

**Parallele und individuelle Evolution des Humanen Immuno-
defizienz Virus 1 Glykoprotein-Gens (env) nach klonaler
Infektion von fünf hämophilen Patienten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Ralf Kurz
aus Neuwied

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Professor Dr. med. B. Matz
2. Gutachter: Herr Professor Dr. med. J. Oldenburg

Tag der Mündlichen Prüfung: 29. September 2009

Aus dem Institut für Virologie des Universitätsklinikum Bonn der Rheinischen Friedrich-
Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Professor Dr. C. Drosten

Meinen lieben Eltern,
Svenja, Antje und Philipp

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	8-11
1 Einleitung	12-33
1.1 Allgemeines	12
1.2 Geschichte von HIV	12
1.3 Klassifizierung	13
1.4 Aufbau des HI-Virus	15
1.5 Genomstruktur des HIV	16
1.6 Infektionszyklus	18
1.7 <i>env</i> -Proteine	23
1.7.1 Aufbau, Struktur und Funktion von gp120	24
1.7.2 Aufbau, Struktur und Funktion von gp41	25
1.7.3 Assoziation von gp120 und gp41	26
1.8 Bedeutung der <i>env</i> -Glykoproteine für die HIV-Infektion und Immunantwort	27
1.9 Übertragung und Virusevolution	29
1.10 Klinik	30
1.11 Therapie	32
1.12 Fallbeschreibung	32
1.13 Aufgabenstellung	33
2 Material und Methoden	34-67
2.1 Chemikalien und sonstige Materialien	34
2.1.1 Chemikalien	34
2.1.2 Enzyme	35
2.1.3 Kits	35
2.1.4 Plasmid-Vektoren	35
2.1.5 Primer	35
2.1.6 Puffer	37
2.1.7 Lösungen	37
2.1.8 DNA-Längenstandard (Marker)	37
2.1.9 Nährmedien	37
2.1.10 Transformationskompetente Bakterien für die Klonierung	38
2.2 Geräte und Hilfsmittel	38
2.3 Computerprogramme	40
2.4 Patienten	40
2.5 DNA-Isolierung aus Blut (zelluläre und provirale DNA)	41
2.5.1 Prinzip	41
2.5.2 Reagenzien und Materialien	41
2.5.3 Durchführung	42

2.6	Polymerase-Kettenreaktion	43
2.6.1	Prinzip	43
2.6.2	Nested-PCR der <i>env</i> -Region mit Expand Long Template	46
2.6.3	Nested-PCR der <i>env</i> -Region mit HotStarTaq Polymerase	47
2.6.4	Semi-Nested-PCR der V1/V2-Region mit HotStarTaq Polymerase	49
2.7	Gel-Elektrophorese	50
2.7.1	Prinzip	50
2.7.2	Reagenzien und Materialien	51
2.7.3	Durchführung	51
2.8	PCR Purifikation	52
2.8.1	Prinzip	52
2.8.2	Reagenzien und Materialien	53
2.8.3	Durchführung	53
2.8.4	Gelbild	53
2.9	Kultivierung von Bakterien	54
2.9.1	Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedien	54
2.9.2	Kultivierung von Bakterien in Festmedien	55
2.9.3	Lagerung von Bakterien/Glycerinkulturen	55
2.10	DNA-Klonierung	55
2.10.1	Prinzip	56
2.10.2	Reagenzien und Materialien	58
2.10.3	Durchführung	58
2.11	Methoden zur Analyse und Aufbewahrung der Klonierungsprodukte	59
2.11.1	Anlegen einer Masterplatte	60
2.11.2	Kontroll V1/V2-PCR der gepickten Bakterienkolonien	60
2.11.3	Anlage von Flüssigkulturen	60
2.11.4	Plasmidpräparation	61
2.12	DNA-Sequenzierung	63
2.12.1	Prinzip	63
2.12.2	Reagenzien und Materialien	64
2.12.3	Durchführung der Sequenzierreaktion	65
2.12.4	DyeEx™ Aufreinigung der Proben der Sequenzierreaktion	66
2.13	Auswertung der Sequenzdaten	67
2.14	Klinische und virologische Daten der Patienten	67
2.14.1	Viruslast	67
2.14.2	CD4 T-Zellzahl	67
3	Ergebnisse	68-110
3.1	HIV-Sequenzierung und Vergleich der Konsensussequenz von 1990 mit der HIV-Sequenz der einzelnen Patienten um das Jahr 2000	68
3.1.1	Expand Long Template PCR des <i>env</i> -Gens	68
3.1.2	Sequenzierung und Alignment der Konsensussequenz des <i>env</i> -Gens von 1990 mit den Sequenzen der Patienten A, B, D, F, G aus dem Jahr 2000	69
3.1.3	Längenpolymorphismen und Punktmutationen im HIV-1 <i>env</i> -Gen	70
3.1.4	Genetische Distanz	81
3.1.5	N-Glykosylierungsstellen	83
3.1.6	Anzahl der geladenen Aminosäuren	89
3.1.7	Epitope	91
3.1.8	Wirtsfaktoren und virale Ko-Infektionen	92

3.2	Longitudinale Analyse der HIV-1 <i>env</i> V1/V2-Region	93
3.2.1	PCR des <i>env</i> -Gens	94
3.2.2	PCR der V1/V2-Region	96
3.2.3	Nukleinsäure-Alignment der V2-Region	97
3.2.4	Aminosäure-Alignment mit Markierung der Ladungen und potenziellen N-Glykosylierungsstellen	97
3.2.5	Längenvergleich und Beschreibung auffälliger Mutationen in V2	100
3.2.6	Ladungen	102
3.2.7	N-Glykosylierungsstellen	103
3.2.8	Genetische Distanz von V2	103
3.2.9	Diversität	107
3.3	Klinische und virologische Daten der Patienten	108
4.	<i>Diskussion</i>	111-122
5.	<i>Zusammenfassung</i>	123
6.	<i>Anhang</i>	124-140
7.	<i>Literaturverzeichnis</i>	141-162
	<i>Danksagung</i>	163
	<i>Lebenslauf</i>	164

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure (amino acid)
A. bidest	bidestilliertes Wasser
ABC	Abacavir (= NRTI)
ART	antiretrovirale Therapie
AZT	Zidovudin (= NRTI)
bp	Basenpaar, Basenpaare
CCR5	Chemokinrezeptor 5
CD	Cluster of differentiation: international standardisierte Nomenklatur für Antigene auf Zelloberflächen
CXCR4	Chemokinrezeptor 4
C1-5	konstante Bereiche 1 bis 5 der <i>env</i> -Sequenz
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
d4T	Stavudin (= NRTI)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>env</i>	Envelope = Hüllprotein von HIV-1
<i>gag</i>	„group specific antigen“ von HIV
gp160	Glykoprotein 160 von HIV-1
gp120	Glykoprotein 120 von HIV-1
gp41	Glykoprotein 41 von HIV-1
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
kb	Kilobasenpaare
LLP	„lentivirus lytic peptides“ = helikale Domänen in der zytoplasmatischen Domäne von gp41
LTNP	„long term non progressors“ (langzeitüberlebende HIV-Infizierte)
LTR	long terminal repeats am Anfang und Ende des HIV-Genoms
MIP1 α	„Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha“
mRNA	„messenger“ RNA (Boten-RNA für die Proteinsynthese)

nef	regulatorisches HIV-Protein
NFV	Nelfinavir (Proteaseinhibitor)
NNRTI	nicht-Nukleosidanalogen als Reverse Transcriptase Inhibitor
NRTI	Nukleosidanalogen als Reverse Transcriptase Inhibitor
NSI	nicht Synzytium induzierend
nt	Nukleotid
PBMC	Periphere Blut-Mononukleare-Zellen
PI	Protease Inhibitor
PM	Punktmutation
pol	„Polymerase“ von HIV
PPSB	Präparat aus Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (Faktor II – Prothrombin; Faktor VII – Prokonvertin; Faktor X - Stuart-Prower-Faktor ; Faktor IX - antihämophiler Faktor B) und anti-thrombotisch wirkenden Faktoren Protein C und Protein S sowie als Zusatz Antithrombin und Heparin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
p 6	Protein zur Förderung des Ausknospungsprozess von HIV aus T-Lymphozyten
p7	Protein zur Stabilisierung der HIV-RNA im Kern, Nukleokapsidprotein
p11	HIV-Proteaseprotein
p17	HIV-Matrixprotein
p24	HIV-Kapsidprotein
p32	HIV-Integrase
p51	HIV-Reverse Transcriptase (RT)
p66	HIV-RT mit RNaseH
RANTES	Zytokin der Interleukin 8 Superfamilie der Zytokine („Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted)
Ref.	Referenzsequenz
rev	regulatorisches HIV-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
R5	Chemokinrezeptor 5 (CCR5)
SQV	Saquinavir (PI)
SDS	„sodium dodecyl sulfate“

tat	regulatorisches HIV-Protein
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V1-5	variable Bereiche 1 bis 5 der <i>env</i> -Sequenz
vif	regulatorisches HIV-Protein
vpr	regulatorisches HIV-Protein
vpu	regulatorisches Protein in HIV-1
vpX	regulatorisches Protein in HIV-2
X4	Chemokinrezeptor 4, CXCR4
3TC	Lamivudin (NRTI)

Verzeichnis der internationalen Abkürzungen der Aminosäuren

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

E501R steht für einen Austausch von Glutaminsäure an Position 501 durch Arginin
N-160 steht für Asparagin an Position 160

Verzeichnis der Abkürzungen der Nucleobasen

A Adenin
C Cytosin
G Guanin
T Thymin

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen des Envelope-Gens des Humanen Immunodefizienz Virus 1 (HIV-1) über einen Zeitraum von ca. zehn Jahren nach der klonalen HIV-1 Infektion von fünf hämophilen Patienten untersucht. Diese Veränderungen wurden in Kontext zum klinischen Verlauf der HIV-1 Infektion in den Patienten gesetzt. Die V2-Region des Envelope-Gens von sechs klonal HIV-1 infizierten hämophilen Patienten wurde in allen vorhandenen Proben zwischen 1990 und um das Jahr 2000 untersucht, da die dort gefundenen Veränderungen vermutlich Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf haben. Zunächst folgt eine allgemeine Einführung zum HIV-1, der hier vorliegenden sehr seltenen klonalen HIV-1 Infektion und zur Aufgabenstellung.

1.1 Allgemeines

Der lateinische Terminus „Virus“ steht für „schleimige Aussonderung“ oder „Gift“. Nachdem 1892 Dmitri I. Iwanowski bereits zeigen konnte, dass es sich beim Erreger der Tabakmosaik-Krankheit um ein „ultrafiltrierbares“ (Bakterienfilter passierendes) Agens handeln muß, gelang 1898 Friedrich Loeffler und Paul Frosch der erste Nachweis eines tierpathogenen Virus, des Maul- und Klauenseuche-Virus. Von den damals bekannten Eigenschaften „ultrafiltrierbar“, „ultravisibel“ (nicht im Lichtmikroskop sichtbar) und „unzüchtbar“ (auf Bakteriennährböden), kommt man heute zu folgender Definition der Viren: Es handelt sich um infektiöse Einheiten mit Durchmessern von etwa 16 nm bis über 300 nm, sie weisen keine zelluläre Organisation auf, besitzen also keine Organellen wie Ribosomen und Mitochondrien, und damit keine Enzymsysteme zur Energiegewinnung und keinen proteinsynthetisierenden Apparat und sie vermehren sich obligat intrazellulär, indem sie den Syntheseapparat der Zelle nutzen, um aus ihrer genetischen Information neue Viruspartikel herzustellen.

1.2 Geschichte von HIV

Ende der 70er, Anfang der 80er Jahre traten in den USA bei vorher gesunden Personen Symptome einer immunologischen Dysfunktion auf. Dieses neue Syndrom war durch generalisierte Lymphadenopathien, opportunistische Infektionen und maligne Erkrankungen wie Non-Hodgkin Lymphome oder das seltene, zu den Angiosarkomen gehörende Kaposi-Sarkom gekennzeichnet [Friedman-Klein et al., 1981]. Als opportunistische Infektionen traten vor allem

die Pneumocystis Pneumonie [Gottlieb et al., 1981], aber auch die Toxoplasma gondii Encephalitis, die Zytomegalie-Virus-assoziierte Retinitis und die Kryptokokken-Meningitis auf. Aufmerksamkeit in der medizinischen Welt erregte erst eine Beschreibung der Centers of Disease Control im Juni 1981 über einen schweren Immundefekt bei fünf homosexuellen Männern in Kalifornien [Centers of Disease Control, 1981], die nicht zu den bekannten Risikogruppen mit verminderter Aktivität des Immunsystems (Patienten mit angeborenem Immundefekt, immunsuppressiver Therapie oder Neoplasien im terminalen Stadium) gehörten. Da es sich um einen erworbenen Immundefekt handelte wurden 1982 alle mit diesem Defekt assoziierten Krankheiten unter dem Namen AIDS (acquired immune deficiency syndrome) zusammengefasst. Etwa ein Jahr später konnte der Erreger dieser neuen Infektionskrankheit in Zellkulturen angezüchtet und untersucht werden [Barré-Sinoussi et al., 1983]. Im Zellüberstand konnte das Enzym „Reverse Transcriptase“ nachgewiesen werden, ebenso wie die Präferenz des Virus zur Zerstörung von CD4-Rezeptor exprimierenden Lymphozyten [Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984; Popovic et al., 1984]. Es handelte sich also um ein CD4 T-lymphotropes Retrovirus. Zuerst als LAV (lymphadenopathy associated virus) bzw. HTLV III (human T-cell leukaemia virus type III) bezeichnet, wurde es 1986 einheitlich als HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) [Coffin et al., 1986] und ein 1986 erstmals isolierter zweiter Typ, der damals auf Westafrika beschränkt war, als HIV-2 benannt [Clavel et al., 1986]. Die Geschichte des HIV begann allerdings schon viel früher, so wurde in alten Seren aus Kongo-Zaire von 1959 eine Variante des HIV-1 gefunden, die dem SIV (simian immunodeficiency virus) der Schimpansen stark ähnelt [Nahmias et al., 1986].

1.3 Klassifizierung

HIV verfügt über eine Reverse Transcriptase (RT) und wird daher der Familie der Retroviridae zugeordnet. Die RT ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die die genomische einzelsträngige RNA der Retroviridae in doppelsträngige DNA umschreibt, welche nun in ein Wirtszellgenom integriert werden kann. Charakteristisch für Retroviridae ist das Vorhandensein von zwei Molekülen linearer, einzelsträngiger RNA in Plusstrang-Polarität (entspricht der Polarität von Messenger-RNA) als Genom mit einer Größe von je 7 bis 11 kb, ein umhülltes Virion, ein sphärisches Nukleokapsid und ein Durchmesser von etwa 80 bis 100 nm.

Das HIV wird den komplexen Retroviren zugeordnet, da es neben den allen Retroviren gemeinsamen Genen wie *gag*, *pol* und *env* noch mehrere Gene für regulatorische Proteine besitzt.

Innerhalb der komplexen Retroviren gehört es aufgrund folgender Eigenschaften zum Genus Lentivirus (lat. lenti = langsam): [van Regenmortel et al., 2000]

- lange Latenzzeit bis zum Ausbruch einer langsam, aber unaufhörlich fortschreitenden Krankheit
- Virus Assembly (Zusammenbau) an der Zellmembran
- ein Genom von 9,3 kb Größe [Ratner et al., 1985; Wain-Hobson et al., 1985]
- direkte Affinität zu Zellen des zentralen Nervensystems und des Immunsystems
- Sequenzhomologie zu anderen Lentiviren
- geringe Antigenität
- ausgeprägte genetische Variabilität, v. a. im Bereich der Oberflächenantigene, wodurch sich das Virus der Immunabwehr entzieht
- Krankheitspenetranz und Letalität bis zu 100%

Innerhalb des Genus Lentivirus kann aufgrund von Unterschieden in den Genomsequenzen, den Antigeneigenschaften, in den natürlichen Wirten und in der Pathogenität zwischen fünf verschiedenen Spezies unterschieden werden. HIV gehört hier zur Spezies der „Primaten Lentivirus Gruppe“, für die die Verwendung eines Chemokinrezeptors und eines CD4-Proteins als Rezeptor zum Eindringen in die Wirtszelle charakteristisch ist. Zusätzlich kann HIV wegen einer Abweichung von über 50% in der Sequenz und wegen des Nachweises des vpx-Gens in HIV-2 an der Stelle des vpu-Gens in HIV-1 noch einmal in die beiden Typen HIV-1 und HIV-2 eingeteilt werden.

Bedingt durch die hohe Replikationsfähigkeit des HIV (10×10^9 Virionen/Tag) [Perelson et al., 1996] und die hohe Fehlerquote der Reversen Transcriptase hat HIV eine hohe Mutationsrate [Meyerhans et al., 1989], die es nötig machte HIV-1 in die Gruppen M (major), O (outlier) und N (non-M or O) zu unterscheiden. Von HIV-1 Gruppe M, die 95% der globalen Virusisolate umfasst, gibt es die Subtypen A bis K [aus „Klinischer Leitfaden HIV“, Gürtler, Rockstroh, 2000, der Firma Abbott; Louwagie et al., 1993] und von HIV-1 Gruppe O drei weitere Subtypen [Janssens et al., 1999]. Von HIV-2 gibt es die Subtypen A bis F [aus „Klinischer Leitfaden HIV“, Gürtler, Rockstroh, 2000, der Firma Abbott]. In Europa und Nordamerika ist der HIV-1 Subtyp B dominant, zu dem auch die untersuchten Sequenzen gehören [Kupfer et al., 2007].

HIV-1 Isolate haben eine extensive genetische Heterogenität [Benn et al., 1985]. In mit zeitlichem Abstand entnommenen Proben eines einzelnen Individuums zeigen sich signifikante Unterschiede in den Virusgenomen [Saag et al., 1988]. Zur Beschreibung der heterogenen und

wechselnden Population des Virus in einem HIV-1 infizierten Individuum wurde der Begriff Quasispezies eingeführt [Meyerhans et al., 1989]. Die Zahl der verschiedenen koexistierenden viralen Quasispezies in einem Patienten wird unter dem Begriff Diversität zusammengefaßt. Die genetische Distanz einer Sequenz zu ihrer Ursprungssequenz wird Divergenz genannt. Bestimmte biologische Eigenschaften können zur weiteren Differenzierung verschiedener HIV-1 Isolate herangezogen werden. Je nachdem welcher Ko-Rezeptor zum Eindringen in die Wirtszelle benutzt wird, spricht man von R5-Isolaten, d. h. Viren, die den Chemokinrezeptor CCR5 als Ko-Rezeptor benötigen oder X4-Isolaten, die den Chemokinrezeptor CXCR4 als Ko-Rezeptor verwenden [Berger et al., 1998]. Eine andere Unterteilung basiert auf der Eigenschaft einiger Viren, in Zellkulturen Synzytien zu induzieren, während andere HIV-1 Isolate diese Eigenschaft nicht besitzen. Diese ältere Klassifizierung von HIV-1 Stämmen ist weitgehend synonym zur Ko-Rezeptorpräferenz von HIV-1 [Björndal et al., 1997]. R5-Viren induzieren meist keine Synzytien und X4-Viren induzieren meistens Synzytien in MT-2-Zellen. Allerdings wurde gezeigt, dass alle HIV-Varianten Synzytien induzieren können, wenn die Zielzellen ausreichende Mengen des Rezeptors exprimieren [Lusso, 2000]. HIV-Stämme, die vor allem von Monozyten abstammende Makrophagen (MDM = monocyte-derived macrophages) befallen, wurden auch M-trope HIV-Stämme und solche, die T-Zellen befallen, T-Zell-Linien (T)-trope HIV-Stämme genannt.

1.4 Aufbau des HI-Virus

Das HI-Virus verfügt über eine Hülle, aus einer Lipiddoppelmembran mit 72 Trimeren eines Oberflächenproteins, dem gp120 (Glykoprotein mit 120 kilodalton Molekulargewicht), und 72 Trimeren eines Transmembranproteins (gp41). Trimere von gp120 bilden die „Knöpfe“ an der Oberfläche des HIV. Gp120 und gp41 sind innerhalb der Trimere über hydrophil-hydrophobe Wechselwirkungen nicht-kovalent verbunden ebenso wie gp120 mit gp41. Innen an die Lipiddoppelmembran anliegend bilden ca. 1000 Moleküle des Matrixproteins p17 eine Auskleidung der Virushülle. Von der Matrix umschlossen bilden ca. 2000 p24-Moleküle das je nach Schnitt- richtung im transmissionselektronenmikroskopischen Bild kegel-, stab- oder ringförmig erscheinende Kapsid [Earl et al., 1990; Gelderblom et al., 1989]. Zwischen Matrixmembran und Kapsid liegt die virale Protease (PR, p11). Das Kapsid umgibt zwei RNA-Moleküle mit Plusstrang-Polarität und die viralen Enzyme Reverse Transkriptase mit RNase H und Integrase.

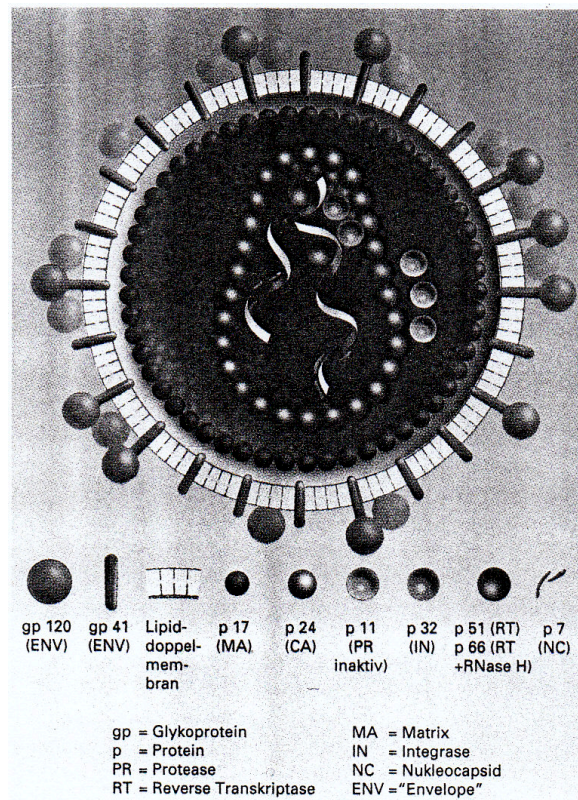


Abb. 1: Schematischer Querschnitt durch einen HIV-Partikel. (Quelle: Gürtler und Rockstroh. „Klinischer Leitfaden HIV“ der Firma Abbott, 2000. Abgedruckt mit freundlicher Genehmigung der Firma Abbott).

1.5 Genomstruktur des HIV

Aufgrund der Funktion der Reversen Transkriptase kann das Genom von HIV-1 in zwei verschiedenen Formen vorliegen: In freien Viruspartikeln (Virionen) als Dimer von zwei identischen einzelsträngigen RNA-Kopien mit einer Länge von ca. 9300 Basen. In infizierten Zellen als doppelsträngige virale DNA, die ins Wirtszellgenom integriert als Provirus bezeichnet wird. Zur Beschreibung des Virus-Genoms wird bei Retroviren üblicherweise die provirale Form verwendet.

Das provirale Genom wird an beiden Enden von repetitiven Sequenzen, den „long terminal repeats“ (LTR), bestehend aus den Untereinheiten U3, R, und U5, flankiert. In der proviralen Form hat das Genom je nach HIV-1 Stamm eine Länge von 9,5 bis 10 kb, da beim Umschreiben der viralen RNA in provirale DNA, die in der RNA-Form am 3'- und am 5'-Ende unterschiedlichen LTRs jeweils ergänzt werden und somit in der DNA-Form an beiden Enden identisch sind. Die LTRs besitzen Sequenzen für die Bindung von zellulären und viralen Trans-

kriptionsfaktoren, für die provirale Integration und das Verpacken der viralen RNA ins Virion. Zwischen den LTRs befinden sich von 5' nach 3' drei für die Retroviren typische Strukturgene, beginnend mit dem *gag*-Gen gefolgt vom *pol*- und *env*-Gen, die für folgende Proteine kodieren:

- *gag*: die gruppenspezifische *Antigene* p17, p24, p7, p6
- *pol*: die Enzyme Reverse Transkriptase (***Polymerase***), Protease und Integrase
- *env*: die Glykoproteine gp120 und gp41 der Virushülle (***Envelope***)

Das *env*-Gen läßt sich nochmals in verschiedene Bereiche unterteilen. Der größte Teil der Sequenz kodiert das gp120, das wiederum aus fünf konservierten (C1 bis C5) und fünf dazwischenliegenden variablen (V1 bis V5) Regionen besteht. Der übrige Teil kodiert das gp41. Sechs weitere Gene kodieren für regulatorische Proteine, welche in die Virusreplikation involviert sind. Das *tat*- und das *rev*-Protein sind für die Virusreplikation essentiell, während die Proteine *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* für die Virusreplikation *in vitro* entbehrlich sind.

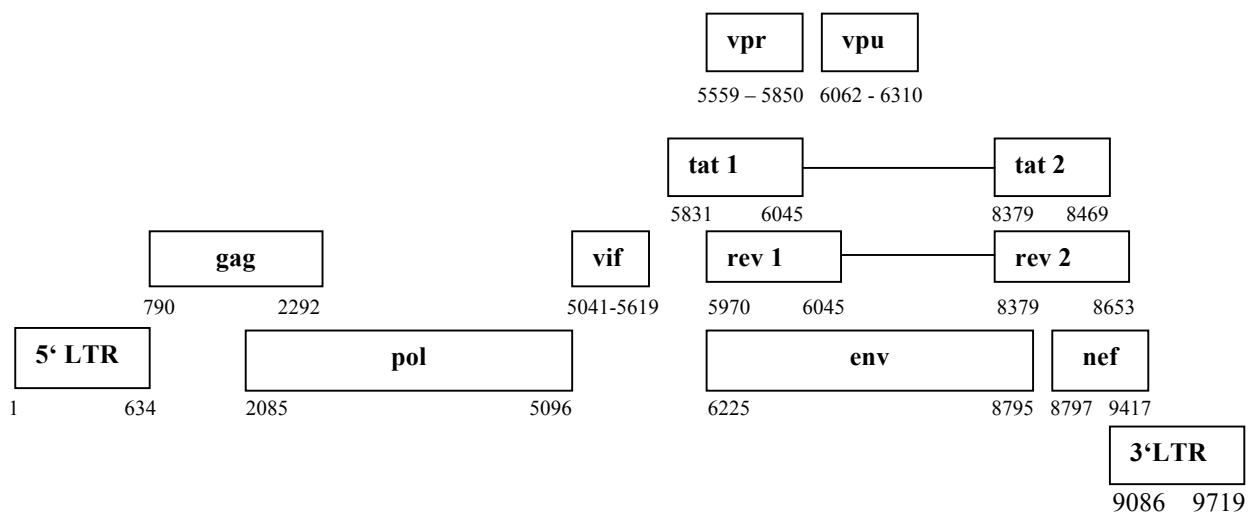


Abb. 2: HIV-Karte. Die Nummerierung bezieht sich auf den Virusstamm HXB2CG, HIV-Database, <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html> (Zugriffsdatum: 14.02.2009).

Die für das kleine Genom hohe Zahl an kodierten Proteinen kommt durch den Einsatz von Prozessierungsmechanismen auf unterschiedlichen Ebenen der Proteinsynthese zustande (posttranskriptional: Spleissmechanismen; translational: ribosomale Leserahmenverschiebung; posttranslational: Spaltung von Vorläuferproteinen durch Protease-Aktivität).

1.6 Infektionszyklus

Die Zahlen in Klammern beschreiben den jeweiligen Schritt im Schema des Infektionszyklus [(1) bis (12) in Abbildung 4].

Wirtszellrezeptoren

HIV kann verschiedene menschliche Zellen befallen, vor allem die CD4⁺ Zellen [Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984] wie Monozyten, Makrophagen, Langerhans Zellen. Die Hauptzielzellen von HIV sind die T-Helfer-Zellen, die den CD4-Rezeptor in großer Zahl exprimieren. Ebenso können antigenpräsentierende dendritische Zellen, Gliazellen und Astrozyten [Edinger et al., 1998] infiziert werden. HIV greift damit Immun- und Nervensystem an.

Nach der Bindung an den CD4-Rezeptor benötigt das Virus noch einen zweiten Rezeptor, um in die Zelle einzudringen. Als Ko-Rezeptoren fungieren Rezeptoren der Chemokinrezeptorfamilien. Chemokinrezeptoren sind Proteine mit sieben membrandurchspannenden Helices (7tm (transmembran)-Proteine), die an G-Protein gekoppelt sind. Zuerst wurde der alpha-Chemokinrezeptor CXCR4 (Fusin) als HIV Ko-Rezeptor identifiziert. Er wird vor allem von den T-tropen HIV-1 Isolaten als Ko-Rezeptor verwendet und von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert [Feng et al., 1996]. Ein zweiter Chemokinrezeptor, der beta-Chemokinrezeptor CCR5, dient als Ko-Rezeptor für sogenannte M-trope HIV-1 Isolate und wird vor allem von dendritischen Zellen, Makrophagen/Monozyten und CD4 T-Zellen exprimiert [Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Deng et al., 1996; Doranz et al., 1996; Dragic et al., 1996; Genoud et al., 1999; Simmons et al., 1998]. Zusätzlich wurden sogenannte R5X4-dualtrope Viren, die sowohl den CCR5- als auch den CXCR4-Rezeptor verwenden können identifiziert [Doranz et al., 1996]. Neben dem CCR5- und CXCR4-Rezeptor können manche HIV-1 Isolate zumindest *in vitro* noch weitere Chemokinrezeptoren zur Infektion der Wirtszelle verwenden z.B. CCR3 [Choe et al., 1996; Doranz et al., 1996; Ross und Cullen, 1998], APJ [Edinger et al., 1998], V28 oder CCR8 [Zhang et al., 1998]. Chemokine als chemotaktisch aktive Zytokine induzieren nach Bindung an die Chemokinrezeptoren eine gerichtete Chemotaxis bei in der Nähe vorhandenen reaktiven Zellen [Janeway et al., 2002]. Die an den CCR5-Rezeptor bindenden CC-Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β werden von CD8-positiven Zellen produziert und können *in vitro* die Infektion von Monozyten/Makrophagen durch M-trope HIV-1 inhibieren [Cocchi et al., 1995]. Das CXC-Chemokin SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) konnte als ein Ligand des CXCR4-Rezeptors identifiziert werden und inhibiert *in vitro* die Infektion von HeLa-CD4-Zellen und PBMCs durch T-trope HIV-1 Stämme [Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996].

I. Virus-Entry

I.a. Adsorption (1)

Zunächst bindet das oberflächliche gp120 Trimer des HIV an den CD4-Rezeptor [Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984; Maddon et al., 1986]. Die hochaffine Bindungsstelle des CD4-Moleküls für gp120 wurde auf einem schmalen Segment der N-terminalen extrazellulären Domäne ausgemacht [Bedinger et al., 1988; Maddon et al., 1988]. CD4 bindende Determinanten in *env* sind in den konstanten C3- und C4-Domänen von gp120 lokalisiert.

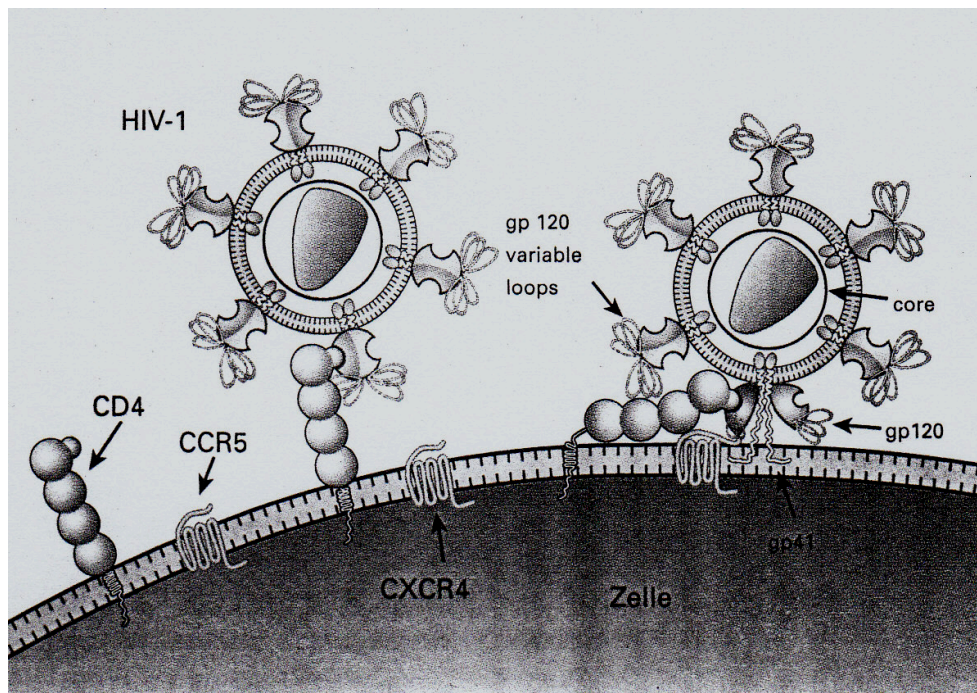


Abb. 3: Vorgang des Anlagerns von HIV an den CD4- und CCR5-Rezeptor. (Quelle: Gürtler und Rockstroh. „Klinischer Leitfaden HIV“ der Firma Abbott, 2000. Abgedruckt mit freundlicher Genehmigung der Firma Abbott.)

Die Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor induziert Konformationsänderungen, die eine normalerweise versteckte Ko-Rezeptor-Bindungsstelle exponieren [Wu et al., 1996]. Dies geschieht durch eine Wegbewegung der hypervariablen V1-, V2- und V3-Loops von der Ko-Rezeptor-Bindungsstelle [Sattentau und Moore, 1991; Sullivan et al., 1998; Thali et al., 1993; Willey et al., 1994; Wyatt et al., 1995]. Dabei gibt es unterschiedliche Theorien, welche Strukturen von gp120 die Ko-Rezeptor-Bindungsstelle ausmachen. Die kristallisierte Struktur des gp120-Kerns, nach vorheriger Entfernung des V1/V2- und V3-Loops, zeigte die CCR5-Bindungsstelle im Bereich der sogenannten „Bridging-sheet“, die die innere und äußere Domäne des gp120 Kerns verbindet (siehe auch Struktur von gp120 in 1.7.1), unter Beteiligung von

Aminosäuren aus der C4-Region und des V1/V2-Stammes [Kwong et al., 1998]. Eine andere Theorie geht von einer direkten Bindung des V3-Loops an die Ko-Rezeptoren aus [Cao et al., 1997; Hoffman et al., 2002; Polzer et al., 2002; Sakaida et al., 1998, Yonezawa et al., 2001].

I.b. Penetration (2)

Nachdem gp120 mit der Ko-Rezeptor-Bindungsstelle interagiert hat, kommt es zu weiteren Konformationsänderungen, die das Fusionspeptid am N-terminalen Ende des viralen Transmembranglykoproteins gp41 exponieren. Bei diesem Mechanismus bewirkt die Konformationsänderung, dass sich das Fusionspeptid vom Zentrum zum Ende des Trimers bewegt, wo es in die Zielmembran inserieren kann. HIV-1 fusioniert direkt mit der Wirtszellmembran ohne rezeptorvermittelte Endozytose, also pH-unabhängig [Maddon et al., 1986; Maddon et al., 1988]. Die gp120-Trimere interagieren bei diesem Mechanismus komplex mit dem gp41-Trimer, dem CD4- und dem Chemokin-Rezeptor. Dabei kooperieren die gp120- und gp41-Monomere und können sich sogar funktionell, bei Vorliegen eines Defekts in einer oder mehreren Untereinheiten, komplementieren [Salzwedel und Berger, 2000].

I.c. Uncoating (3)

Nach dem Eindringen in die Zelle wird das Kapsid abgebaut (= uncoating). Virusgenom, Reverse Transkriptase und Integrase gelangen ins Zytoplasma und bilden den viralen Nukleoprotein-komplex [Varmus und Brown, 1989]. Der genaue Mechanismus ist weiterhin ungeklärt.

II. Reverse Transkription (4)

Die diploide einzelsträngige Virus-RNA wird im Zytoplasma in eine einzelne doppelsträngige DNA-Kopie konvertiert [Haseltine, 1991]. Der Reverse Transkriptase/RNaseH-Komplex übernimmt drei verschiedene Funktionen: Wie eine RNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert er einen DNA-Einzelstrang an der genomischen RNA. Die RNA wird von der RNaseH-Domäne abgebaut und analog einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase synthetisiert der Enzymkomplex an der einzelsträngigen DNA den komplementären DNA-Strang.

III. Migration in den Nukleus (5) und Integration (6)

Das linear-doppelsträngige DNA-Zwischenprodukt bildet mit der im Viruspartikel verpackten viralen Integrase im Zytoplasma einen Präintegrationskomplex [Haseltine, 1991] und migriert in den Nukleus (5) [Cullen, 1991]. Die Integrase bereitet die Enden der doppelsträngigen Provirus-DNA auf die Rekombinationsreaktion vor, spaltet die Wirts-DNA und verbindet die Enden der

Virus- und Wirts-DNA kovalent miteinander [Haseltine, 1991]. Nukleäre Enzyme fügen die Insertionsstelle vollständig zusammen. Die inserierte virale DNA ähnelt einem zellulären Gen und bleibt, einmal integriert, während des kompletten Zelllebens mit dem genetischen Material des Wirtes assoziiert [Haseltine, 1991] und wird bei der Zellteilung an die entstehenden Nachkommenzellen weitergegeben [Cullen, 1991]. Dies führt zu einer latenten Infektion, die in eine produktive Infektion durch Initiation der Transkription der proviralen DNA übergehen kann, wenn der Kontakt mit Antigenen oder Zytokinen die Zelle aktiviert [Robbins et al., 1999].

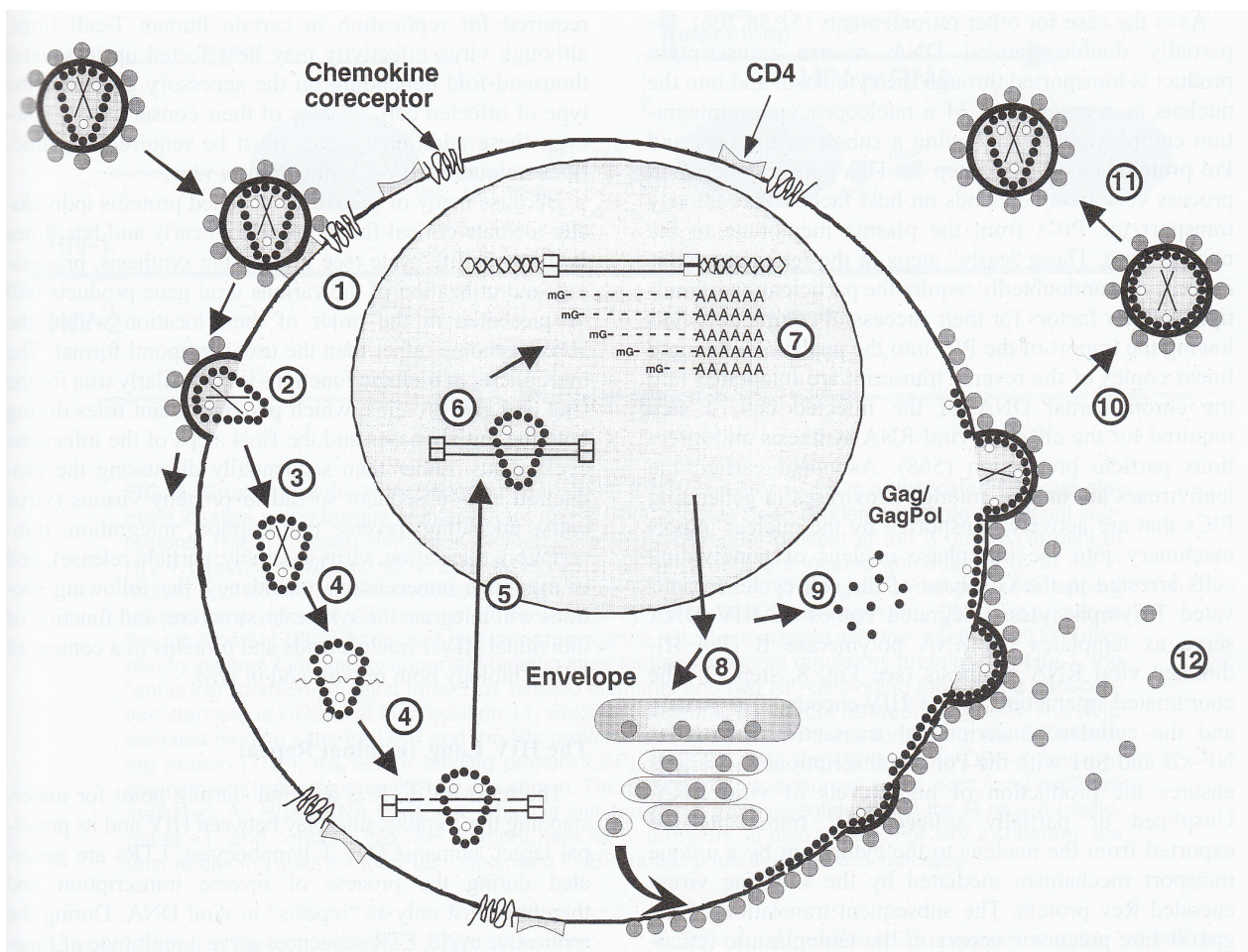


Abb. 4: Replikationszyklus von HIV-1: (1) Virus-Entry, (2) Penetration, (3) Uncoating, (4) Reverse Transkription, (5) Migration in den Nukleus, (6) Integration der proviralen DNA, (7) Transkription, (8) Translation und Assembly des Envelope-Proteins, (9) Translation und Assembly der Gag- und Gag-Pol-Proteine, (10) Budding, (11) Reifung, (12) nicht virusassoziierte gp120 Envelope-Proteine. (Quelle: Fields VIROLOGY, Volume 2, fourth edition, edited by DM Knipe and PM Howley, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, 2001. Abgedruckt mit freundlicher Genehmigung des Verlags).

IV. Transkription (7)/Translation (8)

Im Bereich der LTRs ist eine Transkriptions-Initiationsstelle lokalisiert, von der aus die zelluläre RNA-Polymerase II [Cullen, 1991] mit der Synthese einer kompletten RNA-Kopie der proviralen DNA die Virusexpression beginnt. Das komplette RNA-Transkript kann sowohl als virales Genom als auch als virale mRNA dienen, welche unter Nutzung zellulärer Proteine posttranskriptionell prozessiert (gecappt, gespleisst, polyadenyliert usw.) wird [Varmus und Brown, 1989]. Zuerst kontrollieren zelluläre Proteine, wie der Transkriptionsfaktor NF κ B, die Transkriptions-Initiationsrate auf einem niedrigen, basalen Niveau. Diese initialen Transkripte erreichen das Zytoplasma ausschließlich in Form vollständig gespleisteter viraler mRNA, die für die regulatorischen Proteine *tat*, *rev* und *nef* kodieren. Das daraufhin synthetisierte *tat*-Protein (Transaktivatorprotein) steigert die LTR gesteuerte Transkriptionsrate etwa um den Faktor 1000, [Cullen, 1991; Wei et al., 1998]. Das *rev* (regulator of virion protein expression)-Protein ist essentiell für den Transport ungespleisteter bzw. einfach gespleisteter mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma [Cullen, 1991]. Aus ungespleisteter mRNA entstehen durch ribosomale Leserahmenverschiebung u. a. *gag*- und *gag/pol*-Vorläuferproteine im Mengen-Verhältnis von ungefähr 20:1. Es gibt mindestens fünf verschiedene einfach-gespleistete RNA-Transkripte (ca. 4 kb), von denen die *env*-, *vif*-, *vpu*-, *vpr*- und *tat*-Proteine translatiert werden. Die *env*-Proteine gp120 und gp41 haben ein gemeinsames Vorläuferprotein, das gp160, das von zwei bicistronischen (d. h. mRNAs mit zwei unmittelbar hintereinander angeordneten Leserahmen), einfach gespleisteten mRNAs translatiert wird [Schwartz et al., 1990]. Eine Leitsequenz auf dem gp160-Vorläuferprotein dirigiert die Ribosomen zum rauhen Endoplasmatischen Retikulum, wo sich gp160 als Dimer sammelt, um komplexe Kohlenhydrate zu Asparaginresten hinzugefügt zu bekommen [Haseltine, 1991]. Zu jeder Envelope-Glykoproteinkette werden schätzungsweise zwanzig komplexe Zuckergruppen hinzugefügt [Kozarsky et al., 1989; Matthews et al., 1987]. Das Hinzufügen der N-gebundenen Glykane ist essentiell für die korrekte Faltung und Prozessierung des Envelope-Proteins [Land und Braakman, 2001; Leonard et al., 1990; Li et al., 1993]. Das gp160-Vorläuferprotein tritt in den proximalen Golgi-Apparat ein, wo es von einer zellulären Protease in zwei Untereinheiten gp120 und gp41 gespalten wird [Haseltine, 1991], die danach nicht-kovalent verbunden bleiben.

V. Assembly des Virus-Kapsid

Envelope (8)- und *gag*- mit *gag-pol*-Polyproteinen (9) werden über unterschiedliche Wege an die Innenseite der Zellmembran transportiert, um sich dort zusammenzulagern. Das Kapsid-

Vorläuferprotein inseriert mit einer myristylierten Fettsäure an seinem N-Terminus in die Zellmembran [Haseltine, 1991]. Es beinhaltet zwei Kopien eines konservierten Zinkfinger-Motifs [Cullen, 1991], das an eine sogenannte psi oder packaging RNA-Sequenz [Haseltine, 1991] am 5'-Ende der viralen RNA bindet, um die Inkorporation von zwei Kopien der einzelsträngigen retroviralen RNA in das Virion einzuleiten [Cullen, 1991]. Anschließend werden die viralen Glykoproteine gp120 und gp41 in die Wirtszellmembran eingebaut.

VI. Budding (10)

Der Komplex aus Kapsidprotein, dem replikativen Vorläuferenzym (*gag-gag-pol*-Polyprotein) und viraler RNA sammelt sich in einem geschlossenen sphärischen Partikel, der aus der Zellmembran knospt [Haseltine, 1991], mit der er vermutlich über eine Haltestruktur verbunden bleibt. Die Knospung vollzieht sich an Regionen der Zellmembran, die hohe Konzentrationen der Envelope-Glykoproteine beinhalten [Cullen, 1991], so dass die Hülle der Virionen aus der zellulären Lipiddoppelmembran, in der die viralen *env*-Glykoproteine inseriert sind, besteht. Neben dem Viruspartikel werden gp120-Proteine freigesetzt, die nicht virusassoziiert sind (12).

VII. Reifung (11)

Zunächst spaltet sich die inkorporierte virale Protease autokatalytisch vom *gag-pol*-Polyprotein ab und katalysiert die Spaltung der verbliebenen *gag*- und *gag-pol*-Polyproteine in die funktionellen Virusproteine p6, p7, p9, p17, p24, RT und Integrase. Der Maturationsprozess ist für die Infektiosität des Virion essentiell [Cullen, 1991]. Die Haltestruktur zwischen Viruspartikel und Zellmembran wird gespalten und das Viruspartikel freigesetzt [Haseltine, 1991].

