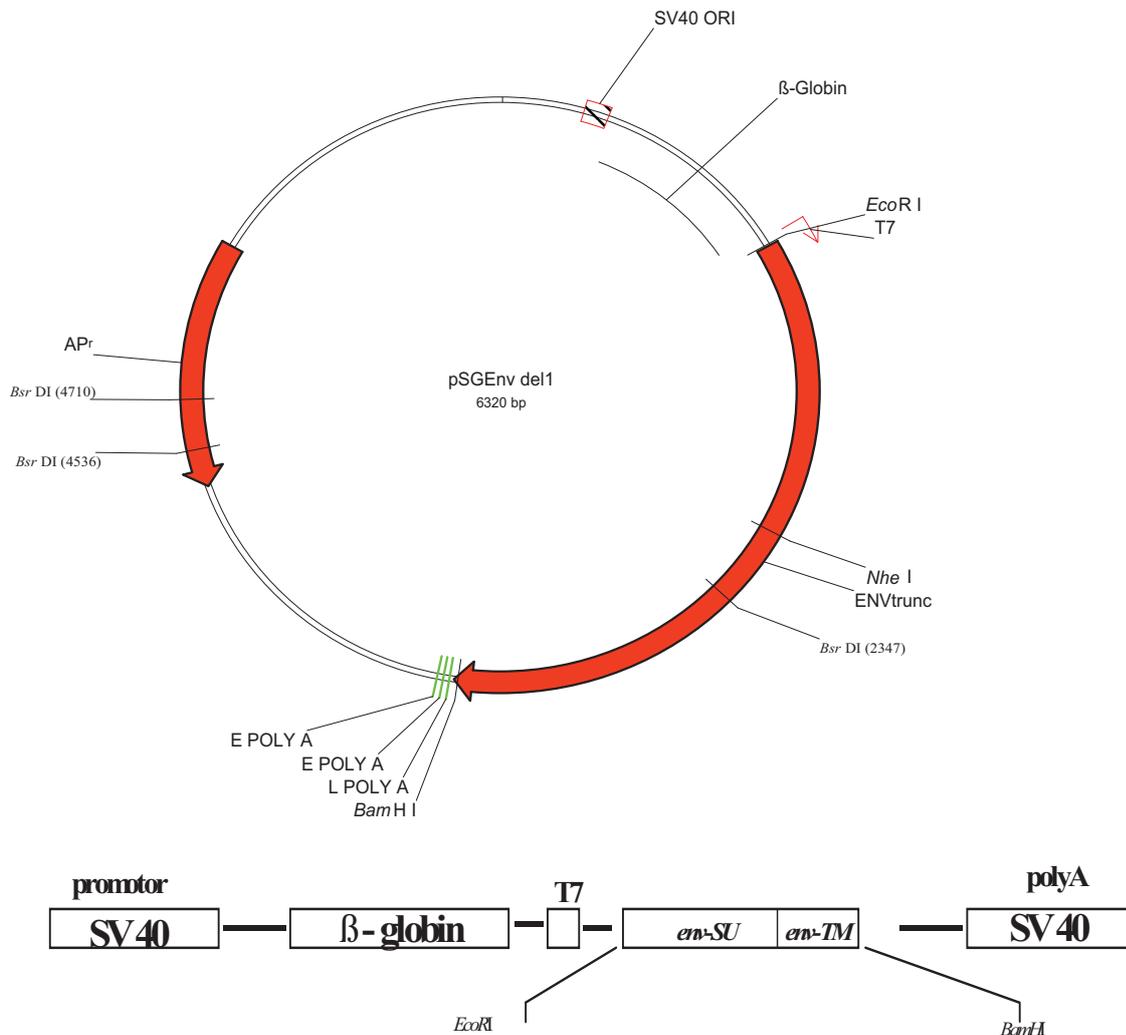


Abb. 17 Das Plasmid pSGEnvdel1. Im unteren Teil der Abbildung sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur Teile des vollständigen Vektors dargestellt. Man sieht, dass das env nur mit den Restriktionsenzymen Eco RI (am 5'-Ende) und Bam HI (am 3'-Ende) geschnitten werden kann.

Um am 5'-Ende eine zusätzliche Schnittstelle für BbsI zu schaffen, welche gebraucht wird, um ein Fragment einzufügen, welches mit EnvKlon-F6 amplifiziert wurde (vgl. 2.2.1 und 2.2.4.1), wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit die 18 C-terminalen Nukleotide des vpu vor das Startcodon des env in pSGEnvdel1 hineinkloniert (vgl. Abb. 19). Hierfür wurde durch eine PCR, welche sich der Primer EnvKlon-F1 und -R3 bedient (s. Tab. 3 in 2.2.1), ein Fragment aus dem Plasmid pNLA1 (s. 2.4.1) amplifiziert, welches mit den o. g. 18 Nukleotiden des vpu beginnt und weitere 1304 bp des env umfasst (s. 1 in Abb. 19). Dieser Genabschnitt entspricht dem Fragment 2 (5'-Fragment) bei der Amplifikation in der Zwei-Fragment-Strategie (vgl. 2.2.1 und 2.2.4.1). Das Amplifikat und pSGEnvdel1 wurden dann mit Eco RI (5'-Ende) und Nhe I (Schnittsequenz: GCTAGC, Schnittstelle bei den env-Nukleotiden 1030 bis 1035, s. Abb. 17) geschnitten (s. 2 in Abb. 19). Anschließend wurde das amplifizierte 5'-Fragment in den aufgeschnittenen Vektor pSGEnvdel1 mit der in 2.2.4.1 beschriebenen Methode hineinkloniert,

und damit gegen die ursprünglichen env-Sequenz, welche den C-Terminus des vpu nicht enthielt, ausgetauscht (s. 3 und 4 in Abb. 19).

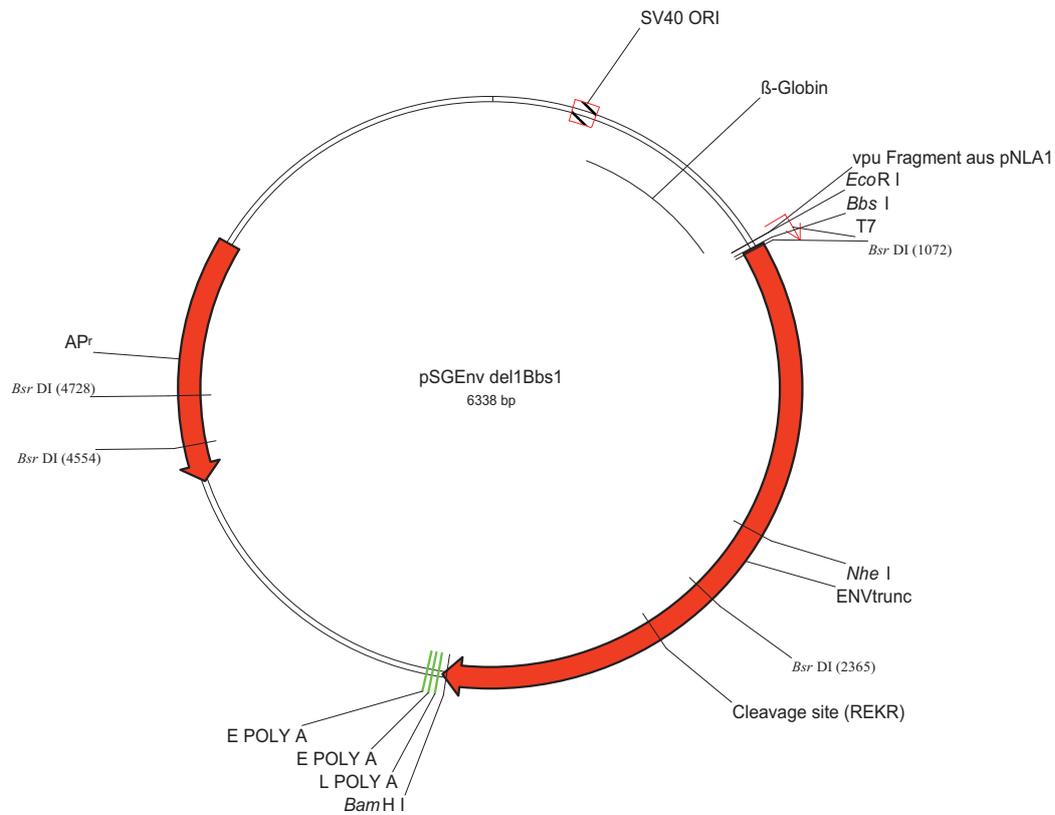


Abb. 18 Der neu klonierte Expressionsvektor pSGEnvdel1Bbs1 als Derivat des Konstrukts pSGEnvdel1. Zu beachten ist das vpu-Fragment unmittelbar vor dem 5'-Ende des env. Zur Sequenz dieses Fragments s. Nr. 4 in Abb. 19.

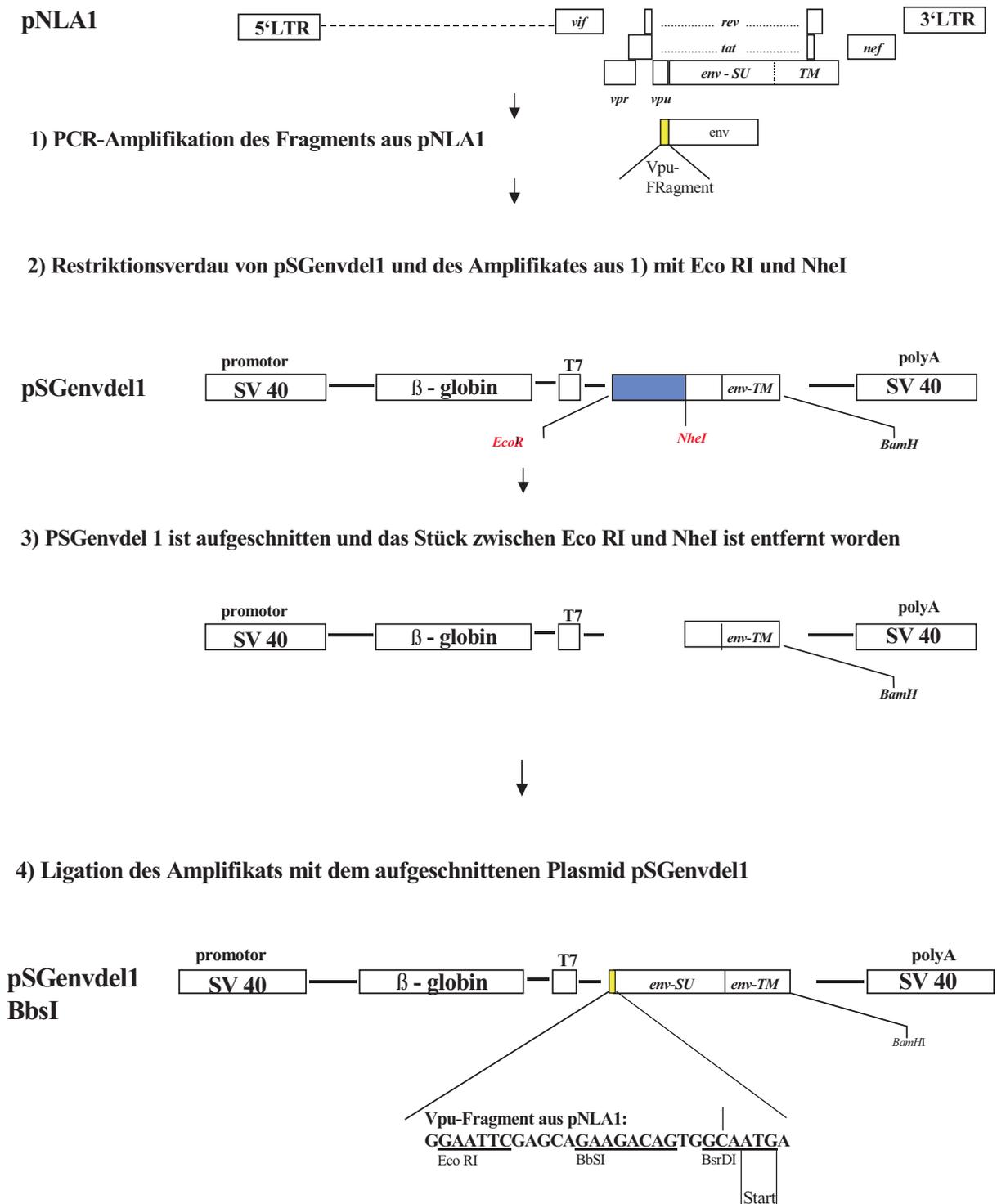


Abb. 19 Klonierung des Konstruktes pSGenvdel1BbsI. Der gelbe Abschnitt symbolisiert die 18 C-terminalen Nukleotide des vpu. In 4) ist dabei anhand der Sequenz des vpu-Fragments zu sehen, dass vor dem Startcodon des env zusätzliche Schnittstellen für BbsI und BsrDI entstehen. Blauer Balken: ursprünglich in pSGenvdel1 enthaltenes env-Fragment ohne vpu-Teil. Einzelheiten siehe Text.

In der Nr. 4 der Abb. 19 ist die Sequenz der 18 Nukleotide des vpu dargestellt. Wie man sieht, kann hier zusätzlich zu Eco RI auch mit BbsI geschnitten werden. Gleichzeitig wurde automatisch eine Schnittstelle für BsrDI geschaffen, welche aber bei der Klonierung von

Wildtyp-env in den Vektor pSGenvdel1BbsI keine Bedeutung hatte. HIV-1-Wildisolate, deren env mit den Primern EnvKlon-F6 und -R1 in einem Fragment amplifiziert wurden, konnten nun in dieses neue Plasmid hineinkloniert werden, indem die Amplifikate und pSGenvdel1BbsI mit den Restriktionsenzymen BbsI und BamHI verdaut wurden. Wurde in der PCR EnvKlon-F1 benutzt, stand am 5'-Ende des env zusätzlich Eco RI als Schnittenzym zur Verfügung (vgl. 2.2.4.1).

#### 2.4.2.2 pSGpNLA1tat als Expressionsplasmid für HIV-1-Wildtyp-env

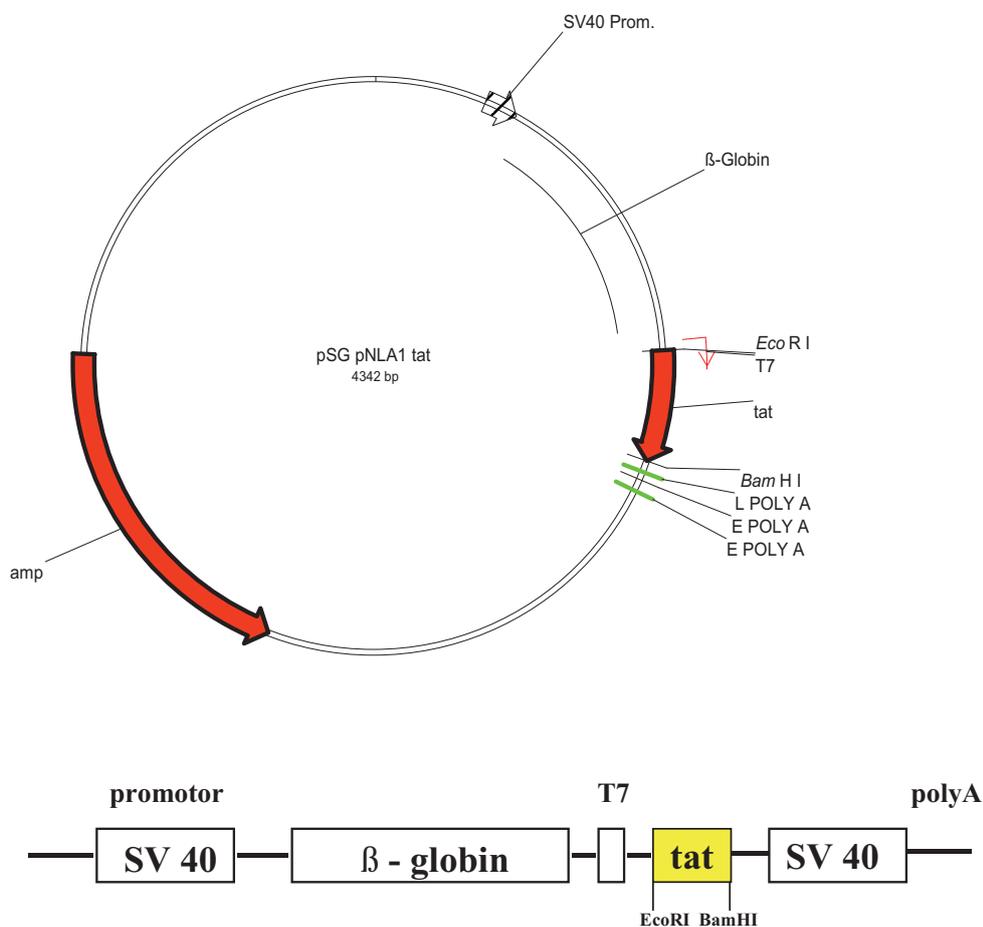


Abb. 20 Das Plasmid pSGpNLA1tat. Auch hier sind im unteren Teil der Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit nur Teile des vollständigen Vektors dargestellt.

Wie in 2.2.1 und 2.2.4.1 dargestellt, wurde das Isolat P168 in zwei Fragmenten amplifiziert und dann in das Plasmid pSGpNLA1tat hineinkloniert. Hierbei wurde der Vektor mit Eco RI und BamHI geschnitten (s. Abb. 20). Die genaue Methodik und Problematik des Restriktionsverbaus der beiden amplifizierten env-Fragmente und deren weitere Klonierung ist in 2.2.4.1 beschrieben.

### 2.4.2.3 pSGpNLA1rev

In 2.2.4.3 wurde bereits erwähnt, dass bei der Transfektion der HIV-1-env-Expressionsvektoren in Eukaryonten das Plasmid pSGpNLA1rev (s. Abb. 21) kotransfiziert wurde.

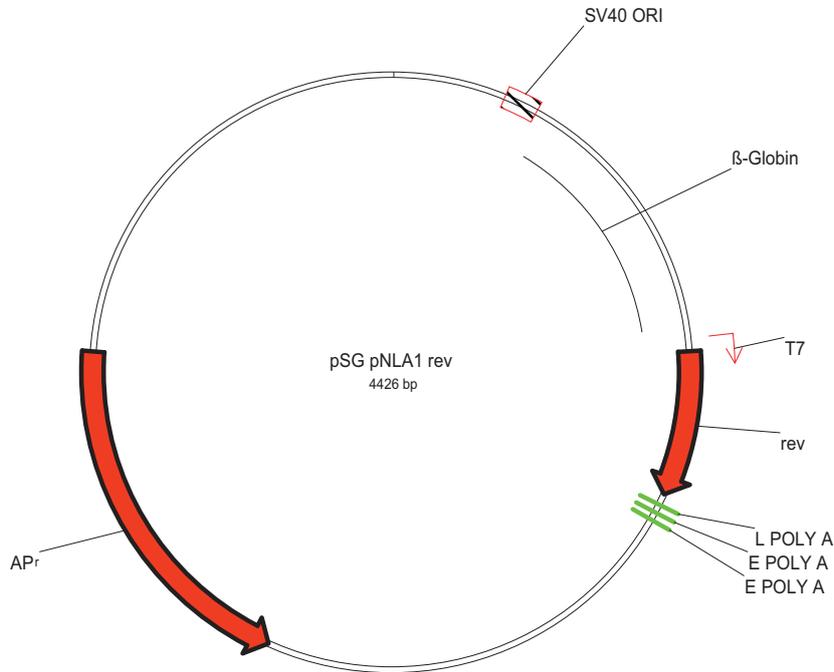


Abb. 21 Das Plasmid pSGpNLA1rev wurde bei der Transfektion der env-Expressionsvektoren in Eukaryontenzellen kotransfiziert, um die Proteinexpression der Env-Wildtypen zu ermöglichen.

Rev wurde benötigt, um die Proteinexpression der Env-Wildtypen in der Zellkultur zu ermöglichen. Zur Bedeutung von rev für die HIV-Proteinexpression siehe Abschnitt 1.2.

