

Universität Ulm

Institut für molekulare Virologie

Leiter: Prof. Dr. Frank Kirchhoff

**Bedeutung der hydrophoben Tasche im HIV-1  
Hüllprotein für die virale Infektiosität und  
Sensitivität gegenüber Entry-Inhibitoren**

Dissertation zur Erlangung

des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Thomas Christian Eder

aus Göppingen

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jan Münch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joerg Fehling

Tag der Promotion: 29.10.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	HIV und AIDS . . . . .	1
1.2	Morphologie, Genomaufbau und Replikation des HI-Virus . . . . .	2
1.3	Wirkstoffe und Kombinationstherapien gegen HIV . . . . .	4
1.4	Struktur des HIV-Hüllproteins und Eintritt in die Wirtszelle . . . . .	6
1.5	Entry-Inhibitoren . . . . .	9
1.6	Fragestellung . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Eukaryote Zelllinien . . . . .	14
2.2	Bakterien . . . . .	14
2.3	Nukleinsäuren . . . . .	15
2.4	Enzyme . . . . .	16
2.5	Reagenzien und Laborhilfsmittel . . . . .	17
2.6	Inhibitoren . . . . .	18
2.7	Reagenzsysteme (Kits) . . . . .	18
2.8	Medien . . . . .	18
2.9	Lösungen und Puffer . . . . .	19
2.10	Antikörper für die Western-Blots . . . . .	21
2.11	DNA-Methoden . . . . .	22
2.12	Bakterienkultur . . . . .	23
2.13	Zellkultur . . . . .	24
2.14	Herstellung von HIV-1 Gp120-Mutanten . . . . .	25
2.15	Herstellung von Viren . . . . .	25
2.16	Bestimmung der viralen Infektiosität, Sensitivität und Replikation . . . . .	26
2.17	Nachweis viraler Proteine durch Western Blot Analyse . . . . .	28
2.18	Zellfusions-Test . . . . .	29
2.19	Computerprogramme und Datenquellen . . . . .	30
2.20	Statistische Auswertung . . . . .	30

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1	Funktionelle Analyse der hydrophoben Tasche im ungebundenen HIV-1 NL4-3 Gp120 . . . . .	31
3.1.1	Expression und Prozessierung des Hüllproteins der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten . . . . .	33
3.1.2	Infektiosität der HIV-1 NL4-3 (X4) und HIV-1 NL4-3 005pf135 (R5) Mutanten in TZM-bl-Zellen . . . . .	34
3.1.3	Replikation der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten . . . . .	36
3.1.4	Fusogenität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten . . . . .	38
3.1.5	Korezeptortropismus der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten . . . . .	39
3.2	Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber Entry-Inhibitoren	40
3.2.1	Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber dem Attachment-Inhibitor BMS-806 . . . . .	41
3.2.2	Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber den Fusions-Inhibitoren T-20 und T1249 . . . . .	42
3.2.3	Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber den CCR5-Antagonisten SCH-D und TAK-779 . . . . .	43
3.2.4	Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber dem CXCR4-Antagonisten AMD3100 . . . . .	44
3.2.5	Tabellarische Zusammenstellung aller IC <sub>50</sub> -Werte . . . . .	45
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>46</b>
4.1	Funktionelle Analyse der hydrophoben Tasche im ungebundenen HIV-1 NL4-3 Gp120 . . . . .	47
4.2	Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber Entry-Inhibitoren	49
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>53</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<sup>32</sup> P	Phosphorisotop der relativen Masse von 32
β-Gal	β-Galaktosidase
°C	Grad Celsius
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
AIDS	engl.: <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
APC	engl.: <i>antigen presenting cells</i>
AS	Aminosäure
ASM	engl.: <i>Alanin Scanning Mutagenesis</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bNAb	engl.: <i>broad neutralizing antibody</i>
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CD4 <sup>+</sup>	CD4 positiv
sCD	engl.: <i>soluble cluster of differentiation</i>
Ci	Curie
CMV	engl.: <i>Cytomegalovirus</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DMEM	engl.: <i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>

DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
E.coli	Escherichia coli
ELISA	engl.: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
env	engl.: <i>envelope</i>
FKS	fötale Kälberserum
FACS	engl.: <i>fluorescence aided cell sorter</i>
g	Gramm
gag	engl.: <i>group specific antigen</i>
h	Stunde
HAART	engl.: <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HR	engl.: <i>heptad repeat</i>
IC	engl.: <i>inhibitor concentration</i>
IC <sub>50</sub>	Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird
IL-2	Interleukin-2
IRES	engl.: <i>internal ribosomale entry site</i>
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LTR	engl.: <i>long terminal repeat</i>
m	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )

M	molar (mol/l)
min	Minute
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>
n	nano ( $10^{-9}$ )
nef	engl.: <i>negative factor</i>
NIAID	engl.: <i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NNRTI	Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP40	Nonidet P 40
NRTI	Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
nt	Nukleotid
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PBS <sub>0</sub>	PBS ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PHA	Phytohämagglutinin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pol	Polymerase
RNA	engl.: <i>Ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe

SDS	engl.: <i>sodium dodecylsulfate</i>
sAIDS	engl.: <i>simian AIDS</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SIV	Affenimmundefizienzvirus ( <i>simian immunodeficiency virus</i> )
SOE	engl.: <i>splice overlap extension</i>
SSC	engl.: <i>salted sodium citrate</i>
tat	engl.: <i>transactivator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	engl.: <i>transfer-ribonucleicacid</i>
UNAIDS	AIDS Programm der Vereinten Nationen
V	Volt
vif	engl.: <i>viral infectiosity factor</i>
vpr	engl.: <i>viral protein rapid</i>
vpu	engl.: <i>viral protein out</i>
(v/v)	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
(w/v)	Masse pro Volumen

### Aminosäuren

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

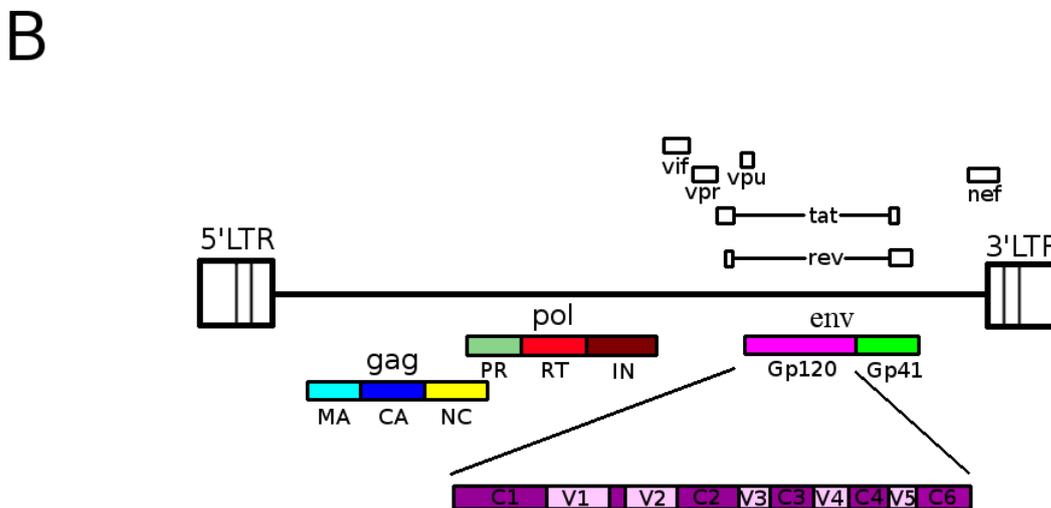
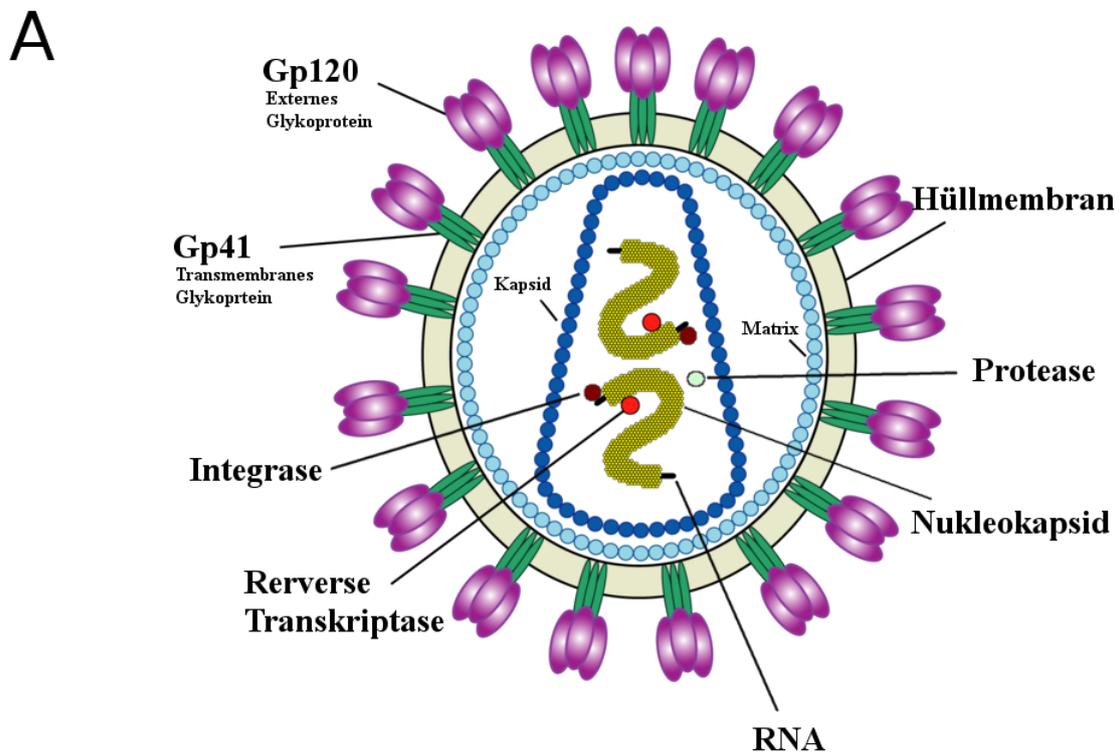
# 1 Einleitung