1.7 *env*-Proteine

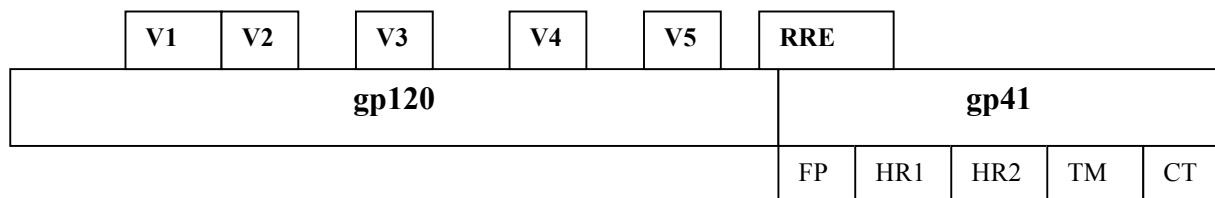


Abb. 5: Schema des *env*-Genoms. gp120, gp41: Glykoprotein 120 bzw. 41, V1-V5: variable Regionen von gp120, RRE: rev responding element, FP: Fusionspeptid, HR: heptad repeat, TM: transmembrane Region, CT: cytoplasmatic tail.

1.7.1 Aufbau, Struktur und Funktion von gp120

Das gp120 enthält fünf hypervariable Regionen (V1-V5), die zwischen stärker konservierten Regionen (C1-C5) lokalisiert sind [Starcich et al., 1986]. In der dreidimensionalen Struktur von monomeren gp120 umfasst der Kern von gp120 Aminosäurereste der konservierten Regionen C1 bis C5, die eine konservierte innere Domäne und eine weniger konservierte stark glykosylierte äußere Domäne bilden, die durch vier antiparallele Beta-Faltblätter („strands“) als sogenanntes Brückentuch („bridging sheet“) miteinander verbunden sind. Ein Strukturmodell favorisiert die CCR5-Rezeptorbindungsstelle im Bereich der „bridging sheet“. Die hypervariablen Regionen V1 bis V4 sind vom gp120-Kern ausgeschlossen und bilden mit Hilfe von Disulfid-Brücken nach außen exponierte Loops [Kwong et al., 1998; Leonard et al., 1990; Wyatt et al., 1998].

Die genauen Funktionen der einzelnen Regionen von gp120 sind größtenteils noch ungeklärt. Klar ist, dass unterschiedliche Eigenschaften (z.B. Ladung, Glykosylierungsgrad) der verschiedenen Regionen zusammen wirken und eine Rolle bei verschiedenen Funktionen des gp120-gp41-Trimerkomplexes spielen (z. B. Ko-Rezeptor-Nutzung).

V1/V2 und V3

1. Chemokinrezeptor-Präferenz und Zelltropismus

Die Chemokinrezeptor-Präferenz der HIV Isolate wird u. a. von der V3-Sequenz in kooperativer Interaktion mit der V1/V2-Region bestimmt [Hoffman et al., 2002; Koito et al., 1994; LaBranche et al., 1999; Palmer et al., 1996; Rizzuto et al., 1998]. Dabei spielen u. a. der Glykosylierungsgrad von V1 und V3, als auch die Ladung von V3 eine Rolle [Pollakis et al., 2001]. Der Wechsel von CCR5- zu CXCR4-tropem Virus ist generell mit einer wachsenden positiven Netto-Ladung von V3 oft in Verbindung mit Sequenzänderungen in V1/V2 und C4 (Position 440) verbunden [Hoffman et al., 2002; Tersmette et al., 1989]. Dabei haben Austausch hin zu basischen, also positiv geladenen Aminosäuren an Position 11 und 25 des V3-Loops einen prädiktiven Wert für den verwendeten Ko-Rezeptor des Virusisolats [Bagnarelli et al., 2003; Hoffman und Doms, 1999]. Mittels Sequenzanalyse des kompletten V3-Loop werden zusätzliche Phänotyp-beeinflussende Mutationen in die Vorhersage des Phänotyp miteinbezogen und die Richtigkeit der Aussage erhöht [Jensen und van't Wout, 2003]. Neben dem Rezeptortropismus ist die V3-Region auch in den Zelltropismus involviert [Cheng-Mayer et al., 1990].

2. Virusinfektiosität

Deletion der V1/V2-Domäne resultiert in dem Verlust der Infektiosität von HIV-1 [Wyatt et al., 1993] und einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber neutralisierenden V3-spezifischen Anti-

körpern [Cao et al., 1997]. In dieser Region bindende Antikörper neutralisieren das Virus [Fung et al., 1992; McKeating et al., 1993]. HIV Isolate des SI-Phänotyps sind *in vitro* schneller und in höherer Anzahl replizierend, als HIV Isolate des NSI-Phänotyps. Analog zum Ko-Rezeptortropismus sind diese *in vitro* Eigenschaften hauptsächlich durch die V3-Sequenz determiniert.

3. Neutralization Escape

Der V3-Loop verdeckt teilweise die CD4- und Chemokin-Rezeptorbindungsstelle [Choe et al., 1996; Hwang et al., 1991; Parren et al., 1999; Wu et al., 1996]. Ebenso maskieren die V1/V2-Loops den Zugang zur CD4-Bindungsstelle [Rizzuto et al., 1998; Wyatt et al., 1995]. Potenziell neutralisierenden Antikörpern wird dadurch der Zugang zur Chemokinrezeptorbindungsstelle erschwert. Diese Region liegt zwischen der Basis der V1/V2- und V3-Loops, die sich nach CD4-Bindung davon wegbewegen und die Interaktion mit dem Chemokinrezeptor vereinfachen [Rizzuto et al., 1998; Wyatt und Sodrowski, 1998]. Außerdem können die N-Glykane im gp120 potenzielle Epitope für neutralisierende Antikörper verdecken [Wei et al., 2003; Ye et al., 2000].

4. Krankheitsprogression

Insertionen in V2 sind assoziiert mit einem langsameren Krankheitsfortschritt bei HIV-1 Infizierten [Masciotra et al., 2002; Shioda et al., 1997; Wang et al., 2000].

5. Replikationsfähigkeit

Die Sequenz des V3-Loops beeinflusst über den Zelltropismus auch die Fähigkeit zur Replikation in bestimmten Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften [Chesebro et al., 1996].

1.7.2 Aufbau, Struktur und Funktion von gp41

Die transmembrane Untereinheit gp41 besteht von N- nach C-terminal aus der Ektodomäne mit Fusionspeptid, N- und C-Helix, getrennt durch die membrandurchspannende Domäne von der zytoplasmatischen Domäne. Die zytoplasmatische Domäne besteht aus dem Tyr-X-X-Leu (genannt YXXL) Endozytosemotif und zwei helikalen Domänen. Diese α -Helix-1 und -2 werden auch „lentivirus lytic peptides“ oder LLP-1 und LLP-2 genannt. LLP-1 umfaßt die aa 257 bis 277 und LLP-2 die aa 316 bis 344 [Kalia et al., 2003].

Das Fusionspeptid besteht aus dem streng hydrophoben Amino-Terminus von Position 1 zu Position 28 und dem sich daran anschließenden polaren Saum (ab Position 16 sind bereits polare Aminosäuren eingestreut). Es ist für die Zellfusionseigenschaften des HIV-1, die sich neben dem Virus-Entry in der Synzytiumbildung von infizierten Zellen äußern, verantwortlich [Freed et al., 1990]. Die N-Helix enthält ein Leucin-Zipper ähnliches Hepta-Wiederholungs-Motif (heptad

repeat 1 = HR1) [Delwart et al., 1990]. Mutationen in der N-Helix schwächen die Infektiosität [Chen et al., 1993] und Membranfusionsaktivität [Cao et al., 1993; Dubay et al., 1992; Weng und Weiss, 1998]. Peptide, die der Sequenz des Leucin-Zippers korrespondieren zeigen in Zellkulturen antivirale Aktivität, indem die Zellfusion beeinträchtigt wird (z.B. DP-107) [Weng und Weiss, 1998; Wild et al., 1994]. Die minimale membrandurchspannende Domäne wird im Bereich der Aminosäuren von Position 177 bis 183 von HXB2 gp41 vermutet. Davor liegt ein konserviertes Tryptophan-reiches Motif aus 17 hydrophoben und ungeladenen Aminosäuren (Position 154 bis 170), das wichtig für die *env*-vermittelte Fusion und Virus-Infektiosität ist. [Salzwedel et al., 1999]. Die LLP-1 und -2 im zytoplasmatischen Teil nehmen unterschiedliche aber jeweils kritische Funktionen im Rahmen der *env*-Inkorporation und -Fusion wahr [Kalia et al., 2003]. Funktionelle Interaktionen zwischen HR1 von gp41, gp120 V1/2, V3 und Sequenzen nah oder innerhalb der CD4-Bindungsstelle bestimmen die mögliche Neutralisationsresistenz gegenüber löslichem CD4 und anderen neutralisierenden Antikörpern [Bouma et al., 2003].

1.7.3 Assoziation von gp120 und gp41

Die Kontaktstellen der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen gp120 und gp41 bestehen aus konservierten Residuen innerhalb einer Disulfid-gebundenen Region von gp41 und innerhalb des Loops von gp41 und aus den Enden von C1 und C5 von gp120. In gp41 von HXB2 sind diese Kontaktstellen L-593 (entspricht L-82 in gp41 der hier untersuchten Sequenzen), W-596 (= W-85), G-597 (= G-86), K-601 (= K-90) und W-610 (= W-99). Zu den Enden von C1 und C5 von gp120 gehören die Aminosäuren 36-45 in C1 und 491-501 in C5). [Helseth et al., 1991; Maerz et al., 2001]. Die Assoziationsfunktion der Disulfid-gebundenen Region von gp41 in diversen HIV-1 Isolaten ist konserviert, aber der Beitrag des einzelnen Residuums zu gp41-Faltung/ -Stabilität, gp120-gp41-Assoziation, Membranfusion und viralem Entry in die Wirtszelle variiert von Isolat zu Isolat. Dies zeigt, dass sich die gp120-gp41 Assoziationsstelle strukturell und funktionell adaptieren kann. [Poumbourios et al., 2003].

1.8 Bedeutung der *env*-Glykoproteine für die HIV-Infektion und Immunantwort

Die Envelope-Glykoproteine gp120 und gp41 sind als Hüllproteine wichtige Ziele der humoralen Immunantwort. Neutralisierende Antikörper interferieren mit der Virus-Zell-Annäherung und -Fusion [Parren et al., 1999]. Die meisten neutralisierenden Antikörper sind gegen gp120-Epitope gerichtet [Javaherian et al., 1989]. Es konnten neutralisierende Antikörper identifiziert werden, die gegen drei Hauptcluster von Epitopen auf gp120 gerichtet sind und effizient die virale Neutralisation vermitteln [Wu et al., 1995]:

1. Neutralisierende Antikörper, welche gegen die hoch immunogene V3-Region von HIV-1 gerichtet sind. Anti-V3-Antikörper, inhibieren einen späten Schritt im Virus-Entry, da sie nicht mit der Bindung von gp120 an CD4 interferieren, aber die HIV-induzierte Synzytiumbildung blockieren [Rusche et al., 1988; Skinner et al., 1988]. Antikörper gegen Epitope im V3-Loop oder gegen CD4-induzierte (nach CD4-Bindung besser zugängliche) Epitope stören die Bindung des gp120-CD4-Komplexes an den jeweiligen Chemokinrezeptor [Wyatt et al., 1998]. Der 17b-Antikörper erkennt ein CD4-induziertes Epitop, welches durch fünf Elemente gekennzeichnet ist: Die hydrophobe ringähnliche Struktur, die von einem Paar Disulfidbrücken, die C3 und C4 verbinden, gebildet wird; konservierte Aminosäuren im Bereich des Stammes der V1/V2-Loop-Struktur; eine konservierte hydrophobe C2-Region von Arginin-252 zu Asparagin-262; Glutaminsäure an Position 370 in der C3-Region und Methionin an Position 475 in der C5-Region [Thali et al., 1993].
2. Neutralisierende Antikörper, die die gp120 Bindung an CD4 inhibieren [Ho et al., 1991; McKeating et al., 1992; Pinter et al., 1993; Wyatt et al., 1998] und Konformationsepitope in multiplen gp120-Domänen erkennen, die mit der CD4-Bindungsstelle zu überlappen scheinen [Thali et al., 1992].
3. Antikörper, die gegen Epitope im Bereich von V2 gerichtet sind [Fung et al., 1992; McKeating et al., 1992; Moore et al., 1993; Warrier et al., 1994].

Das Überleben, die Nachkommenproduktion und die Persistenz auftauchender viraler Quasispezies sind abhängig von der Replikationsfähigkeit des Virus [Domingo und Holland, 1997] und dem Selektionsdruck im infizierten Patienten. Der individuelle Selektionsdruck seinerseits besteht aus einer Kombination von komplexen endogenen Wirtsfaktoren wie der

humoralen und zellulären Immunantwort, dem HLA Haplotyp [Stephens, 2005] und exogenen Faktoren wie einer antiretroviralen Therapie.

HIV-1 hat mehrere Strategien entwickelt, um die Entstehung neutralisierender Antikörper zu begrenzen und/oder ihren Effekt auf den Lebenszyklus des Virus zu verringern und damit als chronische Infektion zu persistieren:

1. Konservierte Regionen von gp120 sind außergewöhnlich extensiv durch N-Glykane beschildet [Olofsson und Hansen, 1998; Reitter et al., 1998]. Ein Modell spricht von einem sich entwickelnden „Glykanschild“, mit dem das HIV durch Veränderung der Benutzung verschiedener N-Glykosylierungsstellen spezifische Epitope selektiv gegen die Erkennung durch neutralisierende Antikörper im Verlauf der Infektion schützen kann. Die Entfernung, Repositionierung und Addition von potenziellen Glykosylierungsstellen mit der Änderung des Envelope-Glykosylierungsmusters resultiert in der Maskierung neutralisierender Epitope [Cheng-Mayer et al., 1999; Lue et al., 2002], und folglich in behinderter Antikörperbindung und limitierter Immunogenität [Reitter et al., 1998; Wyatt et al., 1998]. Dabei wird die Fähigkeit des gp120 zur Interaktion mit CD4- und dem Ko-Rezeptormolekül aufrechterhalten. [Dacheux et al., 2004; McCaffrey et al., 2004; Wei et al., 2003]
2. Die CD4-Bindungsstelle liegt in einer für neutralisierende Antikörper schwer zugänglichen Nische [Kwong et al., 1998; Wyatt et al., 1998].
3. Die rasche Entwicklung von „escape“ Mutanten, also Virusstämmen mit veränderten und damit nicht mehr neutralisierbaren Epitopen [Kwong et al., 1998; Wyatt et al., 1998].
4. Variable Loops verstecken die Ko-Rezeptorbindungsstelle, bis die CD4-Interaktion stattgefunden hat und minimieren die Zeit und den Platz für Antikörper, die gegen den Fusionsprozess intervenieren könnten [Kwong et al., 1998; Moore und Binley, 1998; Rizzuto et al., 1998; Sullivan et al., 1998; Wyatt et al., 1998].
5. Die Trimeren-Envelope-Glykoproteine sind nur wenig immunogen im Vergleich zu ihren dissoziierten Untereinheiten, die als virale Trümmer sogar als Lockvogel die Antikörperherstellung weg von den funktionell wichtigen Formen des *env*-Glykoproteins lenken können [Burton, 1997; Moore und Ho, 1995; Parren et al., 1997].
6. Im nativen HIV-1 *env*-Glykoproteinkomplex ist das gp41 Fusionspeptid, wie der größte Teil der gp41-Ektodomäne nicht für Antikörper zugänglich [Earl et al., 1997; Sattentau et al., 1995].

1.9 Übertragung und Virusevolution

In der Frühphase der HIV-Infektion überwiegen R5-Virusvarianten aufgrund starker Selektion während oder kurz nach der Übertragung [Zhu et al., 1993]. Dies liegt daran, dass die in der Schleimhaut vorhandenen dendritischen Zellen als erste Zellen mit dem HIV infiziert werden und anschließend selbst vor allen mit monozytotropen Zellen in Kontakt treten. Das heißt, Neuinfektionen werden meist durch CCR5-trope HIV-Stämme verursacht, auch wenn zusätzlich X4-Viren übertragen wurden. Dazu passt die Beobachtung, dass Menschen mit einem homozygoten Defekt im CCR5-Gen (Deletion von 32 Basenpaaren), die infolgedessen kein CCR5 auf der Zelloberfläche exprimieren, weitestgehend resistent gegenüber HIV-1 Infektionen sind [Dean et al., 1996; Huang et al., 1996; Liu et al., 1996; Samson et al., 1996]. In Einzelfällen wurden jedoch auch Infektionen mit X4-Viren bei Individuen mit diesem Gendefekt beschrieben [Balotta et al., 1997; Theodorou et al., 1997]. Im Verlauf der Infektion mit Subtyp B HIV-1 Isolaten ist ein Ko-Rezeptorwechsel mit dem Auftreten von X4-Isolaten häufig [Connor et al., 1997]. Das Auftreten von X4-Isolaten korreliert mit einem beschleunigten Verlust der CD4-positiven Zellen und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Krankheitsprogression zu AIDS [Blaak et al., 2000; Fouchier et al., 1995; Richman und Bozzette, 1994; Tersmette et al., 1989]. Obwohl je nach Isolat nur ein oder zwei Mutationen in der *env*-V3 Region zum Ko-Rezeptorwechsel nötig sind und die Mutationsrate von HIV sehr hoch ist, dauert es in der Regel bis zum Auftreten der ersten X4-Isolate mehrere Jahre. Dies wird mit dem Vorliegen eines negativen Selektionsdrucks gegen X4-Isolate erklärt. Dieser Selektionsdruck kann durch Wirtsfaktoren (Zielzell-Prävalenz, Chemokinspiegel, Wirkung der generierten neutralisierenden Antikörper, Präsenz potenter zytotoxischer T-Lymphozyten) und/oder intrinsische Eigenschaften der X4-Isolate (sinkende Replikationsfähigkeit, weniger effiziente Ko-Rezeptornutzung, nur wenige Mutationswege) hervorgerufen werden [Pastore et al., 2004]. Liegt der CCR5-Gendefekt heterozygot vor, so haben diese Patienten statistisch eine zwei bis vier Jahre höhere Lebenserwartung, als Patienten mit CCR5-Wildtyp [Dean et al., 1996; Michael et al., 1997].

Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der genetischen HIV-1 Diversität und der Krankheitsprogression, in dem Sinne, dass eine höhere Diversität mit einem langsameren CD4⁺ T-Zellabfall korreliert [Delwart et al., 1997].

In einer umfassenden longitudinalen Studie zur HIV-1 Evolution wurden drei verschiedene Phasen innerhalb des asymptomatischen Stadiums der HIV-1 Infektion postuliert. In einer frühen Phase wachsen Diversität und Divergenz linear. Während der zweiten Phase stagniert oder sinkt

die Diversität und in der dritten späten Phase wird die Divergenz ebenfalls langsamer oder stoppt [Shankarappa et al., 1999]. Patienten mit einer jahrelang bestehenden HIV-Infektion (mehr als zehn Jahre), ohne Anzeichen einer Entwicklung von AIDS ohne antiretrovirale Therapie werden auch „long term non-progressors“ (LTNP) genannt. In diesen Patienten ist die Viruslast trotz persistierender Virusreplikation niedrig und die Lymphknotenarchitektur und Immunfunktion scheint intakt zu bleiben [Pantaleo et al., 1995; Vicenzi et al., 1997]. Ursache scheint unter anderem eine starke virus-spezifische Immunantwort (zelluläre CD8⁺ T-Lymphozyten-Reaktion und neutralisierende Antikörper) zu sein [Cao et al., 1995]. In diesem Zusammenhang ist die HLA-Allel-Ausstattung des Wirts von Bedeutung. HLA-B57 und HLA-B5801 wurden mit einer Langzeitkontrolle von HIV assoziiert und bewirken wahrscheinlich den starken Selektionsdruck auf das Virus [Kaslow et al., 1996; Migueles et al., 2000].

1.10 Klinik

Ist das ursächliche Ereignis für eine HIV-Infektion ausnahmsweise, wie bei einer Nadelstichverletzung oder einer einmaligen Bluttransfusion, bekannt, so können in etwa 50% der Fälle nach einer Inkubationszeit von ein bis drei Wochen plötzlich auftretende grippeähnliche Symptome als Zeichen der akuten HIV-Erkrankung beobachtet werden. Klinische Leitsymptome sind Fieber, Hautausschlag, Lymphknotenschwellungen und Pharyngitis. Diese Phase der Erkrankung ist mit einer starken Virämie und einem Rückgang der Zahl der zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen verbunden.

Nach der Primärinfektion bleibt der Patient im Durchschnitt über zehn Jahre klinisch asymptomatisch, ist aber schon kurz nach der Infektion mit seinen Körperflüssigkeiten als kontagiös anzusehen. In dieser klinischen Latenzphase der Erkrankung ist die anfänglich hohe Virämie infolge der Kontrolle durch das Immunsystem zurückgegangen, die CD4⁺ T-Zellzahl nimmt allerdings langsam und stetig ab. Im Verlauf der Erkrankung wird das Immunsystem mehr und mehr geschwächt und es entwickelt sich als eines der ersten Zeichen dafür das Lymphadenopathiesyndrom (LAS). Es ist charakterisiert von einer über mindestens drei Monate persistierenden, generalisierten Lymphknotenschwellung an mindestens zwei verschiedenen Körperstellen außerhalb der Inguinalregion, ohne andere erkennbare Ursache, vergesellschaftet mit allgemeinen Symptomen wie Nachtschweiß, Fieber und Durchfall. Sinkt die Zahl der CD4⁺ T-Helfer/Induktor Lymphozyten auf unter 200/μl, so ist ein Übergang in das Stadium AIDS wahrscheinlich. AIDS ist das Endstadium der HIV-Infektion, gekennzeichnet durch das Versagen

der zellulären Immunabwehr. Damit geht die Kontrolle über ein großes Spektrum von Mikroorganismen, die meist intrazellulär wachsen und im Allgemeinen wenig pathogen sind verloren und es treten zwei Leitsymptome auf: Opportunistische Infektionen wie die sehr häufige Pneumocystis-jirovecii-Pneumonie (früher Pneumocystis-carinii-Pneumonie) und die ZNS-Toxoplasmose und/oder Tumoren wie das Kaposi-Sarkom.

Die HIV-Infektion kann in verschiedene Stadien eingeteilt werden. Die gebräuchlichste ist die der Centers of Disease Control [Centers of Disease Control, 1992]. Sie teilt die HIV-Erkrankung in drei, an den CD4⁺ T-Lymphozyten orientierte Zellzahlbereiche ein, mit einer zusätzlichen Einteilung in die klinischen Kategorien A bis C. Die Patienten lassen sich in der 3 x 3-Matrix in die Untergruppen A1 bis C3 einteilen. In die Kategorie A fallen asymptomatische und akute HIV-Infektionen und das LAS. In Kategorie B fallen auf die HIV-induzierte Immunschwäche zurückzuführende symptomatische Krankheitsbilder, die nicht in die AIDS definierende Kategorie C fallen, wie z. B. chronische Diarrhoen. In die Kategorie C fallen mit einer schweren Immundefizienz vergesellschaftete chronische oder therapieresistente Infektionen, das Kaposi-Sarkom und Lymphome. Kategorie 1 bedeutet ≥ 500 CD4⁺ Zellen/ μ l Blut; 2 bedeutet 200-499 CD4⁺ Zellen/ μ l Blut und 3 bedeutet < 200 CD4⁺ Zellen/ μ l Blut.

Labor- ↓/ Klinische- ⇒ kategorie CD4 ⁺ Lymphozyten/ μ l	A (asymptomatisch)	B (symptomatisch, aber kein AIDS)	C (AIDS)
1: ≥ 500	A1	B1	C1
2: 200 bis 499	A2	B2	C2
3: < 200	A3	B3	C3

Tab.1: CDC-Klassifikation der Stadien der HIV-Infektion der Subgruppen A1 bis C3

Ein weiterer bedeutender Parameter für die Klassifizierung der HIV-Infektion ist die Viruslast. Diese beschreibt das Gleichgewicht zwischen den neu gebildeten HI-Viren (täglich werden etwa zehn Milliarden HI-Viren mit einer Halbwertszeit von fünf Stunden bis zwei Tagen gebildet [Ho et al., 1995; Perelson et al., 1996]) und den durch das Immunsystem abgetöteten HIV [Janeway et al., 2002; Kurth, 1994].

1.11 Therapie

Die Therapie der HIV-Infektion besteht aus einer spezifischen antiretroviralen Therapie (ART) und einer supportiven Therapie z. B. durch Ausgleich von Vitamin- und Kalorienmangelzuständen, die durch eine zusätzliche Stoffwechselbelastung infolge einer chronischen HIV-Infektion entstehen. Die Entscheidung zum Beginn einer ART muß individuell getroffen werden. Eine eindeutige Therapieempfehlung besteht für alle symptomatischen Patienten unabhängig vom Immunstatus, für asymptomatische Patienten mit deutlichem CD4⁺ Helferzellverlust (< 350/µl) und für hochvirämische Patienten auch bei noch gutem CD4⁺ Helferzellstatus. Für die spezifische ART wurden im Lauf der Zeit Medikamente mit verschiedenen Angriffspunkten entwickelt, da es aufgrund der speziellen Eigenschaften des HIV (hoher Virusumsatz mit hoher Mutationsrate) zu einer relativ schnellen Resistenzentwicklung kam. Ziel der Therapie ist, möglichst lange eine maximale Suppression der HIV-Vermehrung zu erreichen. Aufgrund der zum Teil starken Nebenwirkungen und gegenseitigen Interaktionen sind neben dem Immunstatus auch individuelle Aspekte wie Lebensweise, Begleiterkrankungen (z. B. Hepatitis) und andere medikamentöse Therapien bei der Auswahl der Medikamente zu berücksichtigen. Zur Verfügung stehen nukleosidale Reverse Transkriptaseinhibitoren (NRTI = Nukleosidanaloga), nicht-nukleosidale Reverse Transkriptaseinhibitoren (NNRTI), Proteaseinhibitoren (PI), Entry-Inhibitoren (Korezeptorantagonisten und Fusionsinhibitoren) und Integrase-Inhibitoren. Unter einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) versteht man die Kombination von drei oder mehr Medikamenten aus mindestens zwei verschiedenen Substanzklassen (aus: Gürtler und Rockstroh. „Klinischer Leitfaden HIV“, der Firma Abbott, 2000).

1.12 Fallbeschreibung

Zwischen November 1989 und März 1990 konvertierten neun Patienten in Deutschland mit Hämophilie B seropositiv für das Humane Immunodefizienz Virus Typ-1, obwohl in Deutschland seit Juni 1984 nur noch virusinaktivierte Gerinnungsfaktorpräparate verwendet wurden. Sechs der Patienten wurden in Bonn wegen ihrer Hämophilie behandelt (Patient B, C, D, E, F und G), einer zuerst in einem anderen Zentrum und später in Bonn (Patient A) und zwei in Frankfurt, über die nur Daten aus der Literatur vorlagen [Cichutek et al., 1991; Cichutek et al., 1992].

Untersuchungen in den hypervariablen Regionen V1 und V2 [Kasper et al., 1993; Kleim et al., 1991] in der V3 und V4 Region des HIV *env*-Gens [Cichutek et al., 1991; Cichutek et al., 1992;

Kasper et al., 1994] und der gag p17-Region des HIV [Kasper et al., 1995] zeigten eine hohe Homogenität (97,5 bis 100% in der V1/V2-Region) bzw. zum Teil Identität (100% in der V3-Region) kurz nach der Serokonversion bei allen infizierten hämophilen Patienten, trotz der massiven Virus-Replikation bald nach der Infektion [Baltimore und Feinberg, 1989] und der mit der HIV-Replikation verbundenen hohen Mutationsrate [Saag et al., 1988; Wolfs et al., 1990]. Da alle Patienten ein zur Inaktivierung mit β -Propiolacton-UV behandeltes PPSB- (Prothrombin (Faktor II), Proconvertin (Faktor VII), Stuart-Prower-Faktor (Faktor X), Antihämophiles Globulin B (Faktor IX)) Gerinnungsfaktorkonzentrat der gleichen Charge erhalten hatten und in dieser Charge eine geringe Menge HIV p24-Antigen nachgewiesen werden konnte [Kleim et al., 1990], wurde das Präparat als einheitliche Infektionsquelle vermutet. Kupfer et al. [1995] konnten 1995 in der betreffenden Charge HIV-spezifische Nukleinsäure isolieren und nach Sequenzanalyse der C2V3C3-Region eine 100%ige Homologie zur entsprechenden Region in den infizierten Hämophilen kurz nach der Infektion feststellen und damit das Gerinnungsfaktorkonzentrat als Infektionsquelle bestätigen. Insgesamt wurden mindestens 48 Hämophile mit der Charge des Gerinnungsfaktorkonzentrats behandelt, von denen nur die oben genannten neun Patienten erkrankten. Dies läßt auf eine sehr geringe Menge des Virus im Präparat schließen und führt zu der Annahme, dass jeder Patient nur ein einziges infektiöses Partikel erhielt und dadurch infiziert wurde [Cichutek et al., 1991; Cichutek et al., 1992].

1.13 Aufgabenstellung

Nachdem bereits einzelne Bereiche des HIV-1 *env*-Gens wie die V1/V2-Region [Kleim et al., 1991; Kasper et al., 1993] und der V3-Bereich [Cichutek et al., 1991; Cichutek et al., 1992; Kasper et al., 1994] und auch Teile des HIV-1 *gag*-Gens [Kasper et al., 1995] zum Zeitpunkt der Serokonversion und nach einigen Monaten, respektive Jahren der Infektion untersucht wurden, sollten in der vorliegenden Arbeit die Veränderungen des kompletten *env*-Gens in den einzelnen Patienten nach einem Zeitraum von zehn Jahren nach Serokonversion analysiert und interpretiert werden. Anschließend sollten die gefundenen Veränderungen in Beziehung zum klinischen Verlauf der HIV-Infektion bei den Patienten gesetzt werden, der mittels der CD4⁺ Zellzahl und der HIV Viruslast dokumentiert wurde. Einige relevante Wirtsfaktoren der Patienten hinsichtlich HLA- und Ko-Rezeptorausstattung sollten berücksichtigt werden. Besonderes Interesse galt der V2-Region des *env*-Gens, da dort Veränderungen mit möglichen Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf gefunden wurden.

2 Material und Methoden

Im folgenden wird zunächst ein Überblick über die verwendeten Chemikalien, Enzyme, Untersuchungs-Kits, Plasmid-Vektoren, Primer, die Herstellung verwendeter Lösungen und Medien, die benutzten Geräte, Computerprogramme und die Herkunft der Proben gegeben. Daran anschließend werden die Methoden und deren Ausführung beschrieben.

2.1 Chemikalien und sonstige Materialien

2.1.1 Chemikalien

Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Ampullenwasser (Ampuwa [®])	Fresenius, Bad Homburg
Aqua bidest. (A. bidest.)	Hergestellt mit Bi-Destille, 1,5l/h, 220 V, 2500 W, Westdeutsche Quarzschmelze, Geesthacht
Borsäure	MERCK, Darmstadt
Bromphenolblau	SERVA FEINBIOCHEMIKA, Heidelberg
Desoxyribonukleotide (25 mM)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA-Längenstandard Marker II	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA-Längenstandard Marker IV	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA-Längenstandard Marker VIII	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethanol, absolut (100%)	MERCK, Darmstadt
Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-phenanthridiniumbromid)	SERVA FEINBIOCHEMIKA, Heidelberg
Ethylendiamin-N, N, N', N', tetraessigsäure (EDTA), p.a.	MERCK, Darmstadt
Glycerin	MERCK, Darmstadt
NuSieve GTG Agarose	Bio Products, Rockland, ME, USA
Seakem LE Agarose	Bio Products, Rockland, ME, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	MERCK, Darmstadt

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen und Verdünnungen mit RNase-freiem Wasser hergestellt.

2.1.2 Enzyme

Expand™ Long Template Polymerase (3,5 U/μl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
QIAGEN® Protease, lyophilisiert	QIAGEN GmbH, Hilden
HotStarTaq DNA Polymerase (5 units/μl)	QIAGEN GmbH, Hilden

2.1.3 Kits

ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	PE Applied Biosystems, Warrington, GB
DyeEx™ Spin Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Expand™ Long Template PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HotStarTaq DNA Polymerase Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAamp Blood and Tissue Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAPREP® Spin Mini Prep	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick™ PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
SigmaSpin™ Post-Reaction Purification Columns	SIGMA-Aldrich, Inc., Saint Louis, Missouri 63103, USA
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	INVITROGEN Corporation, Carlsbad, CA, USA

2.1.4 Plasmid-Vektoren

pCR® 4-TOPO® Vector	INVITROGEN, Carlsbad, Kalifornien, USA
---------------------	--

2.1.5 Primer

Die hier aufgeführten Primer wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech synthetisiert und waren HPLC-gereinigt.

Amplifikation der *env*-Region mittels nested PCR

1. PCR (Produktlänge ca. 3,2 kb)

<i>env</i> A (sense):	5'-GGCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA-3'
<i>env</i> N (antisense):	5'-CTGCCAATCAGGGAAGTAGCCTTGTGT-3'

2. PCR (Produktlänge ca. 2,9 kb)*env B* (sense): 5'-AGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA-3'*env M* (antisense): 5'-TAGCCCTTCCAGTCCCCCCTTTTCTTTTA -3'**Amplifikation der *env* V1-, V2-Region mittels semi-nested PCR****1. PCR (Produktlänge ca. 320 bp)**

SK 122 (sense): 5'-CAAAGCCTAAAGCCATGTGTA-3'

SK 123 (antisense): 5'-TAATGTATGGGAATTGGCTCAA-3'

2. PCR (Produktlänge ca. 290 bp)

JP 124 (sense): 5'-AATTAACCCCACTCTGTGT-3'

SK 123 (antisense): 5'-TAATGTATGGGAATTGGCTCAA-3'

Primer für Sequenzierreaktionen:*env*-Region**Sense:***env B*: 5'-AGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA -3'*env S-2*: 5'-CCATGTGTA AAAATTAACCCC-3'*env S-3*: 5'-GGAAAAGGAGAATGTAAAAA-3'*env S-4*: 5'-AGCACATTGTAACCTTAGT-3'*env S-4/2*: 5'-TATAAGACAAGCACATTG-3'**Antisense:***env M*: 5'-TAGCCCTTCCAGTCCCCCCTTTTCTTTTA-3'*env A-2*: 5'-TTCTATAATCCTATCTGTC-3'*env A-3*: 5'-TATTTTATATAACCACAGCC-3'*env A-4*: 5'-CTGTTGCACTATAACCAGAC-3'

V1-, V2-Region

Sense:

SK 122: 5'-CAAAGCCTAAAGCCATGTGTA-3'

JP 124: 5'-AATTAACCCCACTCTGTGT-3'

2.1.6 Puffer

2.1.6.1 Ladepuffer für Agarose-Gele

Bestandteile: Saccharose 40% [w/v], EDTA 6 mM, Bromphenolblau 0,25% [w/v]

2.1.6.2 TBE-Elektrophoresepuffer (10 x)

Es wurden 121 g Tris, 53,3 g Borsäure und 20 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt.

2.1.6.3 PCR -Puffer

10 x Expand Long Template PCR Puffer 2 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
mit 22,5 mM MgCl₂

PCR Puffer, 10 x mit 15 mM MgCl₂ QIAGEN GmbH, Hilden

2.1.7 Lösungen

2.1.7.1 Ethidiumbromid-Lösung (EtBr) für die DNA-Anfärbung im Agarose-Gel

Ethidiumbromid-Lösung Ethidiumbromid 1 µg/ml

2.1.8 DNA-Längenstandard (Marker)

Bandengröße in bp:

Marker II 23130; 9416; 6557; 4361; 2322; 2027; 564

Marker IV 19329; 7743; 6526; 4254; 3140; 2690; 2377; 1882; 1489; 1150; 925; 697; 421

Marker VIII 1114; 900; 692; 501 und 489 in einer Bande; 404; 320; 242; 190; 147; 124; 110;
67; 37, 34, 26 und 19 in einer Bande

2.1.9 Nährmedien

2.1.9.1 LB (Luria-Bertani)-Medium

Für 1 Liter LB-Medium wurden 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast Extract (Hefeextrakt) und 10 g NaCl mit A. bidest. auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde mit 1 mol/l (1 N) NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt, autoklaviert und im Kühlschrank gelagert.

2.1.9.2 LB (Luria-Bertani)-Agarplatten

Zunächst wurde LB-Medium wie unter 2.1.9.1 beschrieben hergestellt und anschließend 15 g Bacto-Agar zugegeben. Die Agar-Lösung wurde autoklaviert und anschließend bei 55°C im Wasserbad flüssig gehalten. Nach Zugabe von 1000 µl Ampicillin (50 mg/ml) wurde die gewünschte Ampicillin-Konzentration von 50 µg/ml erreicht und die Lösung unter der Sterilbank in Einweg-Petrischalen gegossen, auf Zimmertemperatur abgekühlt und im Kühlschrank gelagert.

2.1.10 Transformationskompetente Bakterien für die Klonierung

One Shot[®]TOP10 Chemically Competent *E. coli* INVITROGEN Corporation, Carlsbad, USA

2.2 Geräte und Hilfsmittel

DNA-Sequenzanalyse

ABI prism 310 Genetic Analyzer

PE Applied Biosystems, Warrington, GB

Gel-Dokumentationsanlage

INTAS, Göttingen

mit Kamera Kaiser RT 1 und

Mitsubishi Video Copy Processor

Gelelektrophoresekammer

EASY-CAST[™] Electrophoresis

Owl Scientific, Inc. Woburn, MA USA

Model # B1

Power Supply Model 500/200

BIO-RAD Laboratories, USA

Flachbett-Gelelektrophorese-Kammern

Eigenbau

mit Gelträgern und Kämmen

Power Supply Model 250/2,5

BIO-RAD Laboratories, USA

Leuchttisch

mit UV-Licht (254 nm)

INTAS, Göttingen

Mikropipetten, verschiedene Größen

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

pH-Meter

Labor pH-Meter 766

Knick, Elektronische Meßgeräte GmbH & Co., Berlin

Pipettenspitzen

z.T. gestopft, RNase- u. DNase-frei

Sarstedt, Nürnbrecht

(10, 20, 100, 200 und 1000 µl)

Greiner Labortechnik, Solingen

Reaktionsgefäße

1,5 und 2 ml Original Eppendorf Safe-Lock

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

0,5 ml

Sarstedt, Nürnbergrecht

0,2 ml

Biozym Diagnostik, Oldendorf

Sterile Werkbänke

BSB 4A

GELAIRE® Flow Laboratories, Meckenheim

Gelaire Laminar air flow, class 100

GELAIRE® Flow Laboratories, Meckenheim

Steril-BH

STERIL, S.p.A.

Thermoblock

Eppendorf ThermoStat plus

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Eppendorf Thermomixer 5436

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Thermocycler

GeneAmp PCR System 2400

Perkin Elmer, Norwalk CT, 06859 USA

T3 Thermoblock

Biometra® Biomedizinische Analytik GmbH,
Göttingen

Eppendorf Mastercycler gradient

Eppendorf AG, 22331 Hamburg

Waage

Mettler PM 1200

Mettler Toledo GmbH, Giessen

Wasserbäder

Wasserbad Typ 1002

Gesellschaft für Labortechnik m.b.H.,
Burgwedel

Wasserbad Typ 1083

GFL®-Gesellschaft für Labortechnik GmbH,
Burgwedel**Zentrifugen**

Tischzentrifuge TDX™ Centrifuge

Abbott Diagnostics Division Products GmbH

Tischzentrifuge Heraeus Biofuge 28R

Heraeus Instrumente GmbH, Düsseldorf

Tischzentrifuge Eppendorf

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Centrifuge 5415 C

Zellkulturtechnik

Tischrundschtütler Certomat® S

B. Braun Biotech International GmbH,
Melsungen

Brutschrank Kelvitron®t

Heraeus Christ, Düsseldorf

Vortex-Genie 2 Model G-560E	Scientific Industries, Inc. Bohemia, NY, USA
IKAMAG [®] Reo Magnetprüher	Janke & Kunkel GmbH, IKA [®] -Labortechnik, Staufen
Mikrowelle	Bosch, Deutschland
Kühlschränke (4°C)	verschiedene Marken
Gefrierschränke (- 20°C und - 70°C)	verschiedene Marken

2.3 Computerprogramme

BCM Search Launcher	Baylor College of Medicine (BCM) HGSC, 1.08.2002: BCM Search Launcher. http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/sequitil/seq-util.html (letztes Zugriffsdatum 4.03.2009)
ClustalW Multiple Sequence Alignment W 1.8	Baylor College of Medicine (BCM) HGSC, 26.08.2003: ClustalW 1.8. http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multialign.html (letztes Zugriffsdatum 4.03.2009)
HIV Sequence Database	Los Alamos National Security, 2009: HIV-Sequenz Database. http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html (letztes Zugriffsdatum: 4.03.2009)

2.4 Patienten

Insgesamt sind neun Hämophilie-Patienten mittels einer kontaminierten Charge eines Blutgerinnungspräparates mit HIV-1 infiziert worden. Von sechs dieser Patienten standen sowohl Serum, als auch EDTA-Vollblutproben zur Verfügung (Patient A, B, D, E, F und G). Patient C verstarb bereits 1991 an einer Hirnblutung. Patient E wurde ab Oktober 1992 mit Zidovudin (AZT = NRTI) und in 1996 mit AZT und Lamivudin (3TC = NRTI) behandelt, mußte die Therapie aber aufgrund von Hepatitis C Symptomen abbrechen und verstarb 1997 an seiner Hepatitis C Ko-Infektion. Patient B wurde seit September 2000 mit AZT und 3TC und seit März 2001 mit 3TC, Stavudin (d4T = NRTI) und Abacavir (ABC = NRTI) behandelt. Patient D wurde ab März 1993 mit AZT, ab Dezember 1995 mit AZT und 3TC und ab Oktober 1996 mit AZT,

3TC und Saquinavir (SQV = PI) behandelt. Patient F wurde ab Juni 1998 mit einer Kombination von AZT und 3TC und Nelfinavir (NFV = PI) therapiert. Die Patienten A und G wurden während des Untersuchungszeitraumes nicht antiretroviral behandelt.

Für die Etablierung der PCRs wurden eingefrorene, bzw. frische Seren oder Vollblut verschiedener positiver Patienten aus dem Institut für Virologie des Universitätsklinikum der Universität Bonn verwendet.

2.5 DNA-Isolierung aus Blut (zelluläre und provirale DNA)

Aufgrund der Tatsache, dass vor allem bei den antiretroviral therapierten Patienten häufig die Viruslast im Plasma unterhalb der Nachweisgrenze lag, konnte keine Virus-RNA isoliert werden. Die Isolierung zellulärer, proviraler HIV-DNA aus EDTA-Blut oder Lymphozyten stellte hier eine Alternative dar. Die hier aufgeführten Sequenzen stammen aus proviraler DNA.

Zur Gewinnung von proviraler DNA von vorhandenem EDTA-Blut wurde das QIAamp DNA Blood Mini Kit von QIAGEN verwendet.

2.5.1 Prinzip

Mit Zitrat, Heparin oder EDTA behandeltes Vollblut wird mittels einer Protease (QIAGEN[®] Protease) lysiert, freigesetzte DNA mit Ethanol gefällt und an eine Silica-Gel-Membran gebunden. Waschschritte beseitigen Zellreste, Proteine, andere Verunreinigungen und Inhibitoren für nachfolgende Untersuchungen, ohne die gebundene DNA abzulösen oder zu beeinträchtigen. Die gereinigte DNA wird mit einem Elutionspuffer von der Silica-Gel-Membran abgelöst und steht für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

2.5.2 Reagenzien und Materialien

Bestandteile des QIAamp Blood and Tissue Kit von QIAGEN:

QIAquick-Säulen mit 2 ml-Sammelgefäßen; lyophilisierte QIAGEN Protease; Protease-Puffer; AL-Puffer; AW-Waschpuffer 1; AW-Waschpuffer 2; AE-Puffer

Weitere Reagenzien/Materialien

RNase-freies Ampuwa; Ethanol (absolut); 1,5 ml Reaktionsgefäß; Zentrifuge; Wasserbad; Kühlschrank; Gefrierschrank; Vortex

2.5.3 Durchführung

Als Ausgangsmaterial diente frisches oder gefrorenes Vollblut. Das verwendete Kit war geeignet für die Isolierung von durchschnittlich 6 µg totaler DNA aus 200 µl Vollblut.

Zuerst wurde das Blut mit einer, laut Hersteller, komplett von RNase und DNase freien Protease (QIAGEN[®] Protease) im Milieu eines Lyse-Puffers, der die optimalen Bedingungen in Bezug auf pH und Salzkonzentration für das Enzym herstellt, lysiert.

Dazu wurde 200 µl AL-Puffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, mit 200 µl einer EDTA-Blutprobe und 20 µl Protease-Stammlösung (24 mg QIAGEN[®] Protease gelöst in 1,2 ml Proteaselösungsmittel) kurz gemischt und zehn Minuten bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Mit der Lyse wurden die Zellen samt Kern zerstört und die Zellbestandteile inklusive des genomischen Materials im Puffer gelöst.

Danach wurde kurz anzentrifugiert, 200 µl Ethanol (absolut) zugegeben, gründlich gemischt und wieder anzentrifugiert. Zugegebenes Ethanol fällte die freigesetzte DNA. Anzentrifugieren vermied eine Kontamination durch am Deckel des Reaktionsgefäßes sitzende Lysattropfen.

Nun wurde der gesamte Ansatz in eine vorbereitete QIAamp-Säule überführt und eine Minute bei 6 000 x g zentrifugiert. Dabei band die DNA fest an die Silica-Gel-Membran (QIAamp Membran), ohne sich bei den folgenden Zentrifugationsschritten zu lösen. Die Salz- und pH-Bedingungen waren so gewählt, dass Proteine und andere Verunreinigungen, die eine anschließende PCR stören könnten, nicht von der Membran zurückgehalten und bei den folgenden Waschschritten (mit Waschpuffer AW-1 und AW-2) abzentrifugiert wurden.

Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, Filtrat und das Auffanggefäß verworfen, 500 µl AW-1 Puffer hinzugegeben und wieder eine Minute bei 6 000 x g zentrifugiert. Danach wurde die Säule wieder in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, 500 µl AW-2 Puffer zugegeben und für drei Minuten bei 20 000 x g zentrifugiert.

Wieder wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt, 200 µl AE-Puffer zum Eluieren zupipettiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine Minute bei 6 000 x g zentrifugiert und das Eluat in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert oder sofort als Template in eine PCR eingesetzt.

2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: **polymerase chain reaction**, PCR) ist eine *in vitro* Methode zur selektiven Vervielfältigung einer DNA-Matrize definierter Länge.

2.6.1 Prinzip

Innerhalb kurzer Zeit kann die DNA-Zielsequenz millionenfach amplifiziert werden [Mullis und Faloona, 1987; Volkenandt et al., 1990]. Eine Schlüsselfunktion kommt dabei thermostabilen DNA-Polymerasen zu. Nach Hitzedenaturierung eines DNA-Doppelstranges zu zwei Einzelsträngen bindet ein zugegebener spezifischer Primer (Starter) an seine komplementäre Sequenz im DNA-Einzelstrang und bildet damit einen partiellen Doppelstrang. Dieser partielle Doppelstrang ist der Startpunkt der DNA-Polymerasen, um zu dem DNA-Einzelstrang die komplementäre Sequenz zu synthetisieren, so dass ein DNA-Doppelstrang entsteht [Saiki et al., 1988].