### 2.4.3 pGL3<sup>®</sup> (enthält ein Luciferase-Gen)

In 2.2.4.3 ist das Plasmid pGL3<sup>®</sup> (Promega, pGL3-Control Vector, Cat. No. E1741), welches für das Luciferase-Gen des Photinus pyralis kodiert, bereits erwähnt worden. Es exprimiert dieses Protein unter der Kontrolle des SV40<sub>early</sub> Promotors (SV40e) (4). Durch Kotransfektion dieses Vektors (zusammen mit den env-Expressionsvektoren und pSGpNLA1rev, vgl. 2.2.4.3) wurde eine Messung der Transfektionseffizienz in Eukaryonten-Zellkulturen ermöglicht, welche in 2.2.4.4 beschrieben ist. Abb. 22 stellt das Plasmid graphisch dar.

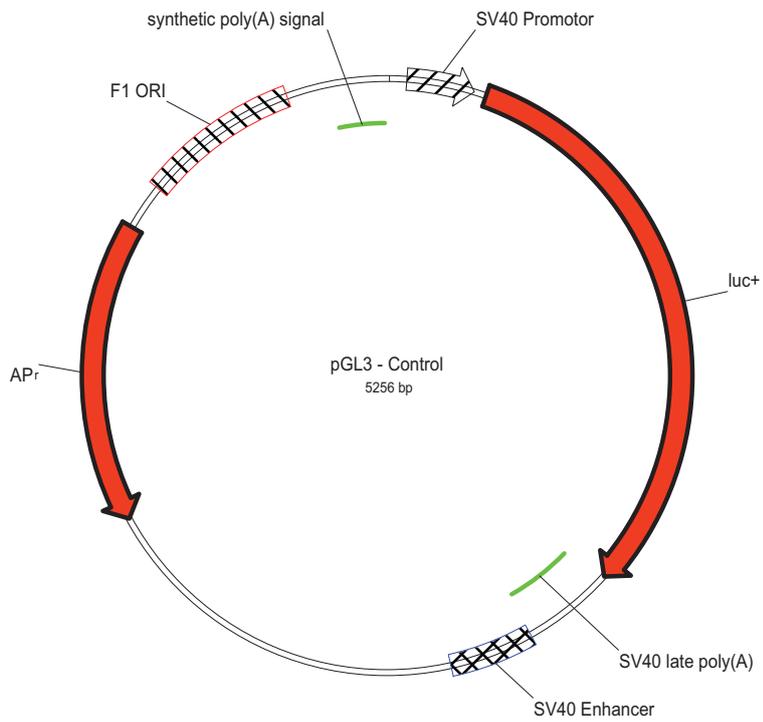


Abb. 22 Das Plasmid pGL3<sup>®</sup>. Es wurde bei der Transfektion der env-Expressionsvektoren in Eukaryonten kotransfiziert, um eine Messung der Transfektionseffizienz zu ermöglichen.

### 3 Resultate

#### 3.1 Amplifikation und Klonierung von HIV-1-env

##### 3.1.1 Etablierung der HIV-1-env-PCR am Isolat pNL4-3

Wie in 2.2.1 dargestellt, erfolgte die Etablierung des PCR-Protokolls zur Amplifikation von HIV-1-env anhand des Plasmids pNLA1nef (HIV-Isolat pNL4-3). Die PCRs wurden hierbei aus einer zehnfachen Verdünnungsreihe dieses Vektors (Einheit: Anzahl von Plasmidkopien/5  $\mu$ l) durchgeführt. Abb. 23 zeigt die Amplifikation des env (2322 Nukleotide des o.g. Plasmids) nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel. In Tab. 4 ist das optimierte PCR-Protokoll angegeben, Tab. 5 stellt die Amplifikationsparameter dar. In dieser PCR war es möglich, mit einer Sensitivität von mindestens 10 Kopien der env-Sequenz in 5  $\mu$ l Pufferlösung zu amplifizieren.

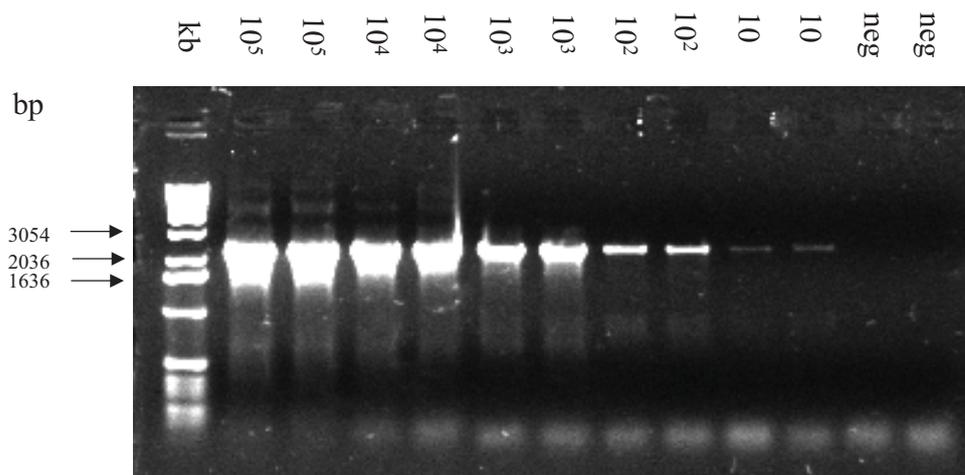


Abb. 23 PCR des HIV-1-env des Plasmids pNLA1nef (Isolat pNL4-3) über eine Länge von 2322 Nukleotide und Elektrophorese der Amplifikate im Agarosegel. Die PCR wurde aus einer zehnfachen Verdünnungsreihe des Vektors durchgeführt. Einheit der Verdünnungsreihe: Anzahl von Plasmidkopien/ 5  $\mu$ l. kb = Kb-Leiter, neg = Negativkontrolle. Einzelheiten siehe Text.

Bestandteil	Genaue Bezeichnung	Menge in µl (für 1 Probe)
PCR-Puffer	10x Expand HF buffer with 15 mM MgCl <sub>2</sub>	10
dNTP-Mix	PCR Nucleotide Mix, Boehringer Mannheim Corp., USA 1581295	2
5'-Primer	EnvKlon-F6 Konzentr.: 3 µM	10
3'-Primer	EnvKlon-R1 Konzentr.: 3 µM	10
aqua dest.		62,25
Polymerase	Expand™ High Fidelity PCR System enzyme mix	0,75
Plasmid-Probe	pNLA1nef (in Minimal-TE)	5
Summe		100

Tab. 4 Optimiertes PCR-Protokoll zur Amplifikation von HIV-1-env in einem Fragment von 2322 Nukleotiden.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeitdauer
Denaturierung des Templats	95 °C	2 min
40 Zyklen:		
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing der Primer	55 °C	30 sec
Elongation durch Polymerase	68 °C	2 min
Abschließende Elongation	68 °C	5 min
Abkühlung	4 °C	bis Probenentnahme

Tab. 5 Amplifikationsparameter der PCR, welche das HIV-1-env in einem Fragment amplifiziert.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Amplifikation des env auch in kürzeren Fragmenten ermöglicht werden. Durch die Verwendung der Primer EnvKlon-F3 und -R3 wird die Möglichkeit geschaffen, das env in zwei Teilen in Expressionsvektoren hineinzuklonieren (vgl. 2.2.1 und 2.2.4.1). Abb. 24 zeigt env-Amplifikate des Plasmids pNLA1nef (vgl. 2.4.1) verschiedener Länge nach ihrer Elektrophorese im Agarosegel.

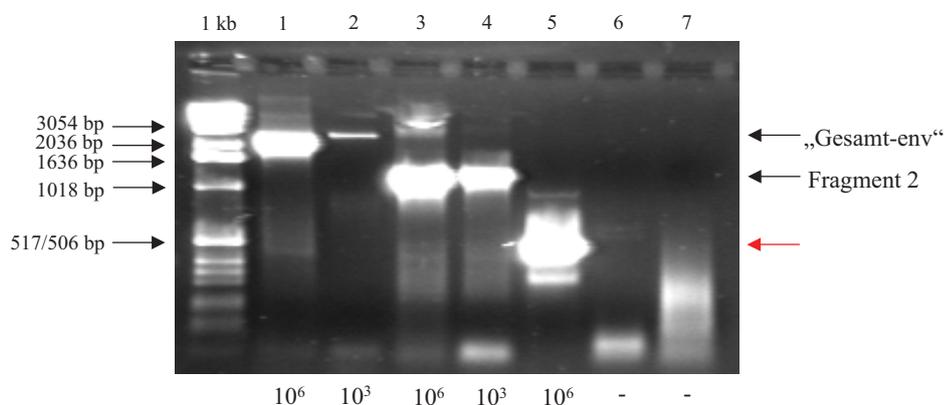


Abb. 24 Dargestellt sind drei env-Fragmente unterschiedlicher Länge nach ihrer Amplifikation und Elektrophorese im Agarosegel. Spur 1 u. 2: „env-Gesamtfragment“ (2322 bp), Spur 3 u. 4: Fragment 2 (5'-Fragment, 1304 bp), Spur 5: 515 bp (roter Pfeil), Spur 6: Negativkontrolle des 2322 bp-Fragments, Spur 7: Negativkontrolle des 1304 bp-Fragments. Die Anzahl der Plasmidkopien von pNLA1nef in der Ausgangslösung ist unter jeder Spur angegeben. 1kb = Kb-Standard. Einzelheiten siehe Text.

In Spur eins und zwei ist das env mit Hilfe der Primer EnvKlon-F1 und -R1 als ein „Gesamtfragment“ mit einer Länge von 2322 Nukleotiden analog zur Abb. 23 amplifiziert worden. Die Bande in Nr. 1 ist dicker als die in Nr. 2, weil hier in der Ausgangslösung  $10^6$  statt  $10^3$  Kopien des Plasmids vorlagen. Spur drei und vier zeigen das Fragment 2 nach einer PCR mit den Primern EnvKlon-F6 und -R3 (1304 Nukleotide, vgl. 2.2.1). Man erkennt deutlich, dass die PCR dieses Fragment so effektiv amplifiziert, dass sich die Menge ursprünglich vorliegender Ziel-DNA kaum noch auf das Amplifikationsergebnis auswirkt (die Banden in Nr. 3 und 4 sind annähernd gleich stark). An fünfter Stelle ist das kurze Fragment zu sehen, welches durch die Verwendung von EnvKlon-F2 in Kombination mit EnvKlon-R1 entsteht (515 Nukleotide, roter Pfeil, vgl. Abb. 12 in Abschnitt 2.2.1). Hier finden sich zusätzlich einige unspezifische Amplifikate, welche nicht näher zugeordnet werden können.

### 3.1.2 Amplifikation und Klonierung von Wildtyp-env aus DNA-Proben

Die Amplifikation des Wildtyp-env aus DNA-Proben bediente sich der 13 HIV-1-Wildisolate, welche in Tab. 1 des Abschnitts 2.1.3 dargestellt sind. Diese Isolate lagen proviral integriert in PBL vor. Aus sechs verschiedenen dieser Isolate konnten insgesamt sieben HIV-1-env-Wildtyp-*Sequenzen* amplifiziert und in Expressionsplasmide hineinkloniert werden: Die env-Fragmente der Isolate P153, P127, P134 sowie zwei verschiedene Sequenzen aus P230 entstammen dabei T-tropen Isolaten, wohingegen P168 und P420 zur Gruppe der dual-tropen Isolate gehören. Wie bereits in 2.2.1 und 2.2.4.1 geschildert, kamen hierfür verschiedene Methoden zur Anwendung, deren Ergebnisse jetzt dargestellt werden. Abb. 25 zeigt die mittels PCR amplifizierten Fragmente der Isolate P230, P153 und P146 nach ihrer Auftrennung in einem Agarosegel.

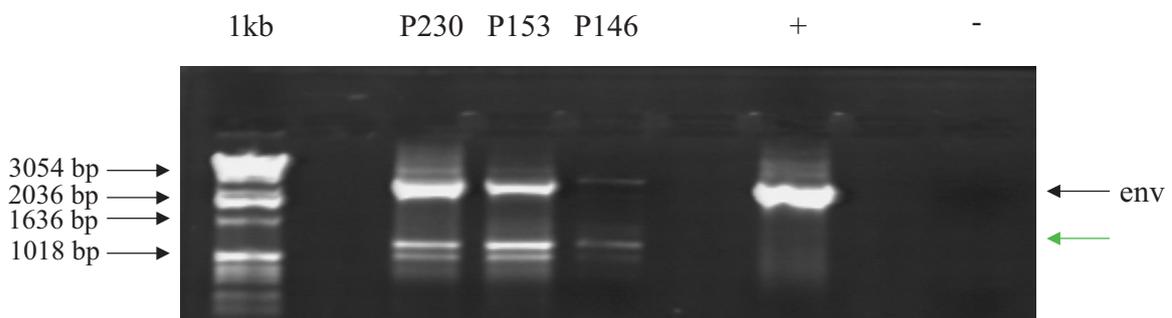


Abb. 25 Agarosegelelektrophorese nach PCR der HIV-1-Isolate P230, P153 und P146. 1kb = Kb-Leiter, + / - = Positivkontrolle (pNLA1nef) / Negativkontrolle (aqua dest.) (bei allen env-PCRs gleich), grüner Pfeil = Amplifikate, welche vermutlich dem Genom der PBLs entstammen, in denen die HIV-DNA proviral integriert vorliegt. Einzelheiten siehe Text.

Die PCR dieser Isolate bediente sich der Primer EnvKlon-F6 und -R1 (vgl. 2.2.1). Als Positivkontrolle diente, wie bei allen env-PCRs, das Plasmid pNLA1nef, als Negativkontrolle aqua destillata. In Abb. 25 sind zusätzlich zu den gesuchten env-Fragmenten bei allen drei

Wildisolaten kürzere Amplifikat zu sehen, welches sich etwas oberhalb der 1018 bp-Bande des Kb-Standards darstellen (grüner Pfeil). Diese Fragmente lassen sich bei allen env-PCRs, sofern diese die Primer EnvKlon-F1 oder -F6 in Kombination mit EnvKlon-R1 benutzen, unabhängig vom verwendeten HIV-Isolat nachweisen. Vermutlich handelt es sich um konservierte Sequenzen, welche außerhalb der proviral integrierten HIV-DNA im Genom der PBLs lokalisiert sind. Diese Banden tauchen auch in anderen Abbildungen dieses Kapitels auf, werden dort dann aber nicht mehr erwähnt. Die env-Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen BbsI und BamHI geschnitten, in das Expressionsplasmid pSGenvdel1BbsI (s. 2.4.2.1) hineinkloniert, und, wie in 2.2.4.1 beschrieben, in *E. coli* transfiziert. Zur Analyse, ob eine Bakterienkolonie die Vektoren samt Wildtyp-env enthält, wurden die Plasmide mittels alkalischer Lyse extrahiert, und erneut mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Dies wird im folgenden am Beispiel von zehn Kolonien des Wildtyps P230 vorgestellt: Abb. 26 zeigt den erneuten Verdau mit den Enzyme BbsI und BamHI. Man erkennt, dass alle zehn Kolonien ein env-Fragment enthalten, welches mit den o.g. Restriktionsenzymen aus dem Plasmid pSGenvdel1BbsI herausgeschnitten werden kann.

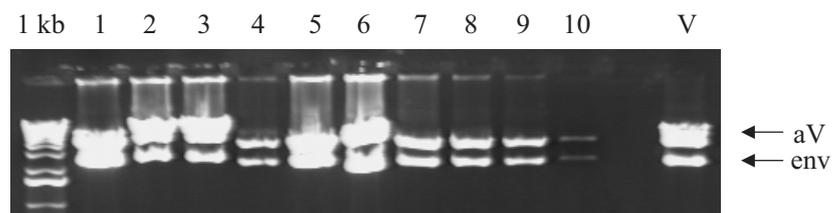


Abb. 26 Agarosegelelektrophorese von zehn klonierten Expressionsplasmiden des env-Wildtyps P230 sowie des Vektors pSGenvdel1BbsI (V) nach Restriktionsverdau mit BbsI und BamHI. Aus allen Klonen kann auf diese Weise env herausgeschnitten werden. aV = aufgeschnittener Vektor, 1kb = Kb-Leiter. Einzelheiten siehe Text.

In Abb. 27 sieht man den Restriktionsverdau der gleichen Klone mit dem vielschneidenden Enzym HinfI (Cave: Lokalisation des Vektors im Gel an einer anderen Position als in Abb. 26). Bei der Analyse des Fragmentmusters fällt auf, dass sich in der Spur des Plasmids pSGenvdel1BbsI (V) zwei Fragmente zeigen (rote Pfeile), welche sich in dieser Konstellation bei keinem der anderen Klone finden. Die Spuren eins bis vier, sowie sechs, acht und neun enthalten mit Sicherheit keines der beiden Fragmente, und stellen damit einen potentiellen Wildtyp dar. In Spur 5 sieht man nur das kleinere Fragment von beiden, welches in Nummer sieben wahrscheinlich auch vorhanden ist. Zusammengefasst wurde dies so interpretiert, dass bei der PCR des untersuchten Wildtypisolates P230 zwei verschiedene HIV-1-env-Sequenzen amplifiziert wurden (vgl. hierzu 4.1). Die Plasmide der Klone Nummer drei und fünf wurden anschließend aufgereinigt und in Eukaryonten transfiziert (vgl. 2.2.4.3).

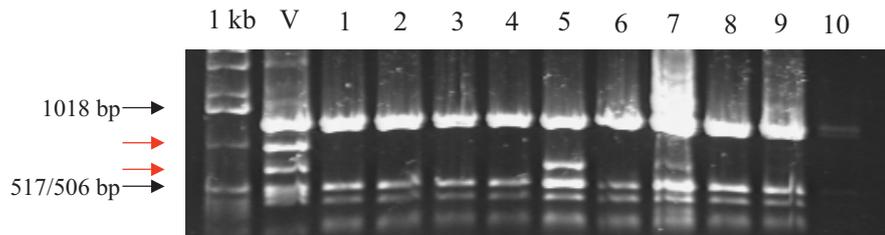


Abb. 27 Restriktionsverdau der Plasmide aus Abb. 26 mit dem vielschneidenden Enzym *HinfI*. Die beiden roten Pfeile zeigen auf zwei Fragmente in der Spur des Vektors pSGenvdel1BbsI (V), welche bei den verdauten Amplifikaten 1 bis 4, sowie 6, 8 und 9 fehlen (potentielle Wildtyp-Sequenz). Das Vorliegen lediglich der kleineren Bande in Spur 5 und 7 deutet auf eine hiervon verschiedene, zweite env-Wildsequenz hin. Einzelheiten siehe Text.

In ähnlicher Weise gelang die Klonierung der Isolate P153, P127 und P420 während sie bei P146 erfolglos war (Ergebnisse s. Abb. 33). Abb. 28 stellt den Amplifikationsversuch weiterer HIV-Isolate dar, bei welchem das gleiche PCR-Protokoll wie oben beschrieben verwendet wurde.

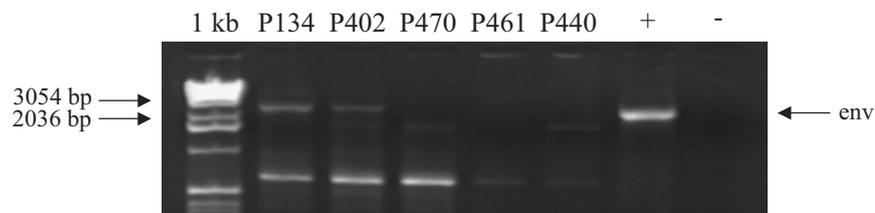


Abb. 28 Amplifikation und Gelelektrophorese des env-Gens von P134 und P402. Bei P470, P461 und P440 lieferte die PCR keine Amplifikate. 1kb = Kb-Standard, + / - = Positiv- / Negativkontrolle.

Wie man sieht, führte die PCR bei den Isolaten P470, P461 und P440 nicht zur Amplifikation des gesuchten env-Fragments. Beim Restriktionsverdau (mit *BbsI* und *BamHI*) der Amplifikate von P134 und P402 entstanden jedoch anstatt der gewünschten env-Bande (s. Abb. 29, roter Pfeil) mehrere kleinere Fragmente (schwarze Pfeile rechts). Die bei den Wildtypen auf der gesuchten Höhe sichtbaren env-Banden waren nur phototechnisch darstellbar, und zu zart, um kloniert werden zu können.