## 1.1 HIV und AIDS

1981 kam es in Kalifornien und New York zu einer ungewöhnlichen Häufung lebensbedrohlicher, opportunistischer Infektionen [31, 59]. Die Betroffenen, meist junge und bisher gesunde homosexuelle Männer, wiesen die Symptome eines stark geschwächten Immunsystems auf. Das neue Krankheitsbild erhielt daher vom *Center of Disease Control* (CDC) die Bezeichnung *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS). Zwei Jahre später gelang es Françoise Barré-Sinoussi und Luc Montagnier ein bis dato unbekanntes Retrovirus zu isolieren [2]. 1986 konnte das Virus der Unterfamilie der Lentiviren zugeordnet werden und erhielt den Namen Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) [2]. Im gleichen Jahr wurde im Blut eines westafrikanischen AIDS-Patienten ein zweiter HIV-Typ entdeckt und mit HIV-2 benannt [11]. Inzwischen konnten in zahlreichen afrikanischen Affenarten eng verwandte Lentiviren nachgewiesen werden. Sie werden nach ihrem Wirt als Affen-Immundefizienzviren (SIV; *Semian Immunodeficiency Virus*) bezeichnet [35]. Phylogenetische Untersuchungen weisen darauf hin, dass das in westafrikanischen Schimpansen vorkommende SIV<sub>cpz</sub> bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts [46] auf den Menschen übertragen wurde und der Vorläufer des heutigen HIV-1 ist [30]. Die Aufspaltung des HIV-1 in drei große Untergruppen (M (*Major*), O (*Outlier*) und N (*New*)) gilt als Beleg dafür, dass mehrere unabhängige Übertragungen auf den Menschen stattfanden [77]. In die Untergruppe M von HIV-1 fallen mehr als 90% aller HIV-Infektionen. Diese Gruppe wird wiederum in neun Subtypen unterteilt, die mit A, B, C, D, F, G, H, J und K bezeichnet werden. In Nordamerika und Europa ist vor allem der Subtyp B verbreitet. Als wahrscheinlichstes Vorläufervirus für das HIV-2 gilt das in rauchgrauen Mangaben (*sooty manglebe*) nachgewiesene SIV<sub>SM</sub> [35]. Gelangt das HI-Virus in den Körper des Wirtes, infiziert es vorwiegend CD4<sup>+</sup> T-Zellen [44]. Im Zuge der Evolution von SIV zu HIV-1 kam es zu einem Verlust immunregulatorischer Funktionen des Virus [75]. Dies wird als Ursache für die nur beim Menschen auftretende Hyperaktivierung des Immunsystems gesehen. Die erhöhte Aktivierungs- und Apoptoserate der T-Zellen hat langfristig eine Überlastung des Immunsystems zur Folge [84]. Im Laufe einer durchschnittlich neun- bis elfjährigen Latenzphase sinkt die Konzentration der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einen kritischen Bereich und es kommt zum Ausbruch von AIDS. Schätzungen der UNO gehen davon aus, dass im Jahr 2012 weltweit 34 Millionen Menschen mit HIV infiziert waren. Hinzu kommen jährlich 2,5 Millionen Neuinfektionen. Das Zentrum der HIV-Epidemie liegt in den südlichen Ländern Afrikas (*Sub-Saharan Africa*). In diesen Ländern leben zwei Drittel aller HIV-Infizierten und sterben 70 % aller AIDS-Opfer (UNAIDS 2012).

## 1.2 Morphologie, Genomaufbau und Replikation des HI-Virus

HIV-Partikel haben einen Durchmesser von circa 100 nm. Das im Zentrum liegende konische Kapsid (p24) wird von einer, der Cytoplasmamembran abgeleiteten, Doppellipidschicht umgeben. Matrixproteine (p17) kleiden die Innenseite dieser Membran aus und stehen mit dem Kapsid in Verbindung. In die Membran ist das transmembranöse Glykoprotein (Gp41) eingelagert, das über nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem externen Glykoprotein (Gp120) verbunden ist. Im Inneren des Kapsids befinden sich das mit dem Nukleokapsidprotein (p7) assoziierte virale Genom sowie die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease [92]. Das Genom besteht aus zwei identischen, einzelsträngigen Plus-Strang-RNAs mit einer Länge von jeweils circa 9,2 kb. Wie bei allen Retroviren werden diese von den LTRs (*Long Terminal Repeats*) flankiert. Die LTRs spielen eine wichtige Rolle bei der Integration in das Wirtszellgenom und der Transkription. Das HIV-Genom codiert insgesamt neun Gene: Drei Hauptgene für die Strukturproteine (Gag), die Enzyme (Pol) und die Glykoproteine der Virushülle (Env) sowie sechs weitere für die Proteine Vpr, Nef, Vif, Tat, Rev und Vpu, die vor allem in der Replikation, der Pathogenese und der Hemmung von Restriktionsfaktoren von Bedeutung sind [97]. Der erste Schritt im Replikationszyklus des HI-Virus ist das Verschmelzen von Virushülle und Zellmembran (siehe Kapitel 1.4). Dadurch werden beide RNA-Genome zusammen mit den viralen Enzymen ins Zellinnere geschleust. Die Reverse Transkriptase katalysiert die Umwandlung der einzelsträngigen RNA in eine doppelsträngige DNA, welche anschließend mit Hilfe der Integrase in das zelluläre Genom eingebaut wird. Die Transkription der viralen DNA von der zellulären RNA-Polymerase II folgt einem komplexen Muster: In einer frühen Phase gelangen nur mehrfach gespleißte mRNA-Moleküle aus dem Zellkern hinaus. Diese codieren die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef. Das Tat-Protein bewirkt durch die Bindung an die viralen LTRs eine erhöhte Transkriptionsrate der viralen DNA, während das Rev-Protein das Ausschleusen ungespleißter und einfach gespleißter mRNAs aus dem Kern ermöglicht. Deren Translationsprodukte werden beim Zusammenbau des unreifen Viruspartikels als Strukturproteine und als RNA-Genom benötigt. Im letzten Schritt des Reifungsprozesses werden nach der Knospung (*budding*) des Virus die Gag/Pol-Vorläuferproteine von der viralen Protease in deren Funktionseinheiten gespalten.