Neben einem DNA-Doppelstrang als Ausgangssequenz und der thermostabilen Polymerase werden zwei Primer, das sind spezifische Oligonukleotide, die zu jeweils einem kurzen Stück am Anfang und am Ende der Zielsequenz komplementär sind, benötigt. Für die Auswahl der Primer müssen der Anfang und das Ende der Zielsequenz bekannt sein, je nach Lage und Länge der Zielsequenz werden dann die Primer unter Beachtung bestimmter Kriterien ausgewählt. Sie sollten etwa 24 bis 34 Nukleotide lang sein, keine sich oft hintereinander wiederholenden Nukleotide aufweisen, um Bindungen mit sich selbst und dem Primerpartner zu vermeiden, und beide etwa die gleiche Schmelztemperatur besitzen. Bei der PCR wiederholen sich zyklisch drei Schritte:

1. Denaturierung

Dabei wird der Ursprungs-DNA-Doppelstrang, also das Template, in einem ersten Schritt bei 95°C denaturiert, das heißt die Wasserstoffbrücken des DNA-Doppelstrang werden gelöst, so dass zwei DNA-Einzelstränge entstehen.

2. Annealing

Im zweiten Schritt lagern sich die Primer bei einer ihnen spezifischen Temperatur an die komplementären DNA-Zielsequenzen an. Die Annealingtemperatur ist die spezifische Temperatur, bei der die Oligonukleotide mit der komplementären Zielsequenz Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und sich anlagern. Diese Temperatur ist u. a. abhängig vom Gehalt der AT- und GC-Basen, da Adenin und Thymin zwei Wasserstoffbrückenbindungen und Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.

3. Extension

Während des dritten Schrittes, der sogenannten Extension, bildet die thermostabile DNA-Polymerase, bei der Temperatur ihres optimalen Wirkungsgrades, durch den Einbau der zu den DNA-Einzelsträngen jeweils komplementären Nukleotide die komplementäre Sequenz eines jeden DNA-Einzelstrangs. Damit synthetisiert sie zwei neue identische DNA-Doppelstränge. Die Primer dienen als Startpunkte dieser Extension. Anschließend findet wieder eine Denaturierung statt und mittels Annealing und erneuter Extension wird zu den nun vorliegenden vier Einzelsträngen wieder jeweils ein komplementärer Doppelstrang von der DNA-Polymerase gebildet. Dabei kommt der DNA-Polymerase eine Schlüsselfunktion zu. Bei den meisten handelsüblichen DNA-Polymerasen handelt es sich um eine Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Sie hat ihr Temperaturoptimum bei 72°C, bleibt aber auch kurze Zeit bei 95°C stabil. Damit bleibt sie über mehrere Zyklen der PCR funktionsfähig, da sie die hohen Denaturierungstemperaturen übersteht, so dass mehrere Zyklen von DNA-Denaturierung, Primeranlagerung und Amplifizierung des komplementären Strangs hintereinander im selben Reaktionsgefäß nur durch das Ändern der Temperatur ablaufen können, ohne dass laufend neue Reagenzien hinzugegeben werden müssen. Dadurch ist es möglich, in modernen Thermocyclern innerhalb von wenigen Stunden ausreichend DNA für weitere Untersuchungen zu erhalten.

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein sehr sensitives Verfahren, bei dem theoretisch eine einzige DNA-Kopie ausreicht, um sie zu vervielfältigen. Mit dieser extremen Sensitivität besteht allerdings auch die Gefahr einer unerwünschten Kontamination der Probe [Fang et al., 1998] z. B. mit einer in einer vorherigen Amplifikation synthetisierten DNA, was zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Aus diesem Grund wurden folgende Richtlinien für alle PCR-Ansätze eingehalten [Kwok und Higuchi, 1989]:

Die Probenaufbereitung/Herstellung der PCR-Ansätze und die eigentliche Amplifikation wurden räumlich getrennt ausgeführt, um Kontaminationen aus vorherigen PCRs zu vermeiden. Die Ansätze wurden mit Nuklease- und Nukleinsäure-freien Geräten und Material hergestellt. Es wurden gestopfte Einmal-Pipetten verwendet. Bei größeren Ansätzen wurden alle gleichen Komponenten als Mastermix in einem Reaktionsgefäß zusammengegeben und anschließend in die einzelnen Ansätze aliquotiert. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden wurde die DNA immer zuletzt in einen Reaktionsansatz gegeben.

Die Untersuchungen dieser Doktorarbeit erfolgten mittels Nested- oder Semi-Nested-PCR.

Prinzip der Nested-PCR

Es wird eine äußere und eine innere PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren gestartet. Die Primer für die erste PCR werden einige Nukleinsäurepaare vor bzw. hinter der Zielsequenz gewählt. Die Primer für die zweite PCR determinieren die Zielsequenz und sind komplementär zu Sequenzen innerhalb des 1. PCR-Produkts. Sie werden in einer 2. PCR mit dem 1. PCR-Produkt als DNA-Template eingesetzt. Diese Methode erlaubt neben der Erhöhung der Sensitivität bei Proben mit wenigen Kopien der Zielsequenz auch eine Erhöhung der Spezifität.

Prinzip der Semi-Nested-PCR

Das Prinzip ist identisch mit dem der Nested-PCR mit einer inneren und äußeren PCR. Allerdings ist bei der Semi-Nested PCR einer der inneren Primer identisch mit einem der äußeren Primer.

Anwendung verschiedener Enzyme für die PCR

Zu Anfang der Versuche wurde das Expand Long Template Enzym System (ROCHE, Diagnostics, Mannheim) angewandt. Es stellte sich unter mehreren getesteten Enzymen als am besten geeignet für die Amplifikation von langen DNA-Zielsequenzen bis zu 3,2 kb aus proviraler DNA heraus. Es handelte sich hierbei um einen Enzym-Mix aus einer Standard-Taq-DNA-Polymerase und der Pwo-DNA-Polymerase. Solch ein Enzym-Mix soll besonders gut für die Amplifikation von langen DNA Zielsequenzen geeignet sein. Die Taq-DNA-Polymerase besitzt keine Kontroll-Lesefunktion für die von ihr synthetisierte DNA. Dagegen besitzt die ebenfalls thermostabile Pwo-DNA-Polymerase eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die den synthetisierten DNA-Strang mit der DNA-Matrize abgleicht und gegebenenfalls Fehler korrigiert. Ein Mix aus beiden Enzymen kann die Fehlerquote um den Faktor 10 im Vergleich zur Taq Polymerase allein reduzieren. Später wurde das HotStarTaq DNA Polymerase System von QIAGEN verwendet. Bei diesem System handelt es sich um eine Hot-Start-PCR, die die HotStarTaq Polymerase erst nach einer 15 minütigen Inkubation bei 95°C aktiviert. Dies soll die Bildung von unspezifischer DNA, falschen Primerprodukten und von Primerdimeren verhindern. Die HotStarTaq DNA Polymerase ist eine modifizierte Form einer rekombinanten 94-kDa DNA-Polymerase, die ursprünglich aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus* isoliert und in *E. coli* kloniert wurde. Sie besitzt eine Extensionsrate von zwei bis vier kb/min bei 72°C, eine Halbwertszeit von zehn Minuten bei 97°C, 60 Minuten bei 94°C und eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität und einen Extra-A-Anhang. Die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität dient zur Entfernung des Primers und kann zur direkten und spezifischen Detektion von PCR-Produkten durch Freisetzung von Fluoreszenz-Reporterfarbstoffen genutzt werden (Real-Time-PCR).

2.6.2 Nested-PCR der *env*-Region mit Expand Long Template

Die Mastermixe wurden immer auf Eis gelagert und es wurde auch auf Eis pipettiert. Sämtliche Komponenten - abgesehen vom Enzym - wurden vor Benutzung durchmischt.

Bestandteile des Expand™ Long Template PCR-Systems:

10 x Puffer Expand Long Template Nr. 2 mit 22,5 mM MgCl₂,

Expand Long Template Polymerasemix (3,5 U/μl)

Weitere Reagenzien:

Primer: *env* A (20 pmol/μl), *env* N (20 pmol/μl), *env* B (20 pmol/μl), *env* M (20 pmol/μl); dNTP-Mix (25 mM); Ampuwa (RNase frei); MgCl₂ (25 mM)

Durchführung:

1. *env*-PCR (ca. 3,2 kb): Template: DNA aus EDTA-Blutprobe isoliert nach 2.5

Mastermix (MM) 1:

Ampuwa	18,0 μl
dNTP's (25 mM)	1,0 μl
<i>env</i> A (20 pmol/μl)	0,5 μl
<i>env</i> N (20 pmol/μl)	0,5 μl
Summe	20,0 μl

Ein Vielfaches des Ansatzes (Anzahl der Proben plus 1) wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. In jedes dünnwandige 0,2 ml PCR-Röhrchen wurden 20 μl MM 1 gegeben, danach 5 μl Template DNA zupipettiert und der Ansatz weiterhin auf Eis gelagert.

Mastermix (MM) 2:

Ampuwa	17,7 μl
10 x Puffer Exp.L.T. Nr. 2	5,0 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 μl
Exp.L.T. Polymerase-Mix (3,5 U/μl)	0,8 μl
Summe	25,0 μl

Ein Vielfaches des Ansatzes wurde im 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. In jedes vorbereitete 0,2 ml PCR-Röhrchen (MM1 + DNA) wurden 25 μl MM 2 gegeben, nachdem der Polymerase-Mix zuletzt zupipettiert war. Der Ansatz wurde gemischt, so dass sich eine Gesamtansatzmenge von 50 μl ergab. Nun wurde das Programm (siehe unten) gestartet und kurz vor Erreichen der 94°C wurden die Proben in die PCR-Maschine gestellt.

PCR-Programm: (GeneAmp PCR System 2400)

94°C	2 min	
94°C	20 sec	
55°C	45 sec	} 30 Zyklen
72°C	6 min	
72°C	10 min	
4°C	unendlich	

2. env-PCR (ca. 2,9 kb): Template: PCR-Produkt aus der 1. env-PCR

Mastermix (MM) 1:

Ampuwa	19,0 µl
dNTP's (25 mM)	1,0 µl
env B (20 pmol/µl)	2,0 µl
env M (20 pmol/µl)	2,0 µl
Summe	24,0 µl

Vorgehen wie bei der ersten PCR, nur dass in jedes 0,2 ml PCR-Röhrchen 24 µl MM 1 und danach 1 µl PCR-Produkt (Template) aus der 1. PCR zupipettiert wurde.

Mastermix (MM) 2:

Ampuwa	17,7 µl
10 x Puffer Exp.L.T. Nr. 2	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
Exp.L.T. Polymerase-Mix (3,5 U/µl)	0,8 µl
Summe	25,0 µl

Vorgehen wie bei der ersten PCR, nur dass in jedem vorbereiteten 0,2 ml PCR-Röhrchen neben MM1 das Produkt aus der 1. PCR vorlag.

PCR-Programm: (GeneAmp PCR System 2400)

94°C	2 min	
94°C	20 sec	
55°C	45 sec	} 30 Zyklen
72°C	6 min	
72°C	10 min	
4°C	unendlich	

2.6.3 Nested-PCR der env-Region mit HotStarTaq Polymerase

Abgesehen vom Enzym wurden sämtliche Komponenten vor Benutzung mittels Vortex gemischt.

Bestandteile des HotStarTaq Polymerase Kits:

10 x PCR-Puffer QIAGEN mit 15 mM MgCl₂, HotStarTaq DNA Polymerase (5 units/µl)

Weitere Reagenzien:

Primer: *env* A (20 pmol/μl), *env* N (20 pmol/μl), *env* B (10 pmol/μl), *env* M (10 pmol/μl); dNTP-Mix (25 mM); Ampuwa (RNase frei)

Durchführung:

1. *env*-PCR (ca. 3,2 kb): Template: DNA aus EDTA-Blutprobe isoliert nach 2.5

Mastermix (MM):

Ampuwa	37,8 μl
dNTP's (25 mM)	0,7 μl
<i>env</i> A (20 pmol/μl)	0,5 μl
<i>env</i> N (20 pmol/μl)	0,5 μl
10 x PCR-Puffer QIAGEN	5,0 μl
HotStarTaq DNA Polymerase (5 units/μl)	0,5 μl
Summe	45 μl

Ein Vielfaches des Ansatzes (Anzahl der Proben plus 1) wurde im 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Anschließend wurde in jedes 0,2 ml PCR-Röhrchen 45 μl Mastermix aliquotiert und danach 5 μl Template DNA zupipettiert, so dass sich eine Gesamtansatzmenge von 50 μl ergab. Mittels Rühren mit der Pipettenspitze wurde gut durchmischt, der Ansatz in den Thermocycler gegeben und das Programm (s. u.) gestartet.

PCR-Programm: (T3 Thermoblock)

95°C	15 min	
94°C	1 min	
55°C	1 min	} 35 Zyklen
72°C	4 min	
72°C	10 min	
4°C	unendlich	

2. *env*-PCR (ca. 2,9 kb): Template: PCR-Produkt aus der 1. *env*-PCR

Mastermix (MM):

Ampuwa	40,8 μl
dNTP's (25 mM)	0,7 μl
<i>env</i> B (10 pmol/μl)	1,0 μl
<i>env</i> M (10 pmol/μl)	1,0 μl
10 x PCR-Puffer QIAGEN	5,0 μl
HotStarTaq DNA Polymerase (5 units/μl)	0,5 μl
Summe	49,0 μl

Vorgehen wie bei der ersten PCR, nur dass in jedes 0,2 ml PCR-Röhrchen 49 μl Mastermix aliquotiert und danach 1 μl PCR-Produkt aus der 1. *env*-PCR zupipettiert wurde.

PCR-Programm: (T3 Thermoblock)

95°C	15 min	
94°C	1 min	
55°C	1 min	} 35 Zyklen
72°C	4 min	
72°C	10 min	
4°C	unendlich	

2.6.4 Semi-Nested-PCR der V1/V2-Region mit HotStarTaq Polymerase

Abgesehen vom Enzym wurden sämtliche Komponenten vor Benutzung mittels Vortex gemischt.

Bestandteile des HotStarTaq Polymerase Kits:

10 x PCR-Puffer QIAGEN mit 15 mM MgCl₂; HotStarTaq DNA Polymerase (5 units/μl)

Weitere Reagenzien:

Primer: SK 122 (10 pmol/μl), SK 123 (10 pmol/μl), JP 124 (10 pmol/μl); Ampuwa (RNase frei); dNTP-Mix (25 mM)

Durchführung:

1. V1/V2-PCR (ca. 320 bp): Template: PCR-Produkt aus der 1. *env*-PCR

Mastermix (MM):

Ampuwa	39,8 μl
dNTP's (25 mM)	0,7 μl
SK 122 (10 pmol/μl)	1,0 μl
SK 123 (10 pmol/μl)	1,0 μl
10 x PCR-Puffer QIAGEN	5,0 μl
HotStarTaq DNA Polymerase (5 units/μl)	0,5 μl
Summe	48,0 μl

Ein Vielfaches des Ansatzes wurde im 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Anschließend wurde in jedes 0,2 ml PCR-Röhrchen 48 μl Mastermix aliquotiert und danach 2 μl PCR-Produkt aus der 1. *env*-PCR zupipettiert, so dass sich eine Gesamtansatzmenge von 50 μl ergab. Mittels Rühren mit der Pipettenspitze wurde gut durchmischt, der Ansatz in den Thermocycler gegeben und das Programm (siehe unten) gestartet.

PCR-Programm: (T3 Thermoblock)

95°C	15 min	
94°C	10 sec	
50°C	20 sec	} 40 Zyklen
72°C	30 sec	
72°C	2 min	
4°C	unendlich	

2. V1/V2-PCR (ca. 290 bp): Template: PCR-Produkt aus der 1. V1/V2-PCR

Mastermix (MM):

Ampuwa	39,8 μ l
dNTP's (25 mM)	0,7 μ l
SK 123 (10 pmol/ μ l)	1,0 μ l
JP 124 (10 pmol/ μ l)	1,0 μ l
10 x PCR-Puffer QIAGEN	5,0 μ l
HotStarTaq DNA Polymerase (5 units/ μ l)	0,5 μ l
Summe	48,0 μ l

Vorgehen wie bei der ersten PCR, nur dass in jedes 0,2 ml PCR-Röhrchen 48 μ l Mastermix aliquotiert und danach 2 μ l PCR-Produkt aus der 1. V1/V2-PCR zupipettiert wurde.

Derselbe Ansatz wurde auch bei der 2. V1/V2-PCR zur Kontrolle einer effizienten Klonierung hergestellt, mit dem Unterschied, dass nur etwa 0,3 μ l Template vorhanden waren (Bakterienklon an der Pipettenspitze) und dem entsprechend mehr Ampuwa verwendet wurde.

PCR-Programm: (T3 Thermoblock)

95°C	15 min	
94°C	10 sec	
50°C	20 sec	} 40 Zyklen
72°C	30 sec	
72°C	2 min	
4°C	unendlich	

2.7 Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese dient zur Größenbestimmung des amplifizierten PCR-Produkts.

2.7.1 Prinzip

DNA-Fragmente werden in einem Agarose-Gel nach unterschiedlicher Größe aufgetrennt. Unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten der geladenen DNA-Fragmente unter einer angelegten Gleichspannung sind entscheidend für die Auftrennung. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist abhängig von der DNA-Konformation, dem Molekulargewicht, der Fragmentlänge, der angelegten Spannung, der Temperatur des Gels, dem pH-Wert, der Salzkonzentration des Puffers und der Agarose-Konzentration, die die Porengröße des Gels bestimmt [Sambrook et al., 1989].

Je nach zu untersuchendem DNA-Fragment wird die Porengröße des Gels, also die Agarose-Konzentration, gewählt. Je größer das Fragment, desto kleiner ist die benötigte Agarose-

Konzentration, um eine praktikable Laufgeschwindigkeit und annehmbare Auftrennung zu erhalten. Das Gel wird in einen Laufpuffer eingetaucht und eine Gleichspannung an die Elektrophoresekammer angelegt. Der Laufpuffer gewährleistet die Leitfähigkeit und verhindert eine Austrocknung des Gels. Die DNA-Proben werden mit einem Ladepuffer gemischt, der Saccharose und den Farbstoff Bromphenolblau enthält. Die Saccharose erhöht die Dichte des Ladepuffers und macht ihn schwerer als den Laufpuffer. Dies bewirkt ein Absinken der Probe auf den Grund der Geltasche und verhindert damit die Verteilung der Probe in der Gelkammer. Der Farbstoff Bromphenolblau macht die Probe im Gel sichtbar, so dass die ungefähre Position der DNA-Fragmente während der Elektrophorese verfolgt werden kann. Das Gel wird nach dem Lauf in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt, um die unterschiedlichen DNA-Banden zu detektieren. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der doppelsträngigen DNA. Mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 250$ bis 310 nm können die DNA-Fragmente ab einer Menge von circa 10 ng sichtbar gemacht werden. Ein DNA-Längenstandard wird parallel mit aufgetrennt, um die Größe der aufgetrennten DNA-Banden abzuschätzen.

2.7.2 Reagenzien und Materialien

Elektrophoresekammer mit Gleichspannungsquelle; Gelkammer mit Kamm; Seakem LE Agarose (2.1.1); NuSieve GTG Agarose (2.1.1); Ethidiumbromid-Lösung (2.1.7.1); Gel-Ladepuffer (2.1.6.1); 1 x TBE-Puffer (2.1.6.2)

2.7.3 Durchführung

Für die Auftrennung der circa $2,9$ kb bis $3,2$ kb großen *env*-Stücke (2. bzw. 1. *env*-PCR), aber auch der ca. 290 und 320 bp (2. bzw. 1. V1/V2-PCR) großen V1/V2-Stücke von HIV-1 wurde ein 1%iges Agarose-Gel hergestellt. Dazu wurden $1,0$ g Seakem LE Agarose abgewogen, mit 1 x TBE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt und in der Mikrowelle durch Aufkochen vollständig gelöst. Nachdem das Gel auf circa 50°C abgekühlt war, wurde es auf einen Gelträger mit Kamm (zur Herstellung der Geltaschen) gegossen, so dass ein etwa 5 mm dickes Gel entstand. Etwa zwanzig Minuten später hatte das Gel eine feste Konsistenz und konnte in eine horizontale Elektrophoresekammer mit 1 x TBE Puffer gegeben werden. Von der 1. *env*-PCR und der 1. und 2. V1/V2-PCR wurden je 8 μl Amplifikat mit 1 μl Ladepuffer gemischt und in eine Geltasche gegeben. Von der 2. *env*-PCR wurde aufgrund der größeren DNA-Menge im Amplifikat nur 1 μl Amplifikat mit 7 μl TBE-Puffer und 1 μl Ladepuffer gemischt und in die Geltasche pipettiert. In

die äußeren Geltaschen wurde je nach Amplifikat 1 µl Längenstandard Nr. II gemischt mit 7 µl TBE-Puffer und 1 µl Ladepuffer, 1 µl Längenstandard Nr. IV gemischt mit 7 µl TBE-Puffer und 1 µl Ladepuffer, oder 2 µl Längenstandard Nr. VIII gemischt mit 6 µl TBE-Puffer und 1 µl Ladepuffer gegeben. Nun wurde eine Spannung von 170 bis 180 Volt für etwa sechzig Minuten angelegt. Daraufhin schloß sich für fünfzehn bis dreißig Minuten die Ethidiumbromid-Färbung an. Zum Schluß konnten die DNA-Banden mit UV-Licht detektiert und computergestützt mit einer Geldokumentationsanlage (INTAS) fotografiert werden.

2.8 PCR Purifikation

Nachdem die Größe der Zielsequenz mittels Gelbild und Markervergleich bestätigt wurde, schloss sich eine Reinigung der amplifizierten DNA an, bevor sie z. B. sequenziert wurde. Dazu wurde das QIAquick PCR Purifikation Kit der Firma QIAGEN verwendet.

2.8.1 Prinzip

Mittels einer Silica-Gel-Membran und verschiedenen Waschschritten lässt sich amplifizierte DNA von den unerwünschten Komponenten des PCR-Ansatzes trennen.

Doppelsträngige DNA bindet unter Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen an die Silica-Membran, während die einzelsträngigen Primer, die dNTPs und sehr kurze, doppelsträngige DNA die Silica-Membran passieren. Anschließend läßt sich die DNA mit Hilfe eines Elutions-Puffers, in dem sie sich löst, von der Silica-Membran ablösen.

Jede QIAquick Säule, mit der Silica-Gel-Membran, hat die Fähigkeit bis zu 10 µg DNA zu binden. Ein spezieller Bindungspuffer (PB-Puffer) mit entsprechender Salzkonzentration und pH-Wert stellt die optimalen Bedingungen zur DNA-Adsorption an die Silica-Membran bereit. Die Adsorption von Nukleinsäuren an Silica-Gel-Oberflächen findet nur in Anwesenheit von hohen Konzentrationen chaotropischen Salzes statt [Vogelstein und Gillespie, 1979], das die Struktur von Wasser verändert [Hamaguchi und Geiduschek, 1962]. Des Weiteren wird bei einem $\text{pH} < 7,5$ eine Adsorption der DNA von bis zu 95% erreicht, während bei einem pH-Anstieg auf über 7,5 dieser Grad der Adsorption drastisch abfällt.

Mit dem PB-Puffer passieren überschüssige Primer, Salze, Enzyme, Nukleotide, Agarose und Farbstoffe die Säule ohne an die Silica-Membran zu binden. Der ethanolhaltige PE-Puffer wäscht anschließend alle Salze aus der Säule. Dabei muß darauf geachtet werden, dass der PE-Puffer, der

mit enzymatischen Reaktionen interferieren kann, anschließend mittels einer zusätzlichen Zentrifugation vollständig entfernt wird.

Die DNA läßt sich mit dem Elutionspuffer EB von der Silica-Gel-Membran lösen. Dabei ist die Lösungswirksamkeit am Besten, wenn der Elutionspuffer eine niedrige Salzkonzentration und einen pH-Wert von 7,0 bis 8,5 aufweist. Es können 30 bis 200 µl Elutionspuffer eingesetzt werden. Damit lässt sich die Endkonzentration der eluierten DNA variieren.

2.8.2 Reagenzien und Materialien

- PCR-Purifikation-Kit von QIAGEN: Puffer PB (Bindungspuffer), Puffer PE (Waschpuffer), Puffer EB (Elutionspuffer), Silica-Gel-Säulen
- 1,5 ml Reaktionsgefäße

2.8.3 Durchführung

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei höchster Rotationsgeschwindigkeit ($\geq 10\ 000 \times g$) mit einer konventionellen Tischzentrifuge durchgeführt.

Ein Volumenanteil PCR-Produkt und fünf Volumenanteile Puffer PB wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Proben wurden gut gemischt und die Lösung auf eine QIAquick-Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen gegeben und eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säulen wieder auf die gleichen Reaktionsgefäße gesetzt. Nun wurden 750 µl Puffer PE auf die Säulen pipettiert und eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluß wurde wieder verworfen und die Säulen wieder auf die gleichen Reaktionsgefäße gesetzt. Danach wurde eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und Säulen auf neue 1,5 ml Reaktionsgefäße plaziert. Schließlich wurden 50 µl EB-Puffer auf die Säulen pipettiert, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und eine Minute zentrifugiert.

Das Eluat konnte bei -20°C gelagert werden, wobei sichergestellt wurde, dass der Elutionspuffer in einem pH-Bereich von 7,0 bis 8,5 lag, um Degradation der DNA zu vermeiden.

2.8.4 Gelbild

Zur Dokumentation und Kontrolle wurde nach der Aufreinigung meist eine Agarose-Gel-Elektrophorese und ein Gelbild wie unter 2.7.3 beschrieben angefertigt. Es wurde je 1 µl DNA mit 7 µl TBE-Puffer und 1 µl Ladepuffer vermischt in die Geltaschen gefüllt.

2.9 Kultivierung von Bakterien

Bakterien gehören zu den heterotrophen bzw. Kohlenstoff-heterotrophen Organismen. Sie benötigen dementsprechend ein Nährmedium, das ihnen organische Kohlenstoffverbindungen zur Deckung ihres Kohlenstoff- und Energiebedarfs und manchmal auch organisch gebundenen Stickstoff für ihre Proteinsynthese zur Verfügung stellt. Desweiteren sind für sie Wasser und eventuell zusätzlich Mineralien, Spurenelemente und Vitamine als Wachstumsfaktoren essentiell. Im in der vorliegenden Arbeit für die Anzucht von *Escherichia coli* Bakterien verwendeten Luria-Bertani- (LB-) Medium befinden sich im Trypton tierische oder pflanzliche Eiweiße als Kohlenstofflieferanten und im Hefeextrakt die benötigten Wachstumsfaktoren, vor allem die Vitamine des B-Komplexes.

Für die Klonierung werden im Allgemeinen Bakterienstämme verwendet, die keine Resistenz gegenüber Antibiotika verfügen. Erst im Rahmen einer Transformation mit einem Plasmid werden Resistenzgene für bestimmte Antibiotika in das Bakterium gebracht. In diesem Falle das Gen für die Information zur Herstellung von Beta-Lactamase, mit deren Hilfe das Antibiotikum Ampicillin abgebaut wird. In der Folge wachsen allein erfolgreich transformierte Bakterien mit Plasmid in Antibiotika-haltigen Nährmedien. Je nach Zielsetzung werden Bakterien entweder in Fest- oder Flüssigmedien kultiviert.

2.9.1 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedien

Flüssige Nährmedien finden ihre Verwendung vor allem bei der Anreicherung von Bakterien und ihrer DNA mitsamt der extrachromosomalen DNA z. B. in Form von Plasmiden. Liegen die Bakterien in ausreichender Menge vor können sie auf ihre Eigenschaften untersucht oder die mit ihnen vervielfältigten Plasmide isoliert werden.

2.9.1.1 Herstellung von LB (Luria-Bertani)-Medium

Für 1 Liter LB-Medium wurden 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast Extract (Hefeextrakt) und 10 g NaCl mit A. bidest. auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde mit 1 mol/l (1 N) NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt, autoklaviert und im Kühlschrank gelagert.

2.9.2 Kultivierung von Bakterien in Festmedien

Festmedien werden wie normale Flüssignährmedien mit allen für die Bakterien benötigten Inhaltsstoffen hergestellt, allerdings wird noch Agar-Agar als für die Bakterien atoxisches Geliermittel hinzugefügt, so dass das Nährmedium bereits bei 45 bis 48°C erstarrt und sich erst bei Temperaturen zwischen 80 und 100°C wieder verflüssigt.

Solche Festmedien finden vor allem in der Isolierung von Reinkulturen mittels des fraktionierten Drei-Ösen-Ausstrichs Verwendung, um isoliert und vereinzelt liegende Kolonien herzustellen. Eine Kolonie ist im Idealfall die, durch viele Teilungsschritte aus einer einzigen Zelle hervorgegangene, Ansammlung weitgehend erbgleicher Individuen.

Die hier verwendeten LB-Agarplatten enthielten 50 µg/ml Ampicillin und wurden zum Nachweis der Transformationseffizienz nach einer Klonierung wie unter 2.10 beschrieben eingesetzt und zum Anlegen von Reinkulturen auf einer Masterplatte verwendet.

2.9.2.1 Herstellung von LB (Luria-Bertani)-Agarplatten

Zunächst wurde 1 l LB-Medium wie unter 2.9.1.1 beschrieben hergestellt. Danach wurden 15 g Bacto-Agar zugegeben. Der Agar wurde autoklaviert und anschließend bei 55°C im Wasserbad flüssig gehalten. Nach Zugabe von 1000 µl Ampicillin (50 mg/ml) wurde die gewünschte Ampicillin-Konzentration von 50 µg/ml erreicht und das Nährmedium in einer Sterilbank in Einweg-Petrischalen gegossen, auf Zimmertemperatur abgekühlt und im Kühlschrank gelagert.

2.9.3 Lagerung von Bakterien/Glycerinkulturen

Die kurzfristige Lagerung von Bakterien erfolgte nach Verschluss der bewachsenen Platten mit Parafilm bei 4°C im Kühlschrank. Zur langfristigen Lagerung wurden Glycerin-Dauerkulturen hergestellt. Dazu wurde 1 ml Flüssigkultur mit 250 µl sterilem Glycerin (85%ig) mittels Invertieren zu einer homogenen Flüssigkeit gemischt und im Gefrierschrank bei -70°C eingefroren.

2.10 DNA-Klonierung

Bei einigen Proben waren nach der PCR zwei eng nebeneinander liegende Banden oder eine dicke Bande im Bereich der gesuchten Genlänge sichtbar. Dies ließ auf das Vorhandensein unterschiedlicher HIV-1 Stämme von unterschiedlicher Länge des *env*-Gens in der verwendeten Blutprobe schließen. Bei anderen Proben traten in der Sequenzierung (Methode unter 2.12

beschrieben) zwei sich überlagernde HIV-Quasispezies auf, so dass sich das Chromatogramm nicht eindeutig auswerten ließ. In diesen Fällen war zur eindeutigen Identifizierung der HIV-Quasispezies eine Klonierung erforderlich.

2.10.1 Prinzip

Klonieren bedeutet die identische Vervielfältigung einer bestimmten DNA im lebenden Organismus. Dazu wird eine amplifizierte Nukleotidsequenz mit Hilfe eines geeigneten Vektors in einen anderen Organismus eingeschleust. Dieser Vorgang wird bei Prokaryonten Transformation genannt. Vektoren sind DNA-Moleküle, die ein fremdes DNA-Fragment als Insert aufnehmen und mit diesem in einer Wirtszelle vermehrt werden können. Gut geeignet zur Klonierung ist ein sich sehr schnell unter einfachen Bedingungen vermehrendes Bakterium, wie *Escherichia coli*. Plasmide, als kleine, ringförmige, doppelsträngige, extrachromosomale DNA-Moleküle, besitzen neben der Information in einen anderen Organismus eingeschleust bzw. aufgenommen zu werden, selektive Eigenschaften wie z. B. Chemotherapeutika-Resistenzen, die sie auf den Organismus übertragen können und einen Replikationsursprung (origin), über den sie sich unabhängig vom Bakterienchromosom vervielfältigen können. [Williams und Patient, 1991; Alberts et al., 1995]

Der Vorteil der Klonierung ist, dass von mehreren amplifizierten Nukleotidsequenzen immer nur eine vom Vektor in den Organismus eingeschleust und von diesem vermehrt wird. Somit kann man mit der Untersuchung mehrerer Klone des Organismus die meisten vorhandenen in einer PCR-Reaktion amplifizierten Nukleotidsequenzen einzeln untersuchen.

In dieser Arbeit wurde das TOPO[®] TA Cloning Kit der Firma Invitrogen verwendet, welches auch zur Insertion großer PCR-Produkte geeignet ist.

2.10.1.1 Insertion des PCR-Produktes in den Plasmid-Vektor (TOPO[®] Cloning Reaktion)

Bei dem pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor des hier verwendeten TOPO TA Cloning[®] Kits for Sequencing handelt es sich um einen Vektor der pUC-Serie mit dem CoIE1 als Replikationsursprung (pUC-origin), durch den sich diese Moleküle bis zu vielen tausend Kopien pro Zelle vermehren [Williams und Patient, 1991]. Weiterhin verfügen sie über die genetische Information für eine Ampicillin- und eine Kanamycin-Resistenz, über ein LacZ α -ccdB-Gen und über Primerbindungsstellen für den M 13 reverse und forward Primer, den T3 und den T7 Primer. Der

Plasmid Vektor, pCR[®]4-TOPO[®], wird linearisiert geliefert mit einzelnen 3'-Thymidin (T) Überhängen und einer Topoisomerase I, die kovalent an den Vektor gebunden ist. Damit ist das Kit für den Einbau von mit Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten in den Plasmid-Vektor geeignet, da die Taq-Polymerase eine nicht-Template-abhängige terminale Transferase-Aktivität besitzt, die einzelne Desoxyadenosine (A) an das 3'-Ende ihrer PCR-Produkte hängt. Dies ermöglicht die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den 3'-Adenosin-Überhängen des Amplifikates und den 3'-Thymidin-Überhängen des Vektors. Durch die anschließende Ligation wird das Amplifikat kovalent in den Vektor eingebaut.

Die kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I stammt aus dem Vaccinia Virus und ist zuständig für die Ausbildung von kovalenten Bindungen des PCR-Produkts mit dem Vektor während der Ligation. Die Topoisomerase I bindet an spezifische Nukleotid-Sequenzen von Duplex-DNA des Vektors und spaltet das Phosphodiester-Rückgrat nach einer 5'-CCCTT-Sequenz in einem Nukleotid-Strang [Shuman, 1991; Shuman, 1994]. Die Energie der gespaltenen Phosphodiesterbindung wird in der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Strangs und einem Tyrosyl-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I gespeichert. In der Folge kann die Phospho-Tyrosyl-Bindung zwischen DNA und Enzym von dem 5'-Hydroxyl der amplifizierten DNA angegriffen werden, was zu einer Reaktionsumkehr führt und die Topoisomerase unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen PCR-Produkt und Plasmid-Vektor freisetzt. Das Hinzufügen einer Salzlösung (200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) bei der TOPO[®] Cloning Reaktion erhöht die Zahl der transformierten *E. coli*, sekundär auch durch eine mögliche Verlängerung der Inkubationszeiten auf bis zu dreißig Minuten. Die Salzlösung beugt einer Wiederanbindung der abgelösten Topoisomerase I an die DNA und eine potenzielle Beschädigung der DNA nach der Ligation des PCR-Produkts durch die Topoisomerase I vor.

2.10.1.2 Transformation des PCR-Produkt haltigen Plasmids in *E. coli*

E. coli Bakterien sind deshalb als Empfänger-Organismus für ein PCR-Produkt-haltiges Plasmid geeignet, da sie sich durch eine hohe Vermehrungsrate und eine große Akzeptanz gegenüber vielen verschiedenartigen Plasmiden auszeichnen. Auch unter natürlichen Bedingungen findet eine Aufnahme von Plasmiden in Bakterien statt. *In vitro* werden allerdings transformationskompetente *E. coli* Zellen verwendet, um eine effektive Aufnahme der konstruierten Plasmide und damit eine hohe Ausbeute an rekombinanten Bakterienzellen zu erhalten. Transformationskompetent werden die *E. coli* Zellen mittels einer speziellen chemischen

Behandlung (z. B. Calciumchlorid bei gramnegativen Bakterien), die die Zellwand der Zellen permeabel für fremde DNA macht, um die Aufnahme der Plasmid-DNA in das Zellinnere zu erleichtern. Setzt man die *E. coli* Zellen einem Hitzeschock aus, beschleunigt sich dieser Vorgang noch zusätzlich. In in dieser Arbeit verwendeten TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing waren chemisch kompetente *E. coli*-Zellen vom Stamm OneShot[®] TOP10 enthalten.

2.10.1.3 Selektion der erfolgreichen Transformation

Der Plasmid-Vektor, pCR[®]4-TOPO[®], verfügt sowohl über die genetische Information für eine Ampicillin- als auch Kanamycin-Resistenz. Erfolgreich transformierte *E. coli* Bakterienzellen erhalten mittels der genetischen Information des Plasmids diese beiden Antibiotika-Resistenzen. Zur Selektion der transformierten Bakterienzellen macht man sich dies zunutze, in dem Wachstum und Vermehrung der *E. coli* Bakterien in Ampicillin- oder Kanamycin-haltigen Nährmedien erfolgt. Daneben verfügt der Plasmid-Vektor aber noch über das *ccdB*-Gen, welches für *E. coli* letal wirkt und mit dem C-Terminus eines *lacZ* α -Fragments fusioniert ist. Erfolgreiche Ligation eines PCR-Produkts in den Plasmid-Vektor unterbricht die Expression des *lacZ* α -*ccdB*-Gens, das damit ausgeschaltet wird, wodurch nur rekombinanten Bakterien das Wachstum ermöglicht wird. Der Vektor erlaubt also eine direkte Selektion von Rekombinanten via Unterbrechung des für *E. coli* letalen Gens *ccdB* [Bernard und Couturier, 1992; Bernard et al., 1993; Bernard et al., 1994].

2.10.2 Reagenzien und Materialien

Es wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing von INVITROGEN verwendet, welches eine Salzlösung, den pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor, Reaktionsgefäße mit OneShot[®] TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* und S.O.C.-Medium (komplexes Nährmedium zur Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien) enthält. Desweiteren wurden benötigt: 0,2 ml Reaktionsgefäße, Eis, Wasserbad, temperierbarer Bakterien-Schüttler, Brutschrank, LB-Platten, Bunsenbrenner und ein Drigalski-Spatel.

2.10.3 Durchführung

Zuerst wurde ein Wasserbad auf 42°C vorgeheizt, das S.O.C.-Medium aus dem Kühlschrank auf Raumtemperatur äquilibriert und die Ampicillin-haltigen LB-Platten auf 37°C aufgewärmt. Anschließend wurde die TOPO[®]Cloning Reaktion angesetzt. Dazu wurde in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß 4,0 μ l des frischen und gereinigten PCR-Produkts, 1 μ l der Salzlösung aus dem

Kit und 1 µl pCR[®]4-TOPO[®]Vektor gegeben und mit der Pipettenspitze vorsichtig gerührt. In Abhängigkeit von der Länge des zu klonierenden PCR-Produkts wurde nun fünf Minuten (beim V1/V2-PCR-Produkt) oder dreißig Minuten (beim *env*-PCR-Produkt) bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt. Für die Transformation wurden 2,0 µl der vorangegangenen TOPO[®]Cloning Reaktion zu einer Ampulle mit auf Eis aufgetauten OneShot[®] TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* Zellen pipettiert und durch Rühren mit der Pipettenspitze vermischt. Es folgte eine fünf minütige Inkubationszeit auf Eis für die TOPO[®]Cloning Reaktion mit dem V1/V2-PCR-Produkt und eine dreißig minütige Inkubationszeit auf Eis für die TOPO[®]Cloning Reaktion mit dem *env*-PCR-Produkt. Daran anschließend wurden die Ampullen in das exakt 42°C warme Wasserbad für dreißig Sekunden gehalten. Sofort erfolgte der Transfer der Reaktionsgefäße auf Eis. In der Sterilbank wurden 250 µl raumtemperiertes S.O.C. Medium in die Ampulle gegeben, diese gut verschlossen und horizontal auf einem temperierbaren Tischrundschtütler (Certomat[®]S, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) bei 37°C und 200 rpm für eine Stunde geschüttelt.

Hieran schloss sich das Ausstreichen von 100 µl der Transformation auf die vorgewärmten LB-Platten mit einem Drigalski-Spatel an. Dies erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach mehreren Versuchen erwiesen sich 100 µl der Transformation als die geeignete Menge, um einerseits ausreichend Kolonien, andererseits genug vereinzelt liegende Kolonien der transformierten *E. coli* Bakterien zu erzielen. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Die gesamte Klonierung erfolgte in Laboratorien der gentechnischen Sicherheitsstufe S1 bzw. S2.

2.11 Methoden zur Analyse und Aufbewahrung der Klonierungsprodukte

Für eine kurzzeitige Aufbewahrung von Klonierungsprodukten als Sammlung einzelner Bakterienkolonien eignet sich eine sogenannte Masterplatte. Auf ihr wachsen mehrere Kolonien identifizierbar durch ein Raster. Mittels PCR können die Klone weiter untersucht werden. Flüssigkulturen der Klone dienen als Vorstufe zur Anlage von Glycerindauerkulturen, mit denen die klonierten Bakterienkulturen dauerhaft im Gefrierschrank bei -70°C für spätere Versuche aufbewahrt werden können. Zudem können aus Flüssigkulturen Plasmidpräparationen angeschlossen werden, d.h. das vervielfältigte gesuchte genetische Material wird isoliert und

kann bei -70°C im Gefrierschrank dauerhaft für spätere Untersuchungen aufbewahrt werden.

2.11.1 Anlegen einer Masterplatte

Hierzu diente eine vorgewärmte LB-Agarplatte mit 50 µg/ml Ampicillin, auf die ein Raster mit Nummerierung zur Identifizierung der Kolonien eingezeichnet wurde. Nach der erfolgreichen Bebrütung des transformierten *E. coli* Kulturen-Ausstrichs wurden vereinzelt liegende Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze auf die Masterplatte in das Raster geimpft. Der Rest der abgeimpften Kolonie auf der Pipettenspitze wurde für eine Insert-spezifische PCR und eine Flüssigkultur wie im Weiteren beschrieben verwendet. Währenddessen wurde die Masterplatte bei 37°C über Nacht im Brutschrank bebrütet, am nächsten Morgen das Wachstum der Kolonien kontrolliert und die Platte mit Parafilm verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt.

2.11.2 Kontroll V1/V2-PCR der gepickten Bakterienkolonien

Es wurde die 2. V1/V2-PCR mit den gepickten Bakterienklonen wie unter 2.6.4 beschrieben durchgeführt. Die ehemals sterile Pipettenspitze mit der abgeimpften Kolonie wurde nur kurz im 0,2 ml Reaktionsgefäß mit dem fertigen Mastermix gerührt und die Reaktion sofort im Thermocycler gestartet.

2.11.3 Anlage von Flüssigkulturen

Für die benötigte Anzahl an Flüssigkulturen wurde LB-Medium mit Ampicillin (50 mg/ml) im Verhältnis 1:1000 versetzt. Nun wurde in sterile Reagenzgläser mit Deckel 2 ml dieses sterilen LB-Mediums mit Ampicillin pipettiert und die Pipettenspitze mit dem Rest des abgeimpften Bakterienklones hineingeworfen, das Reagenzglas verschlossen und auf dem Tischrundschtler (Certomat®S, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen) bei 37°C mit 200 rpm über Nacht bebrütet. Nach zwölf bis sechzehn Stunden konnte anhand der Trübung des Mediums das Bakterienwachstum kontrolliert werden. Von allen Kulturen mit sichtbarer Trübung wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt und ggfs. eine Plasmidpräparation angeschlossen.

2.11.4 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem „QIAprep[®] Miniprep Kit for Purification of Plasmid DNA“ der Firma QIAGEN.

2.11.4.1 Prinzip

Generell werden Plasmide von Bakterienkulturen gewonnen, die in Gegenwart eines selektiven Stoffes, wie einem Antibiotikum gewachsen sind. Weiterhin sollten die Kulturen nur aus einer Kolonie gewachsen sein, die von einer Platte gepickt wurde und in 1 bis 5 ml Antibiotikumhaltigen Mediums nicht länger als zwölf bis sechzehn Stunden gewachsen ist, um eine hohe Plasmidausbeute sicherzustellen. Geeignet ist das Verfahren für bis zu 20 µg high-copy Plasmid DNA von 1 bis 5 ml Übernacht-Kulturen von *E. coli* in Luria Bertani-Medium. Die QIAprep[®] Miniprep Prozedur basiert auf einer alkalischen Lysis der Bakterienzellen gefolgt von einer Adsorption der DNA auf Silica in Gegenwart von hoher Salzkonzentration.

Das Verfahren besteht aus 3 Basisschritten:

Alkalische Lyse der Bakterien und Ausfällung des Lysats

Die QIAprep-Methode bedient sich der modifizierten alkalischen Lysis-Methode von Birnboim und Doly [Birnboim und Doly, 1979]. Bakterien werden unter alkalischen Bedingungen lysiert, darauffolgend neutralisiert und in ein Milieu hoher Salzkonzentration für optimale Bindungsbedingungen gebracht. Lysispuffer P2 beinhaltet NaOH und SDS in Anwesenheit von RNase A, um die Bakterienzellen alkalisch zu lysieren und die bakterielle RNA zu eliminieren [Birnboim, 1983]. SDS löst die Phospholipid- und Proteinkomponenten der Zellmembran, führt also zur Zellyse und Freisetzung der Zellkomponenten, während die chromosomale und Plasmid-DNA, ebenso wie die Proteine, unter den alkalischen Bedingungen denaturiert werden. Eine optimale Lysedauer erlaubt maximale Freisetzung von Plasmid-DNA, ohne chromosomale DNA freizusetzen und minimiert Denaturierung der Plasmid-DNA. Neutralisationspuffer N3 neutralisiert und schafft die hohe Salzkonzentration, die zur Präzipitation von denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA und zellulären Trümmer führt, während die kleinere Plasmid-DNA korrekt renaturiert und in Lösung bleibt.

DNA Adsorption an die Silica-Gel-Membran

Die DNA wird selektiv in Anwesenheit eines Puffers hoher Salzkonzentration an die Silica-Gel-Membran gebunden, während RNA, zelluläre Proteine und Metaboliten nicht von der Membran zurückgehalten werden.

Waschen und Eluieren der Plasmid-DNA

Puffer PB (Bindungspuffer) entfernt in einem kurzen Waschschrift Endonukleasen, die Plasmid-DNA angreifen können. Puffer PE (Waschpuffer) entfernt Salze und Puffer EB (Elutions-Puffer) löst aufgrund seiner niedrigen Salzkonzentration die Plasmid-DNA von der Membran. Die Elutionseffektivität ist pH-abhängig und erreicht ihr Maximum bei einem pH zwischen 7,0 und 8,5.

2.11.4.2 Reagenzien und Materialien

Bestandteile des QIAprep Spin Miniprep Kits der Firma QIAGEN sind: QIAprep spin Säulen mit 2 ml Sammelgefäß, P1-Puffer, P2-Puffer, N3-Puffer, PB-Puffer, PE-Puffer, EB-Puffer und RNase A. Außerdem werden Ethanol und 1,5 ml Reaktionsgefäße benötigt.