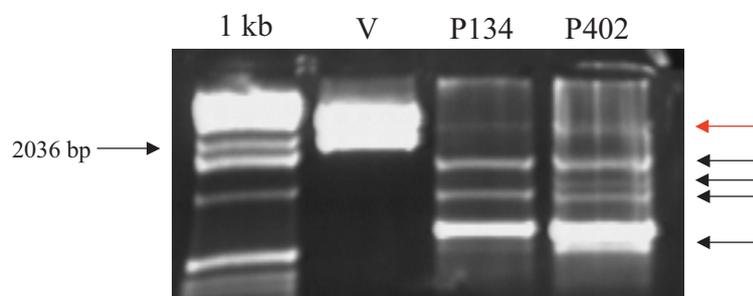


Abb. 29 Restriktionsverdau der amplifizierten env-Sequenzen der Isolate P134 und P402 mit *BbsI* und *BamHI*. Die kurzen Fragmente (schwarze Pfeile rechts), welche anstelle des env (roter Pfeil) entstehen (die env-Banden der Wildtypen sind hier nur beim Überblenden des Bildes zu sehen), deuten auf das Vorliegen zusätzlicher unbekannter Restriktionsschnittstellen für die genannten Enzyme innerhalb der HIV-Wildtypsequenzen hin.

Dies ließ auf das Vorliegen unbekannter Restriktionsschnittstellen für BbsI oder für BamHI sowohl im Isolat P134 als auch in P402 schließen. Aufgrund der Sequenz des 3'-Primers der PCR (EnvKlon-R1, s. 2.2.1) ist ein Restriktionsverdau mit einem anderen Enzym als BamHI am C-Terminus des env nicht möglich. Erfolgt die PCR aber mit dem 5'-Primer EnvKlon-F1 anstelle von EnvKlon-F6, kann das Amplifikat am N-Terminus statt mit BbsI auch mit Eco RI geschnitten werden. In der Hoffnung, dass die ungewollten Schnittstellen das Enzym BbsI betreffen, wurden die o.g. Isolate daraufhin zusätzlich mit dem 5'-Primer EnvKlon-F1 amplifiziert und mit BamHI / Eco RI verdaut (s. Abb. 30).

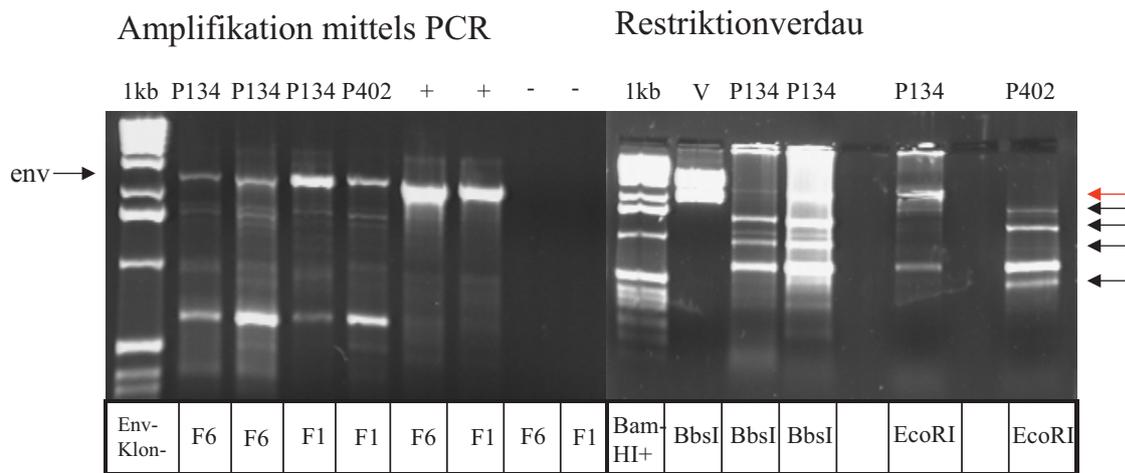


Abb. 30 Agarosegelelektrophorese nach PCR und Restriktionsverdau der Isolate P134 und P402. Die Zeile unter den Bildern stellt den jeweils verwendeten 5'-Primer der PCR (linke Seite) oder das mit BamHI kombinierte Restriktionsenzym (rechte Seite) dar. Bei P134 führte die Verwendung von Eco RI anstelle von BbsI zum gesuchten env-Fragment (roter Pfeil), was bei P402 nicht gelang. Hier zeigen sich wieder die kürzeren Fragmente (schwarze Pfeile rechts). 1 kb = Kb-Leiter, V = Vektor (pSGenvdel1BbsI), + / - = Positiv- / Negativkontrolle. Einzelheiten siehe Text.

Man erkennt, dass die PCR aus P134 in diesem zweiten Versuch zweimal mit EnvKlon-F6 und einmal mit EnvKlon-F1 erfolgte. Bei 402 wurde sie nur mit dem letztgenannten Primer durchgeführt. Es konnte jeweils das env-Fragment erlangt werden, welches daraufhin in der in Abb. 30 (rechte Seite) dargestellten Weise am 5'-Ende entweder mit BbsI oder Eco RI geschnitten wurde. Man sieht, dass man das gesuchte env (roter Pfeil) nur dann erhält, wenn P134 mit BamHI und EcoRI geschnitten wird. Bei Verwendung von BbsI zeigen sich wieder die kürzeren Fragmente (schwarze Pfeile rechts). Folglich muss diese env-Wildsequenz eine unbekannte Schnittstelle für BbsI aufweisen. Das so erhaltene env wurde in das Plasmid pSGenvdel1BbsI hineinkloniert. Bezüglich des Isolats P402 führt offensichtlich auch ein Austausch von BbsI gegen Eco RI nicht zum gesuchten env-Abschnitt. Als Ursache hierfür liegt entweder eine Restriktionsstelle für BamHI vor, oder es gibt Schnittstellen sowohl für BbsI als auch für Eco RI. In beiden Fälle kann der gewünschte Verdau des env nicht erfolgen, womit P402 mit der Methodik der vorliegenden Arbeit nicht klonierbar ist (vgl. hierzu 4.2).

Die Methodik der Amplifikation und Klonierung des Isolats P168 in zwei getrennten env-Fragmenten wurde bereits in 2.2.1 und 2.2.4.1 beschrieben. In Abb. 31 sind beispielhaft die PCR-Produkte des 5'-Fragments (Fragment 2) nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel dargestellt. Die Verwendung der Primer EnvKlon-F1 und -R3 lieferte hier einen Genabschnitt des env, welcher sich etwas oberhalb der Bande befindet, welche die Fragmentlänge 1018 bp (des Kb-Standards) repräsentiert. Wie man sieht, wurde damals die Zwei-Fragment-Klonierung auch bei den Isolaten P230, P153 und P127 ausprobiert. Die PCR-Produkte wurden, wie in 2.2.4.1 beschrieben, geschnitten und anschließend zusammen mit den Amplifikaten des 3'-Fragments (hier nicht dargestellt) in den Expressionsvektor pSGpNLA1tat (vgl. 2.4.2.2) eingefügt. Diese Klonierungsmethode führte jedoch nur im Fall des Isolats P168 zu einem funktionsfähigen Expressionsvektor. P230, P153 und P127 wurden in *einem* Fragment kloniert (s. o.).

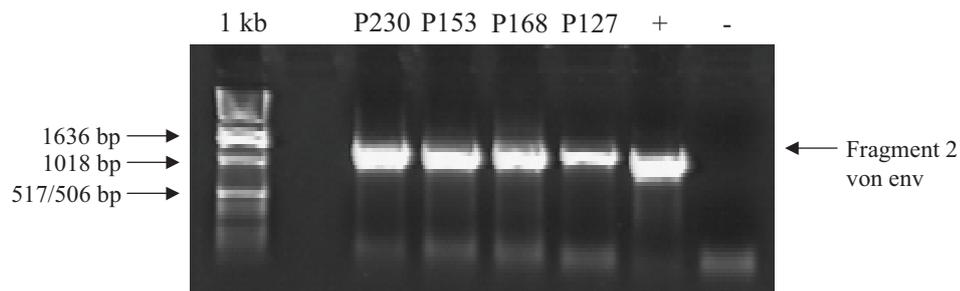


Abb. 31 PCR-Produkte der Isolate P230, P153, P168 und P127 nach Amplifikation lediglich des 5'-Fragments des env-Gens (Fragment 2). 1 kb = Kb-Leiter, + / - = Positiv- / Negativkontrolle.

Nachdem, wie bereits gesagt, sieben HIV-1-Expressionsvektoren hergestellt und in *E. coli* transfiziert worden waren, wurde deren DNA erneut isoliert, aufgereinigt und im Restriktionsverdau analysiert. In Abb. 32 ist hierbei zu sehen, dass alle Expressionsplasmide eine env-Sequenz der gesuchten Länge (ca. 2300 Nukleotide, genaue Länge je nach Wildisolat) enthalten. Die Klone, bei deren PCR der 5'-Primer EnvKlon-F1 war (P168 und P134) wurden am C-Terminus des env mit Eco RI geschnitten, die übrigen mit BbsI.

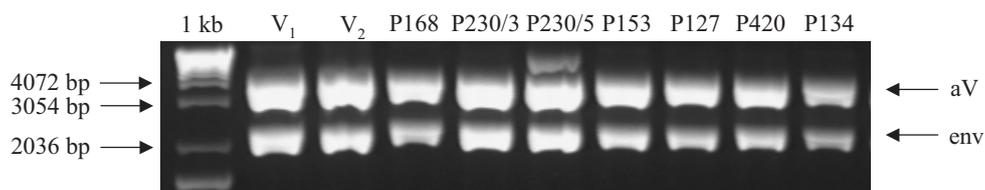


Abb. 32 Restriktionsverdau der sieben klonierten HIV-1-env-Expressionsplasmide und von pSGenvdel1BbsI ( $V_1 / 2$ ) mit den Enzymen Eco RI / BamHI (P168, P134 und  $V_1$ ) und mit BbsI / BamHI (alle übrigen Wildisolate und  $V_2$ ). In allen Plasmiden findet sich das gewünschte env-Fragment. AV = aufgeschnittener Vektor.

Beim Restriktionsverdau der Vektoren mit dem vielschneidenden Enzym HinfI (Abb. 33) findet sich bei jedem Expressionsplasmid ein Bandenmuster, welches sich sowohl von dem des Kontrollplasmids pSGenvdel1BbsI (mit dem env des HIV-1-Isolats pNL4-3) als auch von jedem anderen klonierten Wildtyp unterscheidet. Dies ist ein indirekter Beweis für das Vorliegen von HIV-Wildsequenz in den klonierten Plasmiden und entspricht methodisch der häufig in der Humangenetik angewandten Technik des Restriktionslängenpolymorphismus.

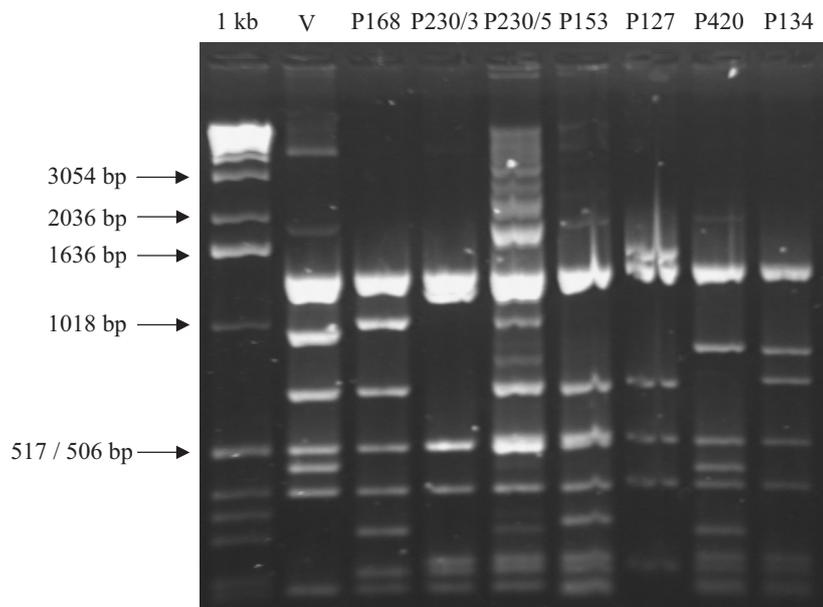


Abb. 33 Restriktionsverdau der klonierten Expressionplasmide mit dem vielschneidenden Restriktionsenzym HinfI. Man erkennt, dass sich das Bandenmuster bei jedem Vektor sowohl von dem der anderen rekombinanten Klone als auch von dem des Kontrollplasmids pSGenvdel1BbsI (V) unterscheidet.

### 3.1.3 Amplifikation und Klonierung von Wildtyp-env aus RNA-Proben

Wie in 1.8 und 2.2.3 dargestellt, sollte zusätzlich zum Ziel der vorliegenden Arbeit, proviral integrierte HIV-DNA zu amplifizieren und zu klonieren, auch HIV-RNA aus Seren oder Liquores HIV-infizierter Patienten verwendet werden. Vorweg sei erwähnt, dass es trotz erheblicher Mühe nicht gelungen ist, rekombinate Expressionsvektoren von HIV-1-env auf der Grundlage von RNA-Material herzustellen. Das methodische „Nadelöhr“ stellte auch hier, wie bei der HIV-DNA (s. 3.1.2), die Amplifikation des env-Fragments, und dessen Klonierung in Expressionsvektoren dar. Die RT-PCR wurde, wie bereits in 2.2.3 beschrieben, sowohl in Two-Step-Protokollen als auch in One-Step-Protokollen durchgeführt, und dabei analog zu den DNA-Proben eine Klonierung des env in einem oder in zwei Fragmenten versucht (vgl. 2.2.1). Obwohl das vorrangige Ziel der env-Klonierung mit diesem Material nicht erreicht werden konnte,

werden einige Zwischenergebnisse der durchgeführten Experimente in 3.1.3.1 und 3.1.3.2 kurz dargestellt. Es bleibt als Ergebnis zu vermerken, dass eine env-Klonierung aus RNA-Material über ca. 2300 Nukleotide (Länge je nach HIV-Wildisolat) mit den in 2.2.1 und 2.2.3 beschriebenen Methoden nicht erfolgreich war.

### 3.1.3.1 Two-Step-RT-PCR von HIV-1-env

In Abb. 34 ist, stellvertretend für die Two-Step-RT-PCR, eine Amplifikation von HIV-RNA vier verschiedener Patientenproben (P1 bis P4, aus Datenschutzgründen anonymisiert) dargestellt. Es handelte sich jeweils um eine Serum- und eine Liquorprobe von zwei HIV-infizierten Patienten. Im Anschluß an eine RNA-Extraktion nach (15) (vgl. 2.2.3.1) erfolgte die Reverse Transkription in diesem Beispiel mit Omniscript™ (vgl. 2.2.3.2). Hierzu wurde das RNA-Substrat in diesem Versuch 5 min bei 95 °C denaturiert, und danach wie im Handbuch von Omniscript™ verfahren (RT-Reaktionsparameter: 60 min, 93 °C). Die PCR erfolgte im Anschluß daran nach dem Standardprotokoll aus 3.1.1. Es wurde in dieser RT-PCR der Versuch unternommen, bei jeder der vier Proben das env in je zwei verschiedenen PCR-Ansätzen sowohl über 2300 Nukleotide (als „Gesamtfragment“, roter Pfeil) als auch das Fragment 1 (3'-Fragment, ca. 1000 bp, blauer Pfeil in Abb. 34) zu amplifizieren. Als Primerpaare (s. 2.2.1) dienten hierbei für das lange Fragment EnvKlon-F1 und -R1 und für das Fragment 1 EnvKlon-F3 und -R1.

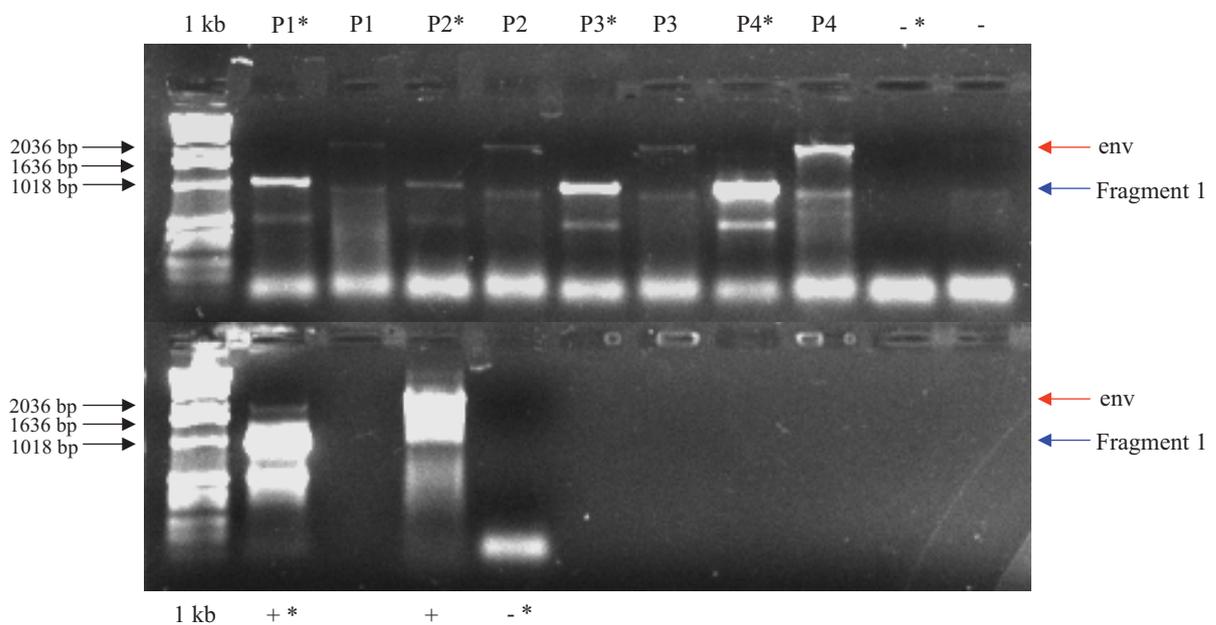


Abb. 34 Two-Step-RT-PCR von vier HIV-RNA-Proben nach deren Extraktion aus Serum (P1 und P3) und Liquor (P2 und P4) und anschließende Auftrennung der Amplifikate im Agarosegel. Bei den Proben wurde in je zwei verschiedenen PCR-Ansätzen das env in einem „Gesamtfragment“ (ca. 2300 bp, roter Pfeil) und als Fragment 1 (vgl. 2.2.1, ca. 1000 bp, blauer Pfeil) erfolgreich amplifiziert. Es wurden Negativkontrollen der RT (- im oberen Teil des Gels) und der PCR (- im unteren Teil des Gels) mitgeführt. PCR-Positivkontrollen (+) erfolgten für beide Fragmentlängen. P\* = Probe, aus der das Fragment 1 amplifiziert werden sollte. 1 kb = Kb-Standard. Einzelheiten siehe Text.

Man erkennt, dass es hier bei allen RNA-Proben gelungen ist, das env in den gewünschten Fragmentlängen zu gewinnen. Die dicke der Banden im durchleuchteten Agarosegel täuscht hier etwas mehr DNA-Substrat vor als wirklich vorhanden war. Für eine Klonierung erwiesen sich die amplifizierten Mengen als nicht ausreichend. Die kurzen Fragmente konnten theoretisch mit ihren Gegenstücken des 5'-Endes in einen Expressionsvektor hineinkloniert werden. Dies gelang jedoch auf Grund der in 2.2.4.1 geschilderten Problematik der Klonierung in zwei Fragmenten nicht, obwohl diese Klonierungsmethode prinzipiell funktionieren kann (vgl. Isolat P168 in 3.1.2). Bei der Amplifikation mit den Primern EnvKlon-F3 und -R1 (Fragment 1) wird ein zusätzliches Fragment von ca. 500 Nukleotiden sichtbar, welches bei allen getesteten HIV-Isolaten (einschließlich pNL4-3) entsteht. Dieses Fragment hatte in der Klonierung der vorliegenden Arbeit keine Bedeutung, und wurde deshalb nicht auf die Primerbindungsstellen im env hin untersucht, die ihm zugrunde liegen.