**Abbildung 1: Morphologie und Genomaufbau von HIV-1** (US National Institute of Health, modifiziert, PD-USGov-HHS-NIH). **(A)** Struktur des HIV-1-Viruspartikels (Maßstab 50.000 : 1). **(B)** Genomaufbau von HIV-1, farblich hervorgehoben sind die 3 für die Strukturproteine codierenden Hauptgene sowie die Anordnung der konservierten (C1-6) und hochvariablen Regionen (V1-5) in der Hüllproteinuntereinheit Gp120. **Abkürzungen:** LTR: long terminal repeat; GAG: group specific antigen; MA: matrix; CA: capsid; NC: nucleocapsid; pol: polymerase; PR: protease; RT: reverse transcriptase; IN: integrase; vif: viral infectivity factor; vpr: viral protein r; tat: transactivator of transcription; rev: regulator of virion; vpu: viral protein u; env: envelope; gp: glycoprotein; nef: negative factor; C1-5: constant region 1-5; V1-5: variable region 1-5; (Copyright © 2005 US National Institute of Health)

### 1.3 Wirkstoffe und Kombinationstherapien gegen HIV

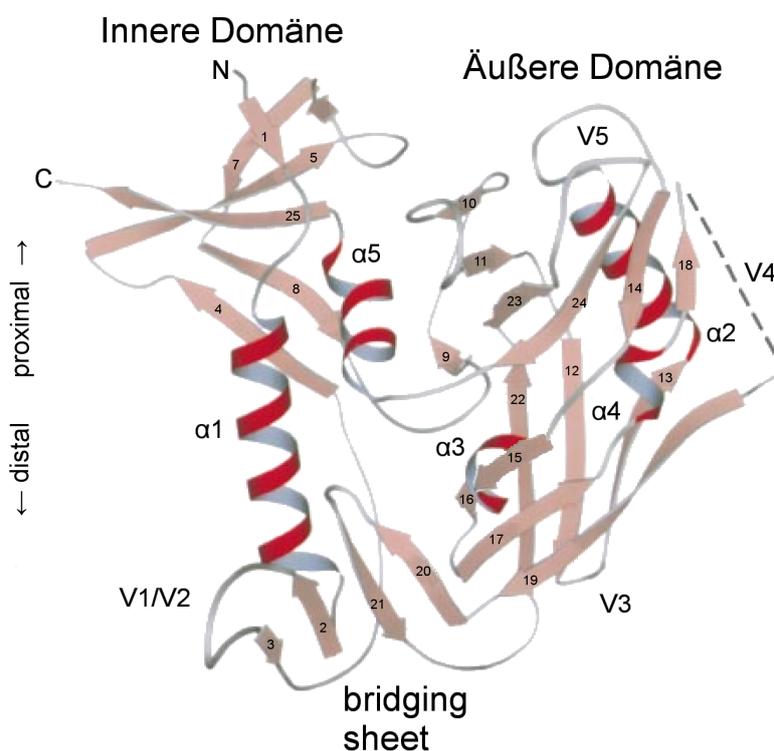
In der HIV-Therapie werden vier Wirkstoffgruppen unterschieden: Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, Protease-Inhibitoren, Integrase-Inhibitoren und Entry-Inhibitoren. Reverse-Transkriptase-Inhibitoren waren die ersten verfügbaren Medikamente im Kampf gegen HIV. In weiterentwickelter Form sind sie bis heute Bestandteil jeder modernen Kombinationstherapie. Man unterscheidet zwischen Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) und Nicht-Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs). NRTIs werden intrazellulär zu aktiven Metaboliten phosphoryliert. Als falsche Substrate konkurrieren sie mit den physiologischen Nukleosiden und führen zu einem DNA-Kettenabbruch [82]. NNRTIs binden in der Nähe der Substratbindungsstelle an die Reverse Transkriptase. Dies führt zu einer deutlichen Reduktion der Enzymaktivität. Protease-Inhibitoren (PIs) nutzen einen anderen Wirkmechanismus. Sie blockieren die Substrattasche der viralen Aspartatprotease und verhindern damit die Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine [26]. Dieser im Replikationszyklus des Virus sehr viel später liegende Angriffspunkt ermöglicht es den Proteaseinhibitoren, die Virussynthese auch nach abgeschlossener Integration ins Wirtszellgenom effektiv zu unterbinden. Im Jahr 2007 wurde nach erfolgreichem Abschluss der klinischen Erprobungsphase Raltegravir (Isentress<sup>TM</sup>) als erstes Präparat der Integrase-Inhibitoren in den USA und Europa zugelassen. Der Transfer der viralen DNA ins Wirtsgenom, ein mehrstufiger Prozess welcher durch die virale Integrase katalysiert wird, hat sich als ein vielversprechender Ansatzpunkt herausgestellt [50]. Zwischenzeitlich wurden mit Elvitegravir und Dolutegravir zwei weitere Substanzen dieser Wirkstoffklasse entwickelt [78, 61]. Klinische Studien konnten eine den Protease-Inhibitoren gleichwertige Wirksamkeit in Kombinationstherapien nachweisen [74, 95]. Die vierte Inhibitorenklasse bildet die heterogene Gruppe der Entry-Inhibitoren. Sie verhindern über verschiedene Wirkmechanismen den Eintritt der HI-Viren in die Körperzellen (siehe Kapitel 1.5).