2.11.4.3 Durchführung

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Tischzentrifuge bei $> 10\ 000 \times g$ durchgeführt. RNase A Lösung wurde im Vorfeld zu Puffer P1 gegeben und dieser im Kühlschrank aufbewahrt. Zu Puffer PE wurde Ethanol gegeben. Eventuell vorhandene Salzpräzipitate in Puffer P2 oder N3 wurden vor der Plasmidisolierung bei 37°C gelöst.

Von einer Übernachtskultur wurden 1 ml in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen und das Bakterienzellpellet in 250 μl Puffer P1 resuspendiert. 250 μl Puffer P2 wurden hinzugefügt und vorsichtig mittels vier bis sechs maligem Invertieren gemischt. Nach Hinzufügen von 350 μl Puffer N3 wurde sofort vier bis sechs mal invertiert, um lokalisierte Präzipitationen zu vermeiden. Ein weißer Niederschlag zeigte die gefällten Proteine an. Danach wurde zehn Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, wobei sich der Niederschlag an der Wand des Reaktionsgefäßes ablagerte. Die klaren Überstände wurden auf eine QIAprep-Säule überführt, es wurde eine Minute zentrifugiert und der Durchfluß abgegossen. Nun wurden 500 μl Bindungspuffer PB hinzupipettiert, für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Daraufhin wurden 750 μl Waschpuffer PE hinzugegeben, wieder für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluß abgegossen. Es erfolgte ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt für eine Minute, um alle Pufferreste sicher zu entfernen, da das im Puffer enthaltene Ethanol nachfolgende enzymatische Reaktionen inhibieren kann. Die QIAprep Säule wurde in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt, 50 μl Puffer EB auf das Zentrum des Silica-Gels pipettiert und eine Minute inkubiert. Anschließend wurde eine Minute zentrifugiert und die Plasmid-Lösung bei -70°C gelagert.

2.12 DNA-Sequenzierung

Mit Hilfe des ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 von PE Biosystems und dem ABI prism 310 Genetic Analyzer wurde die Abfolge der Nucleobasen (Sequenz) der PCR-Produkte bestimmt.

2.12.1 Prinzip

Es wurde eine Abwandlung der kontrollierten De-novo-DNA-Synthesemethode mit Kettenabbruch nach Sanger [Sanger et al., 1977] angewendet. Mit der ursprünglichen Methode nach Sanger wird DNA entlang der zu sequenzierenden DNA-Vorlage von einem festgesetzten Anfangspunkt aus neu synthetisiert und die Synthese nukleotidspezifisch abgebrochen. Dazu wird eine einzelsträngige DNA-Vorlage benötigt, die durch Hitze oder alkalische Denaturierung aus doppelsträngiger DNA gewonnen wird. Als Startpunkt der Synthese ist ein Oligonucleotid-Primer vonnöten. Die DNA-Polymerase synthetisiert den neuen Strang, indem sie die vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs oder Nucleobasen: Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin), die Bestandteil der DNA sind, zu einer Kette polymerisiert. Abgebrochen wird die DNA-Synthese durch den Einbau von Dideoxy-Derivaten der Nucleosidtriphosphate (ddNTPs), denen die Hydroxylgruppe in der 3'-Position des Desoxyribose-Ringes, die für die Kettenverlängerung essenziell ist, fehlt. In vier verschiedenen Reaktionen wird nun jeweils die DNA-Synthese vom gleichen Startpunkt (Primer) mit einem der vier ddNTPs in geringer Konzentration und den anderen vier dNTPs im Überschuss durchgeführt. Immer wenn zufällig ein markiertes ddNTP in die Kette eingebaut wird, endet die DNA-Synthese, so dass DNA-Stränge verschiedener Länge entstehen, die an allen möglichen Positionen mit dem markierten ddNTP enden und daher die ganze DNA-Sequenz des Template repräsentieren. Durch die Festlegung des Anfangspunktes mit dem Primer spiegelt die Länge der Synthesefragmente in einer Reaktion die relative Position des jeweiligen ddNTPs im Molekül wieder. Zur Bestimmung der DNA-Sequenz werden die vier Reaktionen auf einem Polyacrylamid-Sequenzgel nebeneinander entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Die Sequenz ergibt sich nach der Reihenfolge der Signale der markierten ddNTPs und der Zuordnung zu den vier DNA-Basen gemäß den Reaktionsansätzen.

Diese Methode wird in der Fluoreszenz-Sequenzierung mit dem ABI prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und dem ABI prism 310 Genetic Analyzer

folgender Maßen abgewandelt:

Anstelle von vier Reaktionsansätzen werden die vier ddNTPs jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, so dass eine Sequenzierreaktion mit allen vier ddNTPs ausreicht. Die räumliche Trennung der Sequenzfragmente durch die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wird nun mittels einer Trennung durch zeitliche Differenz der Laufzeiten in einer Kapillare, die ein Polymergel enthält, bis zu einem emissionsinduzierenden Laserstrahl ersetzt. Der Laserstrahl regt die Fluoreszenzfarbstoffe an und anhand der Emission kann das jeweilige ddNTP mittels eines Detektors (optisches Spiegelsystem und Kamera) sofort registriert und die Sequenz online bestimmt werden. Durch die Verwendung von Kapillaren wird die Laufzeit herabgesetzt. Außerdem müssen geringere Mengen Template eingesetzt werden, als in traditionellen Sequenzierungsmethoden.

Das verwendete Enzym AmpliTaq DNA Polymerase, FS ist eine Variante der hitzestabilen *Thermus aquaticus* DNA Polymerase, die eine Punktmutation im aktiven Zentrum besitzt. Dadurch verändert es seine Akzeptanz gegenüber Didesoxynukleotiden, die dadurch leichter eingebaut werden. Eine zweite Mutation entfernt die 5'→3' Nukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase. Außerdem wurde zu der Polymerase eine thermostabile anorganische Pyrophosphatase gegeben, um mit der Pyrophosphorolyse verbundene Probleme auszuschalten. Im Ready Reaction Mix sind bereits Dye Terminators (Fluoreszenzfarbstoff markierte ddNTPs), dNTPs, AmpliTaq DNA Polymerase, Pyrophosphatase, Magnesiumchlorid und Puffer vorgemischt. DNA sollte vor der Sequenzierreaktion von durch die PCR hervorgerufenen Verunreinigungen gereinigt werden.

Der empfohlene Reaktionsansatz enthält folgende Komponenten:

Terminator Ready Reaction Mix	8 µl
doppelsträngige DNA	200-500 ng
Primer	3,2 pmol
deionisiertes Wasser	fehlendes Volumen zu 20 µl
Endvolumen	20 µl

2.12.2 Reagenzien und Materialien

- ABI prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit: Die AmpliTaq® DNA Polymerase, FS; BigDye Terminators; Desoxynukleosidtriphosphate; rTth Pyrophosphatase; Magnesiumchlorid und Puffer sind im Ready Reaction Mix fertig zusammengemixt.

- weitere Reagenzien:

Ampuwa; Primer (siehe unter 2.1.5); Template-DNA

2.12.3 Durchführung der Sequenzierreaktion

Zum Start der Sequenzierreaktion wurden die Primer B und M der 2. *env*-PCR und alle unter 2.1.5 aufgeführten Primer für den Start der Sequenzierreaktion in einer Menge von 3,2 pmol eingesetzt. Unter der sterilen Werkbank wurden folgende Komponenten in den Reaktionsansatz gegeben:

Mastermix: Ansatz für 20 µl

Primer (1 pmol/µl)	3,2 µl
Reaktions-Mix	6,0 µl
RNase freies Ampuwa	4,8 µl
Total	14,0 µl

Es wurden 6,0 µl gereinigtes PCR-Produkt hinzugefügt, so dass sich eine Gesamtmenge von 20,0 µl ergab. Für höher konzentrierte DNA konnte das Volumen des Reaktionsansatzes auf 10 µl halbiert werden.

Mastermix: Ansatz für 10 µl

Primer (1 pmol/µl)	3,0 µl
Reaktions-Mix	4,0 µl
Total	7,0 µl

Nach Hinzufügen von 3,0 µl gereinigtem PCR-Produkt ergab sich eine Gesamtmenge von 10 µl. Es wurde auf Eis gearbeitet, in dünnwandige 0,2 ml PCR-Röhrchen pipettiert und der Reaktions-Mix immer zuletzt hinzugegeben. Für die Sequenzierreaktion wurden die Thermocycler GeneAmp PCR System 2400 von Perkin Elmer oder der Biometra T3 Thermoblock verwendet.

Sequenzierprogramm für 20 µl Volumen (GeneAmp PCR System 2400)

96°C	2 min	
94°C	10 sec	
50°C	10 sec	} 25 Zyklen
60°C	4 min	
4°C	unendlich	

Sequenzierprogramm für 10 µl Volumen (T3 Thermoblock)

96°C	2 min	
94°C	10 sec	
50°C	20 sec	} 30 Zyklen
60°C	2 min	
4°C	unendlich	

2.12.4 DyeEx™ Aufreinigung der Proben der Sequenzierreaktion

Bevor die Proben der Sequenzierreaktion sequenziert werden können, müssen sie von allen die Sequenzierung störenden Komponenten gereinigt werden. Dies geschieht mit dem DyeEx™-Kit.

2.12.4.1 Prinzip

Zur Reinigung einer Sequenzierreaktionsprobe wird das Verfahren der Gel-Filtration angewandt. Mit der Gel-Filtration werden basierend auf dem Molekulargewicht Moleküle getrennt. In der gebrauchsfertigen Zentrifugationssäule des DyeEx™ Kits befindet sich ein vorbenetztes Gel-Filtrations-Harz, bestehend aus uniformen Poren. Es ist geeignet, um u. a. nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte ddNTPs, welche die laservermittelte Detektion der Sequenzierprodukte behindern würden, aus einem Sequenzieransatz zu entfernen. Werden Sequenzierreaktionsprodukte auf die DyeEx™-Module pipettiert, diffundieren die kleinen Dye Terminators, also die überschüssigen Fluoreszenzfarbstoffe, in die Poren der Gelkügelchen und werden dort zurückgehalten. Währenddessen passieren die größeren DNA-Fragmente die Kügelchen, ohne in ihre engen Poren zu dringen und werden im Durchfluss nach einer Zentrifugation aufgefangen. Dabei steigt der Prozentsatz an wiedergewonnenen DNA-Fragmenten mit der DNA-Größe und dem Probenvolumen. Nachteil eines zu kleinen Probenvolumens ist eine reduzierte Intensität des Signals und eine reduzierte Leselänge in der Sequenzierung. Werden DyeEx™ Zentrifugationssäulen verwendet liegt das optimale Probenvolumen bei 10 bis 20 µl.

2.12.4.2 Reagenzien und Materialien

DyeEx™ Kits: DyeEx Spin Columns; Collection Reaktionsgefäße (2 ml); weiteres Material: Eppendorf Zentrifuge 5415C; gestopfte Einmal-Pipettenspitzen; Pipetten; 1,5 ml Reaktionsgefäße

2.12.4.3 Durchführung

Die DyeEx™ Spin Columns wurden vorsichtig durchmischt, um das Harz zu resuspendieren. Die Schraubkappe der Säule wurde eine Viertel Drehung geöffnet, um ein Vakuum in der Säule zu vermeiden. Der untere Verschluss der Spin-Säule wurde abgebrochen und die Säule in ein 2 ml Sammelgefäß gestellt. Das Gefäß mit der Säule wurde drei Minuten bei 750 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule vorsichtig in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden 20 µl der Sequenzierreaktion langsam auf das Zentrum der Gel-Kügelchenoberfläche pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, nicht mit der Pipettenspitze das Gel oder die Wände der

Säule zu berühren, langsam zu pipettieren und Tropfen für Tropfen vom Gel absorbieren zu lassen. Die Kappe wurde wieder eine Viertel Drehung aufgeschraubt. Es folgten drei Minuten Zentrifugation bei 750 x g. Zuletzt wurde die Spin-Säule aus dem 1,5 ml-Reaktionsgefäß entfernt. Die Proben konnten bis zum Lauf im Sequenziergerät bei -20 °C eingefroren werden.

2.13 Auswertung der Sequenzdaten

Die Rohdaten der Sequenzen wurden direkt durch die Software des AbiPrism-Sequenziergeräts ermittelt. Anschließend erfolgte die visuelle Auswertung und Überprüfung jeder einzelnen erhaltenen Sequenz anhand der Basenpeaks und die Zusammenführung der Sequenzen einer Patientenprobe aus den verschiedenen Sequenzierreaktionen. Aus den drei Patientenproben von 1990 wurde die Konsensussequenz ermittelt. Mit dem BCM-Search Launcher Programm wurden die Nukleinsäuresequenzen in Aminosäuresequenzen übersetzt. ClustalW Multiple Sequence Alignment diente zum ersten alignen der Sequenzen. Das endgültige Alignment wurde manuell vorgenommen.

2.14 Klinische und virologische Daten der Patienten

2.14.1 Viruslast

Zur quantitativen Bestimmung der Viruslast im Plasma der Patienten wurde der Kit NucliSens HIV-1 QT der Firma Organon Teknika (Boxtel, Niederlande) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Bestimmungen wurden im Rahmen der Krankenversorgung im Institut für Virologie der Universitätsklinik Bonn durchgeführt.

2.14.2 CD4 T-Zellzahl

Die T4-Zellzahl, also die Anzahl der CD4 positiven T-Lymphozyten im peripheren Blut der Patienten, wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Diese Messungen erfolgten im Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin bzw. im Labor der Klinik für Innere Medizin der Universitätsklinik Bonn (Flow Cytometry, Coulter, Immunotech Diagnostics, Krefeld, Germany).

3 Ergebnisse

Alle verwendeten Positionsangaben von Aminosäuren beziehen sich auf die alinierte HXB2-Referenzsequenz. Gp120 und gp41 von *env* wurden getrennt durchnummeriert.

3.1 HIV-Sequenzierung und Vergleich der Konsensussequenz von 1990 mit der HIV-Sequenz der einzelnen Patienten um das Jahr 2000

Als Untersuchungsmaterial standen Proben aus dem Jahr 1990 zum Zeitpunkt der Serokonversion der Patienten und aus den Jahren 1999 bis 2001 nach ca. zehnjähriger Diversifikation des Virus zur Verfügung.

Von den Proben aus dem Jahr 1990 war nach den bereits erfolgten Untersuchungen in den Vorjahren nur noch wenig Material vorhanden. Da sogar im Bereich der hypervariablen Regionen eine bis zu 100%ige Übereinstimmung der Sequenzen nachgewiesen worden war [Kasper et al., 1993; Kasper et al., 1994; Kleim et al., 1991], die auch im mit HIV-1 kontaminierten Gerinnungsfaktorkonzentrat nachgewiesen werden konnte [Kupfer et al., 1995], wurde die Konsensussequenz nur von Proben der Patienten B (Nr. 1154P), D (Nr. 1099P) und G (Nr. 1116P) aus dem Jahr 1990 und dem Gerinnungsfaktorkonzentrat erstellt. Nach ca. zehn Jahren standen von den Patienten A (Nr. 2336P vom 14.01.1999), B (Nr. 2551P vom 26.03.2001), D (Nr. 2480P vom 11.05.2000), F (Nr. 2481P vom 11.05.2000) und G (Nr. 2466P vom 14.03.2000) Proben zur Verfügung. Der Einfachheit halber wurden die Probennummern im Weiteren ohne das anhängliche P angegeben, stimmen aber mit der Labornummer überein.

3.1.1 Expand Long Template PCR des *env*-Gens

Mittels Nested-PCR wurde der 2,9 kb große *env*-Bereichs des HIV-1 Genoms amplifiziert.

Nach der 1. *env*-PCR mit den Primern *env* A und *env* N wurde ein Teil der Amplifikate der jeweiligen Proben als Template in die 2. *env*-PCR mit den Primern *env* B und *env* M zur Herstellung eines 2,9 kb großen *env*-Amplifikats gegeben.

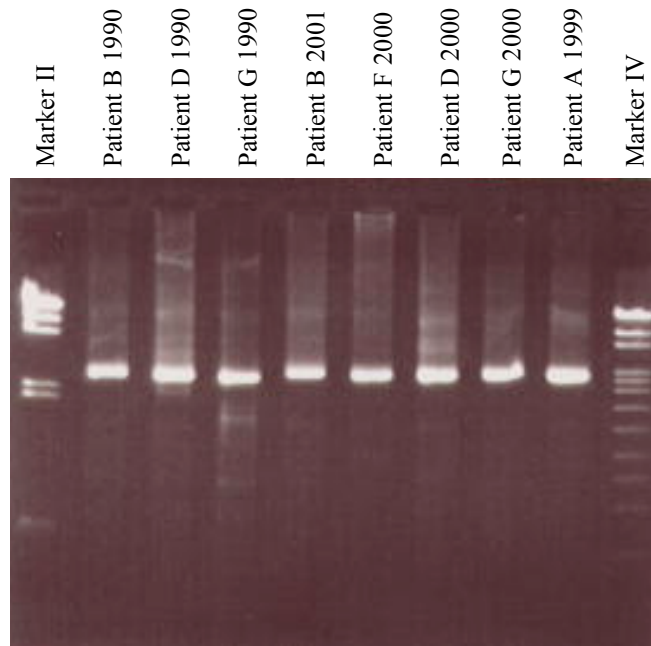


Abb. 6: Elektrophorese mit Proben vom Jahr 1990 und um das Jahr 2000 nach der 2. *env*-PCR mit dem Expand Long Template von Roche. Deutlich sichtbar ist die ca. 2,9 kb große Bande der amplifizierten *env*-Region bei allen untersuchten Proben.

3.1.2 Sequenzierung und Alignment der Konsensussequenz des *env*-Gens von 1990 mit den Sequenzen der Patienten A, B, D, F, G um das Jahr 2000

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms ClustalW version 1.8 [Thompson et al., 1997] aliniert und ggfs. anschließend manuell korrigiert.

3.1.2.1 Nukleinsäuresequenz-Alignment

siehe **Abbildung 25** im Anhang

3.1.2.2 Aminosäuresequenz-Alignment

siehe **Abbildung 26** im Anhang

3.1.3 Längenpolymorphismen und Punktmutationen im HIV-1 *env*-Gen

	GP120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP41
Konsensus 1990	1431	303	75	117	297	105	153	96	123	42	120	1041
Patient A	1473	303	114	117	297	105	156	96	123	42	120	1035
Patient B	1473	306	102	123	297	105	156	96	123	45	120	1038
Patient D	1431	303	69	117	297	105	153	102	123	42	120	1041
Patient F	1503	303	105	123	297	105	156	135	123	36	120	1041
Patient G	1485	303	120	132	297	105	153	99	123	33	120	1041

Tab. 2: Anzahl der Nukleotide in den einzelnen Bereichen des *env*-Gens um das Jahr 2000 im Vergleich zur Konsensussequenz von 1990. Auffällige Werte sind fettgedruckt.

	GP120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP41
Konsensus 1990	477	101	25	39	99	35	51	32	41	14	40	347
Patient A	491	101	38	39	99	35	52	32	41	14	40	345
Patient B	491	102	34	41	99	35	52	32	41	15	40	346
Patient D	477	101	23	39	99	35	51	34	41	14	40	347
Patient F	501	101	35	41	99	35	52	45	41	12	40	347
Patient G	495	101	40	44	99	35	51	33	41	11	40	347

Tab. 3: Anzahl der Aminosäuren in den einzelnen Bereichen des *env*-Gens um das Jahr 2000 im Vergleich zur Konsensussequenz von 1990. Auffällige Werte sind fettgedruckt.

3.1.3.1 Der kodierende Bereich für das gp120

Insgesamt war in den HIV-1 *env*-Sequenzen zehn Jahre nach der Infektion eine Längenzunahme von 42 (Patient A und B) bis 72 (Patient F) Nukleotiden (nt) zu verzeichnen, mit Ausnahme von Patient D, der die Länge der Konsensussequenz beibehielt.

Die konservierten Regionen der Patienten waren wie zu erwarten meist längenkonstant (C2, C4 und C5). In der C1-Region zeigte nur Patient B eine Aminosäure-Insertion, während in der C3-Region die Patienten A, B und F eine Insertion aufwiesen. Dagegen war unter den variablen Regionen nur die V3-Region längenkonstant, während die Patienten in der V2- (zwischen 117 und 132 nt) und V4-Region nur Insertionen und in der V1- und V5-Region neben Insertionen auch Deletionen (Patient D mit zwei Aminosäure-Deletionen in der V1- und Patient F und G mit zwei bzw. drei Aminosäure-Deletionen in der V5-Region) zeigten. V1 (69 bis 120 nt) und V4 (96 bis 135 nt) zeigten die größte Längenvariabilität.

Betrachtet man die non-synonymen Punktmutationen, also die Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, so fanden sich bei Patient B mit 103 die meisten Punktmutationen gefolgt von Patient G (87), F (76), A (60) und Patient D mit 41 Punktmutationen. Die Anzahl der

Mutationen einer Region im Verhältnis zur Länge der jeweiligen Region werden bei der Betrachtung der genetischen Distanzen dargestellt.

Die effektive Anzahl der Aminosäureaustausche war geringer, als die Zahl der non-synonymen Punktmutationen, da in einigen Fällen zwei non-synonyme Punktmutationen in dem selben Kodon auftraten, und daher nur zu einem Aminosäureaustausch führten. Dennoch bleibt die Reihenfolge der Patienten bestehen mit 81 Aminosäureaustauschen bei Patient B, 67 bei Patient G, 61 bei Patient F, 48 bei Patient A und nur 36 Aminosäureaustauschen bei Patient D.

Werden die synonymen Punktmutationen betrachtet, die also nicht zu einem Aminosäureaustausch führen, so zeigten die Patienten G mit 32 und B mit 25 die meisten Mutationen gefolgt von Patient A, F und schließlich D mit nur acht synonymen Punktmutationen.

	GP120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP41
Patient A	60	1	11	6	7	6	7	15	3	2	2	26
Patient B	103	3	24	10	13	4	18	15	3	8	5	36
Patient D	41	3	4	4	6	4	10	7	2	0	1	24
Patient F	76	10	16	7	4	8	7	12	1	4	7	40
Patient G	87	7	16	7	8	4	12	26	1	0	3	22

Tab. 4: Anzahl der **non-synonymen Punktmutationen**, die zu einem Aminosäureaustausch führen, in den einzelnen Regionen des *env*-Gens um das Jahr 2000 im Vergleich zur Konsensussequenz von 1990. Fett markiert sind jeweilige Maximal- bzw. Minimalwerte z.B. zeigte Patient B mit 103 non-synonymen Punktmutationen in der gp120 Region von *env* mehr als doppelt so viele wie Patient D mit 41.

	GP120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP41
Patient A	15	2	2	0	6	0	1	3	0	0	0	5
Patient B	25	3	5	2	5	0	0	2	1	5	2	15
Patient D	8	2	0	0	1	0	1	1	3	0	0	5
Patient F	14	1	5	1	2	0	0	3	2	0	0	9
Patient G	32	2	8	3	6	2	0	5	2	2	2	5

Tab. 5: Anzahl der **synonymen Punktmutationen**, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen, in den einzelnen Bereichen des *env*-Gens um das Jahr 2000 im Vergleich zur Konsensussequenz von 1990. Fett markiert sind jeweilige Maximal- bzw. Minimalwerte. Patient G hat in der überwiegenden Anzahl der Regionen die meisten synonymen Mutationen, während Patient D die geringste Zahl synonyme Mutationen aufweist.

	GP120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP41
Patient A	48	1	7	6	6	6	6	11	2	2	1	24
Patient B	81	3	16	8	10	4	14	12	3	7	4	34
Patient D	36	3	3	3	6	4	8	6	2	0	1	23
Patient F	61	9	11	5	4	8	7	8	2	2	5	34
Patient G	67	6	12	7	7	4	12	16	1	0	2	20

Tab. 6: Anzahl der **Aminosäureaustausche** in den einzelnen Bereichen des *env*-Gens um das Jahr 2000 im Vergleich zur Konsensussequenz von 1990. Fett markiert sind jeweilige Maximal- bzw. Minimalwerte. Patient B hat die größte Anzahl an Aminosäureaustauschen, sowohl in gp120 und gp41 als auch in den meisten Regionen von gp120, im Gegensatz zu Patient D.

3.1.3.1.1 C1-Region

Nr. (HXB2)	1	15	16	30	31	44	45	59
HXB2-Ref	MRVKEKYQHLWRWGW	R	WG	TMLL	GMLM	ICSA	TEK-LWVTVYYGVPV	WKEATTTLFCASDAK
Kons 1990	RNYQHLWRWG-	---	TMLL	GILM	ICSA	AEN-LWVTVYYGVPV	WKEATTTLFCASDAK	
Pat.A 1999	..R..K..-	---	M					
Pat.B 2001	---	I	M		QQ		
Pat.D 2000	---	M	V	A		G	
Pat.F 2000	K						D
Pat.G 2000	..G..-	---	V	G				N
	60	74	76	89	90	104	105	119
HXB2-Ref	AYDTEVHNVWATHAC	VPTDPNPQEVVL	<u>N</u>	TENFNMWKN	DMVEQM	HEDIISLWDQSLKPC		
Kons 1990	AYDTEVHNVWATHAC	VPTDPNPQEVVL	<u>N</u>	TENFNMWKN	NMVEQM	HEDIISLWDQSLKPC		
Pat.A 1999			E				
Pat.B 2001	..G..K							
Pat.D 2000							
Pat.F 2000			ME		K	DA	N
Pat.G 2000	..A..K				D			
	120	129						
HXB2-Ref	VKLTPLCVSL							
Kons 1990	VKLTPLCVTL							
Pat.A 1999							
Pat.B 2001							
Pat.D 2000							
Pat.F 2000							
Pat.G 2000							

Abb.7: Alinierte Aminosäuren (aa) der C1-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G um das Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Positive geladene aa (R, K) sind dunkelgrau, negative geladene aa (D, E) sind hellgrau hinterlegt; potenzielle N-Glykosylierungsstellen sind fettgedruckt und unterstrichen; die Nummerierung bezieht sich auf die HXB2-Referenzsequenz fortlaufend vom Beginn der *env*-Region gezählt; Punkte stehen für identische aa im Vergleich zur Konsensussequenz; Striche bedeuten Deletionen im Vergleich zur Konsensussequenz oder Insertionen bei einer oder mehreren Proben um das Jahr 2000 bzw. eine längere Sequenz bei HXB2.

Nur Patient B zeigte eine Insertion von einer Aminosäure (aa), die durch eine einzelne und zusätzlich eine doppelte Nukleinsäureinsertion nach einem Triplet mit kurzer Verschiebung des Leserasters zustande kommt. Auf diese Weise wurde Asparagin (N) durch zweimal Glutamin (Q) ersetzt. Ansonsten gab es keine weiteren Auffälligkeiten in dieser Region.

3.1.3.1.2 V1-Region

	130	135	141	142	152	153	157
HXB2	KCTDL	KNDTNTN	-----	---SSSGRMIMEKG-	-EIKNC		
Kons 1990	NCTDV	KTNVTSN	-----	---ATNDSNGGG-	-EMKNC		
Pat.A 1999I.C.ETN	-CTERRA	NVTGN.IEMV	V-....	
Pat.B 2001	..SHN	V.SINGTN	---NAT	NDSTGK	GKMK..K	-
Pat.D 2000A..D.	-----	-----	-----	-----	..Y
Pat.F 2000L.CNDEK	INCTGVN	YN--KT.	VTDIE--	-
Pat.G 2000	K....	.NVTAT.VTAP	NATA	ANVTKNA.	RINVTD	T....	

Abb. 8: Alinierte aa der V1-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G um das Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Legende siehe unter Abb. 7.

Die V1-Region war im Allgemeinen sehr variabel. Patient D wies als einziger eine Deletion von zwei aa auf. Die übrigen Patienten zeigten Insertionen von neun (Patient B) bis zu 15 aa (Patient G). Die ersten und die letzten fünf aa erschienen relativ konserviert.

3.1.3.1.3 V2-Region

	158	166	167	181	182	191	192	196
HXB2-Ref	SFNISTSIR	GKVOKEYAFFYK	LDI	IPIDND	-----	TTSY	KL	TSC
Kons 1990	SFNITSSIR	DKMQKEYALFYK	LVD	VPIDGE	-----	NTSY	RL	LINC
Pat.A 1999K	..I.....Q..Q	-----	S.R	
Pat.B 2001	...PV..	..T..Q.....	T...	...EDD	---KT	
Pat.D 2000SD	-----S	
Pat.F 2000	...M.	...E.....HN	---TKS	
Pat.G 2000	...V..G..	..R.....T...	E...R	DN	TSS

Abb. 9: Alinierte aa der V2-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G um das Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Legende siehe unter Abb. 7.

Nach aa-187 folgten bei Patient B und F auffällige Insertionen von zwei aa und bei Patient G sogar von fünf aa. Die Länge der V2-Region der Patienten A und D blieb konstant. Insertionen von drei bis sechs aa in diesem Bereich (aa 185-189) zeigten unveränderte replikative Eigenschaften des Virus, aber einen verminderten Zugang von monoklonalen Antikörpern und löslichen CD4 zur CD4-Bindungsstelle [Fox et al., 1997]. In der Literatur wurden Insertionen in

der V2-Region von *env* mit einer verminderten Krankheitsprogression in Verbindung gebracht [Masciotra et al., 2002; Shioda et al., 1997; Wang et al., 2000]. Aus diesem Grund wurde die V2-Region in allen vorhandenen Proben von 1990 bis zum Jahr 2000 unter 3.2 analysiert, um den Zeitpunkt des ersten Auftretens der Insertionen zu ermitteln und mit der Veränderung klinischer und virologischer Parameter in Kontext zu setzen.

Patient A zeigte nach zehn Jahren einen Wechsel an Position 190 von Serin zu dem positiv geladenen Arginin. Damit wurde eine potenzielle N-Glykosylierungsstelle zerstört und es resultierte eine zunehmend positive Ladung. Die Zunahme positiver Ladungen im V2-Loop könnte auf einen Wechsel von R5- zu X4-tropen Virusisolaten hindeuten [Hoffman et al., 2002; Shieh et al., 2000]. Patient A wies als einziger eine Mutation an Position 166 auf. Das positiv geladene Arginin (R) wurde durch das ebenso positive Lysin (K) ersetzt.

Des Weiteren fiel auf, dass Asparagin (N) an Position 195 bei den Patienten D, F und G aufgrund der gleichen Punktmutation von AAT zu AGT durch Serin (S) ersetzt wurde.

3.1.3.1.4 C2-Region

	197	206	207		221	222		236	237		251
HXB2-Ref	<u>N</u> TSVITQACP	<u>K</u> VSFEPIPIHYCAPA			GFAILKCN	<u>N</u> KT	<u>F</u> NGT		GPCT	<u>N</u> VSTVQCTHGI	
Kons 1990	<u>N</u> TSVITQACP	<u>K</u> VSFEPIPIHYCTPA			GFAILKCN	<u>N</u> KMF	<u>G</u> GK		GECK	<u>N</u> VSTVQCTHGI	
Pat.A 1999
Pat.B 2001
Pat.D 2000
Pat.F 2000
Pat.G 2000
	252		266	267		281	282		295		
HXB2-Ref	RPVVSTQLLL	<u>N</u> GSLA	EEEVVIRSV	<u>N</u> FTDNA		KTIIVQL	<u>N</u> TSV	<u>E</u> I	<u>N</u>		
Kons 1990	RPVVSTQLLL	<u>N</u> GSLA	EEEVVIRSE	<u>N</u> FTNNA		KIIIVQL	<u>N</u> ESV	<u>V</u> I	<u>N</u>		
Pat.A 1999
Pat.B 2001
Pat.D 2000
Pat.F 2000
Pat.G 2000

Abb. 10: Alinierte aa der C2-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G um das Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Legende siehe unter Abb. 7.

Bei konstanter Länge wurde Methionin an Position 232 bei allen Patienten durch Threonin (T) ersetzt. Ursache war bei allen Patienten eine Mutation von ATG nach ACG. Eine weitere Punktmutation von ACC zu GCC bei Patient A, B und G führte zum Austausch von Threonin (T) zu Alanin (A) an Position 219.

3.1.3.1.5 V3-Region

	296	297		11	311	312		325	326	331																		
HXB2-Ref	C	TRP	N	N	TRK	R	IRIQ	GPG	RAF	V	T	I	G	K	I	-	GN	MR	QA	HC								
Kons 1990		C	TRP	N	N	TRR	S	I	N	--	GPG	RAF	Y	A	T	G	E	I	I	G	N	I	R	L	A	H	C	
Pat.A 1999	
Pat.B 2001		
Pat.D 2000		
Pat.F 2000		
Pat.G 2000		

Abb. 11: Alinierte aa der V3-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G um das Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Legende siehe unter Abb. 7. Position 11 und 25 von V3 gezählt nach der Konsensussequenz sind fett und kursiv gedruckt.

Die Länge der Region war konstant. Im Vergleich zu HXB2 war die Region nach Position 309 um zwei Aminosäuren kürzer. Auffällig waren folgende Positionen/Mutationen:

- R305K (Punktmutation AGA zu AAA) bei den Patienten A, B, F, G.
- 306 (= Position 11 von V3): hier fand sich bei allen Patienten ein ungeladenes Serin außer bei Patient F (Mutation zu Glycin). Position 11 und Position 25 von V3 (gezählt von der Konsensussequenz) spielen eine wichtige Rolle bei der Vorhersage des verwendeten Ko-Rezeptors von HIV-1. So ist das Auftreten von positiv geladenen Aminosäuren an diesen Positionen mit der Verwendung des CXCR4 Ko-Rezeptors und dem Erscheinen von SI-Isolaten assoziiert [De Jong et al., 1992; Hoffman et al., 2002; Resch et al., 2001].
- N308H (Punktmutation AAT zu CAT) bei den Patienten A, D, F, G.
- 322 (= Position 25 von V3 der Konsensussequenz): die negativ geladene Glutaminsäure (E) mutierte bei Patient A zum ungeladenen Alanin (A) (Punktmutation GAA zu GCA) und bei Patient B zur negativ geladenen Asparaginsäure (D) (Punktmutation GAA zu GAC).
- N325D (Punktmutation AAT zu GAT) bei den Patienten A, B, D und F. Diese Mutation findet sich unter anderem bei der Entwicklung einer HIV-Resistenz gegenüber Dextran-Sulfat, einem Inhibitor der HIV-CD4⁺ Zellbindung und der Fusion [Este et al., 1997].
- L328Q (Punktmutation CTA zu CAA) bei allen Patienten.
- Die drei von Freed et al. [1991] beschriebenen Aminosäuren an Position 313 (Prolin), 314 (Glycin) und 315 (Arginin) nach HXB2 (entspricht Position 318-320 bei Freed), die in der prinzipiellen Neutralisierungsdeterminante liegen, fanden sich in der Konsensussequenz identisch zu HXB2 und veränderten sich auch nach zehn Jahren nicht. Ausnahme ist Patient A, bei dem das positiv geladene Arginin-315 zur polaren Aminosäure Serin mutierte. Dies ist

bemerkenswert, da die Mutation vom positiv geladenen Arginin zum neutralen Glycin die Fähigkeit, Synzytien zu bilden, komplett unterbindet [Freed et al., 1991].

- Die Mutation an Position 308 von Asparagin (N) zu Histidin (H) ist auch deswegen interessant, weil bei der Konsensussequenz an Position 306 ein Serin (S) vorlag. Die HXB2-Sequenz wies an diesen beiden Positionen jeweils ein Arginin (R) auf. Sullivan et al. [1998] beschrieb eine doppelte Mutation an Position 306 und 308 von RxR zu SxH und eine einzelne Mutation an Position 308 von R zu H, die jeweils zu einem stark verminderten Virus-Entry und einer verminderten Synzytiumbildung führte. S-306 und H-308 lagen bei Patient A, D und G vor.

3.1.3.1.6 C3-Region

	332	340	341		355	356		370	371		384
HXB2-Ref	NISRAKWN	TLKQIAS	KLREQFGN	NKTIIFK	QSSGGDPE	IVTHSFNC	GGGEFFY				
Kons 1990	NLSRTKWEN	TLRQVARKL	REQF--	NKTIVFN	QSSGGDPE	IVMHSFNC	GGGEFFY				
Pat.A 1999	I.GAD...	..K...K...	..-N				
Pat.B 2001	V.KAD.AK	..TK..V..GK..-N	..N..I..H.....				
Pat.D 2000	I.K.E..K	..KR..T.....	..K.....				
Pat.F 2000	...AQ...	...K...K..-N	..KA.....N.....				
Pat.G 2000	...RD.KK	..G...E...K..--	..K...KN.....L..	..AT.....				

Abb. 12: Alinierte aa der C3-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G um das Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Legende siehe unter Abb. 7.

Auffällig war ein Hot-Spot-Bereich bis zur Aminosäure 31 der Konsensussequenz mit vielen non-synonymen Mutationen in einem vergleichsweise kurzen konservierten Bereich. Dabei fanden sich ähnliche Mutationen auf Aminosäureebene bei allen fünf Patienten. Nachfolgend nur ähnliche Mutationen, die sich bei mindestens drei Patienten gleich entwickelten an Position:

- K337D (zwei Punktmutationen von AAA zu GAT) bei den Patienten A, B und G. Patient D zeigte hier eine einfache Punktmutation von AAA zu GAA, die Lysin (K) durch Glutaminsäure (E) ersetzt. Dadurch ergab sich jeweils ein Ladungswechsel von positiv nach negativ. Die Sequenz von Patient F mutierte von positiven K zum neutralen Q.
- N340K (Punktmutation von AAC zu AAA) bei den Patienten B, D und G .
- E351K (Punktmutation von GAA zu AAA) bei den Patienten B, F und G mit Ladungswechsel.

Des Weiteren fand sich nach der 354. aa der Konsensussequenz eine Insertion von Asparagin (N) bei den Patienten A, B und F, hervorgerufen durch die Insertion des ATA-Triplets.

3.1.3.1.7 V4-Region

	385	386		400	401		412	413		417	418																													
HXB2-Ref	C	N	S	T	Q	L	F	N	S	T	W	F	N	S	T	W	S	T	E	G	S	D	---	---	---	---	T	I	T	L	P	C								
Kons 1990		C	N	T	T	K	L	F	N	N	T	W	N	G	A	Q	L	S	N	T	W	-	N	G	T	E	G	E	---	---	---	---	N	I	T	L	P	C		
Pat.A 1999		.	.	.	R	.	D	S	.	.	T	.	.	S	.	Q	.	S	.	R	N	D	---	---	---	---	T		
Pat.B 2001		.	.	.	N	.	K	S	.	.	T	H	.	.	.	I	V	.	D	.	G	N	P	---	---	---	---	
Pat.D 2000		.	.	.	Q	.	.	S	.	.	E	T	.	.	.	Q	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Pat.F 2000		.	.	.	Q	.	.	S	.	.	T	H
Pat.G 2000		.	.	.	E	.	.	S	.	.	K	T	W	N	

Abb. 13: Alinierte aa der V4-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G um das Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Legende siehe unter Abb. 7.

Auffällig war hier eine Insertion von 14 aa bei Patient F nach der 411. aa der Konsensussequenz, die teilweise aus einer Wiederholung des TWNGAQLS aa-Motifs der Konsensussequenz von der 394. bis zur 401. aa mit Variationen durch Punktmutationen besteht.

Patient D wies eine Insertion von zwei aa auf, die eine Verdopplung des IT-Motifs der Konsensussequenz darstellt.

Zusätzlich fanden sich an zwei Positionen Aminosäure-Austausche, die bei allen Patienten erschienen:

- N393S durch eine Punktmutation (PM) von AAT zu AGT bei vier Patienten bzw. zu AGC bei Patient A
- A398T aufgrund einer PM von GCA zu ACA bei vier Patienten bzw. zu ACT bei Patient G

3.1.3.1.8 C4-Region

	419		432	433		447	448		459																																		
HXB2-Ref	R	I	K	Q	I	N	M	W	Q	K	V	G	K	A	M	Y	A	P	P	I	S	G	Q	I	R	C	S	S	N	I	T	G	L	L	L	T	R	D	G	G			
Kons 1990		R	I	K	Q	I	N	M	W	Q	E	V	G	K	A	M	Y	A	P	P	I	R	G	Q	I	R	C	S	S	N	I	T	G	L	L	L	T	R	D	G	G		
Pat.A 1999	
Pat.B 2001	
Pat.D 2000	
Pat.F 2000	
Pat.G 2000	

Abb. 14: Alinierte aa der C4-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G um das Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Legende siehe unter Abb. 7.

Die C4-Region stellte sich als längenkonstant und sehr konserviert dar, ohne erkennbare konvergente Mutationen auf Nukleotid- oder Aminosäureebene.

3.1.3.1.9 V5-Region

	460	462	463	471
HXB2-Ref	NSN	--NE	-SEIF	FRPG
Kons 1990		-NN	GTNETTET	TFRPG
Pat.A 1999		-..	E..A
Pat.B 2001		K.S	SN.G.Q	..I..E
Pat.D 2000		-..
Pat.F 2000		-M	-..	..-...I
Pat.G 2000		-..	..	---.....

Abb. 15: Alinierte aa der V5-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G um das Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Legende siehe unter Abb. 7.

Zu Beginn zeigte Patient B als einziger eine Insertion von einer Aminosäure (Lysin). Auch sonst fanden sich bei Patient B die meisten synonymen und nicht-synonymen Punktmutationen in dieser Region. Weiterhin waren zwei Deletionen von je einer Aminosäure bei Patient F und eine Deletion von drei Aminosäuren bei Patient G auffällig.

3.1.3.1.10 C5-Region

	472	474	475	489	490	505	506	512
HXB2-Ref	GGD	MRDNWR	SELYKYKVV	KIEPLGVAPT	KA	KRR	VVQREKR	
Kons 1990		GGD	MRDNWR	SELYKYKVV	KIEPIGVAPTEA	KRR	VVQREKR	
Pat.A 1999		R
Pat.B 2001		..N	QI	R
Pat.D 2000		..G	Q
Pat.F 2000		..N	..K	R	PK
Pat.G 2000		Q	R

Abb. 16: Alinierte aa der C5-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G aus dem Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Legende siehe unter Abb. 7.

Diese Region war längenkonstant. Es zeigte sich ein auffälliger Aminosäureaustausch an Position 501 mit Ladungswechsel von Glutaminsäure (E) zu Arginin (R) aufgrund einer Punktmutation von GAG zu AGG bei den Patienten A, B und G. Die Aminosäuren von 491 bis 501 sind wichtig für die gp120-gp41-Assoziation [Helseth et al., 1991], deshalb könnte diese Mutation die gp120-gp41-Assoziation beeinflussen.

3.1.3.2 Der kodierende Bereich für das gp41

Nr. (HXB2)	1	14	15	29	30	44	45	59
HXB2-Ref	AVG-IGALFLGFLGA	AGSTMGAASMTLT	VQ	ARQLLSGIVQQNNL	LRAIEAQQHLLQLTV			
Kons 1990	AVGTIGAMFLGFLGA	AGSTMGAASMTLT	VQ	ARLLLSGIVQQNNL	LRAIEAQQHLLQLTV			
Pat.A 1999	..-L.....	I.....	..Q.....
Pat.B 2001	..-.....Q.....
Pat.D 2000	I.....	M.....
Pat.F 2000	T..IA...	..Q.....	S.....
Pat.G 2000	...L.....	V.....

	60	74	75	89	90	104	105	119
HXB2-Ref	WGIKQLQARILAVER	YLDKQQLLGIWGCSG	KLIC	TTAVPWNASWS	NKSLEQIWNHTTWME			
Kons 1990	WGIKQLQARVLAVER	YLRDQQLLGIWGCSG	KLIC	TTTVPWNASWS	NKSLNEIWDNMTWMQ			
Pat.A 1999	A...T...	M.....
Pat.B 2001	Q.....	TYG...X...
Pat.D 2000	A...T...	Q.....
Pat.F 2000	HS...N...
Pat.G 2000	P.A...T...	MD...E...

	120	134	135	149	150	164	165	179
HXB2-Ref	WDREINNYTSLIHSL	IEESQNQQEKNEQEL	LELD	KWASLWNWFNI	TNWLWYIKLFIMIVG			
Kons 1990	WEKEINNYTSLIYTL	IEESQNQQEKNEQEL	LALD	KWASLWNWFNI	SKWLWYIKIFIMIVG			
Pat.A 1999	D.....	E.....	N.....
Pat.B 2001	D.....	N...X...	G.....	N.....	R...I...
Pat.D 2000	D...G...	L.....	K.....	N.....
Pat.F 2000	R...D...D...	I.....	H...K...Q...	T...N...	R.....
Pat.G 2000G...N...	N.....

	180	194	195	209	210	223	224	238
HXB2-Ref	GLVGLRIVFAVLSIV	NRVRQGYSPLSFQTH	LPTPRG-PDRPEGIE	EEGGERDRDRSIRLV				
Kons 1990	GLVGLRIVFAVLSIV	NRVRQGYSPLSFQTH	LPAPRGR-PDRPEGIE	EEGGERDRDRSVRLV				
Pat.A 1999	L.....
Pat.B 2001	I.....	I...F...	F.TS...Q...	G.....
Pat.D 2000	I.....	T.....	K.....
Pat.F 2000	I.....	M.....	T.....
Pat.G 2000	V.....

	239	253	254	268	269	283	284	298
HXB2-Ref	NGSLALIWDLLRSLC	LFSYHRLRDLILLIVT	RIVELLGRRGWEALK	YWWNLLQYWSQELKN				
Kons 1990	DGFLAIFWDDLLRSLC	LFSYHRLRDLILLIVA	RIVEILGRRGWEVLK	YWWNLLKYWSQELKN				
Pat.A 1999	L.....	L...I.V...	T.....	H...A...
Pat.B 2001	I.....	V.....	H...AL...
Pat.D 2000
Pat.F 2000	L.....	T...I...
Pat.G 2000	F.....	L...L...	S.....	H...L...

	299	313	314	328	329	343	344
HXB2-Ref	SAVSLLNATAIAVAE	GTDRVIEVVQACRA	IRHIPRRIRQGLERI	LL			
Kons 1990	SAVSLLDATAITVAE	GTDRIIELVQIAYRA	ILHIPRRIRQGLERA	LL			
Pat.A 1999	N...T...I...	R...G...
Pat.B 2001	G...TIC...
Pat.D 2000	FN.I.MP...	E.....	P.....	K.....
Pat.F 2000	F.TL..A...	V...VF...	L...V...	F.....
Pat.G 2000	N...I...

Abb. 17: Alinierte Aminosäuren der gp41-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G um das Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Legende siehe unter Abb. 7.