### 3.1.3.2 One-Step-RT-PCR von HIV-1-env

Eine One-Step-RT-PCR des env in *einem* Fragment von 2300 Nukleotiden gelang nie. Es wurde auch versucht, die env-Sequenzen in einem One-Step-Protokoll in *zwei* Fragmenten zu amplifizieren (analog zur PCR des Isolats P168 aus DNA, s. 3.1.2) und zu den Two-Step-RT-PCRs des vorigen Abschnitts). Abb. 35 zeigt die Produkte einer solchen RT-PCR, welche mit dem Ziel, das Fragment 2 des env zu amplifizieren (vgl. 2.2.1), aus vier verschiedenen HIV-RNA-Proben erfolgte. Diese Proben entstammten jeweils dem Serum oder dem Liquor von zwei HIV-positiven Patienten. Diese Patienten waren andere als die des Abschnitts 3.1.3.1, weshalb die Proben aus Gründen der Übersichtlichkeit hier mit P5 bis P8 bezeichnet werden.

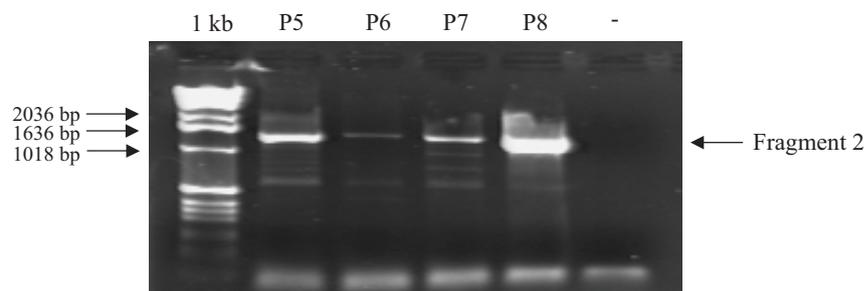


Abb. 35 One-Step-RT-PCR von vier HIV-RNA-Proben aus zwei HIV-positiven Patienten. P5 und P7 waren hierbei die Serumproben, P6 und P8 die Liquorproben der beiden Patienten. Die Amplifikation des Fragments 2 ist bei allen Proben gelungen. 1kb = Kb-Standard. Einzelheiten siehe Text.

Wie man sieht, ist auch hier (nach Extraktion der RNA nach (15)) die Amplifikation des gesuchten Fragments gelungen. Die Primer waren hier EnvKlon-F6 und -R3. Betrachtet man die Ergebnisse dieses und des Abschnitts 3.1.3.1, kann man zusammenfassend sagen, dass es experimentell kein sonderliches Problem darstellt, das Fragmente 1 oder 2 (s. 2.2.1) des env für

---

sich alleine aus RNA-Material mittels RT-PCR zu amplifizieren. Die Klonierung dieser beiden getrennt gewonnenen env-Sequenzen desselben HIV-Wildisolats in einen Expressionsvektor stellt aber auf Grund der in 2.2.4.1 geschilderten Zusammenhänge ein meist unüberwindliches Problem dar. Dass sie bezüglich des DNA-Isolats P168 gelang (vgl. 3.1.2), stellt somit eine Rarität dar.

### **3.1.4 Herstellung des Expressionsplasmids pSGenvdel1BbsI**

In 2.2.4.1 wurde bereits beschrieben, warum die Klonierung von pSGenvdel1BbsI als Expressionsplasmid des HIV-env erfolgte. Die Methodik hierzu ist dort beschrieben. Dass sie zum gewünschten Konstrukt führte, lässt sich daran erkennen, dass das env-Fragment in der richtigen Länge durch Verdau mit bestimmten Restriktionsenzymen aus dem Plasmid gewonnen werden kann: In Abb. 32 (s. Abschnitt 3.1.2) ist der Vektor sowohl mit den Enzymkombinationen Eco RI/Bam HI ( $V_1$ ) als auch mit BbsI/BamHI ( $V_2$ ) geschnitten worden. Man erkennt, dass in sich in beiden Fällen das gesuchte Fragment im Agarosegel findet. Somit muss in diesem Konstrukt vor dem N-Terminus des env zusätzlich zur Schnittstelle für Eco RI eine Schnittstelle für BbsI erzeugt worden sein.

## **3.2 Sequenzierung und Analyse der HIV-1-env-Wildsequenzen**

Den Abschnitten 3.1.2 und 3.1.3 ist zu entnehmen, dass in der vorliegenden Arbeit die Amplifikation und Klonierung von sieben HIV-1-env-Wildtypsequenzen (über 2300 bp) gelang, welche sich ursprünglich proviral integriert in peripheren Blutlymphozyten (PBL) HIV-infizierter Patienten befanden. Diese sieben verschiedenen HIV-1-Wildtypen wurden bzgl. ihrer env-Nukleotidfolgen sequenziert. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf funktionell wichtige Domänen des Glykoproteins gelegt: Den „V3-loop“ als hypervariable Region und die Spaltstelle von gp120 und gp41. Die Sequenzen und Charakteristika dieser env-Abschnitte werden im Folgenden dargestellt.

### **3.2.1 Sequenz und Ladung des „V3-loops“**

Eine Beschreibung der Struktur des V3-loops sowie seiner Bedeutung als hypervariable Region des HIV-Glykoproteins sowohl für den Zelltropismus als auch die Fusionskapazität von HIV-Isolaten findet sich in Kapitel 1.2.. Tab. 6 zeigt die Aminosäuresequenzen der V3-loops der sieben HIV-1-Wildtypen im Vergleich zum HIV-Laborstamm pNL4-3 (im Plasmid pNLA1).

HIV-1-Isolat	Aminosäuresequenz der V3-loops					Tropismus
PNL4-3	CTRPN	NNT	RKSIRIQR	GPGR	AFV <b>T</b> IGKI-GN <b>M</b> RQAHC	T-trop
P168	CTGPN	NNT	RKRITL--	GPGR	VV <b>Y</b> STGEIIGD <b>I</b> RKAHC	dual-trop
P230/3	CIRPN	NKV	TR <b>R</b> IHI--	GPGR	SF <b>H</b> TTKG <b>I</b> KGD <b>I</b> RQAHC	T-trop
P230/5	CIRPN	YKV	TR <b>R</b> IHI--	GPGR	SF <b>H</b> TTKG <b>I</b> KGD <b>I</b> RQAHC	T-trop
P153	CTRPH	KIT	QQ <b>R</b> IHI--	GPGR	SFS <b>A</b> TKG <b>I</b> TGD <b>I</b> RQAHC	T-trop
P127	CTRPN	NNT	RKRITL--	GPGR	V <b>Y</b> YTTG <b>Q</b> IIGD <b>I</b> RQAHC	T-trop
P420	CTRPN	NNT	RKSIRI--	GPGR	AI <b>Y</b> ATG <b>R</b> IIGD <b>I</b> RQAHC	dual-trop
P134	CTRPG	HTT	RR <b>R</b> IHI--	GPGR	TF <b>Y</b> TTG---GD <b>I</b> RRQAHC	T-trop

Tab. 6 V3-loop-Sequenzen und Tropismus der sieben klonierten HIV-1-Wildtypen im Vergleich zu pNL4-3. Die Nukleotidfolgen der Wildisolate unterscheiden sich alle untereinander. Nur pNL4-3, P168, P127 und P420 zeigen das N-X-S/T-Motiv (blau) als potentielle Glykosilierungsstelle an den Aminosäurepositionen sechs bis acht, während das GPGR-Muster (rot) bei allen untersuchten Isolaten konserviert ist. Orange = Cysteine, die die Disulfidbrücke an der Basis der Schleife ausbilden, grün = Positionen, an denen sich bei T-tropen Isolaten i.d.R. basische Aminosäuren finden.

Es zeigt sich, dass sich alle klonierten V3-loop-Sequenzen von einander unterscheiden. Man erkennt zusätzlich, dass das N-X-S/T-Motiv (blau), welches eine potentielle Glykosilierungsstelle an den Positionen sechs bis acht des V3-loops repräsentiert, nur bei pNL4-3 und den Wildisolaten P168, P127 und P420 zu finden ist, während die Sequenz GPGR (rot) an der Spitze der V3-Schleife in allen untersuchten Isolaten konserviert ist (vgl. 1.5.1). In Tab. 7 sind die Ladungswerte der V3-Loops nach ihrer Berechnung mit dem Computerprogramm VektorNTI5 (Informax Inc., 1994-1998) angegeben.

HIV-1-Isolat	Ladung des V3-loops bei pH 7
PNL4-3	7,83
P168	3,83
P230/3	7,00
P230/5	7,00
P153	5,00
P127	4,83
P420	5,83
P134	5,18

Tab. 7 Ladungswerte der V3-loops innerhalb des gp120 der rekombinanten env-Expressionsplasmide bei pH 7,0. Einzelheiten siehe Text.

Wie in 4.1 näher ausgeführt wird, können diese Werte zur Beurteilung des Wirtstropismus und der Fusionskapazität von HIV-Isolaten verwendet werden. Bereits hier sei erwähnt, dass die gezeigten V3-Ladungswerte die von uns klonierten env-Sequenzen mit Ausnahme von P168 als SI-Isolate identifizieren. Bei P168 kann anhand des berechneten Wertes nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die klonierte env-Sequenz einem fusionsaktiven HIV-Isolat entstammt.

### 3.2.2 Spaltstelle von gp120 und gp41

Die Spaltstelle des Env-Proteins zwischen seinen beiden Bestandteile gp120 und gp41 wurde sequenziert, um zu untersuchen, ob bei den klonierten HIV-1-Isolaten eine Trennung des gp160 in seine Ekto- und Transmembrandomäne erfolgen kann. Die Spaltung ist eine Voraussetzung für die Funktionalität des Env, und damit für die Ausbildung von Riesenzellen im Syncytien-Assay der Zellkultur (vgl. 1.5.2 und 2.3.1). Tab. 8 zeigt das entsprechende Aminosäurealignment der HIV-1-Wildtypen im Vergleich zum Laborisolat pNL4-3.

HIV-1-Isolat	Aminosäuresequenz der gp120/gp 41-Spaltstelle					
PNL4-3	APT	KAKR	RVVQ-	REKR	AVGIG-AL	FLGFLG
P168	HPP	PAKR	-RVVQ	REKR	AVGVVGAM	FLGFLG
P230/3	H-P	PXER	EEWCH	REKR	AV-GIGAL	FLGFLG
P230/5	HPP	RSKR	-RVVQ	REKR	A-VGIGAL	FLGFLG
P153	APT	KAKR	RVVQ-	REKR	AVGTLGAM	FLGFLG
P127	APT	KAKR	RVVQ-	REKR	AVGIG-AL	FLGFLG
P420	APT	KAKR	RVVQ-	REKR	AVGTIGAM	FLGFLG
P134	APT	KAK-	RRVVQ	REKR	AVGMLGAM	FLGFLG

Tab. 8 Aminosäurealignment der sieben klonierten HIV-1-Wildtypen und von pNL4-3 an der Spaltstelle des gp160-Vorläuferproteins. Man erkennt, dass die Hauptspaltstelle (REKR, rot) bei allen Isolaten konserviert ist, während sich die zweite putative Spaltstelle (KAKR, blau) nur bei pNL4-3, P153, P127 und P420 findet. Einzelheiten siehe Text.

In 1.5.2 wurde bereits das REKR-Motiv (rot in Tab. 8) als die hauptsächliche Spaltstelle des gp160 beschrieben. Diese Aminosäuresequenz ist in allen untersuchten HIV-Isolaten konserviert, wodurch diese grundsätzlich gespalten werden können. Die ebenfalls bereits in 1.5.2 erwähnte zweite putative Spaltstelle mit der Sequenz KAKR (blau in Tab. 8) findet sich analog zu pNL4-3 nur bei P153, P127 und P420. Des Weiteren weisen alle Isolate das für den gp41-N-Terminus typische duale FLG-Motiv auf, welches sich sieben bis acht Aminosäuren von der Spaltstelle (REKR) entfernt befindet.

### 3.3 Funktionalität von HIV-1-Env-Wildtypen in Eukaryonten-Zellkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität der verschiedenen env-Wildtypsequenzen, welche in Expressionsvektoren hineinkloniert wurden, mit Hilfe eines Syncytien-Assays (s. 2.3.1) getestet. Nach Transfektion der Plasmide in HeLaT4- (CD4-, CXCR4-positiv) oder HeLaT4/R5-Zellen (CD4-, CXCR4-, CCR5-positiv) (s. 2.2.4.3) und Ermittlung der Transfektionseffizienz (s. 2.2.4.4) wurde dabei das Entstehen bzw. Ausbleiben von Riesenzellen begutachtet. Die Tab. 9 zeigt das Ergebnis des Syncytien-Assays nach Transfektion der env-Wildtyp-Expressionsplasmide in die o. g. Zellreihen.

Env-Isolat	Menge an Syncytien	Transfektionseffizienz (RLU)
P168	0	1814000
P230/3	0	840357
P230/5	0	400579
P153	0	2795000
P127	0	1096000
P420	0	1002500
P134	+	1546000
Positivkontrolle	+++	232280
Negativkontrolle	0	4000000

Tab. 9 Ergebnisse des Syncytien-Assays nach Transfektion der sieben env-Wildtyp-Expressionsplasmide in die Zelllinien HeLaT4 (CD4-, CXCR4-positiv) oder HeLaT4/R5 (CD4-, CXCR4-, CCR5-positiv). Von den Wildtypen bildet lediglich P134 Syncytien, dies jedoch deutlich schwächer als die Positivkontrolle (pSGenvdel1). Negativkontrolle = pSGBK. Rechts außen sind die Luciferasewerte angegeben, welche die Transfektionseffizienz angeben. Einzelheiten siehe Text.

Wie man sieht, führen sechs der sieben env-Wildisolate zu keiner signifikanten Ausbildung von Riesenzellen. Lediglich P134 bildet mehr Syncytien als die Negativkontrolle (Plasmid pSGBK, vgl. 2.2.4.3). Es zeigte sich, dass HeLa-Zellen in der Zellkultur auch ohne jegliche env-Expression eine gewisse spontane Fusionsaktivität besitzen. Bei der Beurteilung wurde stets bewertet, ob ein Env-Isolat mehr Riesenzellen bildet, als es diesem „Hintergrundrauschen“ der Negativkontrolle entspricht. In der von uns klonierten env-Sequenz gibt es folglich Unterschiede zwischen den HIV-Wildtypen und dem adaptierten Laborstamm pNL4-3, welche zu dem beschriebene unterschiedlichen Phänotyp in HeLaT4- oder HeLaT4/R5-Zellen führen. Es erwies sich für die Quantität der Syncytienbildung als unerheblich, ob die Transfektion der Expressionsplasmide in HeLaT4- oder HeLaT4/R5-Zellen erfolgte. Wurden HeLa-Zellen verwendet (CD4-negativ), zeigte sich, wie zu erwarten, keinerlei Fusionsaktivität. In Tab. 9 ist beispielhaft die Transfektionseffizienz einer Transfektion der Plasmide in HeLaT4/R5-Zellen angegeben. Anhand der gemessenen Luciferasewerte ist ersichtlich, dass das Ausbleiben von Syncytien bei den Wildisolaten nicht durch eine zu geringe Transfektionseffizienz bedingt ist. Die entsprechenden Werte sind bei allen Wildisolaten höher als bei der Positivkontrolle (pSGenvdel1, s. 2.2.4.3 und 2.4.2.1) und geringer als bei der Negativkontrolle. Beim Isolat P134, welches schwache Fusionen bildet, ist der Luciferasewert mehr als 6,5-fach höher als beim stark

fusionsaktiven Kontrollplasmid pSGenvdel1. (Der Immunblot aus dem Zellkulturextrakt dieser Transfektion ist im Abschnitt 3.4. dargestellt.)

### 3.4 Proteinnachweise des Env in HeLa-Zellkulturen

Im Anschluß an die Analyse der rekombinanten Env-Expressionsplasmide im Syncytien-Assay der HeLa-Zellkulturen (vgl. 3.3) wurden Proteinnachweise des Env aus Zellkulturextrakt (ZKE) und Zellkulturüberstand (ZKÜ) durchgeführt (vgl. 2.2.4.4 und 2.3). Hauptziel dieser Experimente war es, nachzuweisen, dass die Prozessierung der env-Wildsequenzen im Zellapparat der transfizierten HeLa-Zellen zur Proteinexpression des HIV-Glykoproteins führt. Dies konnte für die Wildisolate im *Zellkulturextrakt* mittels Immunoblot, RIPA und IFT gezeigt werden. Lediglich für das Isolat P153 gelang kein zweifelsfreier Nachweis von Glykoprotein. Hier konnte allerdings die env-Wildsequenz im entsprechenden Expressionsplasmid nachgewiesen und sequenziert werden. Ein Nachweis von env im zellfreien *Kulturüberstand* geht zusätzlich auf die Frage ein, in welchen Mengen gp120 von der Zelloberfläche dissoziiert („Env-shedding“, vgl. 1.5.1). Dies ist deshalb von Bedeutung, weil ein solcher extrazellulärer Nachweis von gp120 als Beweis dafür dienen kann, dass das HIV-Glykoprotein nicht nur intrazellulär gebildet wird, sondern auch die Zellmembran erreicht, um dort seiner Funktion im Syncytien-Assay nachkommen zu können. Auf die Tatsache, dass bei der Aufarbeitung des Zellkulturüberstands das freie, ungebunden HIV-Glykoprotein von der Fraktion der Mikrovesikel getrennt wurde, ist bereits in 3.4 hingewiesen worden. Im Folgenden werden zuerst die Proteinnachweise des Env aus Zellkulturextrakt dargestellt, weil sie auf Grund dieser Zusammenhänge nachweisen, dass Env überhaupt entsteht. Abb. 36 zeigt eine Radioimmunpräzipitation (RIPA) der HIV-1-Wildisolate mit einem humanen HIV-positiven Serum nach Transfektion der klonierten Env-Expressionsplasmide in HeLa-Zellen (ohne Korezeptoren).

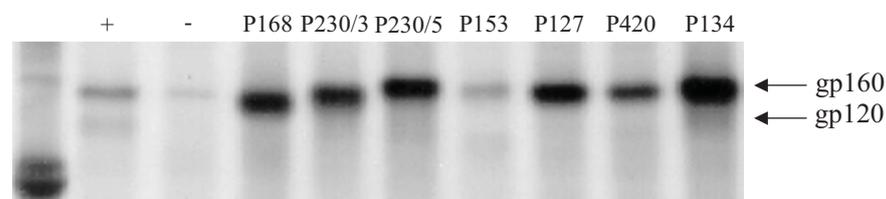


Abb. 36 Radioimmunpräzipitation der Wildtyp-Glykoproteine mit einem humanen HIV-positiven Serum. Man erkennt bei den Wildisolaten mit Ausnahme von P153 gp160-Banden, welche deutlich stärker sind als die der Negativkontrolle (pSGBK). Somit ist, nach Transfektion der Vektoren in HeLa-Zellen, gp160 intrazellulär nachgewiesen. Einzelheiten siehe Text.

Man erkennt bei den Wildisolaten gp160-Banden, welche mit Ausnahme von P153 deutlich stärker sind als die zarte Spur in der Negativkontrolle (pSGBK, s. 2.2.4.3). Bei P153 ist diese

Bande allerdings nicht deutlich dicker ausgeprägt. Es fällt darüber hinaus auf, dass das gp160 der verschiedenen HIV-Wildtypen ein unterschiedliches Laufverhalten in der Elektrophorese aufweist, wie es auch zu erwarten ist. Ein gp120 kann nur bei der Positivkontrolle (pSGenvdel1) nachgewiesen werden, gp41 findet sich nirgends. Somit ist gezeigt, dass nach Transfektion der rekombinanten Env-Expressionsplasmide in HeLa-Zellen gp160 gebildet wird. Damit ist aber noch keine Aussage darüber gemacht, ob sich das gp160 im Zytosol oder in der Zellmembran befindet. Diese beiden Fraktionen der Zelle wurden bei der Aufarbeitung der Zellkultur für die RIPA nicht von einander getrennt (vgl. 2.3.3). Weiterhin läßt sich anhand dieses Versuchs keine Aussage darüber machen, wie die Menge an nachgewiesenem Protein eines Wildtyps zu bewerten ist, weil bei der RIPA aus methodischen Gründen keine Messung der Luciferasewerte möglich war (vgl. 2.3.3). Eine ähnliche Aussagekraft besitzt der IFT, welcher ebenfalls mit einigen Konstrukten durchgeführt wurde. Die hierbei jeweils verwendeten monoklonalen Antikörper sind Tab. 10 zu entnehmen.