Ein großer Durchbruch in der HIV-Therapie gelang 1996 mit der Hochaktiven Antiretroviralen Therapie (*HAART - Highly Active Antiretroviral Therapy*) [76]. Durch die Kombination verschiedener Wirkstoffe kann die *in vivo* Virusreplikation unter die Nachweisgrenze gesenkt werden. Aktuell empfohlene Kombinationstherapien bestehen meist aus 2 NRTIs, die mit einem Protease-Inhibitor, einem Integrase-Inhibitor oder einem NNRTI kombiniert werden [36]. Durch die Einführung von HAART konnten beachtliche Erfolge erzielt werden: Die geschätzte Überlebenszeit unter antiviraler Therapie liegt derzeit bei 30 Jahren [40]. Die Zahl der Menschen in Entwicklungsländern mit Zugang zu HAART konnte in den letzten 6 Jahren verzehnfacht werden (UNAIDS 2012). Neue Kombinationspräparate und eine verbesserte Pharmakokinetik der Wirkstoffe führten

über einfachere Einnahmeregeln und weniger starke Nebenwirkungen zu einer erhöhten Compliance bei den HIV-Patienten. Andere Probleme blieben bisher allerdings ungelöst: Trotz der HAART kommt es immer noch zur Bildung resistenter und multi-resistenter Virusstämme [34]. Verantwortlich für die Bildung dieser Problemviren ist ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Ungeachtet einer korrekt angewandten HAART kann die Virusreplikation nicht vollständig unterdrückt werden [70, 19]. Die geringe Leseschreibgenauigkeit der Reversen Transkriptase erzeugt ständig neue Virusvarianten. Unter dem hohen Selektionsdruck, den die antiviralen Medikamente erzeugen, werden die Viren mit verminderter Sensitivität selektiert. Im ungünstigsten Fall kann eine neu erworbene Resistenz gegenüber einem Wirkstoff auch zu einer Kreuzresistenz gegenüber anderen Wirkstoffen führen [17]. Die Transmission dieser Viren führte in den letzten Jahren zu einem signifikant wachsenden Anteil von Patienten, die bereits bei Behandlungsbeginn mit resistenten Viren infiziert waren [54]. Experimentell konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass das Einfügen multipler resistenzvermittelnder Mutationen nicht unweigerlich mit einer Einschränkung der viralen Replikationsfähigkeit verbunden sein muss [63]. Des Weiteren gibt es bis heute nur unzureichende Daten über die Langzeittoxizität der antiviralen Wirkstoffe und die Folgen der häufig unter HAART auftretenden Stoffwechselveränderungen [73]. Dieses Problem wiegt umso schwerer, da die Persistenz des Erregers in ruhenden T-Gedächtniszellen und Makrophagen eine Elimination des Virus aus dem Körper mit den vorhandenen Medikamenten unmöglich macht. Somit ist eine lebenslange Therapie erforderlich [25, 5]. Der beste Weg diese Probleme zu umgehen, wäre die Entwicklung eines Impfstoffes, der einen umfassenden und zuverlässigen Schutz gegen die verschiedenen HIV-Subtypen bietet. Obwohl die Entdeckung zweier breit neutralisierender Antikörper (bNAb - *broad neutralizing antibody*) im Jahr 2009 der Hoffnung auf einen HIV-Impfstoff neuen Auftrieb gegeben hat [94], konnten bisherige Entwicklungen diesem Anforderungsprofil bei Weitem nicht gerecht werden. Auf Grund der Wandlungsfähigkeit des Virus erscheinen die Chancen auf einen raschen Durchbruch auf diesem Gebiet gering [93]. Selbst wenn die Entwicklung eines Impfstoffes in absehbarer Zeit gelingen sollte, bedarf es weiterhin wirksamer Medikamente für die Millionen von bereits Infizierten.