Auffällig war bereits in der Konsensussequenz, dass nach der dritten aa eine Insertion der polaren Aminosäure Threonin im Vergleich zur Referenzsequenz von HXB2 erfolgt. Dies geschah im hydrophoben N-terminalen Bereich der Fusionsdomäne von gp41. Mutationen der hydrophoben zu geladenen Aminosäuren an den Positionen 1, 2, 9, 15, 26 und 28, sowie eine Doppelmutation an Position 1 und 8 durch andere hydrophobe Aminosäuren sind mit einer starken Reduktion oder gar Unfähigkeit der Synzytiumbildung und damit der Fusionsaktivität assoziiert [Freed et al., 1990]. Deletionen von drei bis vier aa am N-terminalen Ende von gp41 führten zu einer drastischen Senkung der Effektivität der Virus-Zell-Fusionsaktivität. Deletionen der ersten fünf bis sieben aa am N-terminalen Ende führten zu einem kompletten Verlust der Fusionsaktivität [Freed et al., 1990]. Eine spezifische N-terminale Struktur ist damit für die Fusionsaktivität nötig. Von der 8. bis zur 13. aa fand sich ein hochkonserviertes FLG (Phenylalanin-Leucin-Glycin)-Doppelmotiv [Schaal et al., 1995], das auch in allen Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Proben erhalten war. Patient A zeigte zusätzlich eine Deletion nach der 216. Aminosäure. Die übrigen Virussequenzen waren längenkonstant im Vergleich zur Konsensussequenz. Betrachtet man die Mutationen, so war der Aminosäureaustausch K166N mit Ladungsverschiebung durch Punktmutation von AAA zu AAC am auffälligsten, da er bei allen fünf Patienten zu finden war. Diese Ladungsverschiebung lag in einem tryptophanreichen Motif (154. aa bis 170. aa), vor bzw. in der transmembranen Domäne unmittelbar vor dem 4. hochkonservierten Tryptophan. Diese Region wurde als wichtig für die *env*-vermittelte Fusion und Virus-Infektiosität nach dem CD4-Bindungsschritt beschrieben [Salzwedel et al., 1999]. Die fünf beschriebenen Tryptophan-Aminosäuren fanden sich jedoch, sowohl in der Konsensussequenz, als auch in den Sequenzen aus dem Jahr 2000. An Position 163., ebenso in dem vorbeschriebenen Motif gelegen, fanden sich viele unterschiedliche Mutationen bei Patient A, B, D und F.

3.1.3.3 Zusammenfassung der parallelen Virusevolution

- C1: I24M (Patient A, B, D)
- V2: N195S (Patient D, F, G)
- C2: M232T (alle Patienten)
- V3: R305K (Patient A, B, F, G)
- N308H (Patient A, D, F, G)
- N325D (Patient A, B, D, F)
- L328Q (alle Patienten)

C3: E351K (Patient B, F, G)

Insertion N bei Position 356 nach HXB2 (bei Patient A, B, F)

V4: N393S (alle Patienten)

A398T (alle Patienten)

C5: E501R (Patient A, B, G)

Auffällig sind vor allem der V3-Bereich mit vier Positionen paralleler HIV-Evolution bei mindestens vier Patienten und der V4-Bereich mit zwei Positionen paralleler HIV-Evolution bei allen Patienten.

3.1.4 Genetische Distanz

Die genetischen Distanzen wurden als sogenannte „Hamming-Distanzen“, d. h. als Anzahl der Sequenzdifferenzen im Vergleich zur Konsensussequenz dividiert durch die Länge der analysierten Region, berechnet und sind ein Maß für die Divergenz. Die genetische Distanz wurde jeweils für die non-synonymen, die synonymen und die Gesamt-Punktmutationen berechnet.

3.1.4.1 gp120

Im Folgenden wurden die genetischen Distanzen von gp120 der Patienten untereinander und im Hinblick auf die einzelnen Regionen von gp120 miteinander verglichen.

3.1.4.1.1 Zusammenfassende Betrachtung der genetischen Distanzen der einzelnen Patienten (Tabelle 3.6)

Patient B wies mit 7,20% bei den non-synonymen und 8,94% der Gesamtmutationen von allen Patienten die höchste genetische Distanz auf, gefolgt von Patient G (6,08% bzw. 8,32%) und Patient F (5,31% bzw. 6,29%). Zudem waren bei Patient B in den meisten Regionen die höchsten bzw. zweithöchsten genetischen Distanzen zu finden, außer in der V3-Region (3,81%). Auch die Patienten F und G entwickelten in fast allen Regionen hohe genetische Distanzen. Die geringste Divergenz konnte bei Patient D mit 2,87% der non-synonymen und 3,42% der Gesamtmutationen nachgewiesen werden. In allen variablen Regionen wies Patient D die geringste genetische Evolution der HIV-1 *env*-Sequenz auf.

Die Variationsbreite der synonymen Mutationen war insgesamt geringer (2,24% bei Patient G und 0,56% bei Patient D) als bei den non-synonymen Mutationen. Die non-synonymen Mutationen aller Patienten machten 79,66% der Gesamtmutationen aus.

3.1.4.1.2 Zusammenfassende Betrachtung der genetischen Distanzen der einzelnen HIV-1 *env*-gp120-Regionen

Zunächst wurden die non-synonymen Mutationen betrachtet. Die V1-Region wies die höchsten genetischen Distanzen mit 32% bei Patient B und jeweils 21,33% bei Patient F und G, gefolgt von der V4-Region mit 27,8% bei Patient G und jeweils 15,63% bei Patient A und B auf. Bemerkenswert war weiterhin, dass die V3- und V2-Regionen in allen Patienten relativ geringe genetische Distanzen aufwiesen (durchschnittlich 4,9 bzw. 5,8%), während die V5-Region eine sehr hohe Variationsbreite unter den Patienten von 19,5% bei Patient B bis 0% bei Patient D und G hatte. Die konservierten Regionen lagen in ihrer genetischen Distanz deutlich unter der der variablen Regionen, abgesehen von der C3-Region (durchschnittlich 7,06%), die im Durchschnitt noch über der genetischen Distanz der V2- und V3-Region lag.

Betrachtete man die synonymen Mutationen der einzelnen Regionen, so fiel auf, dass die genetische Distanz im Allgemeinen geringer ausfiel. Zudem gab es einige Regionen wie V3, C3, V5 und C5, in denen bei mindestens drei Patienten keine synonymen Mutationen nachgewiesen wurden. Wie auch bei den non-synonymen Mutationen war die Spannbreite der genetischen Distanz der synonymen Mutationen in der V5-Region sehr groß (Patient B mit 11,9% im Gegensatz zu Patient A, D und F mit 0%).

3.1.4.2 gp41

Im Folgenden wurden die genetischen Distanzen von gp41 der Patienten verglichen.

Durchschnittlich fanden sich in diesem Bereich niedrige genetische Distanzen mit vergleichbaren Werten wie in den konservierten Regionen von gp120 (Gesamtmutation von 3,48%). Die non-synonymen Mutationen überwogen wieder deutlich und machten 81,72% der Gesamtmutationen aus. Insgesamt bewegte sich die genetische Distanz in einer geringen Variationsbreite sowohl bei den non-synonymen als auch den Gesamtmutationen von 2,11% bzw. 2,59% bei Patient G zu 3,84% bei Patient F bzw. 4,90% bei Patient B. Die höchste genetische Distanz der Gesamt- (4,90%) und mit großem Abstand auch der synonymen Mutationen (1,44%) wies Patient B auf.

<i>Non-Synonyme Mutationen %</i>	GP 120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP 41
Patient A	4,19	0,33	14,67	5,13	2,36	5,71	4,58	15,63	2,44	4,76	1,67	2,5
Patient B	7,20	0,99	32	8,55	4,38	3,81	11,76	15,63	2,44	19,05	4,17	3,46
Patient D	2,87	0,99	5,33	3,42	2,02	3,81	6,54	7,29	1,63	0	0,83	2,31
Patient F	5,31	3,30	21,33	5,98	1,35	7,62	4,58	12,50	0,81	9,52	5,83	3,84
Patient G	6,08	2,31	21,33	5,98	2,69	3,81	7,84	27,08	0,81	0	2,50	2,11
Durchschnitt	5,13	1,58	18,93	5,81	2,56	4,95	7,06	15,63	1,63	6,66	3,0	2,84
<i>Synonyme Mutationen %</i>	GP 120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP 41
Patient A	1,05	0,66	2,67	0	2,02	0	0,65	3,13	0	0	0	0,48
Patient B	1,75	0,99	6,67	1,71	1,68	0	0	2,08	0,81	11,90	1,67	1,44
Patient D	0,56	0,66	0	0	0,34	0	0,65	1,04	2,44	0	0	0,48
Patient F	0,98	0,33	6,67	0,85	0,67	0	0	3,13	1,63	0	0	0,10
Patent G	2,24	0,66	10,67	2,56	2,02	1,90	0	5,21	1,63	4,76	1,67	0,48
Durchschnitt	1,32	0,66	5,34	1,03	1,34	0,38	0,26	2,92	1,3	3,33	0,67	0,6
<i>Gesamt-Mutationen %</i>	GP 120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP 41
Patient A	5,24	0,99	17,33	5,13	4,38	5,71	5,23	18,75	2,44	4,76	1,67	2,98
Patient B	8,94	1,98	38,67	10,3	6,06	3,81	11,76	17,71	3,25	30,95	5,83	4,90
Patient D	3,42	1,65	5,33	3,42	2,36	3,81	7,19	8,33	4,07	0	0,83	2,98
Patient F	6,29	3,63	28	6,84	2,02	7,62	4,58	15,63	2,44	9,52	5,83	3,94
Patient G	8,32	2,97	32,00	8,55	4,71	5,71	7,84	32,29	2,44	4,76	4,17	2,59
Durchschnitt	6,44	2,24	24,27	6,84	3,91	5,33	7,32	18,54	2,93	9,99	3,67	3,48

Tab. 7: Genetische Distanz der Regionen um das Jahr 2000 im Vergleich zur Konsensussequenz von 1990. Auffällige Maximal- und Minimalwerte sind fettgedruckt.

3.1.5 N-Glykosylierungsstellen

Als potenzielle N-Glykosylierungsstelle gilt die Aminosäure Asparagin (N) vor einer beliebigen Aminosäure (x) mit einem sich anschließenden Serin (S) oder Threonin (T) (NxS oder NxT). Tritt diese Anordnung der Aminosäuren auf, kann Asparagin potenziell glykosyliert werden. Zu beachten ist, dass die Aminosäure Prolin vor oder nach der Aminosäure Serin oder Threonin, also an Position x oder y des foldenen Schemas: Nx[S/T]y einen starken negativen Effekt hat, der die N-Glykosylierung nicht begünstigt. Glykosylierungsmotive mit Threonin an der dritten Position werden häufiger glykosyliert, als solche mit Serin an der dritten Position. [Mellquist et al., 1998]. Die Präsenz eines Aspartat-, Glutamat-, Tryptophan- oder Leucin-Restes an Position X des NxS Schemas führt zu niedriger Oligosaccharidakzeptanz [Kasturi et al., 1997].

	GP120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP41
Consensus 1990	25	2	4	2	6	1	3	4	1	2	0	4
Patient A	27	2	5	1	7	1	3	4	2	2	0	5
Patient B	23	2	5	2	4	1	2	4	1	2	0	4
Patient D	25	2	3	2	7	1	2	5	1	2	0	4
Patient F	29	3	4	2	7	1	2	7	1	2	0	4
Patient G	29	1	6	3	6	1	3	6	1	2	0	5

Tab. 8: Anzahl der potenziellen **Glykosylierungsstellen** der einzelnen Patienten in den einzelnen Bereichen des *env*-Gens um das Jahr 2000 im Vergleich zur Konsensussequenz von 1990. Maximal- und Minimalwerte sind fettgedruckt.

3.1.5.1 gp120

Die Konsensussequenz und Patient D zeigten 25 potenzielle N-Glykosylierungsstellen übertroffen von Patient F und G mit jeweils 29 und Patient A mit 27 Glykosylierungsstellen. Patient B hatte nur 23 potenzielle Glykosylierungsstellen. Betrachtet man die einzelnen Regionen, so fanden sich im V1- und V4-Bereich mit drei bis sechs bzw. vier bis sieben die meisten potenziellen N-Glykosylierungsstellen der variablen Bereiche. In der C2-Region, mit 99 aa die zweitlängste Region nach C1, fanden sich ebenso vier bis sieben N-Glykosylierungsstellen. Keine oder nur wenige Glykosylierungsstellen waren in der C5- (0), V3- (1) und C4-Region (überwiegend 1) zu finden. Auffallend war vor allem die V1- und die V4-Region. Hier kam es bei mehreren Patienten zu größeren Insertionen, die auch mit der Generierung neuer Glykosylierungsstellen einhergingen.

3.1.5.1.1 C1-Region

Glykosylierung an der Position N-88 in C1 ist relevant für die Infektiosität [Lee et al., 1992]. Diese potenzielle Glykosylierungsstelle fand sich in der Konsensussequenz und war nach zehn Jahren bei allen Patienten konserviert. Die zweite potenzielle Glykosylierungsstelle N-130 lag unmittelbar vor V1 und war nur bei Patient G nach zehn Jahren durch eine Mutation von Asparagin zu Lysin verschwunden. Zusätzlich entstand bei Patient F an Position 49 eine neue potenzielle Glykosylierungsstelle durch Mutation von Threonin zu Asparagin.

3.1.5.1.2 V1/V2-Region

N-137 kam in der Konsensussequenz und nach zehn Jahren in Patient A und D an gleicher Position und in Patient B und G um einige aa verschoben vor. Bei Patient F fanden sich die ersten beiden potenziellen Glykosylierungsstellen erst in Insertionen nach Position 141.

Die Wichtigkeit der N-Glykosylierungsstellen für die virale Infektiosität wird besonders an der Glykosylierung an N-141 von gp120 deutlich, da diese in einer hypervariablen Region liegt und dennoch hoch konserviert bei den meisten HIV-1 Isolaten vorliegt [Lee et al., 1992]. Die Glykosylierungsstelle N-141 in V1 fand sich bei Patient D und G an identischer Position und bei den übrigen Patienten um ein bis drei Aminosäuren verschoben.

Nach Position 141 folgten bei Patient A, B, F und G Insertionen, die bei Patient A zu einer und bei den anderen Patienten zu zwei zusätzlichen potenziellen Glykosylierungsstellen führten.

N-146 fand sich nach diesen Sequenzverschiebungen bei der Konsensussequenz und bei Patient A und F nach zehn Jahren, bei den anderen Patienten war sie nach zehn Jahren verschwunden.

N-156 in V1 und N-160 in V2 waren nach multiplen Mutationen in diesen variablen Bereichen wieder die ersten allen Sequenzen gemeinsamen Glykosylierungsstellen, die in allen Sequenzen auch nach zehn Jahren konserviert waren.

Die potenzielle Glykosylierungsstelle N-188 war bei Patient A nach zehn Jahren verschwunden, fand sich sonst aber bei allen Patienten.

Patient G entwickelte vor der Position N-188 eine zusätzliche potenzielle Glykosylierungsstelle durch eine Insertion.

3.1.5.1.3 C2-Region

In einer Studie aus dem Jahr 2000 konnte gezeigt werden, dass die Eliminierung der potenziellen Glykosylierungsstelle N-197 in C2 eine erhöhte Empfindlichkeit des Virusstammes SF162 gegenüber Neutralisation mittels polyklonaler HIV-Seren und monoklonaler Antikörpern, die an den V3-Loop oder die CD4-Bindungsstelle binden verursachte [Ly und Stamatatos, 2000]. Des Weiteren scheint die Glykosylierung an dieser Stelle die Infektiosität von HIV-1 zu erhöhen [Lee et al., 1992]. In den in dieser Arbeit untersuchten Proben war diese potenzielle Glykosylierungsstelle schon in der Konsensussequenz vorhanden und blieb auch nach zehn Jahren bei allen Patienten erhalten.

Die potenziellen Glykosylierungsstellen an Position N-262 und N-276 sind für die Virusinfektiosität wichtig [Lee et al., 1992] und fanden sich in der Konsensussequenz und nach

zehn Jahren unverändert bei allen Patienten. N-262 spielt zudem bei der gp120-gp41-Assoziation eine wichtige Rolle [Reynard et al., 2004]. Mutationen der potenziellen Glykosylierungsstelle an Position N-276 sind mit der Aufhebung der neutralisierenden Wirkung von Patientenseren assoziiert [Wyatt et al., 1998].

Die potenzielle Glykosylierungsstelle N-289 fand sich in der Konsensussequenz als auch bei den Patienten A, D und F nach zehn Jahren. Bei Patient B war S-291 zu A-291 und bei Patient G war N-289 zu K-289 mutiert, so dass diese potenziellen Glykosylierungsstellen verloren gingen. Allerdings hat auch das initial in der Konsensussequenz vorhandene und bei Patient D und F persistierende NES-Motif nur eine schwache Oligosaccharid-Akzeptanz [Kasturi et al., 1997]. Nur bei Patient A mutierte NES zu NKS und hatte damit eine höhere Wahrscheinlichkeit der Glykosylierung.

Die potenzielle Glykosylierungsstelle N-295 war einzig bei Patient B nach zehn Jahren verloren gegangen. Normalerweise ist N-295 sehr konserviert bei HIV-1 Subtyp B Isolaten. Der Verlust dieser Glykosylierungsstelle machte das Virusisolat SF162 sehr neutralisationsempfindlich gegenüber monoklonalen Antikörpern, die den V3-Loop, die CD4- und CCR5-Bindungsstellen und die extrazelluläre Region von gp41 (mit MAb 2F5) erkennen [McCaffrey et al., 2004].

3.1.5.1.4 V3-Region

Die einzige potenzielle Glykosylierungsstelle in V3 (N-301) ist bei den meisten HIV-1 Subtypen konserviert und war in der Konsensussequenz und im Jahr 2000 bei allen Patienten zu finden. N-301 spielt bei der gp120-gp41-Assoziation bei Isolaten aus der Akutphase der HIV-Infektion eine wichtige Rolle [Reynard et al., 2004]. Außerdem soll N-301 eine wichtige Rolle beim Ko-Rezeptor Tropismus und somit beim Übergang von R5- zu X4-tropen HIV-1 Isolaten spielen [Nakayama et al., 1998; Pollakis et al., 2001; Polzer et al., 2002].

3.1.5.1.5 C3-Region

Auch N-332 in C3 ist bei den meisten HIV-1 Subtypen sehr konserviert, wie auch in den vorliegenden Sequenzen. Die Entfernung des gebundenen Glykans bewirkte eine gesteigerte Neutralisation durch polyklonale HIV- und SHIV-positive Seren und durch monoklonale Antikörper, die den V3-Loop, die CD4- und CCR5-Bindungsstellen erkennen [McCaffrey et al., 2004]. Ist N-332 nicht vorhanden, kommt es zu einer verstärkten Bindung von löslichem CD4 [Reynard et al., 2004]. Da bei der Konsensussequenz und bei den Sequenzen von Patient F und G

von 2000 ein Leucin an Position X des NxS-Schemas erscheint, ist die Glykosylierung dieser Stelle bei den genannten Patienten aufgrund der schwachen Oligosaccharid-Akzeptanz [Kasturi et al., 1997] eher unwahrscheinlich. Damit sind die HIV-Quasispezies der Patienten F und G möglicherweise neutralisationsanfälliger, als die der Patienten A, B und D, die an dieser Position jeweils einen Aminosäureaustausch aufwiesen.

Die potenzielle Glykosylierungsstelle N-354 der Konsensussequenz war bei Patient D und G nach zehn Jahren erhalten, bei Patient A und B durch Insertion verschoben und bei Patient F verloren gegangen.

Die potenzielle Glykosylierungsstelle N-362 war in der Konsensussequenz und auch bei den Patienten A und F nach zehn Jahren vorhanden. Diese potenzielle Glykosylierungsstelle konnte bei den Patienten B, D und G nach zehn Jahren nicht mehr nachgewiesen werden. Bei Patient G hatte sich an N-363 nach zehn Jahren eine neue potenzielle Glykosylierungsstelle gebildet.

3.1.5.1.6 V4-Region

N-386 war in allen Sequenzen konserviert, lag benachbart zu der CD4-Bindungsstelle und der CD4-induzierten Epitope und kann die Antikörperantwort gegenüber diesen Bindungsstellen vermindern [Wyatt et al., 1998].

N-392 war nur bei Patient A und B nach zehn Jahren verschwunden.

N-396 konnte in der Konsensussequenz aufgrund von A-398 nicht glykosyliert werden, wohingegen nach zehn Jahren bei allen Patienten eine Mutation nach T-398 stattgefunden hatte, die die potenzielle Glykosylierung an N-396 ermöglicht. Ist N-396 nicht vorhanden, so kommt es zu einer verstärkten Bindung von löslichem CD4 [Reynard et al., 2004].

N-406 fand sich in der Konsensussequenz und stellte sich nach zehn Jahren bei allen Patienten als konserviert dar.

3.1.5.1.7 C4-Region

Die einzige potenzielle Glykosylierungsstelle in C4 an Position N-448 ist - unabhängig vom Subtyp - bei den meisten HIV-1 Isolaten sehr konserviert und war auch in allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben vorhanden. Diese Region trägt zur Bildung der CD4-Bindungsstelle bei und wird von Glykanen flankierender Regionen verdeckt [Kwong et al., 1998; Wyatt et al., 1998; Wyatt und Sodroski, 1998]. Ist N-448 nicht vorhanden, so kommt es zu einer verstärkten Bindung von löslichem CD4 [Reynard et al., 2004]. Die Entfernung dieses Glykans

bewirkt eine gesteigerte Neutralisation durch monoklonale Antikörper, die den V3-Loop, die CD4-Bindungsstelle und die extrazelluläre Region von gp41 (mit MAb 2F5) erkennen [McCaffrey et al., 2004]. Außerdem hindert das „sperrige“ Glykan an N-448 proteolytische Enzyme (z.B. Cathepsin B) am Zugang zum in der Nachbarschaft gelegenen Spaltungsmotif „MYAP“ (aa 434-437) [Sjölander et al., 1996].

3.1.5.1.8 V5-Region

Ein Äquivalent für N-462 der Konsensussequenz fand sich durch Verschiebung um eine aa bei allen Patienten zehn Jahre nach der Infektion. N-462 liegt in der kristallisierten Struktur laut Kwong et al. [1998] in der inneren Domäne von gp120 und ist damit nur schwer von außen für Antikörper zugänglich [Kwong et al., 1998].

N-463 kommt unabhängig vom Subtyp bei den meisten HIV-1 Isolaten vor und war auch in den untersuchten Sequenzen sehr konserviert. Die Entfernung des Glykans an N-463 bewirkt eine gesteigerte Neutralisation durch monoklonale Antikörper, die den V3-Loop, die CD4-Bindungsstelle und die extrazelluläre Region von gp41 (mit MAb 2F5) erkennen [McCaffrey et al., 2004], beeinflusste aber weder die CD4-Rezeptorbindung noch die Synzytium-Bildung [Bolmstedt et al., 1991].

3.1.5.1.9 C5-Region

In der C5-Region der in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden keine potenziellen N-Glykosylierungsstellen nachgewiesen.

3.1.5.2 gp41

Im gp41-Bereich fanden sich durchschnittlich vier bis fünf potenzielle N-Glykosylierungsstellen, die in ihrer Lage im Protein kaum variieren. Mutieren die Glykosylierungsstellen N-105, N-113 und N-126 (entsprechen N-621, N-630 und N-642 nach der Nummerierung von Fenouillet et al. [1993]) zu Glutamin, dann zeigt sich insgesamt eine ähnliche Immunreaktivität, aber auch die Unfähigkeit von HIV-1 Wirtszellen eine Membranfusion zu induzieren [Fenouillet et al., 1993]. Die Glykosylierung von gp41 insbesondere an Position N-105 (entsprechend der potenziellen Glykosylierungsstelle N-621 nach der Nummerierung von Perrin et al. [1998]) wird für die Fusionsaktivität benötigt [Perrin et al., 1998]. Sowohl die Konsensussequenz als auch die Sequenzen aus dem Jahr 2000 besaßen diese kritischen Glykosylierungsstellen.

Zusätzlich fand sich bei den Patienten A und G eine weitere Glykosylierungsstelle an Position 305 von gp41, die sich auch in der HXB2-Sequenz wiederfindet.

3.1.6 Anzahl der geladenen Aminosäuren

Unter den zwanzig wichtigsten Aminosäuren sind zwei positiv (Lysin = K und Arginin = R) und zwei negativ geladen (Asparaginsäure = D und Glutaminsäure = E). In der Tabelle 9 wurde die Anzahl der positiven und negativen Ladungen und die Gesamtladung der einzelnen Regionen der Envelope-Proteine aufgelistet.

Positive Ladung	GP120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP41
Konsensus 1990	+52	+6	+2	+5	+8	+5	+7	+1	+6	+1	+11	+38
Patient A	+55	+7	+4	+6	+9	+4	+5	+2	+5	+1	+12	+36
Patient B	+54	+7	+5	+5	+9	+5	+5	+1	+4	+2	+11	+35
Patient D	+52	+6	+2	+4	+9	+5	+8	0	+6	+1	+11	+38
Patient F	+55	+6	+4	+6	+8	+5	+8	0	+6	+1	+11	+37
Patient G	+58	+8	+3	+5	+9	+5	+9	+1	+6	+1	+11	+35
Negative Ladung	GP120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP41
Konsensus 1990	-44	-11	-3	-5	-7	-1	-5	-2	-2	-2	-6	-32
Patient A	-45	-12	-4	-4	-7	-1	-6	-2	-2	-2	-5	-33
Patient B	-41	-11	-1	-5	-9	-2	-4	0	-2	-2	-5	-27
Patient D	-43	-10	-2	-5	-6	-2	-6	-3	-2	-2	-5	-32
Patient F	-44	-12	-5	-5	-8	-2	-4	-1	-1	-2	-4	-32
Patient G	-47	-11	-3	-8	-7	-1	-5	-4	-2	-1	-5	-33
Gesamtladung	GP120	C1	V1	V2	C2	V3	C3	V4	C4	V5	C5	GP41
Konsensus 1990	+8	-5	-1	0	+1	+4	+2	-1	+4	-1	+5	+6
Patient A	+10	-5	0	+2	+2	+3	-1	0	+3	-1	+7	+3
Patient B	+13	-4	+4	0	0	+3	+1	+1	+2	0	+6	+8
Patient D	+9	-4	0	-1	+3	+3	+2	-3	+4	-1	+6	+6
Patient F	+11	-6	-1	+1	0	+3	+4	-1	+5	-1	+7	+5
Patient G	+11	-3	0	-3	+2	+4	+4	-3	+4	0	+6	+2

Tab. 9: Anzahl der geladenen Aminosäurereste in der Konsensussequenz von 1990 und den Patientensequenzen um das Jahr 2000. Maximal- und Minimalwerte wurden fettgedruckt. Auffällig war die Zunahme der positiven Nettoladung von gp120 nach zehn Jahren. Die positive Gesamtladung bei Patient B nahm im gp120- und gp41-Bereich am stärksten durch den Verlust an negativen Aminosäuren zu. Patient G gewann in gp120 nach zehn Jahren die meisten positiv und negativ geladenen Aminosäuren hinzu. Die größte Variabilität fand sich in der V1-, V2- und C3-Region.

Auffällig war eine Zunahme der positiven Netto-Ladung nach zehn Jahren im Bereich von gp120 von +8 auf bis zu +13. Regionenspezifisch fand sich im Bereich von V1, V2 und C3 die größte Variabilität und in den Regionen V3 und V5 die geringsten Unterschiede der Ladung zwischen den verschiedenen Patienten. Betrachtete man gp41, so nahm die positive Ladung nur bei einem Patienten zu und bei drei Patienten ab. Die positive Gesamtladung nahm bei Patient B im Bereich von gp120 und gp41 am stärksten durch den Verlust an negativ geladenen Aminosäuren zu. Patient G gewann nach zehn Jahren im gp120-Bereich die meisten positiv und negativ geladenen Aminosäuren hinzu (105 Ladungsträger in 2000 im Vergleich zu 96 Ladungsträgern der Konsensussequenz von 1990).

Ladungsveränderungen vom positiv geladenen Arginin (R) zur negativ geladenen Glutaminsäure (E) in den LLP-1 und LLP-2 (lentivirus lytic peptides) Bereichen der zytoplasmatischen Domäne von gp41 können zu einer starken Beeinträchtigung der Fusionseigenschaften führen [Kalia et al., 2003]. Die hier vorhandenen Sequenzen wiesen jedoch nur bei Patient G in 2000 eine tendenzielle Ladungsänderung im beschriebenen Bereich vom positiven Arginin an Position 259 zum neutralen Leucin auf.

Von Interesse ist die Ladungsverteilung in HIV-1 gp120 V3. Es wurde beschrieben, dass das Auftreten einer positiv geladenen aa an Position 306 (Position 11 in V3) oder Position 322 (Position 25 in V3, nummeriert nach der Konsensussequenz) zur Ausprägung des SI-Phänotyps von HIV benötigt wird und ein Austausch der negativ geladenen aa an Position 322 gegen eine ungeladene oder positiv geladene aa den Virus-Phänotyp verändert [De Jong et al., 1992; Resch et al., 2001]. Legt man diese Ergebnisse zu Grunde, dann lag weder 1990 noch zehn Jahre später bei den untersuchten Patienten ein SI-Phänotyp vor, da Serin an Position 306 erhalten bzw. durch das ebenfalls ungeladene Glycin (G) ersetzt wurde. Die negativ geladene Glutaminsäure an Position 322 wurde entweder gegen die negativ geladene Asparaginsäure oder das ladungsneutrale Alanin ausgetauscht. Möglicherweise ist das Verschwinden der negativen Ladung an Position 322 bei Patient A eine Vorstufe für das Erscheinen des SI-Phänotyps. Zum selben Ergebnis kommt man, wenn man die 11KR/25K-Regel von Hoffmann et al. [2002] anwendet. Wenn an Position 11 (306 von HXB2) von V3 die positiv geladenen aa Lysin oder Arginin und an Position 25 (322 von HXB2) ein Arginin vorkommt, kann HIV mit einiger Wahrscheinlichkeit den CXCR4-Rezeptor und nicht mehr CCR5 nutzen [Hoffman et al., 2002]. In den hier untersuchten HIV-1 Sequenzen wurden diese aa an den Positionen 11 und 25 nicht nachgewiesen, was auf das Vorhandensein von durchgehend CCR5 nutzenden Virusstämmen hindeutet.

3.1.7 Epitope

Soweit anhand der Sequenzen möglich wurde das Vorkommen einiger Epitope im Bereich der CD4-Bindungsstelle, CD4-induzierte Epitope und Epitope, die nicht die Rezeptorbindung blockieren untersucht.

3.1.7.1 Epitope innerhalb der CD4-Bindungsstelle

Epitope für neutralisierende Antikörper im Bereich der CD4-Bindungsstelle werden durch Mutationen von D-368 und E-370, die eine Phenylalanin-43-Kavität umgeben, unterbrochen [Wyatt et al., 1998]. In den vorhandenen Sequenzen waren Asparaginsäure-368 und Glutaminsäure-370 in allen Sequenzen erhalten.

3.1.7.2 CD4-induzierte Epitope

Das CD4-induzierte Epitop, das durch den 17b-Antikörper erkannt wird, ist abgesehen von Threonin-202 und Methionin-434 sehr konserviert [Wyatt et al., 1998]. Der V1/V2-Loop, der sehr längenvariabel ist, senkt die Sensitivität des Virus gegenüber neutralisierenden Antikörpern, die gegen V3 und CD4-induzierte Epitope gerichtet sind [Wyatt et al., 1998].

In den hier vorliegenden Sequenzen war T-202 und M-434 durchgehend vorhanden und es ergab sich kein Hinweis auf eine Veränderung der anderen fünf Elemente des 17b-Epitopes wie sie unter 1.8 in der Einleitung beschrieben sind.

3.1.7.3 Nicht-Rezeptorbindung-blockierende Epitope

Das 2G12-Epitop wird durch Veränderung der gp120 Glykosylierung im Bereich der gp120 outer domain beeinträchtigt [Wyatt et al., 1998]. Die potenziellen Glykosylierungsstellen N-295, N-332 und N-392 sind für die Bindung des neutralisierenden 2G12-Antikörpers essenziell [Dacheux et al., 2004] und finden sich in der Konsensussequenz und bei den Patienten D, F und G. Patient B besitzt weder N-295 noch N-392 und Patient A besitzt kein N-392, so dass der 2G12-Antikörper nicht binden kann. Das C108g-Epitop liegt im V2-Loop und ist abhängig von der Glykosylierung an Position N-160 und von intakten Disulfid-Brücken [Pinter et al., 2005; Wu et al., 1995]. Es umfasst minimal die aa von Position 162 bis 169 (STSIRGKV) der V2-Region [Warrier et al., 1994]. In den untersuchten Sequenzen war es durch die Mutation an der wichtigen Position 167 von Glycin (G) nach Asparaginsäure (D) verändert. Das im V3-Loop liegende D19-Epitop ist sehr konserviert, aber in R5-Isolaten nicht exponiert, während es in X4- und R5X4-Isolaten für

D19 zugänglich ist [Lusso et al., 2005]. Der V3-Sequenz nach zu urteilen, könnten die D19-monoklonalen Antikörper nicht mit dem Epitop in den hier untersuchten Patienten reagieren.

3.1.8 Wirtsfaktoren und virale Koinfektionen

Patient	Alter zum Zeitpunkt der HIV-Infektion	Hepatitis B Virus Ko-Infektion	Hepatitis C Virus Ko-Infektion	CCR5-Rezeptor Genotyp	CCR2-Rezeptor Genotyp	HLA-Haplotyp
A	22 Jahre	positiv seit 2002 keine Virämie	positiv keine Angabe über Virämie	wt/ Δ 32	wt/wt	A2 B15 A2 B27
B	10 Jahre	negativ	positiv seit mindestens 1996 virämisch	wt/wt	wt/wt	A3 B14 A68 B18
D	37 Jahre	ausgeheilt	positiv seit mindestens 1996 virämisch	wt/wt	wt/V64I	A2 B37 A2 B51
E	23 Jahre	ausgeheilt	positiv virämisch	wt/wt	wt/wt	A2 B18 A2 B35
F	9 Jahre	negativ	negativ	wt/wt	wt/V64I	A2 B7 A2 B7
G	20 Jahre	negativ	negativ	wt/wt	wt/wt	A2 B27 A24 B58

Tab. 10: Parameter in Verbindung mit der HIV-Infektion. CCR5: Chemokinrezeptor 5; CCR2: Chemokinrezeptor 2; HLA: Humanes Leukozyten Antigen; wt: Wildtyp; wt/ Δ 32: heterozygote Deletion von 32 Nukleotiden im Bereich der CCR5-Rezeptor kodierenden Region (korreliert statistisch mit einer zwei bis vier Jahre höheren Lebenserwartung, als von HIV-1 Infizierten mit CCR5-Wildtyp [Dean et al., 1996; Michael et al., 1997]) ;V64I = Mutation an Position 64 des CCR2-Rezeptor von Valin nach Isoleucin (häufig assoziiert mit einem verzögerten Verlauf der HIV-1 Infektion [Daar et al., 1999; van Rij et al., 1998])

3.2 Longitudinale Analyse der HIV-1 *env* V1/V2-Region

Da Insertionen in der HIV-1 *env* V2-Region mit einer verminderten Krankheitsprogression in Verbindung gebracht wurden [Masciotra et al., 2002; Shioda et al., 1997; Wang et al., 2000], wurde die V2-Region in allen vorhandenen Proben von 1990 bis um das Jahr 2000 analysiert. Auf diese Weise sollte der Zeitpunkt des ersten Auftretens der Insertionen ermittelt und mit der Veränderung klinischer und virologischer Parameter in Kontext gesetzt werden.

Zunächst wurde von den vorhandenen Proben aus dem Jahr 1995/1996 (1881 (Pat. G), 1921 (Pat. A), 1922 (Pat. D), 1928 (Pat. B), 1929 (Pat. F), 1953 (Pat. E)) eine 1. *env*-PCR durchgeführt. Das Produkt diente als Template für die 2. *env*-PCR. Außer Probe 1881 ließ sich für alle Proben ein Amplifikat von 2,9 kb Größe herstellen. Die Klonierung der Amplifikate führte zu sechs Kolonien der Probe 1921 und drei Kolonien der Probe 1922, die mittels positiver 2. V1/V2-PCR nachgewiesen wurden. Von sechs *env*-Kolonien der Probe 1921 und drei *env*-Kolonien der Probe 1922 wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die Identität der Plasmide wurde durch die Insert-spezifische V1/V2-PCR kontrolliert.

Nach 1. *env*-PCR, 2. *env*-PCR und 2. V1/V2-PCR konnten die V1/V2-Sequenzen der Proben 1922, 1928, 1929 und 1953 kloniert werden, so dass von acht Kolonien der Proben 1922, 1928, 1953 und von sieben Kolonien der Probe 1929 eine Plasmidpräparation angeschlossen werden konnte.

Die Probe 1839 (Patient G) von 1995 und die Probe 1672 (Patient F) konnten nach der 1. *env*-PCR und der 1. und 2. V1/V2-Nested-PCR erfolgreich amplifiziert und kloniert werden, so dass von 15 Kolonien der Probe 1839 und von zehn Kolonien der Probe 1672 eine Plasmidpräparation angeschlossen wurde.

Von den meisten vorhandenen Proben zwischen 1990 und 2000 konnte nach der 1. *env*-PCR und der 1. und 2. V1/V2-Nested-PCR erfolgreich ein V1/V2-Amplifikat hergestellt werden. Dazu gehören die Proben Patient A: 1704; Patient B: 1339, 1466, 1572, 1604, 1635, 1705, 1738, 1774; Patient E: 1413, 1462, 1597, 1682, 1795; Patient F: 1530, 2075; Patient G: 1416, 1509, 1653, 1688, 1730, 1799. Das V1/V2-Amplifikat der Proben 1413, 1462, 1572, 1653, 1682, 1688, 1730, 1795, 1799 wurde erfolgreich kloniert und von je fünf Kolonien je Probe eine Glycerinkultur angelegt. Von den meisten der genannten Proben wurde die V1/V2-Region sequenziert.

3.2.1 PCR des *env*-Gens

Im folgenden werden beispielhaft einige Gelbilder der PCR-Produkte von den oben genannten PCRs dargestellt.

3.2.1.1 1. *env*-PCR (Expand Long Template von ROCHE) z. B. mit Proben um 1995

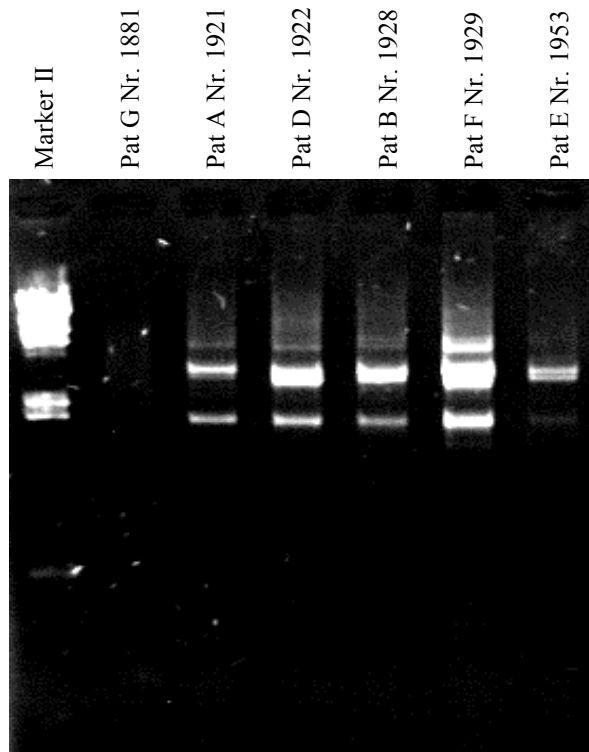


Abb. 18: Elektrophorese nach der 1. *env*-PCR mit Patientenproben um 1995. Man erkennt bei den Patienten A, B, D, E und F mehrere dicht nebeneinander liegende Banden im Bereich von 3,2 kb, allerdings auch eine zusätzliche kleinere Bande (außer bei Pat. E), so dass die 2. *env*-PCR zur weiteren Spezifizierung angeschlossen werden mußte. Die Probe von Patient G konnte nicht erfolgreich amplifiziert werden.

3.2.1.2 1. *env*-PCR und 2. *env*-PCR (HotStar von QIAGEN) z. B. mit Proben um 1995

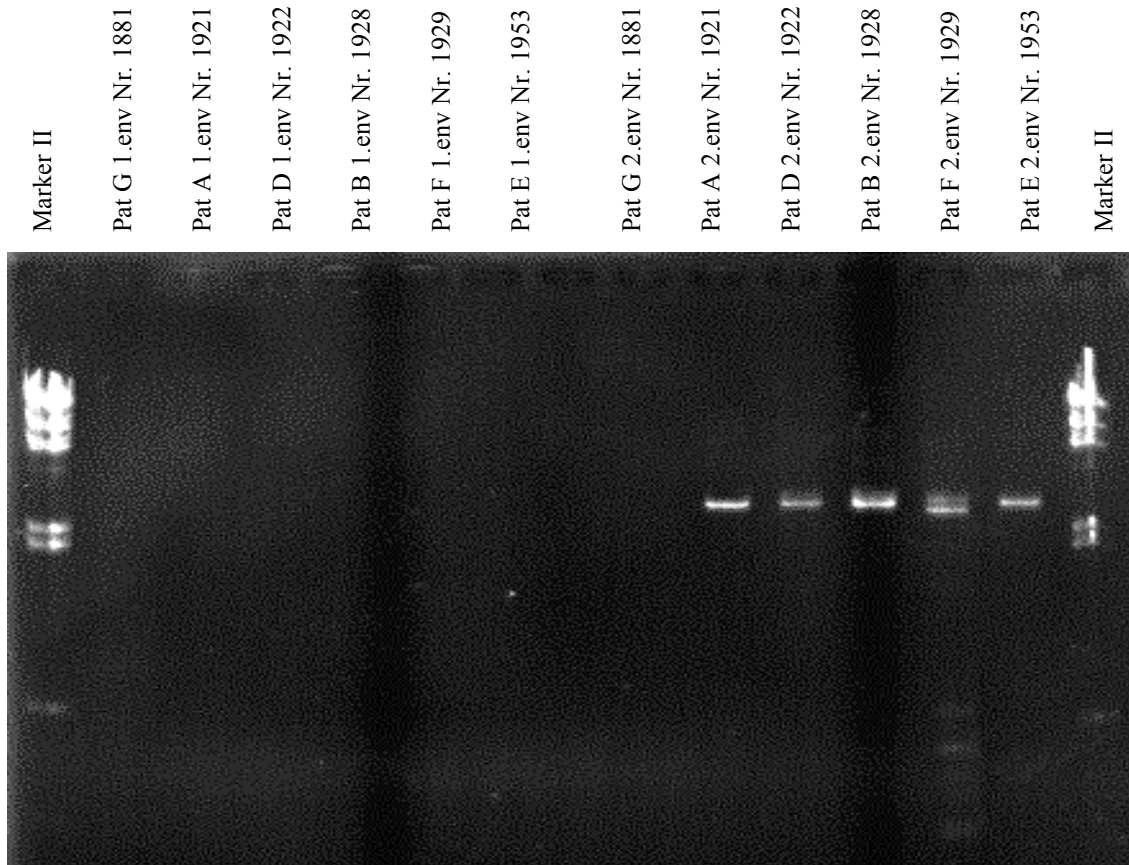


Abb. 19: Elektrophorese nach der 1./2. *env*-PCR mit HotStar-Enzym mit Proben um 1995. Mit HotStar Enzym zeigt sich zunächst in der 1. *env*-PCR kein PCR-Produkt, allerdings findet sich nach der angeschlossenen 2. *env*-PCR das gewünschte Produkt von ca. 2,9 kb Größe außer bei Probe 1881 von Patient G.

3.2.2 PCR der V1/V2-Region

Beispielhafte Darstellung der Gelbilder der V1/V2-PCR-Produkte von den oben genannten PCRs.

3.2.2.1 1. und 2. Nested-V1/V2-PCR (HotStar von QIAGEN)

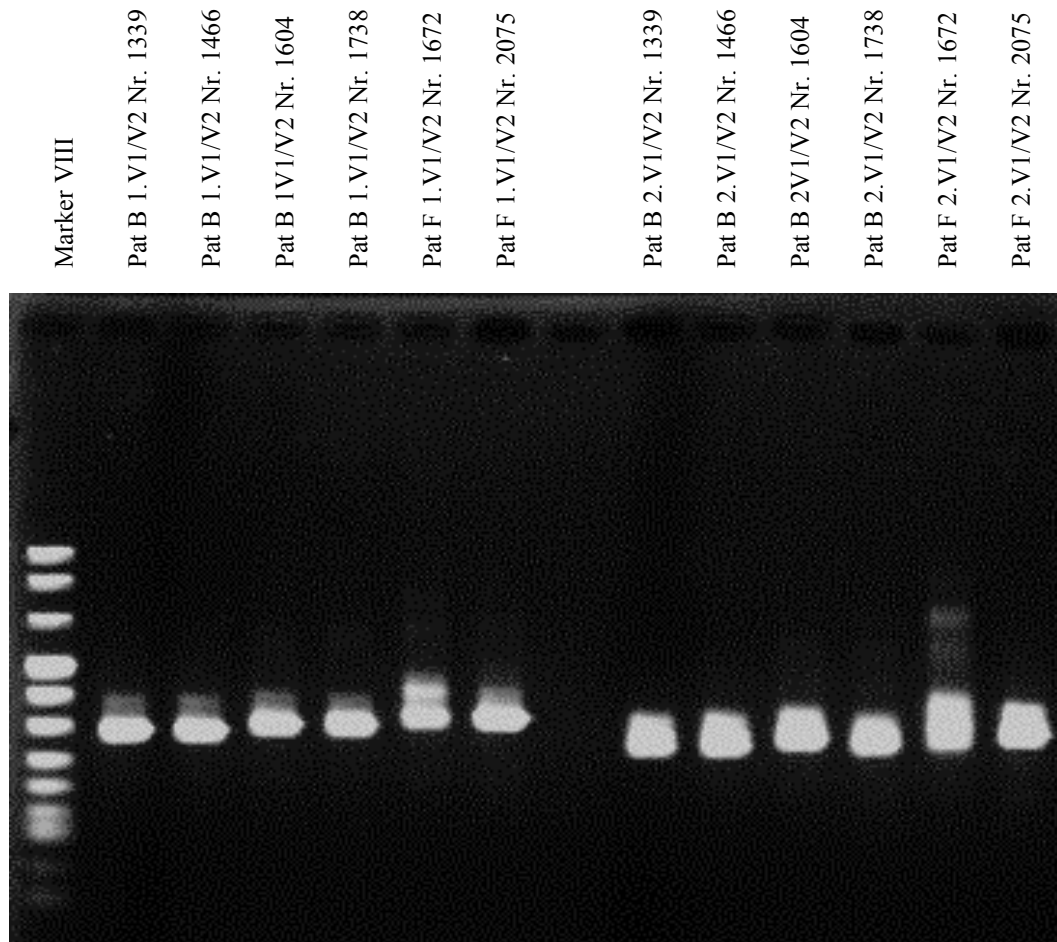


Abb. 20: Elektrophorese nach der 1. und 2. V1/V2-Nested-PCR mit HotStar-Enzym von Proben der Patienten B und F aus verschiedenen Jahren. Das Produkt aus der 1. PCR (320 bp) findet sich auf Höhe der 320 bp Bande von Marker VIII und das Produkt aus der 2. PCR (290 bp) findet sich etwas darunter.