Plasmid	DuPont	Biodesign	Biodesign	DuPont	Biogenesis
	NEA9301 (gp120)	C65291M (gp120)	B65961G (gp120)	NEA9303 (gp41)	MabCI8110 41lg (gp41)
P168	+	0	0	+	+
P127	+	+	+	+	+
P420	0	+	0	0	0
P134	+	0	0	+	+
Positivkontrolle	+	+	+	+	+
Negativkontrolle	0	0	0	0	0

Tab. 10 Immunfluoreszenztest mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern nach Transfektion von rekombinanten Expressionsplasmiden in HeLaT4-Zellen. + = Proteinnachweis, 0 = kein Proteinnachweis, Positivkontrolle = pSGenvdel1, Negativkontrolle = pSGBK. Einzelheiten siehe Text.

Interessant ist die unterschiedliche Reaktivität verschiedener HIV-Wildtyp-Glykoproteine mit den monoklonalen Antikörpern. Um den Einfluß der Transfektionseffizienz bei der Env-Detektion zu berücksichtigen, wurden daraufhin Western-Blots nach Transfektion der Expressionsvektoren in HeLaT4/R5-Zellen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern aus Zellkulturextrakt durchgeführt. Zusätzlich zur RIPA kann hiermit gezeigt werden, dass sich das Glykoprotein intrazellulär an Membranen gebunden befindet (vgl. 2.2.4.4). In Abb. 37 ist ein

solcher Blot mit einem Antikörper (AK) zu sehen, welcher im gp120 bindet (Behring, anti-gp120, No. 87-133/026, Sommerville, NJ).



Abb. 37 Immunblot der HIV-1-Wildtyp-Glykoproteine aus Zellkulturextrakt nach Transfektion der sieben klonierten env-Expressionsvektoren in HeLaT4/R5-Zellen. Der verwendete monoklonale AK richtet sich gegen die Ektodomäne des Env (gp120), und führt zur Detektion von gp160 bei allen Wildisolaten mit Ausnahme von P153. + / - = Positiv- / Negativkontrolle. Einzelheiten siehe Text.

Wie man sieht, kann mit diesem AK gp160 bei den Wildisolaten P168, P230/3, P230/5, P127, P420 und P134 sowie beim Laborisolat pNL4-3 nachgewiesen werden, während P153 keine Reaktion zeigt. Die Luciferasewerte der zugehörigen Transfektion sind in Tab. 9 (Abschnitt 3.3) angegeben. Sie zeigen, dass die detektierten Proteinmengen nicht über unterschiedliche Transfektionseffizienzen erklärt werden können. Die Proteinbande von P230/5 ist beispielsweise deutlich stärker als die von P127, obwohl die Transfektionseffizienz von letzterem Isolat über 2,7-fach höher ist als die des erstgenannten. Abb. 38 zeigt einen ähnlichen Immunblot (ebenfalls transfizierte HeLaT4/R5-Zellen), bei dem jedoch der Antikörper sein Epitop im Bereich des gp41 hat (anti-gp41, Chessie 8).

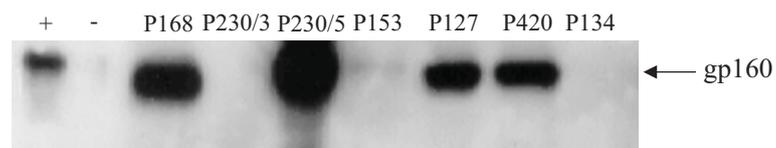


Abb. 38 Immunblot, welcher sich bzgl. seiner Methodik nur dadurch von dem in Abb. 37 dargestellten Blot unterscheidet, dass der monoklonale AK im gp41 bindet. Gp160 wurde hier bei pNL4-3, P168, P230/5, P127 und P420 nachgewiesen.

In diesem Experiment konnte gp160 lediglich im Zellextrakt von pNL4-3, P168, P230/5, P127 und P420 nachgewiesen werden. Gp120 oder gp41 findet sich in keinem der beiden bisher dargestellten Western-Blots. Diese erbringen, wie oben gesagt, zusätzlich zu RIPA und IFT den Beweis, dass bei allen Klonen mit Ausnahme des Isolats P153 nach deren Transfektion in HeLa-Zellen das Wildtyp-Env an Membranen gebunden vorliegt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach Transfektion der Env-Wildtyp-Expressionsplasmide in HeLa-Zellen eine Proteinexpression des gp160 erfolgt, wurde versucht, freies gp120 im Zellkulturüberstand nachzuweisen. Nachdem die Zellkultur so aufgearbeitet worden war, dass die Mikrosivelfraktion aus dem zellfreien Kulturüberstand entfernt wurde (vgl. 2.2.4.4),

bedienten wir uns hierfür eines Immunoblots. In Abb. 39 sind auf diese Weise vier Wildisolate nach ihrer Transfektion in HeLaT4/R5-Zellen untersucht worden. Der Blot bediente sich zweier monoklonaler AK, wovon der eine im Bereich des gp120 (Behring, anti-gp120, No. 87-133/026, Sommerville, NJ) und der andere im gp41 (anti-gp41, Chessie 8) bindet.

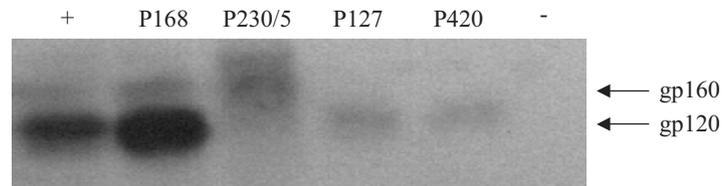


Abb. 39 Western-Blot aus Zellkulturüberstand mit zwei Antikörpern, die im gp120 und gp41 binden, nachdem vier Wildtyp-env-Expressionsplasmide (P168, P230/5, P127, P420) in HeLaT4/R5-Zellen transfiziert wurden. Man erkennt gp120-Nachweise bei den Wildisolaten P168, P127 und P420. P230/5 zeigt kein gp120 im Zellkulturüberstand. + = Positivkontrolle (pSGenvdel1). - = Negativkontrolle (pSGBK). Einzelheiten siehe Text.

Bei P168 findet sich ein starker Nachweis von gp120, welcher den des Laborisolats pNL4-3 (im Plasmid pSGenvdel1, Positivkontrolle) übertrifft. Die Isolate P127 und P420 zeigen deutlich schwächere gp120-Banden, bei P230/5 ist keine Bande sichtbar. Bei P168, P230/5 und pNL4-3 ist eine zarte Spur des gp160 zu erkennen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Funktionalität von HIV-1-Env-Wildtypen in HeLa-Zellreihen

Wie in 1.8 ausführlich dargestellt, ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Funktionalität nahezu des gesamten Env von HIV-Wildisolaten in HeLa-Zellkulturen zu untersuchen, und diese mit der des HIV-Laborstamms pNL4-3 zu vergleichen. Grundlage hierfür ist die Beobachtung, dass die env-Sequenz von pNL4-3 zur Ausbildung von Syncytien führt, wenn diese mittels eines Expressionsplasmids (pNLA1) unabhängig von sonstigen HIV-Genen in HeLaT4-Zellen exprimiert wird (2). Verschiedene HIV-Wildtypen konnten aus infizierten Patienten isoliert, in PBLs angezüchtet und der Gruppe der SI-Isolate zugeordnet werden (3). Diese ließen sich auf HeLaT4-Zellen übertragen, verloren in diesen aber ihre Fusionskapazität. Die Ursache für diesen unterschiedlichen Phänotyp der Wildisolate in PBLs und HeLaT4-Zellen ist bisher unklar, weil beide Zellreihen über die Rezeptoren verfügen, welche von SI-Isolaten benutzt werden (CD4, CXCR4, vgl. 2.2.4.3), und eine Replikation der HIV-Wildtypen in den HeLa-Zellen im Rahmen der genannten Arbeit nachgewiesen wurde. Indem in unseren Experimenten das Wildtyp-env in nahezu seiner gesamten Länge amplifiziert und in einen Expressionsvektor hineinkloniert wird, welcher diese Sequenz als einziges HIV-Gen exprimiert, kann nach dessen transienter Transfektion in HeLaT4-Zellen getestet werden, ob die entstehenden Wildtyp-Glykoproteine analog zum jeweiligen gesamten Viruspartikel zu keinen Syncytien führen. Dies würde die Schlußfolgerung rechtfertigen, dass sich innerhalb der von uns klonierten env-Sequenz Unterschiede zwischen dem adaptierten Laborisolat pNL4-3 und den Wildtypen finden, welche die Fusionskapazität von HIV-1 beeinflussen. Da sechs der sieben in der vorliegenden Arbeit klonierten Konstrukte keine Fusionsaktivität aufweisen (vgl. 3.3), kann diese Aussage für diese Isolate bestätigt werden. Für die env-Sequenz von P168 konnte dabei aber, wie weiter unten dargestellt, nicht wie für die übrigen fünf Isolate dieser Gruppe gezeigt werden, dass sie einem Syncytien-induzierenden Isolat entstammt. Lediglich das Isolat P134 wies eine schwache aber dennoch signifikante Fusogenität auf.

Um zu verstehen, warum dies trotz der Tatsache möglich ist, dass P134 als vollständiges Viruspartikel in HeLaT4-Zellen keine Syncytien ausbildet, muss man berücksichtigen, dass der von uns klonierten env-Sequenz ein Teil des gp41-C-Terminus fehlt. Da alle HIV-Wildtypen in ihrem Genom unterschiedliche Deletionen und Insertionen aufweisen, ist die Länge des Bereichs, welcher bei einem bestimmten Isolat fehlt, von Isolat zu Isolat verschieden. Würde man mit der PCR, welche in der vorliegenden Arbeit etabliert wurde, die env-Sequenz des

Laborisolats pNL4-3 amplifizieren, würde im Vergleich zum vollständigen env-Gen am C-Terminus des gp41 ein Bereich von 240 Nukleotiden fehlen. In vorausgehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der gp41-C-Terminus einen Einfluß auf die Expression und Prozessierung von Env hat. In (2) wurde gezeigt, dass das Plasmid pSGenvdel1, welches die env-Sequenz von pNL4-3 mit einer Deletion von 322 Nukleotiden am gp41-C-Terminus enthält, in HeLa-Zellen eine größere Fusionsaktivität besitzt, als der Vektor pNLA1, welcher das vollständige env enthält. Ein Expressionsvektor, welcher sich von pSGenvdel1 nur darin unterscheidet, dass seine Deletion am C-Terminus lediglich 47 Aminosäuren beträgt (pSGenvdel2), weist wiederum eine ähnliche Fusionskapazität wie pNLA1 auf. Für den HIV-Laborstamm pNL4-3 zeigt sich also, dass sich eine Deletion des gp41-C-Terminus positiv auf dessen Fusionskapazität in HeLaT4-Zellen auswirkt, wenn diese groß genug ist. Es besteht die Möglichkeit, dass ähnliches auch für das Isolat P134 zutrifft, und daher dessen Fusogenität bei dem von uns hergestellten Klon im Vergleich zum vollständigen Viruspartikel derart erhöht ist, dass sie in HeLaT4-Zellen nachweisbar wird. Umgekehrt läßt sich vor diesem Hintergrund argumentieren, dass bei den anderen von uns hergestellten Konstrukten, welche keine Syncytien bilden, die Fusionsaktivität im Vergleich zu den vollständigen HIV-Isolaten in der HeLaT4-Zellkultur dann auch erhöht sein müsste. Möglicherweise ist das Isolat P134 in dem Einfluß des gp41-C-Terminus auf seine Fusogenität dem Laborstamm ähnlicher als die übrigen Wildisolate. Bei pNL4-3 konnte in (2) weiterhin gezeigt werden, dass die erhöhte Fusionskapazität von pSGenvdel1 auf einen gesteigerten Glykoproteintransport zur Zelloberfläche zurückzuführen ist. Darüber hinaus beschreiben die Ergebnisse in (18) zwei Regionen innerhalb der cytoplasmatischen Domäne des gp41, welche die Oberflächenexpression des HIV-Glykoproteins hemmen. Weiterhin konnte für gp41-Deletionsmutanten ein gesteigerter intrazellulärer Proteintransport bei gleichzeitig vermindertem Einbau des Glykoproteins in Viruspartikel nachgewiesen werden. Für letzteres wird eine Interaktion des Env mit Matrixproteinen im Rahmen der Zellreifung diskutiert (32, 43, 48). Möglicherweise bewirken Deletionen im genannten env-Bereich auch eine Hemmung der Virusinfektiosität (58). Die Studien zum Einfluß des gp41 C-Terminus auf die Env-Expression und -prozessierung sind aber noch zu unvollständig, um hiervon eindeutige Aussagen zur Bedeutung seiner Deletion in unseren Experimenten abzuleiten.

Wie in 1.8 geschildert, standen für die vorliegende Arbeit als Ausgangsmaterial verschiedene HIV-Isolate zur Verfügung, welche aus HIV-positiven Patienten der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf isoliert und in PBL-Kulturen angezüchtet worden waren (3). Erwähnt wurde auch bereits, dass im Rahmen dieser Arbeit der Phänotyp der Isolate bereits in verschiedenen

---

Zellkulturen untersucht worden war, was zur Identifikation von verschiedenen SI-Isolaten geführt hatte. Bei diesen wurde dann die o. g. unterschiedliche Fusogenität in PBLs und HeLaT4-Zellen beobachtet. Man muss sich hierbei klarmachen, dass der in diesem System beobachtet Tropismus und Phänotyp von HIV-Isolaten anders gewonnen wurde als in unseren Experimenten: Die in 2.1 beschriebene Virusisolierung von HIV, welche von der genannten Arbeitsgruppe damals durchgeführt wurde, führt zu einer anderen Bedeutung des Wortes HIV-„Isolat“, als es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. Da für jedes „Isolat“ damals eine Summe HIV-positiver Lymphozyten (aus einem infizierten Patienten) mit HIV-negativen Spenderlymphozyten kokultiviert wurde, lagen in jeder dieser Lymphozytenkulturen potentiell mehrere verschiedene HIV-Genome vor. Diese befanden sich somit auch im Zellkulturüberstand, welcher auf andere Zellreihen (u. a. HeLaT4-Zellen) übertragen wurde, um Tropismus- und Fusionsanalysen durchzuführen. Der hierbei beobachtete Phänotyp spiegelt daher die Funktionalität potentiell mehrere HIV-Genome dar, und kann somit prinzipiell keiner einzelnen env-Sequenz zugeordnet werden. Grundlage unserer Experimente ist jedoch die Amplifikation des HIV-1-env mittels PCR, welche grundsätzlich die exponentielle Vermehrung einer Nukleotid-Zielsequenz bewirkt. Aufgrund dieser Zusammenhänge ist es möglich, dass aus einem „HIV-Isolat“, welches in Form potentiell mehrerer verschiedener HIV-Genome in einer PBL-Kultur proviral integriert vorliegt, mittels PCR verschiedene HIV-env-Sequenzen amplifiziert werden. Dies kann sowohl in ein- und derselben PCR als auch in auf einander folgenden PCRs passieren. Diese verschiedenen Sequenzen werden dann im weiteren Verlauf der Experimente in env-Expressionsvektoren kloniert. Dieser Fall ist beim HIV-Wildisolat P230 eingetreten, aus welchem mittels einer PCR zwei verschiedene Klone mit unterschiedlichen env-Nukleotidsequenzen hergestellt werden konnten (vgl. 3.1.2 und 3.2). Aufgrund dieser Tatsache, dass auch mit einer einzelnen PCR aus dem o. g. DNA-Material verschiedene env-Zielsequenzen amplifiziert werden können, kann ein gewonnenes Amplifikat anfangs nicht als einzelne HIV-Sequenz bezeichnet werden. Nach Einfügung der amplifizierten env-Sequenzen in Expressionsvektoren und Transfektion dieser Plasmide in E.coli kann jedoch davon ausgegangen werden, dass je ein Bakterium ein Plasmid aufgenommen hat, und somit jede gewachsene Bakterienkolonie einen Klon darstellt, der nur eine env-Sequenz enthält. Diese Sequenz wurde dann aufgereinigt, sequenziert und in Eukaryonten transfiziert, um anschließend ihre Funktionalität in HeLa-Zellen zu testen. Wird in der vorliegenden Arbeit der Begriff „Isolat“ verwendet, ist hiermit eine solche HIV-Sequenz gemeint, welche als einzige Nukleotidfolge des env in Form eines Klons vorliegt. Diese Zusammenhänge waren selbstverständlich von der o. g. Arbeitsgruppe berücksichtigt worden. In deren Experimenten stellten die in der Zellkultur

---

isolierten HIV-Viren ebenfalls nur ein Ausgangsmaterial für weitere Versuche dar. In diesen wurden rekombinante subgenomische HIV-Klone hergestellt, bei denen in dem Plasmid pNLA1 (s. 2.4.1) die flankierende Region der gp160-Spaltstelle des Laborisolats pNL4-3 gegen die amplifizierte Sequenzen der vorher isolierten HIV-Wildviren ausgetauscht wurde. Auch bei dieser Arbeit wurden verschiedene *Sequenzen* aus einem Isolat mittels PCR amplifiziert (bis zu fünf verschiedene), und nach deren Klonierung und Transfektion in Zellreihen das Entstehen von Riesenzellen analysiert. Aufgrund des bisher Gesagten ist verständlich, dass die Tab. 1 im Abschnitt 2.1.3 den Phänotyp von potentiell mehreren verschiedenen env-Sequenzen in einer Zellkultur darstellt. Die hier aufgetretenen Zellfusionen sagen prinzipiell nur aus, dass innerhalb dieser Schar von env-Nukleotidfolgen eine dabei sein muss, welche in PBLs Syncytien entstehen läßt. Dieser Phänotyp läßt sich also nur bedingt mit dem eines Klons vergleichen, der in der vorliegenden Arbeit hergestellt wurde. Dieser muss zwar der Summe der ursprünglich in der PBL-Kultur vorhandenen HIV-Genome entstammen, jedoch ist keine Aussage darüber möglich, ob diese Sequenz auch in der PBL-Kultur für den cytopathischen Effekt in Form von Riesenzellen verantwortlich war. Diese Einschränkung wurde auch von der genannten Arbeitsgruppe bezüglich ihrer rekombinanten Plasmide getroffen. Auf der anderen Seite muss man sich vor Augen halten, dass durch die Kokultivierung von HIV-positiven und -negativen Spenderlymphozyten (vgl. 2.1) eine gewisse Selektion der ursprünglich aus dem Patienten isolierten HIV-Viren durch die Methodik selbst stattfindet, und damit die Menge an vorhandenen HIV-Genomen reduziert wird. Da die HIV-Ausgangs isolate aller in der vorliegenden Arbeit klonierten Konstrukte ursprünglich in der PBL-Kultur zur Gruppe der SI-Isolate gehörten, kann man unterstellen, dass es völlig unwahrscheinlich ist, dass aus dieser Gruppe von HIV-Genomen in unseren Experimenten sieben mal in Folge just gerade diese env-Sequenzen mit verschiedenen PCRs amplifiziert wurden, welche keine Fusionsaktivität besitzen. Es wäre ein absolut unwahrscheinlicher Zufall, wenn dies bei allen hergestellten Klonen passiert sein sollte. Weiter unten im Text und in 3.2.1 wird darüber hinaus gezeigt, dass eine Analyse der V3-loop-Ladungswerte der rekombinanten Plasmide diese mit Ausnahme von P168 als SI-Isolate identifiziert. Dies ist von großer Bedeutung, weil sichergestellt werden muss, dass die env-Sequenzen, welche in der vorliegenden Arbeit kloniert und bezüglich ihrer Funktionalität in HeLa-Zellreihen untersucht werden, ursprünglich T-tropen bzw. dual-tropen HIV-Isolaten entstammen. Nur so kann der Einfluß der untersuchten env-Sequenzen auf die Fusionskapazität eines HIV-Isolats in HeLaT4-Zellen untersucht werden. Die Isolate P168 und P420 waren in den ursprünglichen Experimenten von Adams et al. bzgl. ihres Tropismus dual-trop, ließen sich also auf HeLaT4-Zellen und primäre Makrophagen übertragen (vgl. Tab. 1 in 2.1.3). Dies bedeutet,

---

dass sie zur Verwendung sowohl des CXCR4- als auch des CCR5-Korezeptors in der Lage sind. Auch sie führten in der PBL-Kultur zur Ausbildung von Syncytien, wobei auf Grund der oben geschilderten Zusammenhänge nicht sicher gesagt werden kann, ob in der Zellkultur dieser Isolate damals sowohl T-trope als auch M-trope HIV-Quasispezies vorlagen, oder ob ihr Phänotyp auf ein HIV-Genom zurückgeht, dessen zugehöriges Glykoprotein mit beiden Korezeptoren interagieren kann.