## 1.4 Struktur des HIV-Hüllproteins und Eintritt in die Wirtszelle

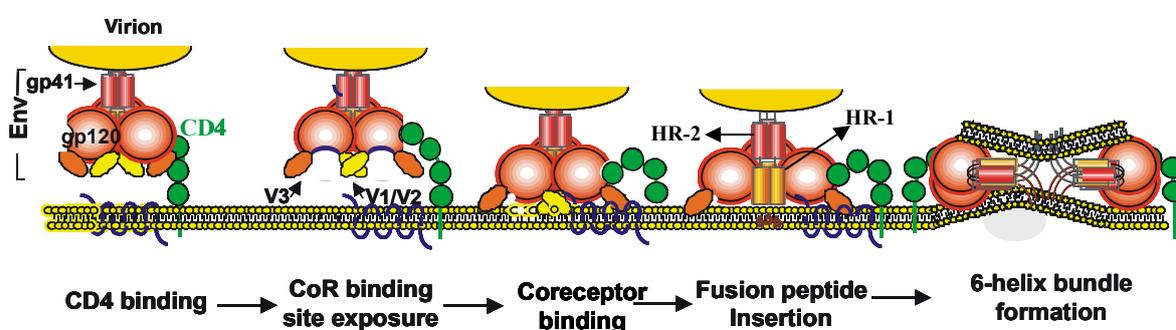
Um eine Zelle infizieren zu können, muss das HI-Virus zuerst deren Plasmamembran überwinden. Diese Funktion wird von dem viralen Hüllprotein (*envelope-protein*) übernommen. Das 160 kDa schwere Glykoprotein wird im Golgi-Apparat durch eine zelluläre Protease in die transmembranäre Untereinheit (Gp41) und die extrazelluläre Untereinheit (Gp120) gespalten. Die beiden Untereinheiten bleiben nichtkovalent miteinander verbunden. Jeweils drei dieser Gp120-Gp41-Komplexe bilden zusammen eines der durchschnittlich 8-15 in jeder Virusmembran verankerten Hüllprotein-Spikes [105]. Das Gp41 wird wiederum in vier funktionelle Untereinheiten eingeteilt: Am C-Terminus liegt die Transmembrandomäne. Sie ist für die Verankerung des Gp41 in der Virusmembran verantwortlich. Es folgen die zwei *heptad repeats* (HR1 und HR2), die durch ein sich wiederholendes Muster aus sieben Aminosäuren charakterisiert sind. Das glycinreiche Fusionspeptid bildet den hydrophoben N-Terminus des Proteins [99, 7]. Vergleichende Sequenzanalysen verschiedener HIV-1, HIV-2 und SIV-Stämme zeigen, dass das Gp120 in fünf hoch variable (V1-V5) und sechs konservierte Regionen (C1-C6) unterteilt werden kann (Abb. 1B) [83, 62]. Die funktionell wichtigen und daher konservierten Regionen des Gp120 liegen überwiegend im Kern des Hüllproteins verborgen. Die variablen Regionen bilden oberflächenexponierte Schleifen. Sie sind stark glykolisiert und damit ausreichend vor einer Antikörperbildung geschützt [100]. Der konservierte Gp120 Kern besteht wiederum aus einer inneren und einer äußeren Domäne, die über eine Brücke (*bridging sheet*) miteinander verbunden sind. Diese *bridging sheet* wird von der V1- und V2-Schleife, sowie der C4-Region ( $\beta 3$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 21$ ,  $\beta 20$ ) gebildet (Abb. 2) [48].



**Abbildung 2): Struktur des Gp120 Kerns gebunden an CD4** (aus [48], modifiziert). Orientierung: Proximal liegt die Virusmembran, distal die Wirtszellmembran. Die innere Domäne bildet den linken und die äußere Domäne den rechten Teil des Gp120 Kerns. Die beiden Domänen sind unten links über die *bridging sheet* verbunden.  $\alpha$ -Helices sind rot dargestellt,  $\beta$ -Faltblätter lachsfarben. Die Verbindungen sind grau eingezeichnet, mit Ausnahme der nicht dargestellten V4-Schleife (gestrichelte Linie). Copyright © Nature License Number: 3767750947162

Der Viruseintritt in die Zelle wird durch die Bindung des Gp120 an das überwiegend auf T-Lymphozyten und Makrophagen exprimierte CD4 eingeleitet. CD4 bindet sowohl an die Übergangsstelle zwischen äußerer und innerer Domäne als auch an die *bridging sheet* [48]. Dabei wird eine von hochkonservierten Aminosäuren ausgekleidete Tasche erzeugt. Entscheidend für die Bindung ist das Phenylalanin an Position 43 des CD4. Es ist die einzige Aminosäure, die direkt in die Tasche bindet und dadurch 23 % der gesamten Kontaktfläche bildet [57]. Aus diesem Grund wird die Tasche als *Phe-43-Cavity* bezeichnet. Im Zuge der Anlagerung des CD4 an das Hüllprotein kommt es in jedem Gp120 Monomer zu weitreichenden Konformationsänderungen [55]. Wie genau diese Konformationsänderungen über die innere Domäne des Gp120 an das Gp41 weitergegeben werden, ist Gegenstand aktueller Forschungen. Es gibt jedoch eindeutige Hinweise auf ein funktionelles Zusammenspiel der beiden Untereinheiten [22]. Im Endeffekt führen diese Umlagerungen zur Freilegung der bisher verborgenen Korezeptorbindungsstellen und zur Aktivierung des Gp41 [101]. Bei primären HIV-1-Isolaten dienen die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 als Korezeptor [20, 24]. Je nach