3.2.2.2 2. V1/V2-PCR Produkte (HotStar von QIAGEN) aus Bakterienkolonien

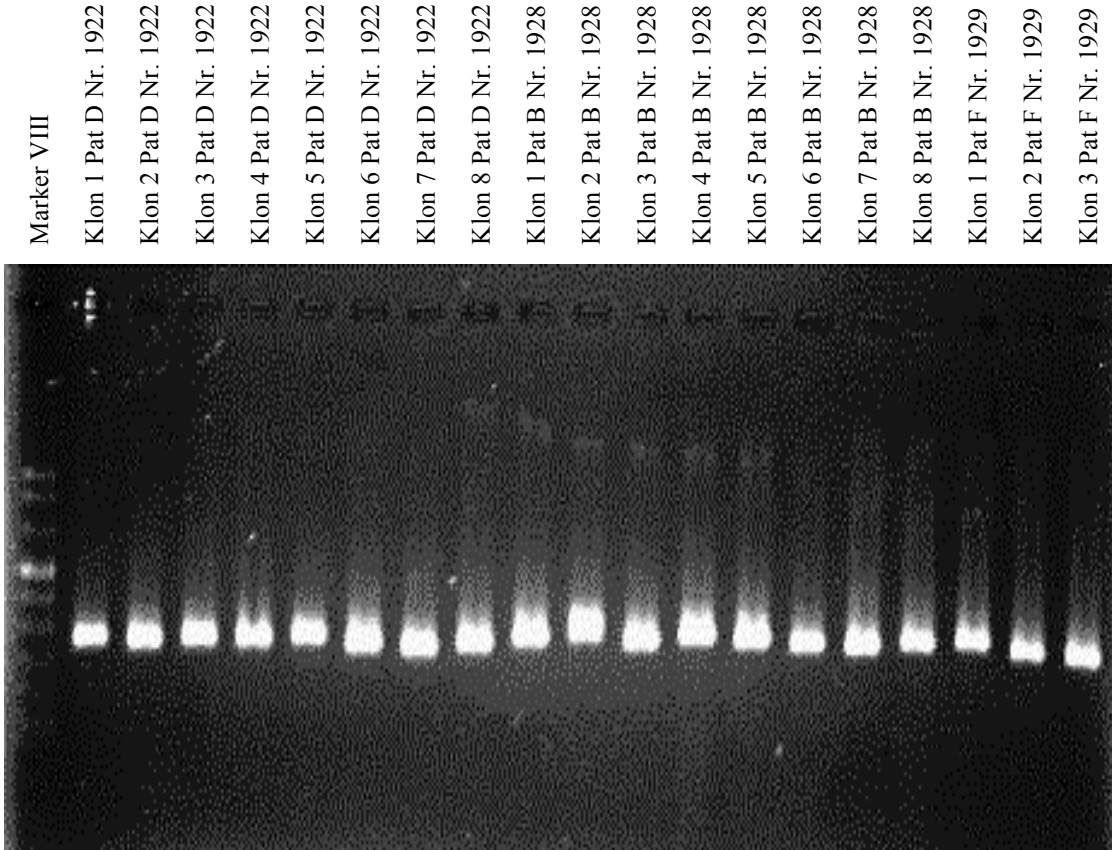


Abb. 21: Elektrophorese nach der 2. V1/V2-PCR aus klonierten V1/V2-Kolonien von Proben der Patienten B, D und F mit erwartetem PCR-Produkt bei ca. 290 bp.

3.2.3 Nukleinsäure-Alignment der V2-Region

siehe Abbildung 27 im Anhang

3.2.4 Aminosäure-Alignment mit Markierung der Ladungen und potenziellen N-Glykosylierungsstellen

Patient A V2												Ladung																																
		1	10	20	30	35	pos	neg	ges																																			
Konsensus		S	N	I	T	S	S	I	R	D	K	M	Q	E	Y	A	L	F	Y	K	L	D	V	V	P	I	D	G	E	-----	N	T	S	Y	R	L	I	N	C	5	5	0		
07/94 1704		5	5	0
12/95 1921:1;2;4		5	5	0	
1a;4a;5a		5	5	0	
1921:3a		.	S	5	5	0	
1921:6a		5	5	0	
1999		6	4	+2	

Patient B V2	1	10	20	30	35	Ladung				
						pos	neg	ges		
Konsensus	SF	N ITSSIRDKM Q KEYALFYKLDVVPIDG E ----- N TSYRLINC	5	5	0					
11/91 1339	5	5	0		
12/92 1466	5	5	0		
07/93 1572:1	.	.	T	D	.	4	5	-1		
1572:3	.	.	T	.	N .	4	5	-1		
1572:2;4;5	N .	5	5	0		
10/93 1604	N .	5	5	0		
01/94 1635	.	.	Q	T	D	4	4	0		
07/94 1705	.	N	Q	T	D	4	4	0		
10/94 1738:1;4	.	.	Q	T	K	N .	5	3	+2	
1738:2;3	.	G	Q	T	K	N .	5	3	+2	
01/95 1774:1	.	.	Q	T	.	N .	4	4	0	
1774:2	.	G	Q	T	.	N .	4	4	0	
1774:3	.	.	Q	T	K	N .	5	3	+2	
1774:4	.	G	Q	T	K	N .	5	3	+2	
01/96 1928:1	.	G	Q	T	K	N .	5	3	+2	
1928:3	.	G	Q	T	KD	N .	5	4	+1	
1928:5	.	N	I	Q	T	D	4	4	0	
1928:6	.	G	I	Q	T	DDK	N .	5	5	0
1928:7	.	G	Q	T	NGK	N .	5	3	+2	
1928:8	.	G	Q	T	DDK	N .	5	5	0	
2001	.	PV	T	Q	T	EDDK	T	5	5	0

Patient D V2	1	10	20	30	35	Ladung		
						pos	neg	ges
Konsensus	SF	N ITSSIRDKM Q KEYALFYKLDVVPIDG E ----- N TSYRLINC	5	5	0			
12/95 1922:1;4	.	.	.	S	.	4	5	-1
1922:6	.	.	.	S	D	4	5	-1
1922:6a	5	5	0
1922:7a	.	.	S	.	.	5	5	0
>2000	.	.	S	S	D	4	5	-1

Patient E V2	1	10	20	30	35	Ladung			
						pos	neg	ges	
Konsensus	SF	N ITSSIRDKM Q KEYALFYKLDVVPIDG E ----- N TSYRLINC	5	5	0				
05/92 1413:5	.	.	.	S	N	5	4	+1	
10/92 1462:3	.	.	.	S	N	5	4	+1	
09/93 1597	.	.	F	.	N T	5	5	0	
05/94 1682:4	.	.	.	Q	N	5	4	+1	
1682:5	.	.	T	R	D	5	5	0	
02/95 1795:1	.	.	Y	S	.	N T	5	5	0
03/96 1953:2;5	.	.	Y	Q	N	N D	5	4	+1
1953:3	.	.	.	L	K	N	6	4	2
1953:1	.	.	D	S	N	N T	5	5	0

Patient	F	V2	1	10	20	30	35	Ladung																				
								pos	neg	ges																		
		Konsensus	SF	<u>N</u> ITSSIRDKMQKEYALFYKLDVVPIDG <u>N</u> T-----SYRLINC	5	5	0																					
03/93		1530	..	Y	..	G	D	..	5	4	+1																	
04/94		1672:d;1a	..	Y	..	L	..	G	D	--	SD	N	..	5	5	0												
		1672:3n;4n	N	I	..	K	6	1	+5												
		1672:5a	A	5	4	+1												
		1672:5n	N	L	..	L	LG	N	..	5	3	+2												
01/96		1929:1	M	..	G	K	..	T	..	G	N	D	..	<u>N</u> N	T	N	Y	T	N	..	S	5	4	+1		
		1929:2;3;4;5;8	A	5	4	+1	
		1929:6	M	A	5	4	+1	
		1929:7	L	..	L	G	D	5	4	+1	
02/97		2075	F	..	M	K	..	T	4	5	-1	
		2000	M	E	H	6	5	+1

Patient	G	V2	1	10	20	30	35	Ladung																							
								pos	neg	ges																					
		Konsensus	SF	<u>N</u> ITSSIRDKMQKEYALFYKLDVVPIDG----- <u>N</u> TSYRLINC	5	5	0																								
06/92		1416:1d;2d	..	V	5	5	0															
02/93		1509:1d;2d	..	V	5	5	0															
		3d;4d
02/94		1653:1;2;3	..	V	..	T	N	5	5	0				
		1653:4	..	V	..	T	..	L	N	5	5	0				
		1653:5	..	V	..	TR	N	6	5	+1				
05/94		1688:3;4;5	..	V	..	T	N	5	5	0				
09/94		1730:1	..	V	..	R	..	H	..	T	..	F	5	3	+2				
		1730:2;5	..	V	..	R	T	5	4	+1				
		1730:4	..	V	..	N	..	T	6	3	+3				
03/95		1799:1	..	V	G	5	4	+1				
		1799:4	..	V	..	M	..	T	Q	4	6	2				
06/95		1839:10	..	V	5	5	0				
		1839:11	..	V	5	6	-1				
		1839:3	..	V	..	K	Q	5	6	-1				
		1839:8	..	V	..	K	6	5	+1				
		1839:12	..	V	6	5	+1				
		1839:2;4	..	V	..	R	E	4	6	-2				
		1839:9	..	V	..	R	E	4	6	-2				
		2000	..	V	..	G	..	R	T	5	8	-3				

Abb. 22: Aminosäure-Alignment der HIV-1 *env* V2-Region im Verlauf von zehn Jahren. Am Anfang einer Zeile stehen Monat und Jahr der Probenentnahme, anschließend die Probennummer. Klone einer Probe stehen hinter einem Doppelpunkt und wurden willkürlich benannt z.B. 1 oder 2d; d alleine heißt Direktsequenzierung. Stimmen mehrere Klone in ihrer Aminosäuresequenz überein, wurden sie hinter dem Doppelpunkt durch Semikolon getrennt aufgezählt z.B. 1509:1d; 2d; 3d; 4d. Punkte stehen für dieselbe Aminosäure (aa) im Alignment, Striche für fehlende Insertionen im Alignment der Proben aller Patienten. Am Zeilenende stehen die Anzahl der negativen und positiven Ladungen und die Nettoladung (ges). Dunkelgrau hinterlegte aa haben eine positive (R, K), hellgrau hinterlegte aa eine negative Ladung (D, E). Potenzielle N-Glykosylierungsstellen sind fettgedruckt und unterstrichen (N).

3.2.5 Längenvergleich und Beschreibung auffälliger Mutationen in V2

3.2.5.1 Patient A

Es lagen Proben von 1994 und 1995 vor. Weder 1994 noch 1995 oder 1999 gab es Insertionen oder Deletionen. Auffällig in den Klonen von 1995 war die Mutation E30D, die zwischen 1995 und 1999 zu Glutamin mutiert.

3.2.5.2 Patient B

Die erste Insertion trat 1993 zwischen Position 30 (E) und 31 (N) in Form der Aminosäure Asparagin in vier von fünf Klonen einer Probe und einer zweiten Probe aus demselben Jahr auf. Von Ende 1994 an fand sich diese Mutation in fast allen Klonen und Proben bis 1996 und war in 2001 zu Threonin mutiert. Es fand sich eine zweite Insertion in Form von Lysin nach Position 30 im Jahr 1996 bei vier von sieben Klonen, die sich bis 2001 durchgesetzt hatte.

Lysin fand sich jedoch schon 1994 durch eine Mutation an Position 30. Wie bei Patient A zeigte sich bereits 1993 in einem von vier Klonen eine Mutation von Glutaminsäure zu Asparaginsäure an Position 30, die in zwei Proben von 1994 wiederkehrte, sich in den meisten Klonen von 1996 wiederfand und sich bis 2001 durchsetzte. Zusätzlich war Glycin an Position 29 bei den meisten Klonen aus 1996 zu Asparaginsäure mutiert und fand sich auch in 2001 wieder. An Position 15 war Glutaminsäure von 1994 an zu Glutamin mutiert und an Position 21 war Lysin 1993 in zunächst 40% der Klone einer Probe und ab 1994 in allen Proben und Klonen zu Threonin mutiert. Das ursprüngliche Serin an Position 7 ist ab 1994 durch andere Aminosäurereste ersetzt worden (zunächst Asparagin, dann immer häufiger Glycin und in 2001 Valin).

3.2.5.3 Patient D

Es zeigten sich weder Insertionen noch Deletionen. Auffällig war die Mutation von Lysin zu Serin an Position 21 zunächst in der Hälfte der Klone von 1995, die sich schließlich bis 2000 durchsetzte. An Position 30 fand sich in einem Klon von 1995 eine Mutation von Glutaminsäure zu Asparaginsäure, die sich zwischen 1995 und 2000 ebenfalls durchsetzte.

3.2.5.4 Patient E

Bereits in 1993 fand sich eine Insertion in Form von Asparagin nach Glutaminsäure an Position 30. Diese Insertion schien sich bis 1996 jedoch noch nicht komplett durchzusetzen, da weiterhin Klone ohne diese Insertion nachgewiesen wurden.

Auffällig war, dass Glutaminsäure an Position 30 häufig zu Asparaginsäure oder gar Asparagin mutierte. Des Weiteren mutierte Prolin an Position 26 von 1992 an häufig zu Serin oder Glutamin, ohne dass sich eine Mutation in allen Klonen von 1996 durchsetzte. Asparaginsäure an Position 28 mutierte von 1992 bis 1996 häufig zu Asparagin. Leucin an Position 22 mutierte in 1995 und 1996 in mehreren Klonen zu Tyrosin und in 1996 schließlich auch bei einem Klon zu Asparaginsäure. Mutationen von Asparagin an Position 31 zu Threonin traten ab 1993 auf und fanden sich ab 1995 zusammen mit der Mutation zu Serin bei fast allen Klonen.

3.2.5.5 Patient F

Bei Patient F fand sich bei einem von fünf Klonen und der Direktsequenzierung des Genoms von 1994 eine Insertion von vier Aminosäuren. Bei einem von acht Klonen aus 1996 wurde eine Insertion von sechs Aminosäuren und bei einem eine Insertion von einer Aminosäure festgestellt. Im Jahr 2000 zeigte sich eine Insertion von zwei Aminosäuren. Die Insertionen traten jeweils ungefähr nach Threonin an Position 32 auf. Die Probe von 1997 hatte als einzige zwei Deletionen an Position 9 und Position 29.

Die häufigsten Mutationen fanden sich an Position 28 mit der Mutation von Asparaginsäure zu Glycin bzw. Alanin und an Position 30 mit der Mutation von Glutaminsäure zu Asparaginsäure. Seltener war die Mutation an Position 8 von Isoleucin in je einem Klon von 1994 und 1996 nach Leucin und parallel in 1996 in zwei Klonen und in 1997 und 2000 jeweils zu Methionin. Eine weitere Mutation fand sich an Position 38 von Asparagin zu Serin bei je einem Klon in 1994 und 1996 und in den Proben von 1997 und 2000.

3.2.5.6 Patient G

In 1994 fand sich bei drei verschiedenen Proben und den meisten Klonen eine Insertion von Asparagin nach Position 30. In fast allen Klonen der Proben von 1995 konnte eine Insertion von Asparaginsäure nach Position 30 detektiert werden. Im Jahr 2000 wurde schließlich eine Insertion von fünf Aminosäuren festgestellt.

Auffällig war die Mutation an Position 4 von Isoleucin zu Valin bereits 1992, die sich bis zum Jahr 2000 bei allen Klonen fortsetzte, sich aber bei den übrigen Patienten nicht fand. An Position 11 trat bei mehreren Klonen von 1994, 1995 und bei der Sequenz aus 2000 eine ladungsneutrale Mutation von Lysin nach Arginin auf. An Position 12 fand sich bei einigen Klonen aus 1994 und 1995 eine Mutation von Methionin zu Threonin. An Position 21 mutierte Lysin in 1994 und 1995

bei einigen Klonen zu Threonin bzw. in 1995 auch zu Glutaminsäure. In 2000 fand sich wieder Threonin an dieser Position. An Position 30 mutierte Glutaminsäure in allen Klonen der späten Probe von 1994 zu Lysin. Diese Mutation fand sich nur noch in einem Klon von 1995.

3.2.5.7 Zusammenschau der Mutationen/Insertionen bei allen Patienten

Die Patienten A und D wiesen in allen Proben keinerlei Insertionen auf. Die Patienten B, E, F und G hatten Insertionen von bis zu sechs Aminosäuren nach der 30. oder 32. Aminosäure von V2. Zum Teil waren diese Insertionen mit einem Zuwachs an Ladungsträgern verbunden. Eine Insertion von einer aa wurde bei den Patient B und E schon seit 1993 nachgewiesen. Patient B hatte seit 1996 in einigen Klonen zwei aa als Insertion. Patient F hatte in 1994 in zwei Klonen eine erste Insertion von vier aa, in 1996 eine Insertion von sechs aa und in 2000 eine Insertion von zwei aa. Patient G hatte in 1994 eine erste Insertion von einer aa und in 2000 plötzlich von fünf aa.

Der Austausch vom positiven Lysin zum neutralen Threonin an Position 21 fand sich bei mehreren Klonen bei Patient B, E, F und G nicht jedoch bei Patient A und D. Die ladungsneutrale Mutation an Position 30 von Glutaminsäure zu Asparaginsäure fand sich bei vielen Klonen von Patient A, B, D, E und F nicht jedoch bei Patient G, der hier jedoch bei einigen Klonen einen Ladungswechsel von der negativen Glutaminsäure zum positiven Lysin aufwies. Bei Patient D, E, F und G fand sich bei einigen Sequenzen vor allem auch im Jahr 2000 eine Mutation von Asparagin an Position 38 zu Serin.

3.2.6 Ladungen

3.2.6.1 Zusammenfassende Betrachtung der Ladungen bei allen Patienten

Die positive Ladung an Position 9, 11, 14 und 35 war bei allen vorhandenen Sequenzen aller Patienten erhalten. Allenfalls kamen ladungsgleiche Mutationen von Lysin zu Arginin wie an Position 11 bei Patient G vor. Ebenso war die negative Ladung an Position 10 und 23 überwiegend bei allen Sequenzen erhalten. Glutaminsäure an Position 15 mutierte bei Patient A, D, E und G überhaupt nicht, bei Patient B auffälligerweise ab 1993 zum neutralen Glutamin und bei Patient F in zwei Sequenzen von 1994 zum positiven Lysin.

An Position 30 fanden sich die meisten ladungsgleichen Mutationen von Glutaminsäure zu Asparaginsäure, die bei allen Patienten außer Patient G vorkamen. An dieser Position kam es jedoch auch häufiger zu einer Mutation zu neutralen Aminosäuren oder gar zum positiven Lysin.

Ähnliches galt für Asparaginsäure an Position 28. Lysin an Position 21 mutierte bei Patient B, E, F und G in mehreren Sequenzen bzw. bei Patient B in allen Sequenzen ab 1994 zum neutralen Threonin, bei Patient D auch zu Serin und war nur bei Patient A nicht mutiert. Bei Patient G kam es an dieser Stelle auch in zwei Klonen von 1995 zu einer Mutation zur negativen Glutaminsäure. Die Änderung der Gesamtladung in V2 erschien letztlich sehr variabel und reichte von neutral in der Konsensussequenz zu plus zwei (Patient A) oder minus drei (Patient G).

3.2.7 N-Glykosylierungsstellen

Die meisten Klone und Proben besaßen potenzielle N-Glykosylierungsstellen an Position 3 und 31 der V2-Region (siehe Abbildung 22). Die Patienten B, F und G wiesen aufgrund von Insertionen zwischen Position 30 und 31 in einigen Klonen und Proben eine dritte potenzielle N-Glykosylierungsstelle auf. Patient B hatte diese Glykosylierungsstelle von 1993 bis 1996 in der überwiegenden Zahl der Klone aller Proben, allerdings nicht mehr im Jahr 2001. Patient F zeigte diese zusätzliche potenzielle N-Glykosylierungsstelle nur in drei Proben aus dem Jahr 1994 und 1996, hatte in 1997 gar nur eine potenzielle N-Glykosylierungsstelle und in 2000 wieder zwei. Patient G hatte eine dritte N-Glykosylierungsstelle in vielen Klonen und Proben von 1994, sie fand sich in 1995 trotz Insertionen nicht mehr, aber wieder im Jahr 2000. In Klon 1730:4 von 1994 fanden sich sogar vier potenzielle N-Glykosylierungsstellen. Auffällig bei Patient E war, dass die Glykosylierungsstelle an Position 31 zwar in einigen Proben durch Mutation verschwand, aber entweder durch eine Insertion von Asparagin vor Position 31 oder durch eine Mutation zu Asparagin an Position 29 oder 30 ersetzt wurde. In einem Klon von 1996 existierten sogar durch Insertion und Mutation zwei nebeneinander liegende N-Glykosylierungsstellen an Position 30 und zwischen Position 30 und 31. Patient A und D zeigten die größte Konstanz in der Position und Anzahl der potenziellen N-Glykosylierungsstellen, allerdings war bei Patient A die zweite potenzielle N-Glykosylierungsstelle im Jahr 1999 verloren gegangen.

3.2.8 Genetische Distanz von V2

Die genetische Distanz ist die Anzahl der Mutationen geteilt durch die Nukleotidlänge in diesem Bereich. Die Insertionen wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Bei Deletionen wurde die Nukleotidlänge von V2 bei der Berechnung entsprechend angepasst. Es wurde die genetische Distanz der non-synonymen Mutationen (Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen) und der Gesamtmutationen (Summe aus synonymen und non-synonymen Mutationen) berechnet.

3.2.8.1 Patient A (117 Nukleotide)

Monat/Jahr / Probennummer/Klon	Non-synonyme Mutationen (NS)	Synonyme Mutationen (S)	Genetische Distanz (NS; NS+S) in %
07/94 1704	0	1	0; 0,85
12/95 1921:1;2;4;1a;4a;6a	1	0	0,85; 0,85
1921:3a; 5a	2	0	1,71; 1,71
1999	6	0	5,13; 5,13

Tab. 11: Genetische Distanz von *env* V2 bei Patient A.

Soweit bei geringer Probenanzahl beurteilbar zeigte sich eine stetige Zunahme der non-synonymen Mutationen und der genetischen Distanz.

3.2.8.2 Patient B (117 Nukleotide)

Monat/Jahr / Probennummer/Klon	Non-synonyme Mutationen (NS)	Synonyme Mutationen (S)	Genetische Distanz (NS; NS+S) in %
11/91 1339	0	0	0; 0
12/92 1466	0	0	0; 0
07/93 1572: 2; 4; 5	0	0	0; 0
1572: 3	1	0	0,85; 0,85
1572: 1	2	0	1,71; 1,71
10/93 1604	0	1	0; 0,85
01/94 1635	3	0	2,56; 2,56
07/94 1705	4	1	3,42; 4,27
10/94 1738: 1; 4	3	0	2,56; 2,56
1738: 2; 3	4	0	3,42; 3,42
01/95 1774: 1	2	0	1,71; 1,71
1774: 2; 3	3	0	2,56; 2,56
1774: 4	4	0	3,42; 3,42
01/96 1928: 1	4	0	3,42; 3,42
1928: 5	5	0	4,27; 4,27
1928: 8	5	1	4,27; 5,13
1928: 3; 6	6	1	5,15; 5,98
1928: 7	7	1	5,98; 6,84
2001	10	2	8,55; 10,26

Tab. 12: Genetische Distanz von *env* V2 bei Patient B.

Es zeigte sich eine stetige und große Zunahme vor allem der non-synonymen Mutationen und damit der genetischen Distanz.

3.2.8.3 Patient D (117 Nukleotide)

Monat/Jahr / Probennummer/Klon	Non-synonyme Mutationen (NS)	Synonyme Mutationen (S)	Genetische Distanz (NS; NS+S) in %
12/95 1922: 6a	0	0	0; 0
1922: 1; 4	2	0	1,71; 1,71
1922: 7a	1	2	0,85; 2,56
1922: 6	3	1	2,56; 3,42
2000	3	0	2,56; 2,56

Tab. 13: Genetische Distanz von *env* V2 bei Patient D.

Soweit bei geringer Anzahl der Proben/ Klone beurteilbar zeigte sich eine leichte Zunahme der non-synonymen Mutationen und der genetischen Distanz.

3.2.8.4 Patient E (117 Nukleotide)

Monat/Jahr / Probennummer/Klon	Non-synonyme Mutationen (NS)	Synonyme Mutationen (S)	Genetische Distanz (NS; NS+S) in %
05/92 1413: 5	2	0	1,71; 1,71
10/92 1462:3	3	0	2,56; 2,56
09/93 1597	2	0	1,71; 1,71
05/94 1682:4	3	1	2,56; 3,42
1682:5	3	2	2,56; 4,27
02/95 1795:1	5	1	4,27; 5,13
03/96 1953: 2	8	2	6,84; 8,55
1953: 5	8	2	6,84; 8,55
1953:3	7	2	5,98; 7,69
1953:1	6	0	5,13; 5,13

Tab. 14: Genetische Distanz von *env* V2 bei Patient E.

Es zeigte sich im großen und ganzen eine stetige Zunahme der non-synonymen Mutationen und damit der genetischen Distanz.

3.2.8.5 Patient F (117 Nukleotide)

Monat/Jahr / Probennummer/Klon	Non-synonyme Mutationen (NS)	Synonyme Mutationen (S)	Genetische Distanz (NS; NS+S) in %
03/93 1530: 1; 2	4	1	3,42; 4,27
04/94 1672: 5a	1	0	0,85; 0,85
1672: d; 1a	5	0	4,27; 4,27
1672: 5n	8	1	6,84; 7,69
1672: 3n; 4n	6	5	5,13; 9,40
01/96 1929: 6	2	0	1,71; 1,71
1929: 2; 3; 4; 5; 8	1	0	0,85; 0,85
1929: 7	4	0	3,42; 3,42
1929: 1	10	0	8,55; 8,55
02/97 2075 (111NT)	8	1	7,21; 8,11
2000 (114 NT)	5	0	4,27; 4,27

Tab. 15: Genetische Distanz von *env* V2 bei Patient F.

Es zeigte sich eine hohe Variabilität der genetischen Distanz der Klone zu einem Entnahmezeitpunkt und auch im Verlauf der Jahre und letztendlich nur eine mäßige Zunahme der genetischen Distanz nach zehn Jahren.

3.2.8.6 Patient G (117 Nukleotide)

Monat/Jahr / Probennummer/Klon	Non-synonyme Mutationen (NS)	Synonyme Mutationen (S)	Genetische Distanz (NS; NS+S) in %
06/92 1416: 1d; 2d	1	0	0,85; 0,85
02/93 1509: 1d; 2d	1	1	0,85; 1,71
1509: 3d; 4d	1	1	0,85; 1,71
02/94 1653: 1; 2; 3	2	0	1,71; 1,71
1653: 4; 5	3	0	2,56; 2,56
05/94 1688: 3; 4; 5	2	0	1,71; 1,71
09/94 1730: 5	4	0	3,42; 3,42
1730: 4	4	1	3,42; 4,27
1730: 2	5	0	4,27
1730: 1	7	1	5,98; 6,84
03/95 1799: 1	3	0	2,56; 2,56
1799: 4	5	1	4,27; 5,13
06/95 1839: 10	1	0	0,85; 0,85
1839: 11	1	1	0,85; 1,71
1839: 3	3	1	2,56; 3,42
1839: 2; 4; 8; 9; 12	4	0	3,42; 3,42
2000	7	3	5,98; 8,55

Tab. 16: Genetische Distanz von *env* V2 bei Patient G

Es zeigte sich eine Zunahme der genetischen Distanz über die Zeit, allerdings mit undulierenden Werten.

Zusammenfassend zeigten Patient B (10,26%) und Patient E (8,55%) eine stetige und große Zunahme der genetischen Distanz. Die Patienten F und G verzeichneten eine mäßige bis große, allerdings undulierende Zunahme der genetischen Distanz (7,2% in 1997 und 4,27% in 2000 bei Patient F). Von den Patienten A und D lagen insgesamt die wenigsten Proben vor, so dass eine Aussage über die Entwicklung der Divergenz nur begrenzt möglich war. Patient A zeigte nach zehn Jahren mit 5,15% eine relativ hohe Divergenz, während Patient D mit 2,56% nach zehn Jahren die niedrigste genetische Distanz in V2 aufwies.

3.2.9 Diversität

Anhand der Sequenzen der geklonten Proben konnte die Diversität von HIV-1 V2 in den einzelnen Patienten ermittelt werden.

Zeitpunkt	Patient A	Patient B	Patient D	Patient E	Patient F	Patient G
05/1992						
06/1992						1/2=0,5
10/1992						
02/1993						1/4=0,25
07/1993		3/5=0,6				
02/1994						3/5=0,6
04/1994					4/6=0,67	
05/1994				2/2=1		1/3=0,33
09/1994						3/4=0,75
10/1994		2/4=0,5				
01/1995		4/4=1				
02/1995						
03/1995						2/2=1
06/1995						7/8=0,875
12/1995	3/8=0,375		4/5=0,8			
01/1996		6/6=1			4/8=0,5	
03/1996				3/4=0,75		

Tab. 17: Tendenz der Diversität der V2-Region. Berechnung: Anzahl der verschiedenen Sequenzen im Verhältnis zur Zahl der auswertbaren Klone eines Probenzeitpunktes. 3/8 bedeutet also, dass drei verschiedene Sequenzen in acht Klonen vorlagen.

Aufgrund der höheren Probenzahl mit erfolgter erfolgreicher Klonierung kann bei den Patienten B und G eine Tendenz zur Entwicklung der Diversität abgelesen werden. Demnach scheint bei Patient B und G die Diversität im V2-Bereich zuzunehmen. Von den Patienten A, D, E und F liegen für eine Interpretation zu wenige Daten vor.

Pat	Datum Labor- nummer	Viruslast RNA/ml	CD4 ⁺ absolut Zahl/ μ l	CD4 ⁺ relativ %	Lympho- zyten- Kultur	Mono- zyten Kultur	antiretrovirale Therapie
D	1099P 10.05.90	11.000	692	38	N		AZT AZT/3TC AZT/3TC/SQV
	1356P 14.01.92	< 4.000	313	37	N		
	1520P 02.03.93	< 4.000	209	31	N		
	1605P 14.10.93	9.000	217	32	N		
	1716P 04.08.94	8.500	170	25	N		
	1783P 19.01.95	16.000	220	20	NSI	n	
	1907P 09.11.95	240.000					
	1922P 19.12.95	32.000	99	15	N	n	
	2044P 31.10.96	21.000	166	20	NSI	n	
	08660 10.04.97	< 4.000	292	31			
	10944 07.05.98	100	332	32			
	2392P 24.06.99	< 80	226	28			
	2480P 11.05.00	< 80	292	32			
F	1164P 10.10.90	18.000	725	31	NSI		AZT/3TC/NFV
	1296P 20.08.91	46.000	843	21	NSI		
	1530P 30.03.93	7.300	686	36	N	n	
	1672P 14.04.94	< 4.000	850	21	NSI	n	
	1929P 11.01.96	28.000	654	18	NSI		
	2075P 06.02.97	26.000	496	18	NSI	p	
	2265P 28.05.98	29.000	549	18	NSI		
	2371P 22.04.99	230	587	26	NSI		
	2481P 11.05.00	2000	746	30	N		
G	1116P 12.06.90	< 4.000	689	39	N		keine
	1301P 27.08.91	9.000	577	41	NSI		
	1416P 02.06.92	< 4.000	711	38	N		
	1509P 02.02.93	< 4.000	587	40	N	n	
	1653P 17.02.94	< 4.000	401	39	N		
	1688P 26.05.94		490	35	N	n	
	1730P 08.09.94	6.000	440	32	N		
	1799P 02.03.95	15.000					
	1839P 01.06.95	21.000	330	35	N	n	
	25897 24.10.96	120.000					
	13625 10.06.97	40.000					
	11829 18.05.98	14.000	355	26			
	25813 04.11.99	12.000	379	34			
	2466P 14.03.00	62.000	407	30	N		

Tab. 18: Klinische und virologische Daten der Patienten aus der Diplomarbeit von Klein [1997], den Daten aus der Krankenversorgung des Instituts für Virologie, des Instituts für Hämatologie und Transfusionsmedizin und der Immunologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik I der Universitätsklinik in Bonn. NSI, SI oder N: Phänotyp der Lymphozytenisolate, NSI: nicht Synzytien induzierend, SI: Synzytien induzierend, N: negative Virusanzucht; n, p oder u: Ergebnisse der Monozyten Kultur, n: negativ, p: positiv, u: unbestimmbar; CD4⁺ absolut: CD4⁺

Zellzahl pro μl Blut, CD4^+ relativ: Prozent der CD4^+ Zellen von der Gesamtzahl der Lymphozyten pro μl Blut; *: Therapie wurde wegen Hepatitis C Symptomen abgebrochen; Viruslast $< 4000/\text{ml}$ oder $< 80/\text{ml}$ bedeutet unterhalb der zum Untersuchungszeitpunkt existierenden Nachweisgrenze (Nachweisgrenze bis 1997: Viruslast $< 4000/\text{ml}$, von 1998 bis 2000 Nachweisgrenze bis 80 HIV-Kopien/ml, von 2001 an lag die Nachweisgrenze bei 50 Kopien/ml).

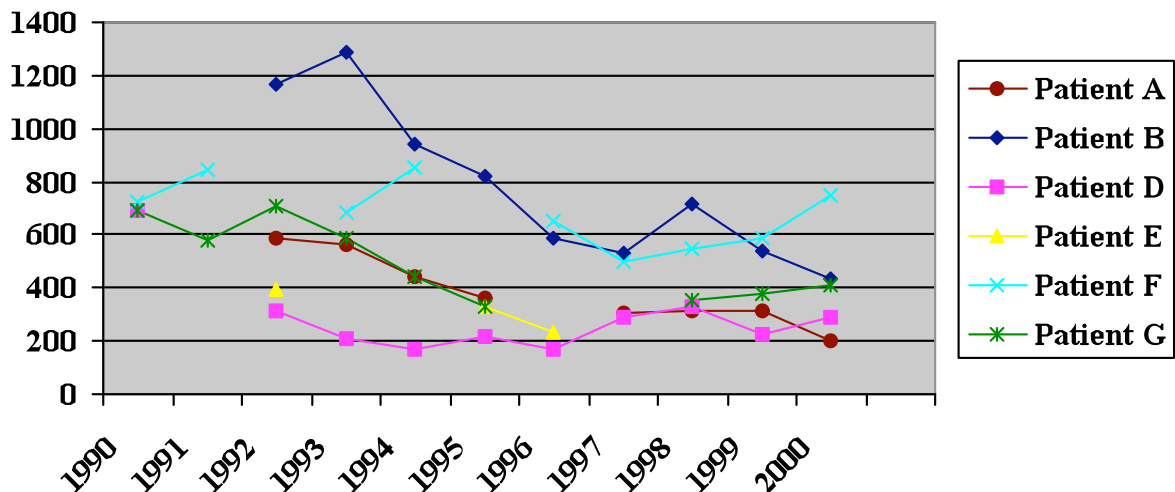


Abb. 23: Verlauf der CD4^+ T-Zellzahl innerhalb von zehn Jahren. CD4^+ T-Zellzahl / μl Blut (Y-Achse); Jahr (X-Achse)

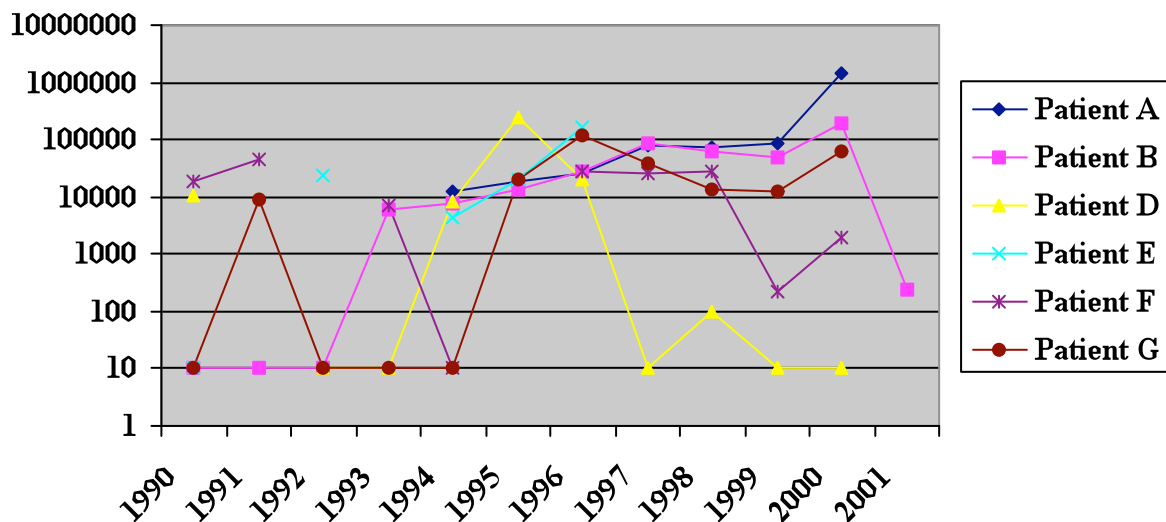


Abb. 24: Viruslast im Verlauf von zehn Jahren. Jahr (X-Achse); Viruslast in Kopien pro ml (Y-Achse) in logarithmischer Skalierung. Lag die Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze, wurden zur besseren Veranschaulichung zehn Kopien/ml logarithmisch dargestellt.

4.0 Diskussion

Neun hämophile Patienten wurden zwischen 1989 und 1990 nachweislich mit demselben HIV-Genotyp aus einer einheitlichen Charge eines β -Propiolakton-UV-inaktivierten Gerinnungsfaktorkonzentrats (PPSB 1601089) infiziert [Cichutek et al., 1991; Cichutek et al., 1992; Kasper et al., 1993; Kleim et al., 1990; Kleim et al., 1991; Kupfer et al., 1995]. Damit bot sich die weltweit einmalige Gelegenheit, die Evolution des gleichen HIV-Stammes in verschiedenen humanen Wirten zu verfolgen. Über einen Zeitraum von zehn Jahren standen von fünf der neun infizierten hämophilen Patienten (Patient A, B, D, F und G) Blutproben zur Verfügung. Nachdem bereits eine vergleichende Sequenzanalyse des *gag*- und *pol*-Gens durchgeführt worden war [Pfafferoth, 2001], wurde in der vorliegenden Arbeit die Entwicklung des *env*-Gens über zehn Jahre untersucht. Die Sequenzen aus dem Jahr 1990 von drei Patienten konnten zu einer Konsensussequenz zusammengeführt werden, die aufgrund der bis zu 100%igen Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen in den hypervariablen Regionen V1/V2, V3 aller Patienten [Kasper et al., 1993; Kleim et al., 1991; Kupfer et al., 1995], den infizierenden Virusstamm repräsentierte. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der einzelnen Patienten nach zehn Jahren wurden untereinander und mit der Konsensussequenz verglichen und mit klinischen Daten der Patienten in Beziehung gesetzt.

Trotz der klonalen HIV-Infektion entwickelten die fünf untersuchten Hämophilen einen unterschiedlichen Krankheitsverlauf zehn Jahre nach der Infektion mit signifikant differierendem Grad der Immundefizienz zwischen den Patienten. Das Immunsystem von Patient D und etwas weniger Patient A war am meisten beeinträchtigt. So zeigte Patient D schon früh die niedrigsten CD4⁺ T-Zellzahlen bis 200/ μ l in 1993, so dass eine antiretrovirale Therapie begonnen wurde, die in 1995 und 1996 intensiviert wurde. Patient A hatte nach zehn Jahren eine sehr hohe Viruslast von 1,5 Millionen Kopien/ml und eine CD4-Zellzahl unter 200/ μ l. Jedoch zeigte keiner der fünf untersuchten Patienten nach zehn Jahren eine Krankheitsprogression hin zu AIDS. Die Patienten B, F und G waren am immunkompetentesten und hatten die höchsten CD4⁺ T-Zellzahlen ohne Therapie oder mit sehr spätem Therapiebeginn (Patient F in 05/1998, Patient B in 03/2000). Die Menge an viralen RNA-Kopien im Blut zu Beginn der klinischen Latenz der Infektion spielt eine Rolle für die Beurteilung der Krankheitsprogression. Je geringer die initiale Viruslast, desto besser ist die Prognose für den infizierten Patienten [Mellors et al., 1996]. Demnach wäre die Prognose der Patienten D (11000 HIV/ μ l in 1990) und F (18000 HIV/ μ l in 1990) schlechter als

die der Patienten B, E und G (Viruslast unter der Nachweisgrenze in 1990). Eine weitere Rolle für die Prognose spielt das Alter zum Zeitpunkt der Infektion mit einem steilen Anstieg einer schnelleren Progressionswahrscheinlichkeit zu AIDS ab einem Alter über vierzig Jahren [Touloumi et al., 1998]. Dies würde eine schlechtere Prognose für Patient D bedeuten, mit 37 Jahren der älteste Patient zum Infektionszeitpunkt.

Die vergleichende Sequenzanalyse des kompletten *env*-Gens zeigte eine ausgeprägte Variation der Sequenzen nach zehn Jahren im Vergleich zur Konsensussequenz, aber auch der Sequenzen der unterschiedlichen Patienten, trotz der klonalen HIV-Infektion. Insgesamt war die gp120 kodierende Region viel größeren Variationen durch Mutationen, Deletionen und Insertionen unterworfen, als die gp41 kodierende Region. Dies liegt u. a. daran, dass gp120 permanent dem Immunsystem exponiert ist, während gp41, abgesehen vom sehr kurzen Fusionsprozess, von gp120 abgeschirmt wird. Die genetische Distanz zur Konsensussequenz der gp120 kodierenden Region war bei allen Patienten höher als die der gp41 kodierenden Region. Zudem war in gp120 die Längenvariation größer und die Zahl der Glykosylierungsstellen und Ladungen variabler.

Die Virusstämme der Patienten D und A zeigten die geringste genetische Divergenz innerhalb der gp120 kodierenden Sequenz vor allem auch im Bereich der variablen Regionen wie V1 (D: 5,33%, A: 17,33% < B: 38,67%), V2 (D: 3,42% < B: 10,26%), V4 und V5. In der V3-Region war die genetische Distanz zur Konsensussequenz bei den Patienten D und B mit jeweils 3,81% am niedrigsten. Im Allgemeinen war die durchschnittliche Divergenz in den Patienten B, F und G höher, als in den Patienten A und D. Das Verhältnis von synonymen zu non-synonymen Mutationen im Bereich der variablen Regionen V1, V2 und V3 war besonders bei den Patienten B, F und G sehr klein. Dies ist ein Hinweis auf einen hohen Selektionsdruck dem die Viren dieser Patienten ausgesetzt sind [Pastore et al., 2004]. Der hohe Selektionsdruck scheint von einem potenten Immunsystem getriggert zu werden, da die Patienten B, F und G die stabilsten CD4⁺ T-Zellzahlen haben und die HI-Viren dieser Patienten die höchste Rate viraler Evolution mit einem Hauptanteil an non-synonymen Mutationen aufweisen [Bonhoeffer et al., 1995; Ross und Rodrigo, 2002]. Eine höhere Divergenz wurde mit höheren Titern homologer neutralisierender Antikörper assoziiert [Blay et al., 2006]. Außerdem wurde eine hohe genetische Distanz zum ursprünglich übertragenen Virusstamm bei Kindern mit niedriger Viruslast und langsamer Krankheitsprogression gefunden und mit einem Virus, welches unter einem hohen Selektionsdruck repliziert erklärt [Ganeshan et al., 1997].

Es wird angenommen, dass die HIV-1 gp120 Evolution zumindest zu Beginn der HIV-Infektion hauptsächlich durch die individuelle humorale Immunantwort mittels neutralisierender Antikörper gesteuert wird [Frost et al., 2005]. HIV-1 entkommt der spezifischen Immunantwort durch positive Selektion viraler Quasispezies, die vor allem Mutationen in den am stärksten immunogenen hypervariablen Regionen beinhalten. Diese Mutationen führen zur Modifikation von Antikörperepitopen, zu Konformationsänderungen der Proteine, dem daraus folgendem Verbergen ursprünglich exponierter gp120 Domänen [Watkins et al., 1996] und der Generierung neuer N-Glykosylierungsstellen in gp120, die zur Maskierung viraler Epitope durch „Glykanschilder“ führt [Wei et al., 2003; Ye et al., 2000]. Der kontinuierliche Selektionsdruck durch das Immunsystem induziert eine permanente Diversifikation viraler Stämme vom übertragenen Ursprungsvirus.

Es gibt Hinweise, dass das Muster potenzieller N-Glykosylierungsstellen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Patienten haben kann. An Position N-332 in C3 lag in der Konsensussequenz und bei den Patienten F und G, das NLS-Motif mit niedriger Glykosylierungsakzeptanz [Kasturi et al., 1997] vor. Die Nicht-Glykosylierung an dieser Stelle führt zu einer erhöhten Neutralisationswahrscheinlichkeit durch Antikörper [McCaffrey et al., 2004; Reynard et al., 2004]. Ähnliches lag bei N-289 in C2 vor. Das NES-Motif in der Konsensussequenz und bei Patient D und F bedeutet ebenso eine niedrige N-Glykosylierungswahrscheinlichkeit [Kasturi et al., 1997]. Bei Patient B und G ist diese potenzielle N-Glykosylierungsstelle zehn Jahre nach der Infektion nicht mehr nachweisbar, nur die Virusstämme in Patient A könnten an dieser Position durch das NKS-Motif uneingeschränkt N-glykosyliert werden.

Der Aminosäureaustausch von N295H bei Patient B mit Verlust der potenziellen N-Glykosylierungsstelle könnte die Viren neutralisationsempfindlich gegenüber monoklonalen Antikörpern machen, die den V3-Loop, die CD4- und CCR5-Bindungsstellen und die extrazelluläre Region von gp41 (mit MAbs 2F5) erkennen, wie es bereits für das Virusisolat SF162 beschrieben wurde [McCaffrey et al., 2004]. In der Literatur wird für möglich gehalten, dass dieses N-Glykan einen Teil der extrazellulären Domäne von gp41 versteckt oder die Orientierung des V3-Loop im Verhältnis zum 2F5-Epitop verändert, bzw. eine globale Veränderung der gp120-Untereinheit bewirkt, die die Interaktion mit gp41 beeinträchtigt und das 2F5-Epitop exponiert [McCaffrey et al., 2004].

Insgesamt führt der schwache N-Glykosylierungs-Akzeptor an Position N-332 in C3 von Patient F und G, an Position N-289 in C2 bei Patient D und F und der Verlust der potenziellen N-Glykosylierungsstellen an Position N-289 bei Patient B und G zu einem möglicherweise reduzierten Glykanschild für einige Epitope neutralisierender Antikörper in der C2V3C3-Region. Darüber hinaus fehlt sowohl in der Konsensussequenz als auch in den Sequenzen ca. zehn Jahre nach der Infektion die potenzielle N-Glykosylierungsstelle an Position N-339, welche in vielen anderen HIV-1 Stämmen (z. B. HXB2) vorhanden ist. Die Tatsache, dass alle klonal infizierten Patienten relativ wenige potenzielle N-Glykosylierungsstellen bzw. relativ viele schwache N-Glykosylierungs-Akzeptoren besitzen könnte eine mögliche Folge der verhältnismäßig guten Immunkonstitution aller Patienten zehn Jahre nach der Infektion sein.

Die Mutation der Glykosylierungsstelle N-188 von Asparagin zu Serin (N188S) im V2-Bereich von Patient A hat für sich alleine genommen keinen [Cheng-Mayer et al., 1999] oder nur einen geringen Effekt auf die Neutralisationssensitivität [Ly und Stamatatos, 2000]. Sie wirkt allerdings verstärkend auf die Neutralisationsresistenz bei gleichzeitigem Verlust der letzten V1 (N-156) und Vorhandensein der ersten V3-Glykosylierungsstelle (N-301) [Cheng-Mayer et al., 1999]. Zwei, der drei Voraussetzungen für eine verstärkte Neutralisationsresistenz liegen bei Patient A vor (Mutation N188S und Vorhandensein von N-301). Einzig das Vorhandensein der V1-Glykosylierungsstelle N-156 hindert die virale Quasispezies von Patient A neutralisationsresistenter zu sein. Möglicherweise ist die Mutation N188S bei Patient A jedoch eine Vorstufe für eine erhöhte Neutralisationsresistenz der vorhandenen viralen Quasispezies.