Nachdem gezeigt wurde, dass Unterschiede innerhalb der klonierten env-Sequenz von pNL4-3 und den Wildtypen zu einem unterschiedlichen Phänotyp in HeLaT4-Zellen führen, stellt sich die Frage, welche Bereiche innerhalb dieses env-Abschnitts hierfür verantwortlich sind. Hierfür muss versucht werden, die Unterschiede zwischen pNL4-3 und den Wildsequenzen innerhalb der von uns klonierten env-Sequenz genauer zu beschreiben. Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten DNA-Substrate, wie oben dargestellt, bereits bzgl. anderer Fragestellungen untersucht wurden, sind die damals erzielten Ergebnisse von besonderem Interesse. Dies gilt insbesondere dann, wenn sich die damals durchgeführten Experimente ebenfalls mit der Bedeutung verschiedener env-Bereiche für die Fusionsaktivität der HIV-Isolate beschäftigten. Die o. g. Arbeitsgruppe um O. Adams befasste sich, wie oben dargestellt, u. a. in (3) mit dem Einfluß der Region um die gp160-Spaltstelle und des N-Terminus des gp41 auf die Fusionskapazität von HIV-Isolaten. Die Kernaussage dieser Arbeit ist, dass diese Region eine untergeordnete Rolle für die Fusogenität von HIV-1-Env in der HeLaT4-Zellkultur spielt. Ein Austausch dieser Region im Plasmid pNLA1 gegen Wildsequenz hatte nämlich zu keiner signifikanten Änderung der Syncytienbildung oder des Tropismus der HIV-Isolate geführt. Vergleicht man die Nukleotidsequenzen der gp160-Spaltstelle der klonierten Plasmide der damaligen mit denen der vorliegenden Arbeit (s. Tab. 8), so zeigt sich, dass diese bei den Isolaten P127, P134 und P153 völlig identisch sind. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die PCRs beider Arbeiten bei diesen Isolaten jeweils ihre Zielsequenz aus dem gleichen HIV-Genom der in der PBL-Kultur vorliegenden HIV-Isolate amplifiziert haben. Die Klone P230/3, P230/5, P168 und P420 weisen eine identische Nukleotidfolge zwischen der Hauptspaltstelle (REKR) und dem dualen FLG-Motiv auf, unterscheiden sich jedoch von den früheren Plasmiden im Bereich vor dem REKR. Da die Isolate P127, P134 und P153 den gleichen HIV-Genomen entstammten wie in unserer Arbeit, liegt der Verdacht nahe, dass das Ausbleiben der Fusionsaktivität in unseren Versuchen bei diesen Isolaten nicht auf die Wildsequenzen um die Spaltstelle des Glykoproteins herum bzw. im gp41-N-Terminus zurückzuführen ist. Man könnte verleitet sein, zu folgern, dass diese Region aufgrund der damaligen Voruntersuchungen nicht die ist, welche den Unterschied zwischen pNL4-3 und den

---

Wildisolaten bzgl. ihrer Fusogenität ausmacht. Bei solchen Schlußfolgerungen ist zu beachten, dass Adams et al. ihre amplifizierten HIV-Wildsequenzen in das Plasmid pNLA1 (s. 2.4.1) hineinklonierten, welches im Vergleich zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Expressionsvektor pSGenvdel1BbsI (s. 2.4.2.1), wie bereits oben gesagt, 312 Nukleotide mehr am C-Terminus des env aufweist, und damit das vollständige env des Isolats pNL4-3 enthält. Darüber hinaus weißt dieser Expressionsvektor zusätzlich die HIV-Gene vif, vpr, vpu und nef auf. Somit wurden die von dieser Arbeitsgruppe gewonnenen Erkenntnisse in einem anderen genetischen Kontext erzielt als die der vorliegenden Arbeit. Das Plasmid pSGenvdel1, welches als einziges HIV-Gen das env des Isolats pNL4-3 in derselben Länge enthält wie pSGenvdel1BbsI, weist zwar, wie oben beschrieben, als solches eine höhere Fusionsaktivität auf als pNLA1. Unklar ist jedoch, wie sich diese Eigenschaft verhält, wenn man in diesem Vektor den Bereich um die Spaltstelle des gp160 gegen Wildsequenz austauscht. Nur anhand eines solchen Konstrukts könnte abschließend beurteilt werden, ob die die Spaltstelle von gp160 flankierende Region ebenfalls im Plasmid pSGenvdel1BbsI, d. h. im Kontext der vorliegenden Arbeit, für sich alleine genommen keinen Einfluß auf die Fusionskapazität von HIV-1-Env hat, und somit das Ausbleiben von Syncytien in unserer Arbeit auf andere env-Wildtypbereich zurückzuführen ist. Aufgrund der Ergebnisse der o. g. Arbeit und des Wissen um die starke Fusogenität von pSGenvdel1 ist aber eher davon auszugehen, dass der Verlust der Fusionsaktivität bei den genannten Isolaten nicht auf die Wildsequenz um das REKR-Motiv herum bzw. am gp41-N-Terminus zurückzuführen ist. Letzten Endes kann man sich dessen aber nicht sicher sein, denn die zusätzlichen Sequenzen in pNLA1 könnten auch bewirkt haben, dass der Austausch von Laborstamm- gegen Wildsequenz im o. g. Bereich bzgl. der Fusionsaktivität des Env kompensiert werden konnte, und dies bei dem kürzeren Plasmid pSGenvdel1BbsI nicht möglich ist. Dieser Zusammenhang sollte in weiteren Experimenten mit der oben vorgestellten Klonierung näher untersucht werden.

Von weiterem Interesse zur Analyse der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist die Dissertation von Rüdiger Blindt aus dem Jahr 1998, welche sich mit der Rolle des V3-loops des Env als Pathogenitätsdeterminante von HIV-1 befasst (14). In dieser Arbeit wurde die V3-loop-Sequenz des env von HIV-Wildisolaten mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor SVATGXbadel hineinkloniert, welcher mit Ausnahme einer Deletion im tat-Exon 1 analog zur o. g. Arbeit von Adams et al. das gesamte env des Isolats pNL4-3 enthält, und zusätzlich für das vpu-Gen kodiert. Auf diese Weise wurde die V3-Loop-Sequenz des Ausgangsplasmids gegen HIV-Wildsequenz ausgetauscht, und anschließend die Fusionsaktivität der rekombinanten Env-Expressionsvektoren in HeLaT4-Zellen untersucht. Dies gelang bezüglich der Isolate P127 und

---

P134, welche dem Autor damals als Mitarbeiter am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ebenfalls zur Verfügung standen. Die damals klonierten V3-loop-Aminosäuresequenzen entsprechen exakt denen der Isolate P127 und P134 unserer Konstrukte (s. Tab. 6), wodurch man wiederum sagen kann, dass diese beiden Isolate in allen drei bisher erwähnten Arbeiten auf die gleichen HIV-Ausgangsgenome zurückgehen (s. o.). Als Ergebnis der Fusogenitätsanalyse der damalige Doktorarbeit zeigten die beiden Expressionsplasmide eine im Vergleich zum Ausgangsplasmid verringerte Fusionsaktivität, welche aber immer noch deutlich nachweisbar war. Somit wurde damals gefolgert, dass „Mutationen im V3-loop von entscheidender Bedeutung für die Determinierung des NSI/SI-Phänotyps von HIV-Isolaten sind.“ Insgesamt kann man sagen, dass der V3-loop ein env-Abschnitt ist, auf den sich zahlreiche Untersuchungen zum HIV-Glykoprotein fokussierten, welche ihm ebenfalls eine große Bedeutung für die Fusion des Virus mit der Wirtszellmembran zuweisen (66, 111, 119, 124, 139) (vgl. 1.5.1.). Auch bei der Arbeit von Blindt et al. muss man einschränkend sagen, dass die Aussagen über den V3-loop in einem anderen Plasmidkontext erzielt wurden als bei unseren Experimenten (s.o.). Anders als bei der Arbeit von Adams et al. (3) wurde hier, im Gegensatz zur gp160-Spaltstelle, ein signifikanter Einfluß der untersuchten Region auf die Fusionsaktivität von HIV-1 festgestellt, indem der Austausch des Laborstamm-V3-loops gegen Wildsequenz die Syncytienbildung verringerte. Ob sich ein solcher Austausch ebenfalls in dem von uns verwendeten Plasmidkontext auf den HIV-Phänotyp auswirken würde, ist unklar. Zu erwarten wäre, dass der V3-loop auch in einem pSGenvdel1-Kontext einen Einfluß auf die Fusionskapazität in HeLaT4-Zellen hat, diese sich bei Verwendung der V3-Wildsequenzen im Vergleich zum Laborisolat verringert, jedoch nicht wie in unseren Versuchen gänzlich erlischt. Folglich kann angenommen werden, dass auch Sequenzen innerhalb des von uns klonierten env-Abschnitts, aber ausserhalb des V3-loops, die Fusionskapazität von HIV-Isolaten in HeLa-Zellen beeinflussen. Diese Folgerung wird gestützt durch eine Studie von Stamatos und Cheng-Meyer (130), welche zeigt, dass ein Austausch der V3-loops verschiedener HIV-1-Isolate untereinander deren Fusionkapazität nicht beeinflusst. Darüber hinaus konnten sie durch Mutationsanalysen eine Interaktion des V3-loops mit der C2-Region des gp120 nachgewiesen, welche die Assoziation der Ekto- und Endodomäne des HIV-Glykoproteins beeinflusst, und damit auch den Phänotyp der untersuchten Isolate verändert. Groenink et al. fanden in HIV-Isolaten, welche sich bezüglich ihres SI-/NSI-Phänotyps von einander unterschieden, identische V3-loop Sequenzen, und leiteten hieraus ebenfalls einen Einfluß anderer Regionen auf den Wirtszelltropismus von HIV-1 ab (67). Letztlich müssen weitere Klonierungen nach oben genanntem Muster eine Aussage dazu liefern, welchen Einfluß der V3-

---

loop auf die Fusionskapazität unserer Konstrukte hat. Man kann Aussagen über den Einfluß eines Genabschnitts letztlich nur dann miteinander vergleichen, wenn sie im gleichen Expressionsplasmid gewonnen wurden.

Blindt et al. untersuchten in ihrer Arbeit darüber hinaus den Einfluß der Gesamtladung der von ihnen klonierten V3-loops auf den Wirtszelltropismus und die Fusionskapazität der verwendeten HIV-Isolate. Hierbei zeigte sich, dass die Gesamtladung des V3-loops eines Isolats besser mit dessen phänotypischem Verhalten korreliert als ein Vergleich der V3-loop-Aminosäuresequenzen. Es wurde weiterhin gezeigt, dass anhand der Ladung dieses env-Abschnitts nicht nur eine Unterscheidung zwischen SI- und NSI-Phänotyp eines HIV-Isolats möglich ist, sondern auch auf dessen Fusionskapazität in der Zellkultur geschlossen werden kann. Diese Ergebnisse werden gestützt durch eine Arbeit von Gouldsmit et al. (36), welche anhand sequentiell gewonnener Patientenisolats zeigen konnte, dass die Anzahl an basischen Mutationen im V3-loop positiv mit der Syncytienbildung der Isolate in der Zellkultur, dem Wechsel von M-tropen zu T-tropen Eigenschaften des Virus und der Progression des Krankheitsbildes des infizierten Isolatspenders zu AIDS korreliert. Eine hohe Gesamtladung des V3-loops repräsentiert demnach eine hohe Fusogenität eines HIV-Isolats. Vor diesem Hintergrund können die Ladungswerte der V3-loops unserer rekombinanten Wildtyp-env-Expressionsplasmide Aufschluß darüber geben, ob die von uns klonierten env-Sequenzen aus jenen HIV-Genomen amplifiziert wurden, welche in der PBL-Kultur ursprünglich fusionsaktiv waren (s.o.). Der V3-loop des in unseren Experimenten verwendeten Kontrollvektors pSGenvdell (s. 2.4.2.1), welcher in den von uns verwendeten Zellkulturen (HeLaT4, HeLaT4/R5) die höchste Fusionskapazität aufweist, besitzt bei pH 7 eine Ladung von 7,83. Bei P127 und P134, welche, wie bereits gesagt, bei unserer Klonierung und der Arbeit von Blindt et al. sequenzidentisch sind, liegen die Werte bei 4,83 bzw. 5,18. Da P127 und P134 in der Arbeit von Blindt et al. eine Fusionsaktivität besaßen, auch wenn diese geringer war als bei ihrem Kontrollplasmid SVATGXbadel, können diese als SI-Isolate bezeichnet werden. Die übrigen unserer Konstrukte weisen mit Ausnahme von P168 allesamt Ladungswerte auf, welche höher liegen als die von P127, ein Umstand, der diese ebenfalls als ursprünglich fusionsaktiv identifiziert (vgl. 3.2.1). Das Isolat P168, welches ehemals dual-trope Eigenschaften besaß (s. Tab. 1 im Abschnitt 2.1.3), weist mit 3,83 einen deutlich niedrigeren Wert auf. Bei diesem kann daher nicht sicher gesagt werden, ob die von uns amplifizierte env-Sequenz diejenige ist, welche bei Adams et al. in der PBL-Kultur zur Ausbildung von Syncytien führte. Von vielen anderen Arbeitsgruppen ist gezeigt worden, dass der Phänotyp eines HIV-Isolats in der Zellkultur mit dem chemischen Charakter der Aminosäuren an bestimmten Positionen des V3-loops in

---

Zusammenhang steht (insbesondere den Positionen 11, 24, 25 und 32) (40, 41, 102, 103). Es zeigte sich jedoch auch, dass bisher keine einzelnen Aminosäuren identifiziert werden konnten, welche die Fusionskapazität oder den Zelltropismus eines HIV-Isolats bestimmen (14). Daher kann eine Analyse der V3-loop-Sequenz (s. Tab. 6 in 3.2.1) auch keinen Aufschluß darüber liefern, welchen Phänotyp die von uns klonierte env-Sequenz des Isolats P168 ursprünglich in der PBL-Kultur aufwies. Bei P168 kommt überdies hinzu, dass die env-Sequenz in diesem Fall in zwei verschiedenen Fragmenten amplifiziert wurde (vgl. 3.1.2 und 2.2.1). Auf Grund der Tatsache, dass in der hierfür verwendeten PBL-Kultur, wie oben dargestellt, potentiell mehrere HIV-Genome vorlagen, führt dies zu der Situation, dass möglicherweise durch diese Methodik die beiden env-Fragmente unterschiedlichen HIV-Genomen entstammen. In einem solchen Hybridplasmid könnte der eine env-Teil theoretisch einem SI- und der andere einem NSI-Isolat entstammen. Dies kann durchaus Konsequenzen auf den Phänotyp von P168 haben. Dessen V3-loop liegt zwar in unserer Klonierung vollständig in einem der beiden Fragmente (Fragment 2, vgl. 2.2.1). Der Vergleich unserer Ergebnisse mit der Arbeit von Blindt et al. zeigt jedoch, dass dieser die Fusionskapazität eines HIV-Isolats nur mitbestimmt und angenommen werden muss, dass diese auch von anderen Sequenzen innerhalb von env beeinflusst wird.

Es ist weiterhin zu bedenken, dass der Verlust der Fusionskapazität der meisten der in der vorliegenden Arbeit klonierten env-Expressionsvektoren (bis auf P134) für sich alleine genommen nichts über die Ursache dieses Phänotyps aussagt. Hierbei ist festzuhalten, dass, anders als bei der ursprünglich von Adams et al. durchgeführten Anzucht der HIV-Isolate, beim Versuchsansatz der vorliegenden Arbeit die HeLa-Zellen das env-Gen direkt durch Transfektion erhalten. Im Rahmen der in (3) durchgeführten Kokultivierung der HIV-Ausgangsisolate (s. 2.1) wurden diese damals als vollständige Viruspartikel mit dem zellfreien Kulturüberstand auf HeLaT4-Zellen übertragen. Somit müssen diese in diesem System erst in die HeLa-Zellen eindringen und sich hierin replizieren, bevor sie ihren CPE ausbilden können. Dass dies gelang, wurde von den Autoren zwar gezeigt, über die Effektivität dieses Prozesses ist hier aber keine Aussage möglich. In unseren Experimenten wird die env-Sequenz mittels nicht-liposomaler Transfektionsreagenzien quasi am HIV-Rezeptor vorbei, direkt in die HeLa-Zelle transfiziert, und anschließend die Effizienz dieses Prozesses durch Messung der Luciferaseaktivität bestimmt (vgl. 2.2.4.3, 2.2.4.4 und 3.3). Neben dem Umstand, dass in der vorliegenden Arbeit die env-Sequenz unabhängig vom restlichen HIV-Genom untersucht wird, kann auf diese Weise in unserem Versuchsaufbau die Funktionalität des Env zuverlässiger analysiert werden. Bei P134 kann man durch die gering vorhandene Fusionsaktivität sagen, dass bei diesem Isolat das Env in der HeLa-Zelle exprimiert und prozessiert wird, sowie anschließend als fusionsaktives integrales

---

Membranprotein auf der Zelloberfläche erscheint. Bei den übrigen Isolaten, welche gar keine Fusogenität mehr besitzen, ist die Frage zu klären, ob die Ursache für das Ausbleiben der Syncytienbildung in der Proteinprozessierung des Env liegt, sodass dieses die Zellmembran gar nicht erreicht, oder ob sich das in der Membran befindliche Env bezüglich seiner Proteinstruktur so verändert hat, dass es seiner Funktionalität an diesem Ort nicht mehr nachkommen kann. Um dies herauszufinden, wurden Proteinnachweise des Env aus den HeLa-Zellkulturen durchgeführt (s. 3.4), mittels derer gezeigt wurde, dass bei den Wildtypklonen gp160 intrazellulär vorhanden ist (RIPA, IFT), und an Membranen gebunden vorliegt (Western-Blot). Damit ist gezeigt, dass die env-Wildtypen im ER translatiert werden, und es kann ausgeschlossen werden, dass Basenaustausche im Bereich der Rev-bindenden-Domäne (RRE, vgl. 1.2) zu einem Ausbleiben der Proteinexpression geführt haben. Lediglich bezüglich des Isolats P153 gelang kein zweifelsfreier Nachweis von Glykoprotein (vgl. 3.4). Überdies zeigt das Vorhandensein der Env-Spaltstelle in der Aminosäuresequenz aller hergestellten env-exprimierenden Vektoren unserer Arbeit (s. Tab. 8), dass das Vorläuferglykoprotein gp160 intrazellulär gespalten werden kann. Mutationen im REKR-Motiv hätten nämlich eine Ursache für das Ausbleiben des CPE in der Zellkultur sein können, indem mangels Spaltung keine regelrechte Prozessierung des Glykoproteins in der HeLa-Zelle stattfindet. Ein Nachweis von gp120 im zell- und mikrovesikelfreien Kulturüberstand gelang bei den Isolaten P168, P127 und P420. Diese Proteinfraction stellt die extrazelluläre Domäne des Glykoproteins dar, welche an der Zelloberfläche vom gp41 dissoziiert ist. Der Nachweis dieses „Env-sheddings“ (12) zeigt, dass das Glykoprotein bei den genannten Isolaten zumindest die Zellmembran erreicht, ein Prozess, welcher bei HIV per se unökonomisch abläuft (42, 47, 149). Offen bleibt, ob dieser Sheddingprozess bei den klonierten env-Wildsequenzen evtl. in quantitativ so großen Mengen abläuft, dass dies die Funktionalität des Env negativ beeinflusst. Insbesondere könnte dies beim Isolat P168 der Fall sein, bei welchem der extrazelluläre gp120-Nachweis besonders stark ausfällt (vgl. Abb. 39 in 3.4). Eine weitere Möglichkeit für das Ausbleiben von Syncytien ist der Einbau von HIV-Glykoprotein in Mikrovesikel und dessen Abtransport aus der infizierten bzw. transfizierten HeLa-Zelle. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass sich im zell- und mikrovesikelfreien ZKÜ von P230/5 kein HIV-Glykoprotein nachweisen lässt (vgl. 3.4 und Abb. 39). Letztlich ist zu klären, welcher Faktor im Gefüge von intrazellulärer Env-Proteinprozessierung (einschließlich Mikrovesikeltransport), Env-Shedding und veränderter Raumstruktur des Glykoproteins dem Verlust bzw. der starken Reduktion (P134) der Fusionskapazität der Env-Wildtypen in der HeLaT4- bzw. HeLaT4/R5-Zellkultur zu Grunde liegt, oder ob evtl. eine Interaktion dieser drei Faktoren hierfür verantwortlich ist.