Wahl des Korezeptors werden die HI-Viren in R5-, X4- oder R5/X4-trope Stämme eingeteilt [4]. R5-trope Viren spielen vor allem bei der Virusübertragung von Mensch zu Mensch eine große Rolle. Im späteren Krankheitsverlauf kommt es bei circa 50 % der Infizierten zum Auftreten X4-troper Virusstämme. Dies deutet meist auf ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium hin [13]. Als Bindungsstelle für den Korezeptor dient die Basis der V3-Region sowie die *bridging sheet* [48]. Die Korezeptorwahl wird maßgeblich von der Spitze der V3-Region bestimmt [14, 42]. Bereits der Austausch einer Aminosäure in dieser Region kann zu einem Wechsel des Korezeptortropismus führen [43]. Die Bindung des Korezeptors verringert zusätzlich die Distanz zwischen Virus- und Zellmembran und ermöglicht dem freigelegten, hydrophoben Fusionspeptid, sich in der Zellmembran zu verankern [8, 21]. Dieser instabile Zustand, bei dem Gp41 mit beiden Membranen in Kontakt steht, wird als *prehairpin intermediate* bezeichnet. Zwischen den Membranen liegen nun die n- und c-terminalen *heptad repeats* (HR-1 und HR-2), die über eine flexible Cysteinschleife miteinander verbunden sind. Im nächsten Schritt falten sich die HR1 zurück auf die HR2 und bilden zusammen das sogenannte *six-helix bundle* [99]. In dieser Konformation werden die beiden Membranen einander so weit angenähert, dass es zu einer Vermischung der Lipidschichten kommt. Durch die dabei entstehende Pore kann das Viruskapsid in die Zelle eingeschleust werden [29].



**Abbildung 3: Eintrittsmechanismus des HIV-1** (aus [64], modifiziert). Abgebildet sind die in 1.4 erläuterten Phasen des Viruseintritts mit (1) der Anlagerung des CD4 an die Hüllproteinuntereinheit Gp120, (2) der Exposition der Korezeptorbindungsstelle, (3) der Bindung der Korezeptoren, (4) dem Einfügen des Fusionspeptids (HR-1 und HR-2) in die Wirtszellmembran und (5) der Bildung des *six-helix bundle*. **Abkürzungen:** **env:** envelope, **CoR:** coreceptor, **V1-3:** variable region 1-3, **HR:** heptad repeat Copyright © 2003, The National Academy of Sciences

## 1.5 Entry-Inhibitoren

Gemeinsames Charakteristikum aller Entry-Inhibitoren ist die vorteilhafte Eigenschaft, das Virus schon außerhalb der Zelle anzugreifen. Somit wird das Problem anderer HIV-Medikamente, hohe intrazelluläre Wirkstoffspiegel erzielen zu müssen, umgangen [104]. Dem Viruseintritt in die Wirtszelle gehen umfangreiche Umlagerungen in dem viralen Hüllprotein voraus. Diese führen zur Exposition hochkonservierter Domänen, welche ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung der Entry-Inhibitoren darstellen. Die Gruppe der Entry-Inhibitoren wird in drei Klassen unterteilt: Fusions-Inhibitoren, Korezeptor-Antagonisten und Attachment-Inhibitoren [72].

Der Fusions-Inhibitor T-20 (Fuzeon<sup>TM</sup>, Enfuvirtide) war lange Zeit der einzige Entry-Inhibitor, der klinisch angewandt wurde [60]. T-20 besteht aus einem 36 Aminosäuren langen, synthetischen Peptid, welches die Struktur des C-terminalen *heptad repeats* (HR-2) imitiert. Durch die Bindung an HR-1 kann es die Bildung des *six-helix bundle* und damit den Viruseintritt blockieren [98]. Verschiedene Studien belegen auch eine gute *in vivo* Wirksamkeit des Fusions-Inhibitors [49, 51]. T-20 und das davon abgeleitete aber nie für die klinische Anwendung zugelassene T-1249 müssen auf Grund ihrer Peptidstruktur zweimal täglich subkutan verabreicht werden [28]. Diese aufwändige Verabreichungsform und die hohen Herstellungskosten führten dazu, dass sich T-20 bisher nur als Reservemedikament etablieren konnte. Zur Anwendung kommt es vorwiegend bei bestehenden Resistenzen oder Unverträglichkeiten gegenüber anderen Medikamenten [90].

Die zweite Gruppe unter den Entry-Inhibitoren bilden die Korezeptor-Antagonisten. Sie sind wiederum unterteilt in CCR5- und CXCR4-Antagonisten. Der Wirkstoff TAK-779 war einer der ersten selektiven CCR5-Antagonisten [1]. Da jedoch die parenterale Verabreichung an der Injektionsstelle zu Irritationen führte, wurde die weitere klinische Erprobung eingestellt [69]. Aus einer ganzen Reihe weiterer neu entwickelter Wirkstoffe gelangten mit Vicriviroc, Aplaviroc und Maraviroc drei CCR5-Antagonisten in fortgeschrittene Stadien der klinischen Erprobung am Menschen. Vicriviroc (SCH-D) ist ein nicht-peptidischer, selektiver CCR5-Antagonist, der durch die Bindung in die transmembrane Tasche des CCR5 eine Interaktion mit Gp120 verhindert [91]. Auf Grund der geringen Molekülgröße kann Vicriviroc oral verabreicht werden. In zwei Phase-III-Studien (VICTOR-E3 und VICTOR-E4) blieb die Wirkung bei bereits vorbehandelten Patienten hinter den hohen Erwartungen zurück. Der Antrag auf Zulassung wurde deshalb zunächst zurückgestellt, weitere klinische Studien werden aber fortgesetzt. Die Entwicklung von Aplaviroc musste nach der Entdeckung einer erhöhten Lebertoxizität des Wirkstoffes [66] eingestellt werden. Somit ist Maraviroc (Celsentri<sup>TM</sup>) bis dato der