Betrachtet man die Veränderungen aller Glykosylierungsstellen eines Patienten im Vergleich zur Konsensussequenz, so fällt auf, dass Patient D die geringsten Abweichungen in der Lage der Glykosylierungsstellen zur Konsensussequenz aufweist und auch dieselbe Anzahl an Glykosylierungsstellen besitzt. Alle anderen Patienten zeigen größere Abweichungen in der Lage und Anzahl der Glykosylierungsstellen im Vergleich zur Konsensussequenz. In einem sich durch stetigen Wechsel der effektiven Glykosylierung der potenziellen N-Glykosylierungsstellen der Immunantwort anpassendem „Glykanschild“ [Wei et al., 2003] könnte dies ein Hinweis auf ein weniger effektives Immunsystem bei Patient D sein, von dem ein schwächerer Selektionsdruck ausgeht.

Beispielhaft für die wechselnde Glykosylierung der potenziellen Glykosylierungsstellen können N-156 in V1 und N-160 in V2 genannt werden. Mutationsanalysen zeigten, dass nur eine der beiden potenziellen Glykosylierungsstellen glykosyliert wird [Wu et al., 1995]. Vor allem N-156

ist hochkonserviert. Eine Mutation an dieser Stelle führt zu einer verminderten Expression von Konformationsepitopen und einer erhöhten Expression des glykoproteinabhängigen C108G-Epitops. Eine Mutation an Position 160 führt zu einer Zerstörung des C108G-Epitops mit einer Erhöhung der Expression von konformationsabhängigen Epitopen. Die Art und Weise der Glykosylierung an diesen beiden Positionen beeinflusst die Konformation der V1/V2-Region, die für die Expression nativer Epitope benötigt werden. [Wu et al., 1995].

Die potenzielle Glykosylierungsstelle N-113 in gp41 von HXB2 war bei der Konsensussequenz und den Sequenzen um das Jahr 2000 nicht vorhanden und wurde bereits in der Konsensussequenz durch eine neue Glykosylierungsstelle an Position 114 ersetzt. Cao et al. [1993] beschreibt Mutanten des komplementären T im NxT-Motif an Position 115. und 128. zu den potenziellen N-Glykosylierungsstellen N-113 („NHT“ in der HXB2-Sequenz) und N-126 („NYT“ in den untersuchten Sequenzen und der HXB2-Sequenz), die durch Verlust dieser Glykosylierungsstellen einen kompletten Defekt im Processing des gp160-Vorläuferproteins, also in der Spaltung des gp160 in gp120 und gp41, erleiden und die fusogenen Eigenschaften in Form der Synzytiumbildung verlieren [Cao et al., 1993]. Dies unterstreicht die Wichtigkeit dieser Glykosylierungsstellen und erklärt, warum der Verlust der Glykosylierungsstelle N-113 durch die neue unmittelbar benachbarte Glykosylierungsstelle N-114 kompensiert werden musste.

Statistisch signifikante Variationen von potenziellen N-Glykosylierungsstellen erfolgen häufig in sogenannten „Hot Spots“, die oft in der Nähe der CD4-Bindungsstelle liegen. Konservierte potenzielle N-Glykosylierungsstellen liegen im Allgemeinen an der „stummen“, also nicht der Immunantwort ausgesetzten, Seite des *env*-gp120. [Blay et al., 2006].

Das N-Glykanschild könnte ein Ziel antiviraler Strategien mittels glykanbindender Stoffe sein. Diese neue Klasse potenzieller Therapeutika zwingt das HIV zur Deletion von potenziellen Glykosylierungsstellen, um dem Medikamenten-Selektionsdruck zu entkommen. Damit werden ursprünglich versteckte, virale Epitope exponiert und potenziell vorhandenen neutralisierenden Antikörpern zugänglich gemacht. [Balzarini et al., 2005; Balzarini et al., 2006].

In der vorliegenden Arbeit konnte der Verlauf der Evolution des *env*-Gens in keine Relation zu einer antiretroviralen Therapie gesetzt werden. Aufgrund der Tatsache, dass eine erfolgreiche antiretrovirale Therapie die Virusreplikation und damit die Anzahl der möglichen Mutationsereignisse während der fehleranfälligen reversen Transkription reduziert, wäre eine Verlangsamung der Virusevolution erwartet worden. Allerdings richtete sich die bei einigen Patienten

angewandte antiretrovirale Therapie und damit der ausgeübte Selektionsdruck nicht direkt gegen die viralen Glykoproteine gp120 und gp41, sondern nur gegen die HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) bzw. die virale Protease. In einer in diesem Institut durchgeführten Diplomarbeit wurde u. a. die Evolution der viralen Gene der RT und der Protease der selben Patienten zehn Jahre nach der Infektion untersucht [Pfafferott, 2001]. In dieser Arbeit konnte trotz der geringeren Virusreplikation sogar eine Zunahme der Divergenz in der *pol*-Region in Form einer Ausbildung Resistenz-assoziiierter Mutationen beobachtet werden. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Virusreplikation in den Patienten durch die ART nicht komplett unterdrückt wurde und daher die Evolution der viralen Sequenzen z.B. in den lymphatischen Organen fortschreiten konnte.

Insertionen und Deletionen fanden sich bis auf drei Ausnahmen (C1, C3, gp41) ausschließlich in den variablen Regionen V1, V2, V4 und V5 von gp120. Dabei traten die größten Längenvariationen in der V1- (zwischen 23 und 40 aa) und in der V4-Region (zwischen 32 und 45 aa) auf, wobei Patient D als einziger eine Deletion von zwei aa in V1 aufwies. Die Insertionen in V1 führten bei den immunkompetenten Patienten B, F, und G zur Ausbildung von zwei und bei Patient A zu einer zusätzlichen potenziellen N-Glykosylierungsstelle. Auffällig war die Längenvariation in der V2-Region. Die V2-Sequenzen der beiden Patienten mit den niedrigsten CD4⁺ T-Lymphozytenzahlen (A und D) hatten nach zehn Jahren dieselbe Länge wie die Konsensussequenz, während die übrigen drei immunkompetenteren Patienten eine Längenextension von zwei aa (Patienten B und F) und vier aa (Patient G) in V2 entwickelten. Diese Längenextension in V2 wurde in mehreren Studien mit einer langsameren Krankheitsprogression assoziiert [Masciotra et al., 2002; Shioda et al., 1997; Wang et al., 2000]. Die V2-Extension scheint außerdem mit einer Aufrechterhaltung der CCR5 Ko-Rezeptornutzung bei LTNP (long term non-progressors) zu korrelieren [Masciotra et al., 2002]. Die Ausbildung von Insertionen in der V2-Region in den Patienten B, F und G deuten also darauf hin, dass diese Patienten eine günstigere Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf haben, als die beiden anderen Patienten, bei denen diese Insertionen fehlen.

Das Phänomen der V2-Extension wurde genauer untersucht, indem von allen vorhandenen Proben vom Jahr 1990 bis um das Jahr 2000 die V1/V2-Region amplifiziert, die V2-Sequenzen aliniert und im zeitlichen Verlauf verglichen wurden. Zusätzlich zu den fünf Patienten, von denen Proben von 1990 bis 2000 vorlagen, wurde auch noch Patient E, von dem Proben von 1990 bis 1996 zur Verfügung standen, in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die stärker immunbeeinträchtigten Patienten A und D zeigten auch in den Jahren zwischen 1990 und 2000 keine Insertionen in V2. Die Viruslast nahm bei Patient A stetig zu, die initiale CD4⁺ Zellzahl war relativ gering (587/ μ l in 1992). Bei Patient D fiel die Viruslast zunächst ab, nahm dann jedoch trotz Beginn einer ART mit Zidovudin ebenso stetig zu, bis eine kombinierte ART begonnen und im Verlauf modifiziert wurde. Die initiale CD4⁺ Zellzahl lag bei 692/ μ l, fiel allerdings innerhalb von 34 Monaten auf unter 300/ μ l ab, ohne sich wieder zu erholen, trotz modifizierter ART.

Die übrigen Patienten und auch Patient E zeigten bereits zwischen 1992 und 1994 erste Insertionen zwischen der 30. und der 31. aa bzw. 32. und 33. aa (Pat. F) des V2-Loop. Häufig führte die Insertion von Asparagin zu der Ausbildung einer zusätzlichen potenziellen N-Glykosylierungsstelle, die jedoch in einigen Patienten im Laufe der Zeit auch wieder verschwand (Patient B, E, F und G).

Patient B zeigte in der überwiegenden Zahl der Proben und Klone ab 1993 eine Insertion von einer Aminosäure, die auch zur Ausbildung einer potenziellen N-Glykosylierungsstelle führte und ab 1996 eine Insertion von insgesamt zwei Aminosäuren (darunter eine potenzielle N-Glykosylierungsstelle außer im Jahr 2001). In dieser Zeit kam es bei insgesamt geringer Viruslast bei Patient B zu einem temporären Anstieg mit anschließendem Abfall der Viruslast. Im Jahr 2000 stieg die Viruslast jedoch in den sechsstelligen Bereich, so dass eine ART begonnen und in 2001 trotz starkem Absinken der Viruslast modifiziert wurde. Die CD4⁺ Zellzahl war auf relativ hohem Niveau und bis zum Jahr 2000 immer über 500/ μ l, sank aber stetig.

Ähnlich verhielt es sich in Patient G, der seit 1994 eine Insertion von einer Aminosäure (in Form einer potenziellen N-Glykosylierungsstelle oder negativen Ladung) in den meisten Proben bzw. Klonen zeigte, im Jahr 2000 aber plötzlich eine Insertion von fünf Aminosäuren aufwies. Allerdings konnte die Entwicklung von 1995 bis 2000 aufgrund fehlender Proben proviraler DNA nicht dargestellt werden. Die Viruslast war die ersten vier Jahre mit < 4.000 (unter der Nachweisgrenze) bis 9.000 Kopien pro ml sehr gering und stieg erst in 1995 (15.000 bis 21.000 Kopien/ml) mit einem Maximum von 120.000 Kopien/ml in 1996, um ab 1997 bis 1999 wieder bis auf 12.000 Kopien/ml abzufallen und in 2000 wieder zuzunehmen (62.000 Kopien/ml). Die CD4⁺ Zellzahl betrug 689/ μ l, zeigte undulierende Bewegungen und sank auch ohne ART nicht unter 330/ μ l (407/ μ l im Jahr 2000).

Diese Entwicklung war bei Patient F weniger konstant, da bereits in zwei Klonen aus 1994 eine Insertion von vier Aminosäuren und einem Klon von 1996 eine Insertion von sechs Aminosäuren

nachgewiesen wurde, sich im Jahr 2000 aber nur eine Insertion von zwei Aminosäuren wiederfand. Die Viruslast war auch bei diesem Patienten undulierend mit 18.000 Kopien/ml in 1990, einem Maximum von 46.000 Kopien/ml in 1991 und einem Minimum von < 4.000 (unter der Nachweisgrenze) ohne ART in 1994. Zwischen 1996 und 1998 lag die Viruslast bei 26.000 bis 28.000 Kopien/ml und nach Beginn der ART in 1998 bei 230 bis 2000 Kopien/ml in 1999 und 2000 und war damit stark rückläufig. Die $CD4^+$ Zellzahl hielt sich permanent auf relativ hohem Niveau mit überwiegend über 500 Zellen/ μ l und zeigte ebenso einen undulierenden Verlauf. Das Minimum lag bei 496/ μ l in 1997 mit wieder steigenden Werten nach Beginn der ART in 1998. Möglicherweise ist der Rückgang der Anzahl der inserierten Aminosäuren zwischen 1996 und 2000 auch mit dem Beginn einer ART in 1998 in Bezug zu setzen.

Patient E hatte in 1993 eine Insertion von einer aa (potenzielle N-Glykosylierungsstelle), die sich auch in Proben von 1995 und 1996 wiederfand, sich aber nicht in allen Quasispezies in 1996 durchzusetzen schien. Die Viruslast zeigte bis 1996 Werte von < 4.000 Kopien/ml in 1990 bis maximal 24.000 Kopien/ml in 1992 und stieg in 1996, also also kurz bevor Patient E 1997 an seiner HCV Ko-Infektion starb, auf 170.000 Kopien/ml rapide an. Die $CD4^+$ Zellzahl war eher gering und stieg nicht über 400/ μ l. Dies lag sicher mit daran, dass der Patienten aufgrund seiner HCV-geschädigten Leber eine dauerhafte ART nicht vertrug.

Insgesamt ist es aufgrund des multifaktoriellen Geschehens einer HIV-1 Infektion schwierig, anhand der vorliegenden Daten eine direkte Beziehung des Auftretens einer neuen V2-Extension zum klinischen Verlauf herzustellen. Shioda et al. [1997] beobachteten eine V2-Extension speziell in Individuen mit langsamer oder keiner HIV-1 Krankheitsprogression und begründeten dies mit einer potenziellen Einschränkung der HIV-1 Replikationskapazität in Makrophagen. Masciotra et al. [2002] assoziierten ebenso eine V2-Extension mit einer langsamen Progression der HIV-1 Infektion und fanden, dass das Erscheinen einer V2-Extension im Infektionsverlauf in „LTNP“ (long term non progressors) mit der Aufrechterhaltung der CCR5 Ko-Rezeptor-Nutzung assoziiert ist. Ebenso fanden Wang et al. [2000] eine V2-Extension nur bei langsamem Fortschreiten (slow progressors = SL) oder Langzeit nicht-Fortschreiten (LTNP) der HIV-1 Infektion. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen also die Erkenntnisse von Masciotra et al. [2002], Shioda et al. [1997] und Wang et al. [2000] wonach eine V2-Extension mit einem langsameren Krankheitsverlauf der HIV-1 Infektion assoziiert ist. Anhand der Patienten B und G kann man darüber spekulieren, dass die Insertionen (häufig mit der Ausbildung einer zusätzlichen potenziellen N-Glykosylierungsstelle) einem sich auf niedrigem Niveau replizierenden Virus

ermöglichen, sich stärker zu vermehren. Ein Vorteil für das Virus könnte darin liegen, dass potenzielle neutralisierende Antikörper einen verminderten Zugang zur CD4-Rezeptorbindungsstelle haben, wenn eine Insertion in V2 vorliegt [Fox et al., 1997]. Damit wären diese Insertionen eine Art *Ultima ratio* des Virus gegenüber einem starken Immunsystem zu bestehen und stellen somit einen indirekten Hinweis auf ein starkes Immunsystem dar. Möglicherweise verschwinden diese Insertionen wieder, wenn das Virus zusätzlich von einer ART beeinträchtigt wird (siehe Patient F).

Soweit bei relativ kleiner Probenzahl beurteilbar, scheint die Diversität, also die Anzahl gleichzeitig vorkommender Quasispezies im V2-Bereich bei Patient B und G, mit der Zeit zuzunehmen, während sie bei Patient E über den gesamten untersuchten Zeitraum relativ hoch ist. McDonald et al. [1997] beschreiben eine Zunahme der HIV-1 Quasispezies Diversität mit der Zeit in Individuen mit einem besser funktionierendem Immunsystem. Eine höhere Diversität ist außerdem mit einem langsameren Abfall der CD4⁺ T-Zellzahl korreliert [Delwart et al., 1997; Liu et al., 1997; Shankarappa et al., 1999]. Die zunehmende Diversität im V2-Bereich bei den Patienten B und G könnte aus der Reifung spezifischer neutralisierender Antikörper gegen den V1/V2-Bereich resultieren [Rybarczyk et al., 2004]. Dies stützt die These eines stärkeren Immunsystems bei den Patienten B und G.

Sowohl die Divergenz (genetische Distanz einer Sequenz zu ihrer Ursprungssequenz) aller Patienten von der Ursprungssequenz, als auch die Diversität (Anzahl der vorhandenen koexistierenden Quasispezies zu einem Untersuchungszeitpunkt) bei den Patienten B und G wuchsen signifikant mit der Zeit (vergleiche dazu auch die longitudinale Untersuchung der C2V3C3-Region [Kupfer et al., 2007]). Shankarappa et al. [1999] postulierten drei verschiedene Phasen innerhalb des asymptomatischen Stadiums der HIV-1 Infektion. In einer frühen Phase wachsen Diversität und Divergenz linear. Während der zweiten Phase stabilisiert sich die Diversität oder sie nimmt ab und in einer dritten, letzten Phase sinkt oder stoppt die Divergenz [Shankarappa et al., 1999]. Demnach befinden sich die Patienten B und G nach zehn Jahren noch in der ersten Phase des asymptomatischen Stadiums der HIV-1 Infektion. Da die Divergenz bei allen in dieser Arbeit untersuchten Patienten wuchs, hat noch keiner der Patienten die letzte asymptomatische Phase der HIV-Infektion erreicht [Delwart et al., 1997; Shankarappa et al., 1999; Williamson et al., 2005].

Die Analyse der V3-Region zeigte keine signifikanten Variationen zwischen den Patienten. Die potenzielle N-Glykosylierungsstelle N-301 in V3 fand sich in allen untersuchten Sequenzen, ist assoziiert mit dem CCR5-Tropismus und der Blockierung HIV-1 V3-spezifischer neutralisierender Antikörper *in vitro* [Clevestig et al., 2006; Pollakis et al., 2001; Polzer et al., 2002]. Für die nach zehn Jahren fortbestehende Nutzung des CCR5 Ko-Rezeptors bei allen Patienten spricht weiter, dass die V3-Ladung im Laufe der Evolution nicht positiver wurde (Konsensussequenz und Patient G: plus vier, die übrigen Patienten: plus drei) [Pollakis et al., 2001]. Eine Nettoladung negativer als plus fünf wurde mit dem NSI-Phänotyp assoziiert [Fouchier et al., 1992]. Die Anwendung der 11KR/25K-Regel [Hoffman et al., 2002] auf die V3-Sequenz in den untersuchten Patienten unterstreicht ebenso die ausschließliche Nutzung von CCR5, da an Position 11 und 25 von V3 nur negativ geladene bzw. neutrale Aminosäuren nachgewiesen wurden. Diese Untersuchungen wurden mittels der geno2pheno Ko-Rezeptor Vorhersagemethode und durch die alleinige Anzucht von NSI-Isolaten in periodischen PBMC-Ko-Kultur-Experimenten bestätigt [Kupfer et al., 2007]. Auch bei den Patienten mit V2-Extension gab es keinen Hinweis für einen Wechsel des Ko-Rezeptors von CCR5 zu CXCR4 wie von Jansson et al. [2001] beschrieben.

Interessanterweise findet sich in der C2-, V3- und V4-Region eine parallele Evolution in vier von fünf bzw. allen Patienten, die in C2 sogar in vier von fünf Patienten zur Ausbildung einer potenziellen N-Glykosylierungsstelle führt (Mutationen: C2: M232T in allen Patienten; V3: R305K, N308H, N325D in vier von fünf Patienten, L328Q in allen fünf Patienten; V4: N393S und A398T in allen fünf Patienten). Unter dieser konvergenten Virusentwicklung waren jedoch keine Veränderungen im V3-Bereich, die als kritisch für einen Übergang vom M-tropen zu T-tropen Phänotypen beschrieben wurden [Chesebro et al., 1992; Strunnikova et al., 1995]. Innerhalb von einzelnen Patienten wurde bereits eine konvergente HIV-Evolution im V3-Bereich beschrieben [Holmes et al., 1992]. Neu in der vorliegenden Arbeit ist allerdings die Beobachtung einer konvergenten HIV-Evolution in verschiedenen Patienten. Die konvergenten Aminosäureaustausche könnten als vorteilhaft für das HI-Virus durch Erhöhung der Replikationsfähigkeit (viral fitness) oder durch Entkommen vor potenziell existierenden neutralisierenden Antikörpern gegen Epitope in diesen Regionen interpretiert werden. Jedoch sind die beschriebenen Mutationen nicht mit signifikanten Veränderungen der Viruslast oder der CD4⁺ Zellzahl verbunden. Damit ist der Selektionsdruck des Immunsystems die wahrscheinlichste Ursache für die sich parallel entwickelnden Genotypen [Kupfer et al., 2007].

Patient G weist in seinem HLA-Genotyp den B58-Supertyp auf. Der B58-Supertyp ist bei Kaukasiern und Afrikanern mit geringer Virämie, spätem Auftreten von AIDS und möglicher Schwächung von HIV-1 vermittelt durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) assoziiert [Stephens, 2005]. Zumindest die ersten fünf Jahre hat Patient G vergleichsweise eine sehr niedrige Viruslast.

Patient A hat in seinem HLA-Genotyp das B27-Allel und ist außerdem noch heterozygot für den CCR5-Δ32 Genotyp. Liegt ein SDF1-Wildtyp, ein heterozygoter CCR5-Δ32 Genotyp und ein HLA-B27-Allel in Abwesenheit eines HLA-DR6-Allels vor, so ist nach einem multivariaten Logistik-Regressionsmodell die Chance, ein „Long term Nonprogressor“ zu sein, um den Faktor 47 erhöht [Magierowska et al., 1999]. Zwar zeigte Patient A nach zehn Jahren noch keine Anzeichen von AIDS, jedoch wies er außerordentlich hohe Viruslasten und niedrige CD4⁺ T-Zellzahlen auf, als Zeichen für ein kompromittiertes Immunsystem.

Zusammenfassend gibt die Virusevolution hinreichende Indizien für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf und den unterschiedlichen Immunstatus der Patienten.

1. Die immunkompetentesten Patienten B, F und G weisen im Gegensatz zu den Patienten A und D Mutationen auf, die Hinweise auf eine Beeinträchtigung bzw. permanent erforderliche Anpassung des Glykanschildes sind. Dies kann als Ausdruck eines kompetenten Immunsystems mit hohem Selektionsdruck auf HIV-1 gewertet werden. Die Muster der potenziellen N-Glykosylierungsstellen sind bei diesen Patienten hoch variabel. Sichtbar ist dies an der Ausbildung neuer potenzieller N-Glykosylierungsstellen durch Insertionen, die Veränderung vorhandener N-Glykosylierungsstellen von einem starken zu einem schwachen N-Glykan-Akzeptor und den vollständigen Verlust potenzieller N-Glykosylierungsstellen.
2. Die hohe Divergenz der immunkompetentesten Patienten B, F und G ist ein weiteres Indiz für den hohen Selektionsdruck durch ein kompetentes Immunsystem.
3. Eine Zunahme der Diversität mit der Zeit, wie sie bei Patient B und G im V2-Bereich vorzukommen scheint, ist ein Zeichen für ein gut funktionierendes Immunsystem und korreliert mit langsamer Krankheitsprogression der HIV-1 Infektion [Wang et al., 2000]. Sie ist ein Merkmal der frühen Phase innerhalb des asymptomatischen Stadiums der HIV-1 Infektion wie von Shankarappa et al. [1999] postuliert.

4. Im V2-Bereich der immunkompetentesten Patienten kommt es zu Extensionen, die mit verlangsamer Krankheitsprogression in Verbindung gebracht werden [Masciotra et al., 2002; Shioda et al., 1997; Wang et al., 2000].
5. Patient A weist Mutationen auf, die auf eine Schwächung des Immunsystems hindeuten könnten: Die S190R-Mutation als mögliche Vorstufe zu X4-Isolaten. Der Verlust der potenziellen Glykosylierungsstelle N-188 in Zusammenhang mit gleichzeitigem Vorhandensein der ersten V3-Glykosylierungsstelle als Vorstufe zur möglichen Mutationssequenz mit dem Verlust von N-188 und N-156 und dem Vorhandensein von N-301, der verstärkend auf die Neutralisationsresistenz wirkt [Cheng-Mayer et al., 1999]. Die Zunahme der positiven Ladung in der V2-Region kann ein Indiz für einen Wechsel von R5- zu X4-tropen Virus sein [Hoffman et al., 2002]. Möglicherweise bewahrt diesen Patienten sein heterozygoter CCR5- Δ 32 Genotyp vor einer Progression zu AIDS.
6. Das ausschließliche Vorliegen von R5-Isolaten, ableitbar an der V3-Sequenz, ist eine mögliche Erklärung für das Fehlen einer Progression zu AIDS in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten.

Die beobachtete Virusevolution könnte sowohl Folge als auch Ursache für die unterschiedlichen Verläufe sein. Im Verlauf der HIV-1 Infektion gibt es ein fortwährendes Wechselspiel zwischen Wirt und Viren, was zur viralen Evolution (Mutation und Selektion), als auch zur (bei den einzelnen Patienten unterschiedlich ausgeprägten) Schädigung des Wirtes führt.

Weitere Untersuchungen wie die Evolution der kodierenden Sequenz für die regulatorischen Proteine und die weitere Evolution der bereits untersuchten *env*, *gag* und *pol* kodierenden Sequenzen der hier vorhandenen Kohorte von homogen HIV-infizierten Hämophilen und ihrer Viruspopulationen werden für ein besseres Verstehen der Pathogenese von HIV benötigt. Ebenso sind der Grund für ein Auftreten der V2-Extensionen und die Konsequenzen für das HI-Virus nicht hinreichend geklärt und bleiben Gegenstand der weiteren Forschung.

5. Zusammenfassung

Ausgehend vom einmaligen Fall einer klonalen HIV-1 Infektion von sechs Patienten mit Hämophilie B mit einem genetisch identischen HIV-1 Stamm konnte die Virusevolution des *env*-Gens und im Speziellen der V2-Region über einen Zeitraum von zehn Jahren untersucht und in Korrelation zu klinischen und patientenspezifischen Parametern dargestellt werden.

Nach zehn Jahren war bei keinem der Patienten eine Progression zu AIDS aufgetreten. Ein Grund könnte ein gut funktionierendes Immunsystem sein, das HIV einem hohen Selektionsdruck aussetzt. Dafür sprechen große Variationen im Muster der potenziellen N-Glykosylierungsstellen in den klonal infizierten Patienten. Die Variabilität des "Glycan shield" kann als Versuch des HIV gewertet werden, neutralisierenden Antikörpern zu entkommen. Die im Vergleich zu anderen Virusstämmen relativ geringe Anzahl an N-Glykosylierungsstellen spricht für eine gute Kontrolle der Virusreplikation durch das jeweilige Immunsystem der Patienten.

Die Abwesenheit einer basischen Mutation an Position 11 und 25 von V3 bei allen Patienten und eine Elongation von V2 bei den Patienten B, F und G könnte die bisherige ausschließliche Nutzung von CCR5 als Ko-Rezeptor für das HI-Virus erklären.

Im Vergleich der Patienten sprachen mehrere Ergebnisse für einen günstigeren Krankheitsverlauf bei den Patienten B, F und G. Sie hatten den gesamten Verlauf der Infektion die höheren CD4⁺ T-Zellzahlen. Die Evolutionsrate in Form von Divergenz und Diversität im HIV-1 *env*-Gen, als Zeichen eines ständigen Selektionsdrucks einer effektiven Immunantwort, war höher als bei Patient A und D. Auffällig bei den Patienten B, F und G war eine Extension der V2-Region um zwei bis fünf Aminosäuren, die in der Literatur mit einem günstigeren Krankheitsverlauf assoziiert wurde [Masciotra et al., 2002; Shioda et al., 1997; Wang et al., 2000].

Die Analyse der V2-Region über den gesamten Zeitraum der Infektion zeigte auch im zusätzlich einbezogenen Patient E das Auftreten einer Insertion. Die Insertionen traten bereits drei bis vier Jahre nach Infektionsbeginn auf und waren in ihrer Zahl innerhalb der Patienten im Lauf der Jahre variabel (Patient F mit vier Insertionen in einem Klon in 04/1994, sechs Insertionen in einem Klon in 01/1996 und zwei Insertionen im Jahr 2000). Zu einem Untersuchungszeitpunkt traten in einer unterschiedlichen Anzahl Klone Insertionen auf.

Interessanterweise traten sieben konvergente non-synonyme Mutationen unterschiedlicher Bereiche des *env*-Gens, davon vier in der V3-Region, in den untersuchten Patienten auf. Sie können als Steigerung der viralen replikativen Fitness oder als Mechanismus des Entkommens vor neutralisierenden Antikörpern oder als eine Kombination von beiden interpretiert werden.

6. Anhang

C1-NT	1 (HXB2 Pos 6310)	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
<u>Kons 1990</u>	GCTGCAGAA-AAC--	TTGTGGGT	CACAGTC	TATTATGGGGT	GCCT	GTGTGGAAAGAAGCA	ACCACC	ACTCTATTT	TGTGCAT	CAGATGCT		
Pat.A 1999-...--
Pat.B 2001C...AAC
Pat.D 2000	.T.....C.-...--G.....
Pat.F 2000-...--T...A.....
Pat.G 2000	.T.....G.-...--
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180
<u>Kons 1990</u>	AAAGCATATGATACA	GAAGTACATAATGTT	TGGGCCACACATGCCTGT	GTACCCACAGACCCC	AACCCACAAGAAGTG	GTATTGGGAAAT						
Pat.A 1999G.....A.....A.....						
Pat.B 2001G.....	...AAG.....A.....
Pat.D 2000
Pat.F 2000A...A...
Pat.G 2000C.....	...AA.....
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270
<u>Kons 1990</u>	GTGACAGAAAATTTT	AATATGTGGAAAAT	AACATGGTAGAACAG	ATGCATGAGGATATA	ATCAGTTTATGGGAT	CAAAGCCTAAAGCCA						
Pat.A 1999
Pat.B 2001
Pat.D 2000A.....A.....
Pat.F 2000A...	G..GC.....C...G.....
Pat.G 2000G.....A.....
	271	285	286	300								
<u>Kons 1990</u>	TGTGTAAAATTAACC	CCTCTCTGTGTTACT	TTAAAT									
Pat.A 1999								
Pat.B 2001								
Pat.D 2000								
Pat.F 2000C								
Pat.G 2000CG								
V1-NT	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
<u>Kons 1990</u>	TGCACTGATGTGAAG	ACTAATGTC	ACTAGT	AAT-----	-----	-----	-----	-----	GCC	ACTAATGATAGTAAT		
Pat.A 1999C.....	.T....TG....GAG	.C.AAT---TGC	ACT	GAGAGGAGGGCTAAT	GTC	ACTGGTAAT...	.T.....				
Pat.B 2001	...T..C..AACGTC	...G.A.A.A.G.C	.C.GAT-----	---	AATGCCACTAAT	GATAGTACTGGGAAA	GGA..AATG.AA...					
Pat.D 2000	G.....GA.
Pat.F 2000A...	CTA...TG..A.GA.	G.GAAGATTAATTGC	ACTGGTGTGAATTAC	AAT-----AAGA.TTC.C.G..						
Pat.G 2000A.GTCACTG.C.C.	...GTCACTGCCCT	AATGCCACTGCCGCT	AATGTC	ACTAAGAAT	G.C.....G...					

	91	105	106	120
<u>Kons 1990</u>	GGGGGAGGA-----	GAAATGAAAACTGC		
Pat.A 1999A.ATGGTAGTA	---.....		
Pat.B 2001	...AA.....-----		
Pat.D 2000-----A.		
Pat.F 2000	ATT.A.-----		
Pat.G 2000	AAT.TCACTGATACC		

V2-NT	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
<u>Kons 1990</u>	TCTTTCAATATCACC	TCAAGCATAAGAGAT	AAGATGCAGAAAGAA	TATGCACTTTTTTAT	AAGCTTGATGTAGTA	CCAATAGATGGCGAG						
Pat.A 1999A....A.....A.....C..						
Pat.B 2001	C..GT.....CA.....C..C.....G.AT..C						
Pat.D 2000GT.....T						
Pat.F 2000G.....G.....CA.A.T						
Pat.G 2000G.A...	...G.....	.G.....	.G.....CA.....A.A.A...						

	91	105	106	120	121	132
<u>Kons 1990</u>	-----	AATACTAGCTATAGG	TTGATAAATTGT			
Pat.A 1999	-----	.G....C.....			
Pat.B 2001	-----AAGACTC...			
Pat.D 2000	-----G....			
Pat.F 2000	-----ACTAAAT.....G....			
Pat.G 2000	GATAAATACTAGCGATG....			

C2-NT	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
<u>Kons 1990</u>	AACACCTCAGTCATT	ACACAGGCCTGTCCA	AAGGTATCCTTTGAG	CCAATTCCCATACAT	TATTGCACCCCGGCT	GGTTTTGCGATTCTA						
Pat.A 1999A.....G...A...						
Pat.B 2001A.....TG.....						
Pat.D 2000A.....C.....						
Pat.F 2000A.....						
Pat.G 2000A.....G...T...						

	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180
<u>Kons 1990</u>	AAGTGTAATAATAAG	ATGTTCTCGGGGAAAA	GGAGAATGTAAAAAT	GTCAGCACAGTACAA	TGTACACATGGAATT	AGGCCAGTAGTATCA						
Pat.A 1999C....A	.C....A.....						
Pat.B 2001G..G..	.CA...AA.....						
Pat.D 2000C.....						
Pat.F 2000C.....						
Pat.G 2000C.....	.CA..T.....G.....						

126

	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270
<u>Kons 1990</u>	ACTCAACTGCTGCTA	AATGGTAGTCTAGCA	GAAGAAGAGGTAGTA	ATCAGATCAGAAAAT	TTCACAAACAATGCT	AAAATTATAATAGTA						
Pat.A 1999C.....C.....T.....G.....
Pat.B 2001T.....C.....GG.....
Pat.D 2000A..	..A.....T..G.....
Pat.F 2000CG.....C.....
Pat.G 2000A.....A.....CC.....

	271	285	286	297
<u>Kons 1990</u>	CAGCTGAATGAATCT	GTAGTAATTAAT		
Pat.A 1999A.....A.....		
Pat.B 2001A.....G..	..AA....C..		
Pat.D 2000		
Pat.F 2000	..A.....		
Pat.G 2000G.....C.....		

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
<u>V3-NT</u>												
<u>Kons 1990</u>	TGTACAAGACCCAAC	AACAATACAAGGAGA	AGTATAAATATAGGA	CCAGGGAGAGCCTTT	TATGCAACAGGAGAA	ATAATAGGAAATATA						
Pat.A 1999A.C.....T.....C.....G.....
Pat.B 2001A.C.....C.....G.....
Pat.D 2000C.....C.G.....G.....
Pat.F 2000G.A.	G.....C.....G..A.G.....G.....
Pat.G 2000T....C.....A.C.....T..

	91	105
<u>Kons 1990</u>	AGACTAGCACATTGT	
Pat.A 1999A.....	
Pat.B 2001A.....C	
Pat.D 2000A.....	
Pat.F 2000A.....	
Pat.G 2000A.....	

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
<u>C3-NT</u>												
<u>Kons 1990</u>	AACCTTAGTAGAACA	AAATGGGAGAACACT	TTAAGACAGGTAGCT	AGAAAATTAAGAGAA	CAATTTAATA---AA	ACAATAGTCTTTAAT						
Pat.A 1999	..A.....G..G.T	G.T.....A.....	.A.....ATA..
Pat.B 2001	..G.....A.G..	G.T....C..A...C.A.....	GT.....G..A..ATA.CA.....
Pat.D 2000	..TA.....A...	G.....A...A.AG.....	.C.....---G
Pat.F 2000G.	C.....A.....A.....ATA..	..A.....C.....
Pat.G 2000G.	G.T...A...A...	..G.....	GA.....A..---G

	91	105	106	120	121	135	136	150	151	156
<u>Kons 1990</u>	CAATCCTCAGGAGGG	GACCCAGAAATTGTA	ATGCACAGTTTTTAAT	TGTGGAGGGGAATTT	TTCTAC					
Pat.A 1999
Pat.B 2001	...CA.....	..T.....
Pat.D 2000T.....
Pat.F 2000A.....
Pat.G 2000	A.T.....T.....	..C..	.C.....

V4-NT	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
<u>Kons 1990</u>	TGTAATACAACAAA	CTGTTTAATAATACT	TGGAATGGAGCACAA	CTGAGTAATACTTGG	AATGGTACTGAAGGA	GAA-----						
Pat.A 1999G.G...GC...A.....G....CA.	...A....CGGAAT	..T-----						
Pat.B 2001CG.G....A...TT.GT.	...A....G.AAT	CC-----						
Pat.D 2000C.....C..G....A.A.....CA.						
Pat.F 2000C.....C..G....A...T---.....	...A..AC.TCTG	A.TACTTGGAAATGAA						
Pat.G 2000G..G....AA.A.TTGG	AATGAA.CATACCC.	.G.AA..A.ACT.A.	...-----						

	91	105	106	120	121	135	136
<u>Kons 1990</u>	-----	-----	-----	AATATCACACTCCCA	TGC		
Pat.A 1999	-----	-----	-----	.C.....G.....	...		
Pat.B 2001	-----	-----	-----AC	...		
Pat.D 2000	-----	-----	-----AATATC	.C.....	...		
Pat.F 2000	ACACAAGTACTGAGT	ACTCAGAATAGTACTA.	...			
Pat.G 2000	-----	-----	-----GGAT		

C4-NT	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
<u>Kons 1990</u>	AGAATAAAACAAATT	ATAAACATGTGGCAG	GAAGTAGGAAAAGCA	ATGTATGCCCTCCC	ATCAGAGGACAAATT	AGATGTTCATCAAAT						
Pat.A 1999
Pat.B 2001
Pat.D 2000AG.....
Pat.F 2000G.....
Pat.G 2000

	91	105	106	120	121
<u>Kons 1990</u>	ATTACAGGGCTGCTA	TTAACAAGGGATGGT	GGT		
Pat.A 1999
Pat.B 2001C
Pat.D 2000A..A
Pat.F 2000T
Pat.G 2000G

V5-NT 1 15 16 30 31 45
Kons 1990 ---AATAATGGGACC AACGAGACCACCGAG ACCTTCAGACCTGGA
 Pat.A 1999 ---.....A.... ..C.....
 Pat.B 2001 AAG....GCA.T.AT ..T.G....CAA... .T.....A.
 Pat.D 2000 ---.....
 Pat.F 2000 ---....TG---... ..---... ..AT.
 Pat.G 2000 ---..... ..T-----..A

C5-NT 1 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90
Kons 1990 GGAGGAGATATGAGG GACAATTGGAGAAGT GAATTATATAAATAT AAAGTAGTAAAAATT GAACCAATAGGAGTA GCACCCACCGAGGCA
 Pat.A 1999AG....
 Pat.B 2001A..... ..T.....CC..... ..A..AG....
 Pat.D 2000C.....
 Pat.F 2000A.....A.G..... ..CCT...
 Pat.G 2000C..... ..G.....C.....AG....

91 105 106 120
Kons 1990 AAGAGAAGAGTGGTG CAGAGAGAGAAAAGA
 Pat.A 1999
 Pat.B 2001
 Pat.D 2000
 Pat.F 2000A.....
 Pat.G 2000

gp41-NT 1 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90
Kons 1990 GCAGTGGGAACAATA GGAGCTATGTTCCCTT GGGTCTTGGGAGCA GCAGGAAGCACTATG GGCGCAGCGTCAATG ACGCTGACGGTACAG
 Pat.A 1999 ...---.T....C..A

91 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180
Kons 1990 GCCAGACTATTGTTG TCTGGTATAGTGCAA CAGCAAATAAATTTG CTGAGAGCTATTGAG GCGCAACAGCACCTG TTGCAACTCACAGTC
 Pat.A 1999A.....
 Pat.B 2001A.....T
 Pat.D 2000A..... ..A..
 Pat.F 2000A..... ..G.....
 Pat.G 2000

Abb. 25: Nukleinsäure-Alignment der *env*-Region von Proben um das Jahr 2000 der Patienten A, B, D, F und G mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Die Nummerierung bezieht sich auf die Konsensussequenz der jeweiligen Region von *env*; die erste Aminosäure von C1 entspricht der Position 6310 der HXB2-Referenzsequenz; Punkte stehen für identische Aminosäuren im Vergleich zur Konsensussequenz; Striche bedeuten Deletionen im Vergleich zur Konsensussequenz oder Insertionen bei einer oder mehreren Proben um das Jahr 2000.

gp120

Nr. (HXB2)	1	15	16	30	31	44	45	59	60	74	76	89
HXB2-Ref	MRVKE	EKYQHLWR	RWGW	RWGTMLLGLML	MICSA	TEK-LWVTVYYG	VPV	WKEATTTLFCAS	DAK	AYDTEVHNVWATHAC	VPTDPNPQEVV	LVNV
Kons 1990		RNYQHLWR	RWG-	---TMLLGLML	MICSA	AEN-LWVTVYYG	VPV	WKEATTTLFCAS	DAK	AYDTEVHNVWATHAC	VPTDPNPQEVV	LVGN
Pat.A 1999		..R..K..	---M.....								E..
Pat.B 2001				---I..M..					..G..K..			
Pat.D 2000			M..V	A..							
Pat.F 2000			K..	---				D..N..				ME..
Pat.G 2000		..G..		---	..V..	G..			..A..K..			
	90	104	105	119	120	134	135	141	142	152	153	166
HXB2-Ref	TENFNMWKN	DMVEQM	HEDIISLWD	QSLKPC	VKLTPLCVSL	KCTDL	KNDTNTN	-----	---SSGRMIME	KG-	-EIKNCSFN	NISTTSIR
Kons 1990	TENFNMWKN	NMVEQM	HEDIISLWD	QSLKPC	VKLTPLCVTL	NCTV	KTNVTSN	-----	---ATNSNGGG	-	EMKNC	SFNITSSIR
Pat.A 1999							..I..C..E	TN-CTERRA	NVTGN.I..	..MV	V-	..K
Pat.B 2001						..SHN	V..SINGTN	---NAT	NDSTGK	KGKMK..	K..	..PV..
Pat.D 2000						..A..D..		---				..Y..
Pat.F 2000	..K..DA..N..		Q..				..L..CN..K	INCTGVN	YN--KT..	..VTDI		..M..
Pat.G 2000	..D..					..K..	..NVTAT..	VTAPNATA	ANVTKNA..	..RIN	VTD	..V..G..
	167	181	182	191	192	206	207	221	222	236	237	251
HXB2-Ref	GKVQKEYA	FFYKLDI	IPIDND	-----	TTSY	KLTS	CNTSVITQACP	KVSFEPIPIHYCAPA	GFAILKCN	NKTFNGT	GPCTNV	STVQCTHGI
Kons 1990	GKMQKEYA	LFYKLDV	VPIIDG	-----	NTSY	RLINC	NTSVITQACP	KVSFEPIPIHYCTPA	GFAILKCN	NKMFGGK	GECKNV	STVQCTHGI
Pat.A 1999	..I..		..Q..Q..	---	S..R..				..A..		..T..E..	
Pat.B 2001	..T..Q..	..T..	..D..D..	---	KT..				..A..	..DET..K..		
Pat.D 2000		..S..	..D..			..S..		..I..		..T..		
Pat.F 2000			..HN--TK..		..S..			..I..		..T..		
Pat.G 2000	..R..	..T..	..R..	NTS		..S..	..I..	..A..		..T..		

132

	252	266	267	281	282	296	297	311	312	325	326	340	
HXB2-Ref	RPVVSTQLLLL	NGSLA	EEEVVISV	NFTDNA	KTIIVQLN	TSV	EINC	TRPNNT	RKRIRIQ	GPGRAFVTIG	KI-GN	MRQAHCN	ISRAKWN
Kons 1990	RPVVSTQLLLL	NGSLA	EEEVVISV	ENFTNNA	KIIIVQLN	ESVINC	TRPNNT	RRSINI--	GPGRAF	YATG	IIGN	IRLAHC	NLSRTK
Pat.A 1999D	K	E	K	H	--	S	A
Pat.B 2001D	V	A	K	H	Q	V
Pat.D 2000	T	K	D	V	H	--	A	Q
Pat.F 2000	D	T	S	KG	HM--
Pat.G 2000	I	T	K	A	L	K

	341	355	356	370	371	385	386	400	401	412	413	417
HXB2-Ref	TLKQIASKLRE	QFGN	NKTIIFK	QSSGGDPE	IVTHSFNCGG	EFFYC	NSTQLFN	NSTWFN	NSTW	STEGSN	NTEGSD	---
Kons 1990	TLRQVARKLRE	QF--	NKTIVFN	QSSGGDPE	IVMHSFNC	GGEFFYC	NNTKLFN	NNTWNGAQL	SNTW-	NGT	GG	---
Pat.A 1999	..K	..K	-N	R	S	T	..S
Pat.B 2001	..TK	..V	..GK	..-N	..N	..I	..H	N	K	..S
Pat.D 2000	..KR	..T	--	Q	S
Pat.F 2000	K	-N	Q	S
Pat.G 2000	..G	E	K	L

	418	432	433	447	448	462	463	474	475	489	490	505
HXB2-Ref	CRIKQIINMWQ	KVGK	AMYAPPISG	QIRCSS	NITGLLL	TRDGGNSN	--NE-	SEIFRPGGGD	MRDNWRSE	LYKYKVV	KIEPLGV	APTKAKRR
Kons 1990	CRIKQIINMWQ	EVGK	AMYAPPIRG	QIRCSS	NITGLLL	TRDGG-NN	GTN	TTTFRP	GGGD	MRDNWRSE	LYKYKVV	KIEPIGV
Pat.A 1999	N	T
Pat.B 2001	S	S	L
Pat.D 2000	V	I
Pat.F 2000
Pat.G 2000

	505	511
HXB2-Ref	VVQREKR	
Kons 1990	VVQREKR	
Pat.A 1999	
Pat.B 2001	
Pat.D 2000	
Pat.F 2000	
Pat.G 2000	

gp41

Nr. (HXB2)	1	14	15	29	30	44	45	59	60	74	75	89
HXB2-Ref	AVG-IGALFLGFLGA	AGSTMGAASMTLTVQ	ARQLLSGIVQQQNNL	LRRAIEAQQHLLQLTV	WGIKQLQARILAVER	YLRDQQLLGIWGCSG						
Kons 1990	AVGTIGAMFLGFLGA	AGSTMGAASMTLTVQ	ARLLLSGIVQQQNNL	LRRAIEAQQHLLQLTV	WGIKQLQARVLAVER	YLRDQQLLGIWGCSG						
Pat.A 1999	..-.L.....I.....	..Q.....
Pat.B 2001	..-.....Q.....Q.....
Pat.D 2000
Pat.F 2000
Pat.G 2000L.....V.....
	90	104	105	119	120	134	135	149	150	164	165	179
HXB2-Ref	KLICCTTAVPWNASWS	NKSLEQIWNHTTWME	WDREINNNTSLIHSL	IEESQNQQEKNEQEL	LELDKQASLWNWFNI	TNWLWYIKLFIMIVG						
Kons 1990	KLICCTTVPWNASWS	NKSLNEIWDNMTWMQ	WEKEINNNTSLIYTL	IEESQNQQEKNEQEL	LALDKWASLWNWFNI	SKWLWYIKIFIMIVG						
Pat.A 1999A...T...	..M.....
Pat.B 2001TYG...X.....
Pat.D 2000A...T...	..M.....
Pat.F 2000HS...N.....
Pat.G 2000P.A...T...	..MD...E.....
	180	194	195	209	210	223	224	238	239	253	254	268
HXB2-Ref	GLVGLRIVFAVLSIV	NRVRQGYSPLSFQTH	LPTPRG-PDRPEGIE	EEGGERDRDRSIRLV	NGSLALIWDLLRSLC	LFSYHRLRDLILLIVT						
Kons 1990	GLVGLRIVFAVLSIV	NRVRQGYSPLSFQTH	LPAPRGRPRDRPEGIE	EEGGERDRDRSVRLV	DGFLAIFWDDLRSLC	LFSYHRLRDLILLIVA						
Pat.A 1999
Pat.B 2001	..I.....I..F...
Pat.D 2000	..I.....T.....
Pat.F 2000	..I.....M.....
Pat.G 2000V.....
	269	283	284	298	299	313	314	328	329	343	344	
HXB2-Ref	RIVELLGRRGWEALK	YWWNLLQYWSQELKN	SAVSLLNATAIAVAE	GTDRVIEVVQGACRA	IRHIPRRIRQGLERI	LL						
Kons1990	RIVEILGRRGWEVLK	YWWNLLKYWSQELKN	SAVSLLDATAITVAE	GTDRRIIELVQIAYRA	ILHIPRRIRQGLERA	LL						
Pat.A 1999	..T.....H...A...
Pat.B 2001	..V.....H...AL...
Pat.D 2000
Pat.F 2000T.....I.....
Pat.G 2000	..S.....H...L...