---

## 4.2 Methodischer Ansatz

Unter methodischen Gesichtspunkten war die Hauptproblematik der vorliegenden Doktorarbeit die Etablierung eines PCR-Protokolls, welches dazu geeignet ist, HIV-1-env-Wildsequenzen in einer Länge von 2400 Nukleotiden zu amplifizieren. Hierbei waren diverse Probleme zu lösen, welche sich insbesondere in ihrer Summation negativ auf das Amplifikationsergebnis auswirken:

- 1) Die Länge des amplifizierten Bereichs (die genaue Länge ist abhängig vom jeweiligen HIV-Isolat, vgl. 2.2.1), welche besondere Leistungsanforderungen an die verwendeten Enzymsysteme stellt.
- 2) Die unterschiedliche Affinität der PCR-Primer zu den HIV-Wildtypsequenzen. Es mußten Primer gefunden werden, welche dem Spektrum der HIV-Nukleotidsequenzen Rechnung tragen.
- 3) Das Vorliegen von unbekanntem Primer-Anlagerungsstellen, welche sich aus der Variabilität der Nukleotid-Wildsequenz ergeben. Diese führen zur Amplifikation von kürzeren DNA-Fragmenten als gewollt.
- 4) Das unterschiedliche Verhalten der Wildtyp-Nukleotidsequenzen bei PCR-Denaturierungsschritten (unterschiedlich viele Wasserstoffbrücken etc.). Bei der Amplifikation von HIV-RNA ist nach einer unspezifischen RNA-Extraktion (s. Abschnitt 2.2.3.1) eine Reverse Transkription der Ziel-RNA in cDNA erforderlich, bevor eine PCR erfolgen kann. Hieraus ergeben sich weitere Schwierigkeiten:
- 5) Das Vorliegen von RNA-Sekundärstrukturen („hairpin structures“), insbesondere bei der o. g. RNA-Länge, welche eine Anlagerung des Primers bei der RT erschweren.
- 6) Die RNA-Degradierung durch RNasen.
- 7) Die unterschiedlich große Menge von HIV-RNA im untersuchten Ausgangsmaterial (Seren oder Liquores mit unterschiedlicher Viruslast).
- 8) Darüber hinaus ist die sequentielle Abfolge von RNA-Extraktion, RT und PCR per se schon kritisch, weil es auf jeder Stufe dieser Prozedur zu einem quantitativen Verlust von DNA- oder RNA- Molekülen kommt. So ist z.B. die Menge an gewonnener cDNA nach der RT naturgemäß geringer als die Menge ursprünglich vorhandener HIV-RNA. Dies kann sich insbesondere dann als Problem erweisen, wenn die anfänglich vorhandene HIV-RNA-Menge gering ist. Ausserdem ist die Abfolge dieser drei Reaktionen nur so gut wie das schwächste Glied in ihrer Kette: wenn z.B. die RT, welche vom 3'-Ende der RNA in Richtung 5' abläuft, vorzeitig abbricht, hat der 5'-Primer bei der PCR keine Bindungsstelle mehr.

Voraussetzung für die Lösung dieser Probleme ist ein leistungsfähiges PCR-Protokoll, welches anhand des subgenomischen HIV-1-Plasmids pNLA1nef etabliert wurde (vgl. 2.2.1). Unabhängig davon, ob DNA oder RNA untersucht wurde, war es notwendig, in zahlreichen Versuchen die Amplifikationsprotokolle so einzustellen, das die Amplifikation der HIV-env-Sequenz gelingt. Hierfür wurde auf verschiedenen methodischen Ebenen angesetzt: 1)

---

Verwendung verschiedener Reverser Transkriptasen und DNA-Polymerasen, sowohl in unterschiedlichen Kombinationen mit einander als auch in jeweils verschiedenen Mengen. 2) Hohe Reaktionstemperaturen bzw. lange Denaturierungszeiten in RT und PCR zur Denaturierung von RNA- und DNA-Sekundärstrukturen (Voraussetzung: Thermostabilität der Enzymsysteme). 3) Zusatz von Reagenzien, die Sekundärstrukturen auflösen: DMSO (46), Betain. Dies ist besonders in GC-reichen RNA-Sequenzen hilfreich, weil sich hier Sekundärstrukturen in Form von Wasserstoffbrücken besonders gut ausbilden können. 4) Verwendung von RNase-Inhibitoren (rRNasin<sup>®</sup> RNase Inhibitor, US Pat. No. 5.552,302, Promega). 5) Inaktivierung der RT-Reaktionsreagenzien nach der RT durch Erhitzen für störungsfreie PCR. 6) Variation der Primersequenz in RT und PCR. 7) Amplifikation der env-Zielsequenz in zwei verschiedenen Teilfragmenten. Wie in 2.2.1 beschrieben, wurden alle Bestandteile der PCR-Reaktionslösung für sich alleine und in ihrer Kombination miteinander variiert, sowie mit den Amplifikationsparameter experimentiert, um optimale Amplifikationsergebnisse zu gewährleisten.

Das in der vorliegenden Arbeit aufgebaute Klonierungssystem, welches die Konstruktion eines neuen Expressionsplasmids einschließt, ist in 2.2.4.1 und 2.4.2.1 beschrieben. Es soll als Schwierigkeit im Umgang mit HIV-Wildtypen erwähnt werden, dass das Vorliegen von zusätzlichen unbekanntem Restriktionschnittstellen in der amplifizierten Wildsequenz eine Klonierung von env-Amplifikaten erschwerte (P134) und zum Teil unmöglich machte (P402, vgl. 3.1.2). Bei den Proteinnachweisen des Env unterschiedlicher HIV-Wildisolate und deren Vergleich mit einander ist zu beachten, dass hierfür nicht nur die absolute Menge an Protein, sondern auch die Affinität der verwendeten meist monoklonalen Antikörper (AK) zum jeweiligen Epitop von Bedeutung ist. Weil diese Affinität bei jedem Wildisolat unterschiedlich ist, ist oft keine Aussage darüber möglich, ob ein starker Nachweis von Env auf eine große Proteinmenge oder eine hohe Affinität des Antikörpers zu seinem Epitop zurückzuführen ist. Überhaupt ist bei jenen Proteinnachweisen, welche sich monoklonaler Antikörper zur Detektion des Env bedienen, zu beachten, dass diese auf Grund der Variabilität der Wildtypglykoproteine nicht bei allen HIV-1-Isolaten an ihre entsprechenden Epitope binden können. Ein negativer Proteinnachweis bedeutet daher nicht unbedingt, dass kein Wildtyp-Env vorhanden ist. Eine Lösung dieses Problems gelang teilweise durch die Verwendung polyklonaler Antikörper.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Fusionskapazität nahezu des gesamten Env von HIV-Wildisolaten in Korezeptor-exprimierenden HeLa-Zellkulturen zu untersuchen, und sie hierbei mit dem in HeLa-Zellen fusionsaktiven Glykoprotein des Laborstamms pNL4-3 zu vergleichen. Es wurde ein PCR-Protokoll erarbeitet, mit dem das env in einer Länge von ca. 2400 Nukleotiden amplifizieren werden kann, was seiner gesamten Länge bis auf ein kurzes Stück des gp41-C-Terminus entspricht. Hiermit wurden die env-Sequenzen von HIV-Wildisolaten amplifiziert, welche proviral integriert in peripheren Blutlymphozyten (PBLs) vorlagen. Diese HIV-Wildtypen waren in einer vorausgehenden Studie aus infizierten Patienten der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf isoliert, in PBLs angezüchtet und ihr Zelltropismus durch Übertragung der HIV-Partikel mit dem zellfreien Kulturüberstand auf verschiedene Zellkulturen analysiert worden. Hierbei zeigten die Wildisolate in der PBL-Kultur eine Fusionsaktivität, welche nach ihrer Inokulation auf HeLa-T4-Zellen trotz nachgewiesener HIV-Replikation nicht mehr nachweisbar war. Die Fragestellung der vorliegenden Studie war, ob es innerhalb des untersuchten env-Bereichs Unterschiede zwischen pNL4-3 und den Wildisolaten gibt, welche den Phänotyp von HIV-Isolaten in HeLa-Zellen bestimmen, und somit für das Ausbleiben der Syncytienbildung der Wildtypen in HeLaT4-Zellen verantwortlich sind. Es wurde in der vorliegenden Arbeit ein Expressionsplasmid (pSGenvdel11BbsI) konstruiert, in welches die env-Amplifikate hineinkloniert wurden. Unter der Kontrolle eines SV40-Promotors exprimiert dieser Vektor das Env als einziges HIV-Protein, um den Einfluß weiterer HIV-Sequenzen auszuschließen. Durch transiente Transfektion auf der Grundlage nicht-liposomaler Reagenzien wurden die Konstrukte in HeLaT4- (CD4+, CXCR4+) und HeLa-T4/R5-Zellen (CD4+,CXCR4+,CCR5+) eingeschleußt, die Proteinexpression durch Kotransfektion eines Rev-exprimierenden Vektor ermöglicht, und die Transfektionseffektivität mit Hilfe eines ebenfalls kotransfizierten Luciferase-Assays kontrolliert. Das Auftreten von Syncytien wurde mit Lichtmikroskopie analysiert, und die nachweisbaren Proteinmengen im Zellkulturextrakt und Zellkulturüberstand mittels RIPA, Western-Blot und Immunfluoreszenz (IFT) detektiert.

Von den sieben HIV-1-env-Wildtypesequenzen, deren Klonierung gelang, zeigt keine einzige nach Transfektion in HeLaT4- oder HeLaT4/R5-Zellen eine ähnlich starke Fusionskapazität wie pNL4-3, obwohl sie ursprünglich allesamt in der PBL-Kultur zur Ausbildung von Riesenzellen führten und Analysen zur Gesamtladung der V3-loop-Wildsequenzen diese mit Ausnahme des Isolats P168 als (in PBLs) Syncytien-induzierend identifizieren. Sechs der sieben Isolate führen zu überhaupt keinen Syncytien, während das Isolat P134 eine gewisse Fusogenität aufweist,

---

welche jedoch von der des Laborstamms pNL4-3 weit übertroffen wird. Mittels RIPA, IFT und Western-Blot konnte bei den Wildtypklonen, mit Ausnahme des Isolats P153, eine intrazelluläre gp160-Expression nachgewiesen werden. Eine Analyse der Nukleotidsequenzen (Sequenzierung) ergab darüber hinaus eine Konservierung der gp160-Spaltstellen, womit als Ursache für die Nicht-Fusogenität eine Mutation der proteolytischen Spaltstelle ausgeschlossen wurde. Die gering vorhandene Fusionsaktivität des Isolats P134 sowie der Nachweis von gp120 im Zellkulturüberstand der Isolate P168, P127 und P420 weist nach, dass das HIV-Glykoprotein die Zellmembran erreicht.

Durch diese Ergebnisse kann die o. g. Fragestellung bejaht werden: Innerhalb der env-Sequenz, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, gibt es Unterschiede zwischen dem adaptierten Laborstamm pNL4-3 und den HIV-Wildisolate, welche zu einem unterschiedlichen Phänotyp der HIV-Glykoproteine in HeLa-T4- und HeLaT4/R5-Zellen führen. Die Eigenschaft des Env des HIV-Laborisolats pNL4-3, in HeLa-T4- oder HeLa-T4/R5-Zellen Syncytien als Zeichen seines CPE auszubilden, stellt offenbar eine Besonderheit dieses Isolats dar, welche die Mehrzahl der untersuchten HIV-Wildtyp-env-Sequenzen nicht aufweisen. Voruntersuchungen anderer Arbeitsgruppen zum Einfluß des V3-loops auf die Fusionskapazität von HIV-1, welche mit einem Teil der gleichen HIV-Wildisolate in einem leicht veränderten Plasmidkontext durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass dieser unterschiedliche Phänotyp nicht ausschließlich durch die V3-loop-Wildsequenzen erklärbar ist. Innerhalb des klonierten env-Bereichs muss es weitere Unterschiede zwischen pNL4-3 und den Wildisolaten geben, welche die Fusogenität mitbestimmen. Ebenfalls aus früheren Studien mit den gleichen Env-Wildtypen gibt es Hinweise darauf, dass die Region um die gp160-Spaltstelle hieran nicht beteiligt ist. Betrachtet man die Eigenschaft der Membranfusion nur als ein Charakteristikum unter vielen anderen im Lebenszyklus des HIV, kann man genereller feststellen, dass Aussagen über das HIV, welche anhand des Isolats pNL4-3 gewonnen werden, nur bedingt auf andere HIV-Isolate übertragbar sind. Die HIV-Forschung steht vor dem Dilemma, dass ihre in-vitro gewonnenen Erkenntnisse über einzelne HIV-Isolate evtl. nur wenig darüber aussagen, was sich tatsächlich im infizierten Patienten abspielt.

Das zusätzlich zur Hauptfragestellung gesteckte Ziel, das env unbekannter HIV-Quasispezies aus RNA-Proben (Serum oder Liquor) zu amplifizieren, und sie im Anschluß daran ebenfalls zu klonieren, wurde trotz zahlreicher Versuchansätze nicht erreicht.

## 6 Literatur

### Reference List

1. **Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M. A. Martin.** 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59**:284-291.
2. Adams, O. Funktion und zellulärer Transport des HIV-1 Glykoproteins. 2001. Ref Type: Thesis/Dissertation
3. **Adams, O., H. Schaal, and A. Scheid.** 2000. Natural Variation in the Amino Acid Sequence around the HIV Type 1 Glycoprotein 160 Cleavage Site and Its Effect on Cleavability, Subunit Association, and Membrane Fusion. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**:1235-1245.
4. **Alam, J. and J. L. Cook.** 1990. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* **188**:245-254.
5. **Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-1958.
6. **Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., R. C. 2. Sowder, R. E. Benveniste, D. L. Mann, J. C. Chermann, and L. E. Henderson.** 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines [see comments]. *Science* **258**:1935-1938.
7. **Asjo, B., L. Morfeldt-Manson, J. Albert, G. Biberfeld, A. Karlsson, K. Lidman, and E. M. Fenyo.** 1986. Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* **2**:660-662.
8. **Barre Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler Blin, F. Vezinet Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
9. **Bernstein, H. B. and R. W. Compans.** 1992. Sulfation of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* **66**:6953-6959.
10. **Bernstein, H. B., S. P. Tucker, S. R. Kar, S. A. McPherson, D. T. McPherson, J. W. Dubay, J. Lebowitz, R. W. Compans, and E. Hunter.** 1995. Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41. *J. Virol.* **69**:2745-2750.
11. **Berson, J. F., D. Long, B. J. Doranz, J. Rucker, F. R. Jirik, and R. W. Doms.** 1996. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol.* **70**:6288-6295.

12. **Bird, C., P. A. Gleeson, A. Ramsay, P. Li, and J. McCluskey.** 1992. Stable expression of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in transfected L cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:1999-2009.
13. **Blacklow, S. C., M. Lu, and P. S. Kim.** 1995. A trimeric subdomain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Biochemistry* **34**:14955-14962.
14. **Blindt, R.** 1998. Untersuchung zur Rolle des V3-Loops des HIV-1-Glykoproteins als Pathogenitätsdeterminante. Dissertationsarbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie.
15. **Boom, R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen, and N. J. van der.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**:495-503.
16. **Bosch, V. and M. Pawlita.** 1990. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 env gene product proteolytic cleavage site. *J. Virol.* **64**:2337-2344.
17. **Brand, D., K. Srinivasan, and J. Sodroski.** 1995. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 entry in the CDR2 loop of the CD4 glycoprotein. *J. Virol.* **69**:166-171.
18. **Bultmann, A., W. Muranyi, B. Seed, and J. Haas.** 2001. Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that inhibit cell surface expression. *J. Virol.* **75**:5263-5276.
19. **Cairns, J. S. and M. P. D'Souza.** 1998. Chemokines and HIV-1 second receptors: the therapeutic connection. *Nat. Med.* **4**:563-568.
20. **Capon, D. J. and R. H. Ward.** 1991. The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:649-78:649-678.
21. **Chambers, P., C. R. Pringle, and A. J. Easton.** 1990. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **71**:3075-3080.
22. **Cheng-Mayer, C., D. Seto, M. Tateno, and J. A. Levy.** 1988. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* **240**:80-82.
23. **Chesebro, B., K. Wehrly, J. Nishio, and S. Perryman.** 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.
24. **Chiu, I. M., A. Yaniv, J. E. Dahlberg, A. Gazit, S. F. Skuntz, S. R. Tronick, and S. A. Aaronson.** 1985. Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature* **317**:366-368.
25. **Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski.** 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**:1135-1148.

26. **Clavel, F., D. Guetard, F. Brun Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343-346.
27. **Clements, G. J., M. J. Price-Jones, P. E. Stephens, C. Sutton, T. F. Schulz, P. R. Clapham, J. A. McKeating, M. O. McClure, S. Thomson, and M. Marsh.** 1991. The V3 loops of the HIV-1 and HIV-2 surface glycoproteins contain proteolytic cleavage sites: a possible function in viral fusion? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**:3-16.
28. **Coffin, J. M.** 1979. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J. Gen. Virol.* **42**:1-26.
29. **Coffin, J. M.** 1990. Genetic variation in Retroviruses, p. 11-33. *In* E. Kurstak , R. G. Marusyk , F. A. Murphy , and M. H. V. V. Regenmortel (eds.), *Applied virology research*.
30. **Coffin, J. M., S. H. Hughes, and H. E. Varmus.** 1997. *Retroviruses*.
31. **Cohen, E. A., G. Dehni, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* **64**:3097-3099.
32. **Cosson, P.** 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J.* **15**:5783-5788.
33. **Cullen, B. R.** 1992. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol. Rev.* **56**:375-394.
34. **Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-767.
35. **Dayton, A. I., J. G. Sodroski, C. A. Rosen, W. C. Goh, and W. A. Haseltine.** 1986. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**:941-947.
36. **de Jong, J. J., J. Goudsmit, W. Keulen, B. Klaver, W. Krone, M. Tersmette, and A. de Ronde.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J. Virol.* **66**:757-765.
37. **Decroly, E., S. Benjannet, D. Savaria, and N. G. Seidah.** 1997. Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *FEBS Lett.* **405**:68-72.
38. **Delwart, E. L., G. Mosialos, and T. Gilmore.** 1990. Retroviral envelope glycoproteins contain a "leucine zipper"-like repeat [comment]. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**:703-706.
39. **Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R.**

- 
- Littman, and N. R. Landau.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 [see comments]. *Nature* **381**:661-666.
40. **Distler, O., P. W. McQueen, M. L. Tsang, C. Byrne, B. A. Neilan, L. Evans, R. Penny, D. A. Cooper, and S. F. Delaney.** 1995. Characterization of the V3 region of HIV-1 isolates from Sydney, Australia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**:423-425.
41. **Distler, O., P. W. McQueen, M. L. Tsang, L. A. Evans, L. Hurren, C. Byrne, R. Penny, D. A. Cooper, and S. F. Delaney.** 1995. Primary structure of the V3 region of gp120 from sequential human immunodeficiency virus type 1 isolates obtained from patients from the time of seroconversion. *J. Infect. Dis.* **172**:1384-1387.
42. **Doms, R. W., R. A. Lamb, J. K. Rose, and A. Helenius.** 1993. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193**:545-562.
43. **Dorfman, T., F. Mammano, W. A. Haseltine, and H. G. Gottlinger.** 1994. Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **68**:1689-1696.
44. **Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton.** 1996. HIV-1 entry into CD4<sup>+</sup> cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5 [see comments]. *Nature* **381**:667-673.
45. **Dubay, J. W., S. R. Dubay, H. J. Shin, and E. Hunter.** 1995. Analysis of the cleavage site of the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein: requirement of precursor cleavage for glycoprotein incorporation. *J. Virol.* **69**:4675-4682.
46. **Dutton, C. M., C. Paynton, and S. S. Sommer.** 1993. General-Method for Amplifying Regions of Very High G-Plus-C Content. *Nucl. Acids. Res.* **21**:2953-2954.
47. **Earl, P. L., B. Moss, and R. W. Doms.** 1991. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **65**:2047-2055.
48. **Facke, M., A. Janetzko, R. L. Shoeman, and H. G. Krausslich.** 1993. A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **67**:4972-4980.
49. **Favaro, J. P. and S. J. Arrigo.** 1997. Characterization of Rev function using subgenomic and genomic constructs in T and COS cells. *Virology* **228**:29-38.
50. **Felber, B. K., M. Hadzopoulou Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland, and G. N. Pavlakis.** 1989. rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:1495-1499.
51. **Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven- transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* **272**:872-877.