Abb. 26: Alinierte Aminosäuren der *env*-Region von Proben der Patienten A, B, D, F und G um das Jahr 2000 im Vergleich mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Positive Ladungen sind gelb, negative Ladungen grün hinterlegt; potenzielle N-Glykosylierungs-

stellen sind dunkelgrün geschrieben und unterstrichen; die Nummerierung bezieht sich auf die HXB2-Referenzsequenz; Punkte stehen für identische Aminosäuren im Vergleich zur Konsensussequenz; Striche bedeuten Deletionen im Vergleich zur Konsensussequenz oder Insertionen bei einer oder mehreren Proben um das Jahr 2000; die Aminosäuren der V1-, V4- und V5-Region sind blau geschrieben und unterstrichen; die Aminosäuren der V2- und V3-Region sind rot geschrieben und unterstrichen.

Patient A V2-NT	1	15 16	30 31	45 46	60 61	75
<u>Kons 1990</u>	TCTTTCAATATCACC	TCAAGCATAAGAGAT	AAGATGCAGAAAGAA	TATGCACTTTTTTAT	AAGCTTGATGTAGTA	
07/94 1704
12/95 1921:1S2
1921-2S2
1921-4S2
1921-1a
1921-3aG.....
1921-4a
1921-5a
1921-6a
2000A.....A.....
Patient A V2 NT	76	90 91	105 106	120 121	135	
<u>Kons 1990</u>	CCAATAGATGGCGAG	-----	---AATACTAGCTAT	AGGTTGATAAAATTGT		
07/94 1704	-----	---.....T...
12/95 1921:1 S2T	-----	---.....
1921:2 S2T	-----	---.....
1921:4 S2T	-----	---.....
1921:1aT	-----	---.....
1921:3aT	-----	---.....
1921-4aT	-----	---.....
1921-5aT	-----	---.....
1921-6aT	-----	---.....G.....
2000	.A.....C..	-----	---.G...C.....

Patient B V2-NT	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75
<u>Kons 1990</u>	TCTTTCAATATCACC	TCAAGCATAAGAGAT	AAGATGCAGAAAGAA	TATGCACTTTTTTTAT	AAGCTTGATGTAGTA					
11/91 1339
12/92 1466
07/93 1572:1C
1572:2
1572:3C
1572:4
1572:5
10/93 1604
01/94 1635CC
07/94 1705ATCC
10/94 1738:1CC
1738:4CC
1738:2GCC
1738:3GCC
01/95 1774:1CC
1774:2GCC
1774:3CC
1774:4GCC
01/96 1928:1GCC
1928:3GCC
1928:4G.GAC	..CC	..G
1928:5AACC
1928:6GACC
1928:7GCC
1928:8GCC
2000	C..GTCACC

Patient D V2 NT	76	90	91	105	106	120	121	135
<u>Kons 1990</u>	CCAATAGATGGCGAG	-----	---	AATACTAGCTAT	AGGTTGATAAAATTGT			
12/95 1922:1 S2	-----	---			
1922:4 S2	-----	---			
1922:6 S2T..T	-----	---			
1922:6a	-----	---			
1922:7a	-----	---			
1922:8a	-----	---			
2000T	-----	---G.....			

Patient E V2-NT	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75
<u>Kons 1990</u>	TCTTTCAATATCACC	TCAAGCATAAGAGAT	AAGATGCAGAAAGAA	TATGCACTTTTTTAT	AAGCTTGATGTAGTA					
05/92 1413:5					
10/92 1462:3					
09/93 1597T.....	
05/94 1682:4C.....	
05/94 1682:5C.....	
02/95 1795:1	..C.....TA.....	
03/96 1953-2A.....TA.....	
03/96 1953-5A.....TA.....	
03/96 1953-3G.....	
03/96 1953-1GA.....	

Patient E V2-NT	76	90	91	105	106	120	121	135
<u>Kons 1990</u>	CCAATAGATGGCGAG	-----	---	AATACTAGCTAT	AGGTTGATAAAATTGT			
05/92 1413:5	T.....A.....	-----	---			
10/92 1462:3	T.....A.....T	-----	---			
09/93 1597	-----	---	AAT.C.....			
05/94 1682:4	.A...A.....T	-----	---C.....			
05/94 1682:5A.A..T	-----	---A.....			
02/95 1795:1	T.....	-----	---	AAT.C.....G.....			
03/96 1953-2	.A...A..AAT..C	-----	---	..G.....			
03/96 1953-5	.A...A..AAT..T	-----	---	..G.....			
03/96 1953-3	.T.....AAGA.T	-----	---	..C.....A.....			
03/96 1953-1	T.....A.T	-----	---	AAT.C.....			

Patient F V2 NT	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75
<u>Kons 1990</u>	TCTTTCAATATCACC	TCAAGCATAAGAGAT	AAGATGCAGAAAGAA	TATGCACCTTTTTTTAT	AAGCTTGATGTAGTA					
03/93 1530:1TA.....
1530:2TA.....
04/94 1672:direktTA.....
1672:1aTA.....
1672:3nT.....A..	..A..A..A..A..
1672:4nT.....A..	..A..A..A..A..
1672:5a
1672:5nA.C.....	..A...T.....
01/96 1929:1G.....	..GG.A.....
1929:2
1929:3
1929:5
1929:8
1929:4
1929:6G.....
1929:7C.....
12/97 2075T.....G---
2000G.....

Patient F V2 NT	76	90	91	105	106	120	121	135
<u>Kons 1990</u>	CCAATAGATGGCGAG	AATACT-----	-----AGCTAT	AGGTTGATAAAATTGT				
03/93 1530:1G.....T
1530:2G.....T
04/94 1672:direktG.....C	-----AGC	GACAATACT.....
1672:1aG.....C	-----AGC	GACAATACT.....
1672:3nG.....T
1672:4nG.....T
1672:5aC.....
1672:5nC...G...A.T
01/96 1929:1G.AA...C	AACAATACT	AACTATACT.A...
1929:2C.....
1929:3C.....
1929:5C.....
1929:8C.....
1929:4C.....
1929:6C.....
1929:7G.....C	-----ACT.....
02/97 2075	---.C	.C.A-----	-----A.....
2000	CA.---	AAAAATACT.....

Patient G V2-NT	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75
<u>Kons 1990</u>	TCTTTCAATATCACC	TCAAGCATAAGAGAT	AAGATGCAGAAAGAA	TATGCACTTTTTTAT	AAGCTTGATGTAGTA					
06/92 1416:1dG.....
1416:2dG.....
02/93 1509:1dG.....
1509:2dG.....
1509:3dG.....
1509:4dG.....
02/94 1653:1G.....C.....
1653:2G.....C.....
1653:3G.....C.....
1653:4G.....C.....C.....
1653:5G.....C.....G.....
05/94 1688:3G.....C.....
1688:4G.....C.....
1688:5G.....C.....
09/94 1730:1G.....G.....T.....C.....ATT.....
1730:2G.....G.....G.....C.....
1730:5G.....G.....C.....
1730:4G.....A.....C.....
03/95 1799:1G.....
1799:4G.....G.....C.....C.....
06/95 1839:10G.....
1839:11G.....
1839:3G.....A.....
1839:8G.....A.....
1839:12G.....G.....
1839:2G.....G.....G.....
1839:4G.....G.....G.....
1839:9G.....G.....G.....
2000	...G.....G.....CA.....A.....A.A.....

Patient	G	V2	NT	76	90	91	105	106	120	121	135
<u>Kons 1990</u>				CCAATAGATGGCGAG	-----	---	AATACTAGCTAT	AGGTTGATAAAATTGT			
06/92	1416:1d			-----	---			
	1416:2d			-----	---			
02/93	1509:1d			..C.....	-----	---			
	1509:2d			..C.....	-----	---			
	1509:3d			..C.....	-----	---			
	1509:4d			..C.....	-----	---			
02/94	1653:1			AAT-----	---			
	1653:2			AAT-----	---			
	1653:3			AAT-----	---			
	1653:4			AAT-----	---			
	1653:5			AAT-----	---			
05/94	1688:3			AAT-----	---			
	1688:4			AAT-----	---			
	1688:5			AAT-----	---			
09/94	1730:1			A.....	-----	---			
	1730:2			A.....	-----	---			
	1730:5			A.....	-----	---			
	1730:4			A.A AAT-----	---			
03/95	1799:1			G.....G GAT-----	---			
	1799:4			.A.....	GAT-----	---	T.....			
06/95	1839:10			-----	---			
	1839:11			GAT-----	---	A.....		
	1839:3			.AG.....	GAT-----	---			
	1839:8			A.A A.....	GAT-----	---			
	1839:12			A.G.....	GAT-----	---			
	1839:2			C.....	GAT-----	---			
	1839:4			C.....	GAT-----	---			
	1839:9			G.....	GAT-----	---			
2000				G.A... GATAA	ACTAGCGAT	---	G.....	

Abb. 27: Nukleinsäure-Alignment der *env* V2-Region von Proben der Patienten A, B, D, E, F und G von 1990-2000 (soweit Proben vorhanden) mit der Konsensussequenz aus dem Jahr 1990. Punkte stehen für identische Aminosäuren im Vergleich zur Konsensussequenz; Striche bedeuten Deletionen im Vergleich zur Konsensussequenz oder Insertionen bei einer oder mehreren Proben.

7. Literaturverzeichnis

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molekularbiologie der Zelle. Weinheim - New York – Basel – Cambridge - Tokyo: VCH, 1995.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272: 1955-1958.
- Bagnarelli P, Fiorelli L, Vecchi M, Monachetti A, Menzo S, Clementi M. Analysis of the functional relationship between V3 loop and gp120 context with regard to human immunodeficiency virus coreceptor usage using naturally selected sequences and different viral backbones. *Virology* 2003; 307: 328-340.
- Balotta C, Bagnarelli P, Violin M, Ridolfo AL, Zhou D, Berlusconi A, Corvasce S, Corbellino M, Clementi M, Clerici M, Moroni M, Galli M. Homozygous delta 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1-infected patient. *AIDS* 1997; 11: F67-71.
- Baltimore D, Feinberg MB. HIV revealed: toward a natural history of the infection. *N Engl J Med* 1989, 321: 1673-1675.
- Balzarini J, Van Laethem K, Hatse S, Froeyen M, Peumans W, Van Damme E, Schols D. Carbohydrate-binding agents cause deletions of highly conserved glycosylation sites in HIV GP120: a new therapeutic concept to hit the achilles heel of HIV. *J Biol Chem* 2005; 280: 41005-41014.
- Balzarini J, Van Laethem K, Peumans WJ, Van Damme EJ, Bolmstedt A, Gago F, Schols D. Mutational pathways, resistance profile, and side effects of cyanovirin relative to human immunodeficiency virus type 1 strains with N-glycan deletions in their gp120 envelopes. *J Virol* 2006; 80: 8411-8421.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-871.
- Bedinger P, Moriarty A, von Borstel RC 2nd, Donovan NJ, Steimer KS, Littman DR. Internalization of the human immunodeficiency virus does not require the cytoplasmic domain of CD4. *Nature* 1988; 334: 162-165.

- Benn S, Rutledge R, Folks T, Gold J, Baker L, McCormick J, Feorino P, Piot P, Quinn T, Martin M. Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science* 1985; 230: 949-951.
- Berger EA, Doms RW, Fenyö EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA. A new classification for HIV-1. *Nature* 1998; 391: 240.
- Bernard P, Couturier M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* 1992; 226: 735-745.
- Bernard P, Kézdy KE, Van Melderen L, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN, Couturier M. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol* 1993; 234: 534-541.
- Bernard P, Gabant P, Bahassi EM, Couturier M. Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* 1994; 148: 71-74.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7:1513-1523.
- Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 1983; 100: 243-255.
- Björndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, Albert J, Scarlatti G, Littman DR, Fenyö EM. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* 1997; 71: 7478-7487.
- Blaak H, van't Wout AB, Brouwer M, Hooibrink B, Hovenkamp E, Schuitemaker H. In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1269-1274.
- Blay WM, Gnanakaran S, Foley B, Doria-Rose NA, Korber BT, Haigwood NL. Consistent patterns of change during the divergence of human immunodeficiency virus type 1 envelope from that of the inoculated virus in simian/human immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol* 2006; 80: 999-1014.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382: 829-833.

- Bolmstedt A, Hemming A, Flodby P, Berntsson P, Travis B, Lin JP, Ledbetter J, Tsu T, Wigzell H, Hu SL, Olofsson S. Effects of mutations in glycosylation sites and disulphide bonds on processing, CD4-binding and fusion activity of human immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 1991; 72: 1269-1277.
- Bonhoeffer S, Holmes EC, Nowak MA. Causes of HIV diversity. *Nature* 1995; 376: 125.
- Bouma P, Leavitt M, Zhang PF, Sidorov IA, Dimitrov DS, Quinnan GV Jr. Multiple interactions across the surface of the gp120 core structure determine the global neutralization resistance phenotype of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2003; 77: 8061-8071.
- Burton DR. A vaccine for HIV type 1: the antibody perspective. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10018-10023.
- Cao J, Bergeron L, Helseth E, Thali M, Repke H, Sodroski J. Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. *J Virol* 1993; 67: 2747-2755.
- Cao J, Sullivan N, Desjardin E, Parolin C, Robinson J, Wyatt R, Sodroski J. Replication and neutralization of human immunodeficiency virus type 1 lacking the V1 and V2 variable loops of the gp120 envelope glycoprotein. *J Virol* 1997; 71: 9808-9812.
- Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 201-208.
- Centers of Disease Control. Pneumocystis pneumonia - Los Angeles. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 1981; 30: 250-252.
- Centers of Disease Control. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report* 1992; 41: 1-19.
- Chen SS, Lee CN, Lee WR, McIntosh K, Lee TH. Mutational analysis of the leucine-zipper-like motif of the human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane glycoprotein. *J Virol* 1993; 67: 3615-3619.
- Cheng-Mayer C, Quiroga M, Tung JW, Dina D, Levy JA. Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 T-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity, and CD4 antigen modulation. *J Virol* 1990; 64: 4390-4398.

- Cheng-Mayer C, Brown A, Harouse J, Luciw PA, Mayer AJ. Selection for neutralization resistance of the simian/human immunodeficiency virus SHIV-SF33A variant in vivo by virtue of sequence changes in the extracellular envelope glycoprotein that modify N-linked glycosylation. *J Virol* 1999; 73: 5294-5300.
- Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, Perryman S. Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J Virol* 1992; 66: 6547-6554.
- Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, Perryman S. Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virol* 1996; 70: 9055-9059.
- Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; 85: 1135-1148.
- Cichutek K, Norley S, Linde R, Kreuz W, Gahr M, Löwer J, von Wangenheim G, Kurth R. Lack of HIV-1 V3 region sequence diversity in two haemophilic patients infected with a putative biologic clone of HIV-1. *AIDS* 1991; 5: 1185-1187.
- Cichutek K, Merget H, Norley S, Linde R, Kreuz W, Gahr M, Kurth R. Development of a quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7365-7369.
- Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Champalimaud JL, Montagnier L. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233: 343-346.
- Clevestig P, Pramanik L, Leitner T, Ehrnst A. CCR5 use by human immunodeficiency virus type 1 is associated closely with the gp120 V3 loop N-linked glycosylation site. *J Gen Virol* 2006; 87: 607-612.
- Cocchi F, DeVico AI, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+T cells. *Science* 1995; 270: 1811-1815.
- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, Weiss R. Human immunodeficiency viruses. *Science* 1986; 232: 697.

- Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997; 185: 621-628.
- Cullen BR. Regulation of human immunodeficiency virus replication. *Annu Rev Microbiol* 1991; 45: 219-250.
- Daar ES, Lynn H, Donfield S, Gomperts E, Hilgartner MW, Hoots K, Chernoff D, Winkler C, O'Brien SJ. Effects of plasma HIV RNA, CD4+ T lymphocytes, and the chemokine receptors CCR5 and CCR2b on HIV disease progression in hemophiliacs. Hemophilia Growth and Development Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 21: 317-325.
- Dacheux L, Moreau A, Ataman-Onal Y, Biron F, Verrier B, Barin F. Evolutionary dynamics of the glycan shield of the human immunodeficiency virus envelope during natural infection and implications for exposure of the 2G12 epitope. *J Virol* 2004; 78: 12625-12637.
- Dalglish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; 312: 763-767
- De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 1992; 66: 6777-6780.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1996; 273: 1856-1862.
- Delwart EL, Mosialos G, Gilmore T. Retroviral envelope glycoproteins contain a "leucine-zipper"-like repeat. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990; 6: 703-706.
- Delwart EL, Pan H, Sheppard HW, Wolpert D, Neumann AU, Korber B, Mullins JI. Slower evolution of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies during progression to AIDS. *J Virol* 1997; 71: 7498-7508.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di-Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381: 661-666.

- Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 1997; 51: 151-178.
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; 85: 1149-58.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; 381: 667-673.
- Dubay JW, Roberts SJ, Brody B, Hunter E. Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *J Virol* 1992; 66: 4748-4756.
- Earl PI, Doms RW, Moss B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 648-652.
- Earl PL, Broder CC, Doms RW, Moss B. Epitope map of human immunodeficiency virus type 1 gp41 derived from 47 monoclonal antibodies produced by immunization with oligomeric envelope protein. *J Virol* 1997; 71: 2674-2684.
- Edinger AL, Hoffman TL, Sharron M, Lee B, Yi Y, Choe W, Kolson DL, Mitrovic B, Zhou Y, Faulds D, Collman RG, Hesselgesser J, Horuk R, Doms RW. An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 1998; 72: 7934-7940.
- Este JA, Schols D, De Vreese K, Van Laethem K, Vandamme AM, Desmyter J, De Clercq E. Development of resistance of human immunodeficiency virus type 1 to dextran sulfate associated with the emergence of specific mutations in the envelope gp120 glycoprotein. *Mol Pharmacol* 1997; 52: 98-104.
- Fang G, Zhu G, Burger H, Keithly JS, Weiser B. Minimizing DNA recombination during long RT-PCR. *J Virol Methods* 1998; 76: 139-148.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272: 872-877.
- Fenouillet E, Jones I, Powell B, Schmitt D, Kieny MP and Gluckman JC. Functional role of the glycan cluster of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein (gp41) ectodomain. *J Virol* 1993; 67: 150-160.

- Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 1992; 66: 3183-3187.
- Fouchier RA, Brouwer M, Broersen SM, Schuitemaker H. Simple determination of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing V3 genotype by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 906-911.
- Fox DG, Balfe P, Palmer CP, May JC, Arnold C, McKeating JA. Length polymorphism within the second variable region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein affects accessibility of the receptor binding site. *J Virol* 1997; 71: 759-765.
- Freed EO, Myers DJ, Risser R. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4650-4654.
- Freed EO, Myers DJ, Risser R. Identification of the principal neutralizing determinant of human immunodeficiency virus type 1 as a fusion domain. *J Virol* 1991; 65: 190-194.
- Friedman-Klein AE. Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York City. *Ann Int Med* 1982; 96: 693.
- Frost SD, Wrin T, Smith DM, Kosakovsky Pond SL, Liu Y, Paxinos E, Chappey C, Galovich J, Beauchaine J, Petropoulos CJ, Little SJ, Richman DD. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18514-18519.
- Fung MS, Sun CR, Gordon WL, Liou RS, Chang TW, Sun WN, Daar ES, Ho DD. Identification and characterization of a neutralization site within the second variable region of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* 1992; 66: 848-856.
- Ganeshan S, Dickover RE, Korber BT, Bryson YJ, Wolinsky SM. Human immunodeficiency virus type 1 genetic evolution in children with different rates of development of disease. *J Virol* 1997; 71: 663-677.
- Gelderblom HR, Özel M, Pauli G. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch Virol* 1989; 106: 1-13.
- Genoud S, Kajumo F, Guo Y, Thompson D, Dragic T. CCR5-Mediated human immunodeficiency virus entry depends on an amino-terminal gp120-binding site and on the conformational integrity of all four extracellular domains. *J Virol* 1999; 73: 1645-1648.

- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HW, Weisman JD, Fan PT, Wolf Ra, Saxon A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previous healthy homosexual men. *N Engl J Med* 1981; 305: 1425-1431.
- Hamaguchi K, Geiduschek EP. The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleate helix. *JACS* 1962, 84: 1329-1337.
- Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J* 1991; 5: 2349-2360.
- Helseth E, Oshevsky U, Furman C, Sodroski J. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* 1991; 65: 2119-2123.
- Ho DD, McKeating JA, Li XL, Moudgil T, Daar ES, Sun NC, Robinson JE. Conformational epitope on gp120 important in CD4 binding and human immunodeficiency virus type 1 neutralization identified by a human monoclonal antibody. *J Virol* 1991; 65: 489-493.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373: 123-126.
- Hoffman NG, Seillier-Moisewitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol* 2002; 76: 3852-3864.
- Hoffman TL, Doms RW. HIV-1 envelope determinants for cell tropism and chemokine receptor use. *Mol Membr Biol* 1999; 16: 57-65.
- Holmes EC, Zhang LQ, Simmonds P, Ludlam CA, Brown AJ. Convergent and divergent sequence evolution in the surface envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 within a single infected patient. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4835-4839.
- Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996; 2: 1240-1243.
- Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 1991; 253: 71-74.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.

- Janssens W, Heyndrickx L, Van der Auwera G, Nkengasong J, Beirnaert E, Vereecken K, Coppens S, Willems B, Fransen K, Peeters M, Ndumbe P, Delaporte E, van der Groen G. Interpatient genetic variability of HIV-1 group O. *AIDS* 1999; 13: 41-8.
- Jansson M, Backström E, Scarlatti G, Björndal A, Matsuda S, Rossi P, Albert J, Wigzell H. Length variation of glycoprotein 120 V2 region in relation to biological phenotypes and coreceptor usage of primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 1405-1414.
- Javaherian K, Langlois AJ, McDanal C, Ross KL, Eckler LI, Jellis CL, Porfy AT, Rusche JR, Bolognesi DP, Putney SD, Matthews TJ. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6768-6772.
- Jensen MA, van't Wout AB. Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev* 2003; 5: 104-112.
- Kalia V, Sarkar S, Gupta P, Montelaro RC. Rational site-directed mutations of the LLP-1 and LLP-2 lentivirus lytic peptide domains in the intracytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 gp41 indicate common functions in cell-cell fusion but distinct roles in virion envelope incorporation. *J Virol* 2003; 77: 3634-3646.
- Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Muñoz A, Saah AJ, Goedert JJ, Winkler C, O'Brien SJ, Rinaldo C, Detels R, Blattner W, Phair J, Erlich H, Mann DL. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 1996; 2: 405-411.
- Kasper P, Kaiser R, Kleim J-P, Oldenburg J, Brackmann HH, Rockstroh J, Schneweis KE. Diversification of HIV-1 strains after infection from a unique source. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9: 153-157.
- Kasper P, Kaiser R, Oldenburg J, Brackmann HH, Matz B and Schneweis KE. Parallel evolution in the V3 region of HIV type 1 after infection of hemophiliacs from a homogeneous source. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 1669-1678.
- Kasper P, Simmonds P, Schneweis KE, Kaiser R, Matz B, Oldenburg J, Brackmann HH and Holmes EC. The genetic diversification of the HIV type 1 gag p17 gene in patients infected from a common source. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 1197-1201.

- Kasturi L, Chen H, Shakin-Eshleman SH. Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem J* 1997; 323: 415-419.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC and Montagnier L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984, 312: 767-768.
- Kleim JP, Bailly E, Schneweis KE, Brackmann HH, Hammerstein U, Hanfland P, Loo Bvan and Oldenburg J. Acute HIV-infection in patients with hemophilia B treated with beta-propiolactone-UV-inactivated clotting factor. *Thromb Haemostas* 1990; 64: 336-337.
- Kleim JP, Ackermann A, Brackmann HH, Gahr M, Schneweis KE. Epidemiologically closely related viruses from hemophilia B patients display high homology in two hypervariable regions of the HIV-1 env gene. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7: 417-421.
- Klein, A. Molekularbiologische Analysen zur Diversifikation des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) in sechs klonal infizierten Patienten. Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 1997.
- Koito A, Harrowe G, Levy JA, Cheng-Meyer C. Functional role of the V1/V2 region of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 in infection of primary macrophages and soluble CD4 neutralization. *J Virol* 1994; 68: 2253-2259.
- Kozarsky K, Penman M, Barisipour L, Haseltine W, Sodroski J, Krieger M. Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *AIDS* 1989; 2: 163-169.
- Kupfer B, Oldenburg J, Brackmann HH, Matz B, Schneweis KE, Kaiser R. Beta-propiolactone UV inactivated clotting factor concentrate is the source of HIV-infection of 8 hemophilia B patients: confirmed. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1386-1387.
- Kupfer B, Sing T, Schöffler P, Hall R, Kurz R, McKeown A, Schneweis K-E, Eberl W, Oldenburg J, Brackmann HH, Rockstroh JK, Spengler U, Däumer MP, Kaiser R, Lengauer T and Matz B. Fifteen years of env C2V3C3 evolution in six individuals infected clonally with human immunodeficiency virus type 1. *J Med Virol* 2007; 79: 1629-1639.

- Kurth R. Das erworbene Immundefizienz-Syndrom AIDS. In: Brandis H, Eggers HJ, Köhler W, Pulverer G, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie. Stuttgart; Jena; New York: Gustav Fischer Verlag, 1994: 882-892.
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-238.
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Raymond WS, Sodroski J, Wayne AH. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998; 393: 648-659.
- LaBranche CC, Hoffman TL, Romano J, Haggarty BS, Edwards TG, Matthews TJ, Doms RW, Hoxie JA. Determinants of CD4 independence for a human immunodeficiency virus type 1 variant map outside regions required for coreceptor specificity. *J Virol* 1999; 73: 10310-10319.
- Land A, Braakman I. Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* 2001; 83: 783-790.
- Lee W-R, Syu W-J, Du B, Matsuda M, Tan S, Wolf A, Essex M, Lee T-H. Nonrandom distribution of gp120 N-linked glycosylation sites important for infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2213-2217.
- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. 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* 1990; 265: 10373-10382.
- Li Y, Luo L, Rasool N, Kang CY. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J Virol* 1993; 67: 584-588.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86: 367-377.
- Liu SL, Schacker T, Musey L, Shriner D, McElrath MJ, Corey L, Mullins JI. Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses. *J Virol* 1997; 71: 4284-4295.
- Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M, Brennan TP, Sanders-Buell E, Eddy GA, van der Groen G, Fransen K, Gershy-Damet GM, Deleys R, Burke DS. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS* 1993; 7: 769-780.

- Lue J, Hsu M, Yang D, Marx P, Chen Z, Cheng-Mayer C. Addition of a single gp120 glycan confers increased binding to dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin and neutralization escape to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2002; 76: 10299-10306.
- Lusso P. Chemokines and Viruses: The Dearest Enemies. *Virology* 2000; 273: 228-240.
- Lusso P, Earl PL, Sironi F, Santoro F, Ripamonti C, Scarlatti G, Longhi R, Berger EA, Burastero SE. Cryptic nature of a conserved, CD4-inducible V3 loop neutralization epitope in the native envelope glycoprotein oligomer of CCR5-restricted, but not CXCR4-using, primary human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 2005; 79: 6957-6968.
- Ly A, Stamatatos L. V2 loop glycosylation of the human immunodeficiency virus type 1 SF162 envelope facilitates interaction of this protein with CD4 and CCR5 receptors and protects the virus from neutralization by anti-V3 loop and anti-CD4 binding site antibodies. *J Virol* 2000; 74: 6769-6776.
- Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immunosystem and the brain. *Cell* 1986, 47: 333-348.
- Maddon PJ, McDougal JS, Clapham PR, Dalgleish AG, Jamal S, Weiss RA, Axel R. HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4. *Cell* 1988; 54: 865-874.
- Maerz AL, Drummer HE, Wilson KA, Pombrouros P. Functional analysis of the disulfide-bonded loop/chain reversal region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 reveals a critical role in gp120-gp41 association. *J Virol* 2001; 75: 6635-6644.
- Magierowska M, Theodorou I, Debré P, Sanson F, Autran B, Rivière Y, Charron D, Costagliola D. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood* 1999; 93: 936-941.
- Masciotra S, Owen SM, Rudolph D, Yang C, Wand B, Saksena N, Spira T, Dhawan S and Lal RB. Temporal relationship between V1V2 variation, macrophage replication, and coreceptor adaption during HIV-1 disease progression. *AIDS* 2002; 16: 1887-1898.
- Matthews TJ, Weinhold KJ, Lyerly HK, Langlois AJ, Wigzell H, Bolognesi DP. Interaction between the human T cell lymphotropic virus type IIIB envelope glycoprotein gp120 and the surface antigen CD4: role of carbohydrate in binding and cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5424-5428.

- McCaffrey RA, Saunders C, Hensel M, Stamatatos L. N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *J Virol* 2004; 78: 3279-3295.
- McDonald RA, Mayers DL, Chung RC, Wagner KF, Ratto-Kim S, Birx DL, Michael NL. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 env sequence variation in patients with diverse rates of disease progression and T-cell function. *J Virol* 1997; 71: 1871-1879.
- McKeating JA, Thali M, Furman C, Karwowska S, Gorny MK, Cordell J, Zolla-Pazner S, Sodroski J, Weiss RA. Amino acid residues of the human immunodeficiency virus type I gp120 critical for the binding of rat and human neutralizing antibodies that block the gp120-sCD4 interaction. *Virology* 1992; 190: 134-142.
- McKeating JA, Shotton C, Cordell J, Graham S, Balfe P, Sullivan N, Charles M, Page M, Blomstedt A, Olofson S, Kayman SC, Wu Z, Pinter A, Dean C, Sodroski J, Weiss RA. Characterization of neutralizing monoclonal antibodies to linear and conformation-dependent epitopes within the first and second variable domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* 1993; 67: 4932-4944.
- Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272: 1167-1170.
- Mellquist JL, Kasturi L, Spitalnik SL, Shakin-Eshleman SH. The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* 1998; 37: 6833-6837.
- Meyerhans A, Cheynier R, Albert J, Seth M, Kwok S, Sninsky J, Morfeldt-Månson L, Asjö B, Wain-Hobson S. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* 1989; 58: 901-910.
- Michael NL, Louie LG, Sheppard HW. CCR5-delta 32 gene deletion in HIV-1 infected patients. *Lancet* 1997; 350: 741-742.
- Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, Hallahan CW, Selig SM, Schwartz D, Sullivan J, Connors M. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2709-2714.

- Moore JP, Sattentau QJ, Yoshiyama H, Thali M, Charles M, Sullivan N, Poon SW, Fung MS, Traincard F, Pincus M, Robey G, Robinson JE, Ho DD, Sodroski J. Probing the structure of the V2 domain of human immunodeficiency virus type 1 surface glycoprotein gp120 with a panel of eight monoclonal antibodies: human immune response to the V1 and V2 domains. *J Virol* 1993; 67: 6136-6151.
- Moore JP, Ho DD. HIV-1 neutralization: the consequences of viral adaptation to growth on transformed T cells. *AIDS* 1995; 9: 117-136.
- Moore JP, Binley J. HIV. Envelope's letters boxed into shape. *Nature* 1998; 393: 630-631.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350.
- Nahmias AJ, Weiss J, Yao X, Lee F, Kodzi R, Schanfield M, Matthews T, Bolognesi D, Durack D, Motulsky A, Kanki P, Essex M. Evidence for human infection with a HTLV-III/LAV like virus in Central Africa, 1959. *Lancet* 1986; 1: 1279-1280.
- Nakayama EE, Shioda T, Tatsumi M, Xin X, Yu D, Ohgimoto S, Kato A, Sakai Y, Ohnishi Y, Nagai Y. Importance of the N-glycan in the V3 loop of HIV-1 envelope protein for CXCR-4- but not CCR-5-dependent fusion. *FEBS Lett* 1998; 426: 367-372.
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; 382: 833-835.
- Olofsson S, Hansen JE. Host cell glycosylation of viral glycoproteins--a battlefield for host defence and viral resistance. *Scand J Infect Dis* 1998; 30: 435-440.
- Palmer C, Balfe P, Fox D, May JC, Frederiksson R, Fenyö EM, McKeating JA. Functional characterization of the V1V2 region of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 1996; 220: 436-449.
- Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF, Montefiori D, Orenstein JM, Fox C, Schragr LK, Margolick JB, Buchbinder S, Giorgi JV, Fauci AS. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 209-216.
- Parren PWI, Burton DR, Sattentau QJ. HIV-1 antibody--debris or virion? *Nat Med.* 1997; 3: 366-367.

- Parren PWHI, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *AIDS* 1999; 13: 137-162.
- Pastore C, Ramos A, Mosier DE. Intrinsic obstacles to human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching. *J Virol* 2004; 78: 7565-7574.
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271: 1582-1586.
- Perrin C, Fenouillet E, Jones IM. Role of gp41 glycosylation sites in the biological activity of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Virology* 1998; 242 (2): 338-345.
- Pfafferott KJ. Untersuchung zur Evolution des HIV in vivo. Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2001.
- Pinter A, Honnen WJ, Racho ME, Tilley SA. A potent, neutralizing human monoclonal antibody against a unique epitope overlapping the CD4-binding site of HIV-1 gp120 that is broadly conserved across North American and African virus isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9: 985-996.
- Pinter A, Honnen WJ, D'Agostino P, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Kayman SC. The C108g epitope in the V2 domain of gp120 functions as a potent neutralization target when introduced into envelope proteins derived from human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *J Virol* 2005; 79: 6909-6917.
- Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* 2001; 276: 13433-13441.
- Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Schreiber M. The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology* 2002; 304: 70-80.
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 1984; 224: 497-500.

- Poumbourios P, Maerz AL, Drummer HE. Functional evolution of the HIV-1 envelope glycoprotein 120 association site of glycoprotein 41. *J Biol Chem* 2003; 278: 42149-42160.
- Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Doran ER, Rafalski JA, Whitehorn EA, Baumeister K, Ivanoff L, Petteway SR Jr, Pearson ML, Lautenberger JA, Papas TS, Ghayeb J, Chang NT, Gallo RC and Wong-Staal F. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 1985; 313: 277-284.
- Reitter JN, Means RE, Desrosiers RC. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat Med* 1998; 4: 679-684.
- Resch W, Hoffman N, Swanstrom R. Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks. *Virology* 2001; 228: 51-62.
- Reynard F, Fatmi A, Verrier B, Bedin F. HIV-1 acute infection env glycomutants designed from 3D model: effects on processing, antigenicity, and neutralization sensitivity. *Virology* 2004; 324: 90-102.
- Richman DD, Bozzette SA. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 1994; 169: 968-974.
- Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, Sodroski J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 1998; 280: 1949-1953.
- Robbins SL, Cotran R, Kumar V, Collins T. *Pathologic Basis of Disease (6th Edition)*. Philadelphia - London - Toronto - Montreal - Sydney - Tokyo: W.B. Saunders Company, 1999.
- Ross TM, Cullen BR. The ability of HIV type 1 to use CCR-3 as a coreceptor is controlled by envelope V1/V2 sequences acting in conjunction with a CCR-5 tropic V3 loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7682-7686.
- Ross HA, Rodrigo AG. Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *J Virol* 2002; 76: 11715-11720.

- Rusche JR, Javaherian K, McDanal C, Petro J, Lynn DL, Grimaila R, Langlois A, Gallo RC, Arthur LO, Fischinger PJ, Bolognesi DP, Putney SD, Matthews TJ. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope, gp120. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3198-3202.
- Rybarczyk BJ, Montefiori D, Johnson PR, West A, Johnston RE, Swanstrom R. Correlation between env V1/V2 region diversification and neutralizing antibodies during primary infection by simian immunodeficiency virus sm in rhesus macaques. *J Virol* 2004; 78: 3561-3571.
- Saag MS, Hahn BH, Gibbons J, Li Y, Parks ES, Parks WP, Shaw GM. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo. *Nature* 1988; 334: 440-444.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
- Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, Hattori T, Uchiyama T. T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J Virol* 1998; 72: 9763-9770.
- Salzwedel K, West JT, Hunter E. A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for env-mediated fusion and virus infectivity. *J Virol* 1999; 73: 2469-2480.
- Salzwedel K, Berger EA. Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: Functional complementation of specific defects in gp120 and gp41. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12794-12799.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofsted C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; 382: 722-725.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74: 5463-5467.

- Sattentau QJ, Moore JP. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med* 1991; 174: 407-415.
- Sattentau QJ, Zolla-Pazner S, Poignard P. Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. *Virology* 1995; 206: 713-717.
- Schaal H, Klein M, Gehrman P, Adams O and Scheid A. Requirement of N-terminal amino acid residues of gp41 for human immunodeficiency virus type 1-mediated cell fusion. *J Virol* 1995; 69: 3308-3314.
- Schwartz S, Felber BK, Fenyó EM, Pavlakis GN. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J Virol* 1990; 64: 5448-5456.
- Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, Gupta P, Rinaldo CR, Learn GH, He X, Huang XL, Mullins JI. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73: 10489-10502.
- Shieh JT, Martin J, Baltuch G, Malim MH, Gonzalez-Scarano F. Determinants of syncytium formation in microglia by human immunodeficiency virus type 1: role of the V1/V2 domains. *J Virol* 2000; 74: 693-701.
- Shioda T, Oka S, Xin X, Liu H, Harukuni R, Kurotani A, Fukushima M, Hasan MK, Shiino T, Takebe Y, Iwamoto A, Nagai Y. In vivo sequence variability of human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120: association of V2 extension with slow disease progression. *J Virol* 1997; 71: 4871-4881.
- Shuman S. Site-specific DNA cleavage by vaccinia virus DNA topoisomerase I. Role of nucleotide sequence and DNA secondary structure. *J Biol Chem* 1991; 266: 1796-1803.
- Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 1994; 269: 32678-32684.
- Simmons G, Reeves JD, McKnight A, DeJucq N, Hibbitts S, Power CA, Aarons E, Schols D, De Clercq E, Proudfoot AE, Clapham PR. CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *J Virology* 1998; 72: 8453-8457.

- Sjölander S, Bolmstedt A, Akerblom L, Horal P, Olofson S, Morein B, Sjölander A. N-linked glycans in the CD4-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp160 are essential for the in vivo priming of T cells recognizing an epitope located in their vicinity. *Virology* 1996; 215: 124-133.
- Skinner MA, Langlois AJ, McDanal CB, McDougal JS, Bolognesi DP, Matthews TJ. Neutralizing antibodies to an immunodominant envelope sequence do not prevent gp120 binding to CD4. *J Virol* 1988; 62: 4195-4200.
- Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC, Wong-Staal F. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 1986; 45: 637-648.
- Stephens HA. HIV-1 diversity versus HLA class I polymorphism. *Trends Immunol* 2005; 26: 41-47.
- Strunnikova N, Ray SC, Livingston RA, Rubalcaba E, Viscidi RP. Convergent evolution within the V3 loop domain of human immunodeficiency virus type 1 in association with disease progression. *J Virol* 1995; 69: 7548-7558.
- Sullivan N, Sun Y, Sattentau Q, Thali M, Wu D, Denisova G, Gershoni J, Robinson J, Moore JP, Sodroski J. CD4-induced changes in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization. *J Virol* 1998; 72: 4694-4703.
- Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, de Goede RE, Lange JM, Schellekens PT, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F. 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* 1989; 63: 2118-2125.
- Thali M, Furman C, Ho DD, Robinson J, Tilley S, Pinter A and Sodroski J. Discontinuous, conserved neutralization epitopes overlapping the CD4-binding region of human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein. *J Virol* 1992; 66: 5635-5641.
- Thali M, Moore JP, Furman C, Charles M, Ho DD, Robinson J, Sodroski J. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol* 1993; 67: 3978-3988.

- Theodorou I, Meyer L, Magierowska M, Katlama C, Rouzioux C. HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. Seroco Study Group. *Lancet* 1997; 349: 1219-1220.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4876-4882.
- Touloumi G, Karafoulidou A, Gialeraki A, Katsarou O, Milona I, Kapsimali V, Mandalaki T, Hatzakis A. Determinants of progression of HIV infection in a Greek hemophilia cohort followed for up to 16 years after seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 19: 89-97.
- van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. *Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses*. San Diego: Academic Press, 2000.
- van Rij RP, de Roda Husman AM, Brouwer M, Goudsmit J, Coutinho RA, Schuitemaker H. Role of CCR2 genotype in the clinical course of syncytium-inducing (SI) or non-SI human immunodeficiency virus type 1 infection and in the time to conversion to SI virus variants. *J Infect Dis* 1998; 178: 1806-1811.
- Varmus H, Brown P. Retroviruses. In: Berg DE, Hose MM, Hrsg. *Mobile DNA*. Washington DC: Am Soc Microbiol, 1989: 53-108.
- Vicenzi E, Bagnarelli P, Santagostino E, Ghezzi S, Alfano M, Sinnone MS, Fabio G, Turchetto L, Moretti G, Lazzarin A, Mantovani A, Mannucci PM, Clementi M, Gringeri A, Poli G. Hemophilia and nonprogressing human immunodeficiency virus type 1 infection. *Blood* 1997; 89: 191-200.
- Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 615-619.
- Volkenandt M, Löhr M, Dicker AP. Gene amplification by the polymerase chain reaction. *Dtsch Med Wochenschr* 1990; 115: 670-676.
- Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 1985; 40: 9-17.
- Wang B, Spira TJ, Owen S, Lal RB, Saksena NK. HIV-1 strains from a cohort of American subjects reveal the presence of a V2 region extension unique to slow progressors and non-progressors. *AIDS* 2000; 14: 213-223.

- Warrier SV, Pinter A, Honnen WJ, Girard M, Muchmore E, Tilley SA. A novel, glycan-dependent epitope in the V2 domain of human immunodeficiency virus type 1 gp120 is recognized by a highly potent, neutralizing chimpanzee monoclonal antibody. *J Virol* 1994; 68: 4636-4642.
- Watkins BA, Buge S, Aldrich K, Davis AE, Robinson J, Reitz MS Jr, Robert-Guroff M. Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to neutralization by natural antisera occurs through single amino acid substitutions that cause changes in antibody binding at multiple sites. *J Virol* 1996; 70: 8431-8437.
- Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 1998; 92: 451-462.
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 2003; 422: 307-312.
- Weng Y, Weiss C. Mutational analysis of residues in the coiled-coil domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J Virol* 1998; 72: 9676-9682.
- Wild C, Dubay JW, Greenwall T, Baird T, Oas TG, McDanal C, Hunter E, Matthews T. 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 than assembly of the glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12676-12680.
- Willey RL, Martin MA, Peden KW. Increase in soluble CD4 binding to and CD4-induced dissociation of gp120 from virions correlates with infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1994; 68: 1029-1039.
- Williams JG, Patient RK. *Gentechnologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1991.
- Williamson S, Perry SM, Bustamante CD, Orive ME, Stearns MN, Kelly JK. A statistical characterization of consistent patterns of human immunodeficiency virus evolution within infected patients. *Mol Biol Evol* 2005; 22: 456-468.
- Wolfs TF, de Jong JJ, Van den Berg H, Tijnagel JM, Krone WJ, Goudsmit J. Evolution of sequences encoding the principal neutralization epitope of human immunodeficiency virus 1 is host dependent, rapid, and continuous. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9938-9942.

- Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5." *Nature* 1996; 384: 179-183.
- Wu Z, Kayman SC, Honnen W, Revesz K, Chen H, Vijnh-Warrier S, Tilley SA, McKeating J, Shotton C, Pinter A. Characterization of neutralization epitopes in the V2 region of human immunodeficiency virus type 1 gp120: role of glycosylation in the correct folding of the V1/V2 domain. *J Virol* 1995; 69: 2271-2278.
- Wyatt R, Sullivan N, Thali M, Repke H, Ho D, Robinson J, Posner M, Sodroski J. Functional and immunologic characterization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins containing deletions of the major variable regions. *J Virol* 1993; 67: 4557-4565.
- Wyatt R, Moore JP, Accola M, Desjardin E, Robinson J, Sodroski J. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J Virol* 1995; 69: 5723-5733.
- Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet R, Robinson J, Sodroski J. The antigenic structure of HIV gp120 envelope glycoprotein." *Nature* 1998; 393: 705-711.
- Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998; 280: 1884-1888.
- Ye Y, Si ZH, Moore JP, Sodroski J. Association of structural changes in the V2 and V3 loops of the gp120 envelope glycoprotein with acquisition of neutralization resistance in a simian-human immunodeficiency virus passaged in vivo. *J Virol* 2000; 74: 11955-11962.
- Yonezawa A, Hori T, Takaori-Kondo A, Morita R, Uchiyama T. Replacement of the V3 region of gp120 with SDF-1 preserves the infectivity of T-cell line-tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2001; 75: 4258-4267.
- Zhang YJ, Dragic T, Cao Y, Kostrikis L, Kwon DS, Littman DR, KewalRamani VN, Moore JP. Use of coreceptors other than CCR5 by non-syncytium-inducing adult and pediatric isolates of human immunodeficiency virus type 1 is rare in vitro. *J Virol* 1998; 72: 9337-9344.
- Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 1993; 261: 1179-1181.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Bertfried Matz danke ich besonders für die Überlassung dieses spannenden Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Vor allem danke ich ihm für sein großes und andauerndes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, für seine starke Unterstützung und für sehr interessante Gespräche und Diskussionen des außergewöhnlichen Themas.

Meinem Betreuer Dr. Bernd Kupfer danke ich sehr herzlich für sein fortwährendes und unermüdliches Engagement, die intensive und fachlich hervorragende Betreuung dieser Arbeit und für viele fruchtbare Diskussionen, die dieser Arbeit zugute gekommen sind. Vor allem danke ich ihm auch für ein sehr angenehmes, lockeres und konstruktives Arbeitsklima und seine stete Bereitschaft mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Frau Professor Dr. Anna Maria Eis-Hübinger danke ich für die anregenden Diskussionen.

Frau Dr. Christine Buchholz danke ich für sehr nützliche Tips zur förmlichen Erstellung dieser Arbeit und aufmerksames Korrekturlesen.

Der Klinik für Hämatologie und Transfusionsmedizin und der Immunologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin I danke ich für die Entnahme der Patientenproben und für die Überlassung der Daten der CD4⁺ T-Lymphozytenzahl.

Vor allem danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Virologie, die mich jederzeit hilfsbereit unterstützt haben und die für eine sehr angenehme Atmosphäre im Labor gesorgt haben. Dabei gilt mein besonderer Dank Bettina Kochan und Gertrud Spiegelberg, die mich in die grundlegenden Methoden eingearbeitet haben, aber auch Beate Schneider, Jean Ndjomou, Ulrike Reber, Monika Pollig, Ilka Weiß, Frau Frank und den vielen anderen guten Seelen der Virologie.

Ganz besonderer Dank gebührt auch meiner Freundin Svenja Pentling, die mich mental immer in der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat und die Geduld und Verständnis zeigte, wenn ich mal wieder weiter an der Doktorarbeit arbeiten mußte und keine Zeit für gemeinsame Freizeit hatte.