- 
52. **Fenouillet, E. and I. M. Jones.** 1995. The glycosylation of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein (gp41) is important for the efficient intracellular transport of the envelope precursor gp160. *J. Gen. Virol.* **76**:1509-1514.
  53. **Fisher, A. G., M. B. Feinberg, S. F. Josephs, M. E. Harper, L. M. Marselle, G. Reyes, M. A. Gonda, A. Aldovini, C. Debouk, R. C. Gallo, and et al.** 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**:367-371.
  54. **Franke, E. K. and J. Luban.** 1995. Cyclophilin and gag in HIV-1 replication and pathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **374**.
  55. **Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions [see comments]. *Nature* **372**:359-362.
  56. **Freed, E. O., D. J. Myers, and R. Risser.** 1989. Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J. Virol.* **63**:4670-4675.
  57. **Gabuzda, D. H., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, T. Dorfman, W. A. Haseltine, and J. Sodroski.** 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* **66**:6489-6495.
  58. **Gabuzda, D. H., A. Lever, E. Terwilliger, and J. Sodroski.** 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* **66**:3306-3315.
  59. **Gallaher, W. R., J. M. Ball, R. F. Garry, M. C. Griffin, and R. C. Montelaro.** 1989. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses [see comments]. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**:431-440.
  60. **Garcia, J. V., J. Alfano, and A. D. Miller.** 1993. The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 Nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4. *J. Virol.* **67**:1511-1516.
  61. **Gardner, M. B., M. Endres, and P. A. Barry.** 1994. The simian retroviruses: SIV and SRV, p. 133-276. *The retroviridae*.
  62. **Gaynor, R. B.** 1995. Regulation of HIV-1 gene expression by the transactivator protein Tat. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **193**:(-).
  63. **Geyer, H., C. Holschbach, G. Hunsmann, and J. Schneider.** 1988. Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. *J. Biol. Chem.* **263**:11760-11767.
  64. **Gonda, M. A., F. Wong Staal, R. C. Gallo, J. E. Clements, O. Narayan, and R. V. Gilden.** 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* **227**:173-177.
  65. **Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon.** 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305**:1425-1431.

- 
66. **Goudsmit, J., C. Debouck, R. H. Melen, L. Smit, M. Bakker, D. M. Asher, A. V. Wolff, C. J. J. Gibbs, and D. C. Gajdusek.** 1988. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:4478-4482.
  67. **Groenink, M., A. C. Andeweg, R. A. Fouchier, S. Broersen, R. C. van der Jagt, H. Schuitemaker, R. E. de Goede, M. L. Bosch, H. G. Huisman, and M. Tersmette.** 1992. Phenotype-associated env gene variation among eight related human immunodeficiency virus type 1 clones: evidence for in vivo recombination and determinants of cytotropism outside the V3 domain. *J. Virol.* **66**:6175-6180.
  68. **Guo, H. G., F. M. Veronese, E. Tschachler, R. Pal, V. S. Kalyanaraman, R. C. Gallo, and M. S. Reitz, Jr.** 1990. Characterization of an HIV-1 point mutant blocked in envelope glycoprotein cleavage. *Virology* **174**:217-224.
  69. **Gurtler, L. G., P. H. Hauser, J. Eberle, A. von Brunn, S. Knapp, L. Zekeng, J. M. Tsague, and L. Kaptue.** 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.* **68**:1581-1585.
  70. **Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**:662-669.
  71. **Hallenberger, S., V. Bosch, H. Angliker, E. Shaw, H. D. Klenk, and W. Garten.** 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**:358-361.
  72. **Hallenberger, S., M. Moulard, M. Sordel, H. D. Klenk, and W. Garten.** 1997. The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J. Virol.* **71**:1036-1045.
  73. **Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman.** 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:7311-7315.
  74. **Helseth, E., U. Olshevsky, C. Furman, and J. Sodroski.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* **65**:2119-2123.
  75. **Hirsch, V. M., G. Myers, and P. R. Johnson.** 1993. Genetic diversity and phylogeny of primate lentiviruses, p. 221-240. *In* W. J. W. Morrow and N. L. Haigwood (eds.), HIV-molecular organization, pathogenicity and treatment.
  76. **Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-126.
  77. **Hoggan, M. D., R. L. Willey, K. Strebel, and M. A. Martin.** 1989. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **63**:1455-1459.

- 
78. **Holschbach, C., J. Schneider, and H. Geyer.** 1990. Glycosylation of the envelope glycoprotein gp130 of simian immunodeficiency virus from sooty mangabey (*Cercocebus atys*). *Biochem. J.* **267**:759-766.
  79. **Hosaka, M., M. Nagahama, W. S. Kim, T. Watanabe, K. Hatsuzawa, J. Ikemizu, K. Murakami, and K. Nakayama.** 1991. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **266**:12127-12130.
  80. **Houts, G. E., M. Miyagi, C. Ellis, D. Beard, and J. W. Beard.** 1979. Reverse-Transcriptase from Avian-Myeloblastosis Virus. *Journal of Virology* **29**:517-522.
  81. **Huet, T., R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants, and S. Wain Hobson.** 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1 [see comments]. *Nature* **345**:356-359.
  82. **Innis, M. A., D. H. Gelfand, and J. Sninsky.** 1990. PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California 92101.
  83. **Ivey-Hoyle, M., R. K. Clark, and M. Rosenberg.** 1991. The N-terminal 31 amino acids of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein gp120 contain a potential gp41 contact site. *J. Virol.* **65**:2682-2685.
  84. **Kido, H., A. Fukutomi, and N. Katunuma.** 1991. A novel membrane-bound serine esterase in human T4(+)-lymphocytes is a binding protein of envelope glycoprotein gp120 of HIV-1. *Biomed. Biochim. Acta* **50**:781-789.
  85. **Kjems, J. and P. A. Sharp.** 1993. The basic domain of Rev from human immunodeficiency virus type 1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *J. Virol.* **67**:4769-4776.
  86. **Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-768.
  87. **Koot, M., I. P. Keet, A. H. Vos, R. E. de Goede, M. T. Roos, R. A. Coutinho, F. Miedema, P. T. Schellekens, and M. Tersmette.** 1993. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS [see comments]. *Ann. Intern. Med.* **118**:681-688.
  88. **Kotov, A., J. Zhou, P. Flicker, and C. Aiken.** 1999. Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J. Virol.* **73**:8824-8830.
  89. **Kozarsky, K., M. Penman, L. Basiripour, W. Haseltine, J. Sodroski, and M. Krieger.** 1989. Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **2**:163-169.
  90. **Kwong, P. D., R. Wyatt, Q. J. Sattentau, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson.** Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus [In Process Citation]. *J. Virol.* 2000. Feb. ;74. (4. ):1961-72. **74**:1961-1972.

91. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
92. **Leonard, C. K., M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory.** 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **265**:10373-10382.
93. **Louwagie, J., W. Janssens, J. Mascola, L. Heyndrickx, P. Hegerich, G. Van der Groen, F. E. McCutchan, and D. S. Burke.** 1995. Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin. *J. Virol.* **69**:263-271.
94. **Lu, M., S. C. Blacklow, and P. S. Kim.** 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* **2**:1075-1082.
95. **Luban, J., K. L. Bossolt, E. K. Franke, G. V. Kalpana, and S. P. Goff.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73**:1067-1078.
96. **Luciw, P. A.** 1996. Human Immunodeficiency Viruses and their Replication, p. 1881-1952. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, and et al. (eds.), *Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia.
97. **Lusso, P., F. Cocchi, C. Balotta, P. D. Markham, A. Louie, P. Farci, R. Pal, R. C. Gallo, and M. S. Reitz, Jr.** 1995. Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J. Virol.* **69**:3712-3720.
98. **Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-348.
99. **Malim, M. H. and B. R. Cullen.** 1993. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol. Cell Biol.* **13**:6180-6189.
100. **Malim, M. H., J. Hauber, R. Fenrick, and B. R. Cullen.** 1988. Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* **335**:181-183.
101. **McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, and I. L. Weissman.** 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**:55-67.
102. **Milich, L., B. Margolin, and R. Swanstrom.** 1993. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J. Virol.* **67**:5623-5634.

103. **Milich, L., B. H. Margolin, and R. Swanstrom.** 1997. Patterns of amino acid variability in NSI-like and SI-like V3 sequences and a linked change in the CD4-binding domain of the HIV-1 Env protein. *Virology* **239**:108-118.
104. **Morikawa, Y., E. Barsov, and I. Jones.** 1993. Legitimate and illegitimate cleavage of human immunodeficiency virus glycoproteins by furin. *J. Virol.* **67**:3601-3604.
105. **Mulder, J., N. McKinney, C. Christopherson, J. Sninsky, L. Greenfield, and S. Kwok.** 1994. Rapid and Simple Pcr Assay for Quantitation of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Rna in Plasma - Application to Acute Retroviral Infection. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:292-300.
106. **Murakami, T., T. Hattori, and K. Takatsuki.** 1991. A principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 interacts with proteinase-like molecule(s) at the surface of Molt-4 clone 8 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1079**:279-284.
107. **Nakayama, K., T. Watanabe, T. Nakagawa, W. S. Kim, M. Nagahama, M. Hosaka, K. Hatsuzawa, K. Kondoh-Hashiba, and K. Murakami.** 1992. Consensus sequence for precursor processing at mono-arginyl sites. Evidence for the involvement of a Kex2-like endoprotease in precursor cleavages at both dibasic and mono-arginyl sites. *J. Biol. Chem.* **267**:16335-16340.
108. **Neumann, P., M. O'Shaughnessy, R. Remis, C. Tsoukas, D. Lepine, and M. Davis.** 1990. Laboratory evidence of active HIV-1 infection in Canadians with hemophilia associated with administration of heat-treated factor VIII. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **3**:278-281.
109. **Otteken, A., P. L. Earl, and B. Moss.** 1996. Folding, assembly, and intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein analyzed with monoclonal antibodies recognizing maturational intermediates. *J. Virol.* **70**:3407-3415.
110. **Otteken, A. and B. Moss.** 1996. Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin. *J. Biol. Chem.* **271**:97-103.
111. **Palker, T. J., M. E. Clark, A. J. Langlois, T. J. Matthews, K. J. Weinhold, R. R. Randall, D. P. Bolognesi, and B. F. Haynes.** 1988. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:1932-1936.
112. **Pandori, M. W., N. J. Fitch, H. M. Craig, D. D. Richman, C. A. Spina, and J. C. Guatelli.** 1996. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J. Virol.* **70**:4283-4290.
113. **Perez, L. G. and E. Hunter.** 1987. Mutations within the proteolytic cleavage site of the Rous sarcoma virus glycoprotein that block processing to gp85 and gp37. *J. Virol.* **61**:1609-1614.
114. **Pinter, A., W. J. Honnen, S. A. Tilley, C. Bona, H. Zaghoulani, M. K. Gorny, and S. Zolla-Pazner.** 1989. Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **63**:2674-2679.

- 
115. **Purcell, D. F. and M. A. Martin.** 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* **67**:6365-6378.
  116. **Putterman, D., R. B. Pepinsky, and V. M. Vogt.** 1990. Ubiquitin in avian leukosis virus particles. *Virology* **176**:633-637.
  117. **Rana, S., G. Besson, D. G. Cook, J. Rucker, R. J. Smyth, Y. Yi, J. D. Turner, H. H. Guo, J. G. Du, S. C. Peiper, E. Lavi, M. Samson, F. Libert, C. Liesnard, G. Vassart, R. W. Doms, M. Parmentier, and R. G. Collman.** 1997. Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation. *J. Virol.* **71**:3219-3227.
  118. **Robey, W. G., B. Safai, S. Oroszlan, L. O. Arthur, M. A. Gonda, R. C. Gallo, and P. J. Fischinger.** 1985. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV- III with sera from AIDS patients. *Science* **228**:593-595.
  119. **Rusche, J. R., K. Javaherian, C. McDanal, J. Petro, D. L. Lynn, R. Grimaila, A. Langlois, R. C. Gallo, L. O. Arthur, P. J. Fischinger, and et al.** 1988. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus- infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope, gp120 [published errata appear in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Nov;85(22):8697 and *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Mar; 86(5):1667]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:3198-3202.
  120. **Saag, M. S., B. H. Hahn, J. Gibbons, Y. Li, E. S. Parks, W. P. Parks, and G. M. Shaw.** 1988. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo. *Nature* **334**:440-444.
  121. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
  122. **Schawaller, M., G. E. Smith, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1989. Studies with crosslinking reagents on the oligomeric structure of the env glycoprotein of HIV. *Virology* **172**:367-369.
  123. **Schellekens, P. T., M. Tersmette, M. T. Roos, R. P. Keet, F. de Wolf, R. A. Coutinho, and F. Miedema.** 1992. Biphasic rate of CD4+ cell count decline during progression to AIDS correlates with HIV-1 phenotype [see comments]. *AIDS* **6**:665-669.
  124. **Schreiber, M., C. Wachsmuth, H. Muller, S. Odemuyiwa, H. Schmitz, S. Meyer, B. Meyer, and J. Schneider-Mergener.** 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.
  125. **Schubert, U., S. Bour, R. L. Willey, and K. Strebel.** 1999. Regulation of virus release by the macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 AD8 isolate is redundant and can be controlled by either Vpu or Env. *J. Virol.* **73**:887-896.

- 
126. **Schwartz, O., A. Dautry Varsat, B. Goud, V. Marechal, A. Subtil, J. M. Heard, and O. Danos.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces accumulation of CD4 in early endosomes. *J. Virol.* **69**:528-533.
  127. **Schwartz, O., V. Marechal, O. Danos, and J. M. Heard.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J. Virol.* **69**:4053-4059.
  128. **Seillier-Moiseiwitsch, F., B. H. Margolin, and R. Swanstrom.** 1994. Genetic variability of the human immunodeficiency virus: statistical and biological issues. *Annu. Rev. Genet.* **28**:559-96:559-596.
  129. **Speck, R. F., K. Wehrly, E. J. Platt, R. E. Atchison, I. F. Charo, D. Kabat, B. Chesebro, and M. A. Goldsmith.** 1997. Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J. Virol.* **71**:7136-7139.
  130. **Stamatatos, L. and C. Chengmayer.** 1993. Evidence That the Structural Conformation of Envelope Gp120 Affects Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Infectivity, Host-Range, and Syncytium-Forming Ability. *Journal of Virology* **67**:5635-5639.
  131. Steffen, C. Roche Applications Manual, Roche Molecular Biochemicals. 1999. 3-1-1902.  
Ref Type: Generic
  132. **Stein, B. S. and E. G. Engleman.** 1990. Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **265**:2640-2649.
  133. **Stein, B. S., S. D. Gowda, J. D. Lifson, R. C. Penhallow, K. G. Bensch, and E. G. Engleman.** 1987. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* **49**:659-668.
  134. **Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks, and M. A. Martin.** 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**:728-730.
  135. **Tersmette, M., G. R. de, B. J. Al, I. N. Winkel, R. A. Gruters, H. T. Cuypers, H. G. Huisman, and F. Miedema.** 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.
  136. **Tersmette, M., R. A. Gruters, W. F. de, G. R. de, J. M. Lange, P. T. Schellekens, J. Goudsmit, H. G. Huisman, and F. Miedema.** 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.
  137. **Tersmette, M., J. M. Lange, R. E. de Goede, F. de Wolf, J. K. Eeftink-Schattenkerk, P. T. Schellekens, R. A. Coutinho, J. G. Huisman, J. Goudsmit, and F. Miedema.** 1989. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* **1**:983-985.

- 
138. **Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski, and H. G. Gottlinger.** 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions [see comments]. *Nature* **372**:363-365.
  139. **Travis, B. M., T. I. Dykers, D. Hewgill, J. Ledbetter, T. T. Tsu, S. L. Hu, and J. B. Lewis.** 1992. Functional roles of the V3 hypervariable region of HIV-1 gp160 in the processing of gp160 and in the formation of syncytia in CD4+ cells. *Virology* **186**:313-317.
  140. **Trkola, A., T. Dragic, J. Arthos, J. M. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. J. Maddon, and J. P. Moore.** 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5 [see comments]. *Nature* **384**:184-187.
  141. **Uchiyama, T., J. Yodoi, K. Sagawa, K. Takatsuki, and H. Uchino.** 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**:481-492.
  142. **Vanden Haesevelde, M., J. L. Decourt, R. J. De Leys, B. Vanderborght, G. Van der Groen, H. van Heuverswijn, and E. Saman.** 1994. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J. Virol.* **68**:1586-1596.
  143. **Veronese, F. D., A. L. DeVico, T. D. Copeland, S. Oroszlan, R. C. Gallo, and M. G. Sarngadharan.** 1985. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* **229**:1402-1405.
  144. **von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken, and D. Trono.** 1993. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J. Virol.* **67**:4945-4955.
  145. **Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41 [see comments]. *Nature* **387**:426-430.
  146. **Welker, R., H. Kottler, H. R. Kalbitzer, and H. G. Krausslich.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* **219**:228-236.
  147. **WHO Network for HIV Isolation and Characterization.** 1994. HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:1327-1343.
  148. **Wild, C., J. W. Dubay, T. Greenwell, T. J. Baird, T. G. Oas, C. McDanal, E. Hunter, and T. Matthews.** 1994. Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:12676-12680.
  149. **Willey, R. L., J. S. Bonifacino, B. J. Potts, M. A. Martin, and R. D. Klausner.** 1988. Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:9580-9584.

- 
150. **Willey, R. L., T. Klimkait, D. M. Frucht, J. S. Bonifacino, and M. A. Martin.** 1991. Mutations within the human immunodeficiency virus type 1 gp160 envelope glycoprotein alter its intracellular transport and processing. *Virology* **184**:319-329.
  151. **Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* **66**:7193-7200.
  152. **Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* **66**:226-234.
  153. **Wu, L., N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski.** 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5 [see comments]. *Nature* **384**:179-183.
  154. **Yang, C. and R. W. Compans.** 1996. Palmitoylation of the murine leukemia virus envelope glycoprotein transmembrane subunits. *Virology* **221**:87-97.
  155. **Yoshida, M., I. Miyoshi, and Y. Hinuma.** 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**:2031-2035.
  156. **Yoshida, M., M. Seiki, K. Yamaguchi, and K. Takatsuki.** 1984. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**:2534-2537.

## 7 Lebenslauf

geboren:	29. Dezember 1977, Düsseldorf	
Familienstand:	verheiratet, eine Tochter	
Eltern:	Waltraud und Erich Grund (Beamte der Stadt Düsseldorf)	
Geschwister:	Martin Grund (Brandmeister der Stadt Düsseldorf) Florian Grund (Industriekaufmann)	
Schulbildung:	08 / 1984 – 07 / 1988	Kath. Grundschule Monheim
	08 / 1988 – 07 / 1994	Realschule Monheim
	08 / 1994 – 06 / 1997	Gymnasium Monheim
Hochschulbildung:	10 / 1997 - 09 / 1998	Universität zu Köln / Lehramtsstudium Geschichte und Philosophie / Latinum
	10 / 1998 – 11 / 2005	Universität Düsseldorf / Studium der Humanmedizin / Dissertation am Institut für Virologie der Universität Düsseldorf
Ärztliche Tätigkeit:	12 / 2005 – 11 / 2006	Assistenzarzt in der Inneren Medizin / St. Josef – Krankenhaus Monheim
	seit 12 / 2006	Wiss. Mitarbeiter am Institut für Virologie der Universitätsklinik Essen

## **8 Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn PD Dr. med Ortwin Adams für die Überlassung des interessanten Themas, sowie die nette und intensive Betreuung bedanken. Des weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern sowohl des Instituts für Virologie als auch des Instituts für medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf für die gute Zusammenarbeit. Den Drs. K. Köhrer und S. Scheuring im BMFZ (Biomedizinisches Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) danke ich für die Sequenzierung meiner HIV-1-env-Wildtypsequenzen. Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in allen Phasen der Dissertation besonders unterstützt hat.