einzig für die Behandlung von Patienten zugelassene CCR5-Antagonist [23]. AMD3100 war einer der ersten CXCR4-Korezeptor-Antagonisten, der eine hohe antivirale Potenz *in vitro* und *in vivo* nachweisen konnte [18]. Seine weitere Entwicklung wurde jedoch nach dem Auftreten kardiotoxischer Nebenwirkungen in einer Phase-Ia/IIb-Studie gestoppt [38]. Mit SDF-1 $\alpha$  konnte ein natürlicher Ligand des CXCR4-Rezeptors identifiziert werden, der in Hämatopoese, Gehirnentwicklung und Herzfunktion eine wichtige Rolle zu spielen scheint [86,106]. Zukünftige CXCR4-Antagonisten stehen vor der schwierigen Aufgabe, eine effiziente Blockade des Viruseintrittes zu gewährleisten, ohne dabei die natürliche Funktion des Rezeptors zu blockieren.

Die dritte Gruppe wird von den Attachment-Inhibitoren gebildet. Sie blockieren die Bindung zwischen CD4 und Gp120 und die daran anschließenden Umlagerungsprozesse im Hüllprotein. Der Attachment-Inhibitor BMS-806 (früher BMS-378806) gehört mit einem Molekulargewicht von 406,5 g/mol zu den niedermolekularen HIV-1 Inhibitoren [53]. Die im Jahr 2003 erstmals beschriebene Struktur (Abb. 4C) des 4-Methoxy-7-Azaindol-Derivats ermöglicht eine gute orale Bioverfügbarkeit [96]. BMS-806 bindet an Gp120 unabhängig von dessen Korezeptortropismus [33] und zeigt mit einer mittleren IC<sub>50</sub> von 12 nM eine gute Wirksamkeit gegen eine Reihe von primären HIV-1 Subtyp B Isolaten [53]. SIV, HIV-2 und einige HIV-1 Subtyp C Stämme können durch BMS-806 nicht inhibiert werden, da ihre Hüllproteine von Natur aus resistenzvermittelnde Mutationen aufweisen [65]. Die Bindungsstelle des BMS-806 am Hüllprotein und der genaue Wirkmechanismus des Inhibitors sind umstritten. Einigkeit besteht in der Annahme, dass BMS-806 an das Hüllprotein Gp120 bindet, und zwar vor dessen Kontakt mit CD4. Ein Teil der Publikationen vertritt die These, dass BMS-806 mit CD4 um dieselbe Bindungsstelle in der *Phe-53-Cavity* konkurriert [33, 53]. Die Ergebnisse einer aktuellen *molecular-docking*-Studie stützen diese Vermutung [45]. Im Widerspruch dazu steht die These, dass BMS-806 nur die Konformationsänderungen, die durch die Bindung des CD4 hervorgerufen werden, blockiert, und nicht dessen Bindung an sich [85, 81]. Einige *in vitro* erzeugte Mutationen in HIV-1-Viren vom Subtyp B, die zu einer verminderten Sensitivität gegenüber BMS-806 führten, lieferten schon früh erste Hinweise auf die Lokalisation der Bindungsstelle [53]. Diesem Ansatz folgend konnten weitere resistenzvermittelnde Aminosäuren identifiziert werden. Sie sind um die *Phe-43-Cavity* und die daran angrenzenden Strukturen gruppiert [57]. BMS-806 inhibiert den CD4-Bindungsprozess und damit den initialen Schritt des Viruseintritts. Es muss daher schon vor dem Kontakt zwischen Virus und Zelle an das Virushüllprotein gebunden sein. Der komplizierte Aufbau des Gp120 mit seinen 5 variablen Schleifen (V1-5) und seinem hohen Grad an Glykolisierung machten die zweifelsfreie Identifizierung der BMS-806-Bindungsstelle bisher jedoch unmöglich. Neue Untersuchungen über

die Struktur des ungebundenen SIV Gp120 führten zu der Entdeckung einer von 10 Aminosäuren gebildeten hydrophoben Tasche [9] (Abb. 4B). Diese hydrophobe Tasche existiert nur im ungebundenen Hüllprotein. Weite Teile der Aminosäuresequenz von SIV Gp120 stimmen mit denen des HIV-1 Gp120 überein (35% identisch, >70% Homologie). Daher war es durch einen Vergleich der beiden Sequenzen möglich, die Aminosäuren zu ermitteln, welche die hydrophobe Tasche im HIV-1 Gp120 bilden (Abb. 4A). Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass es sich nicht um dieselben Aminosäuren handelt, welche die *Phe-53-Cavity* bilden. Hingegen besteht eine große Übereinstimmung zwischen den Aminosäuren, deren Mutation zu einer Resistenzbildung gegenüber BMS-806 führt [57] und denen, welche die hydrophobe Tasche im ungebundenen HIV-1 Gp120 auskleiden. Deshalb gilt die hydrophobe Tasche in HIV-1 als die potenzielle Bindungsstelle für BMS-806 und andere Entry-Inhibitoren.

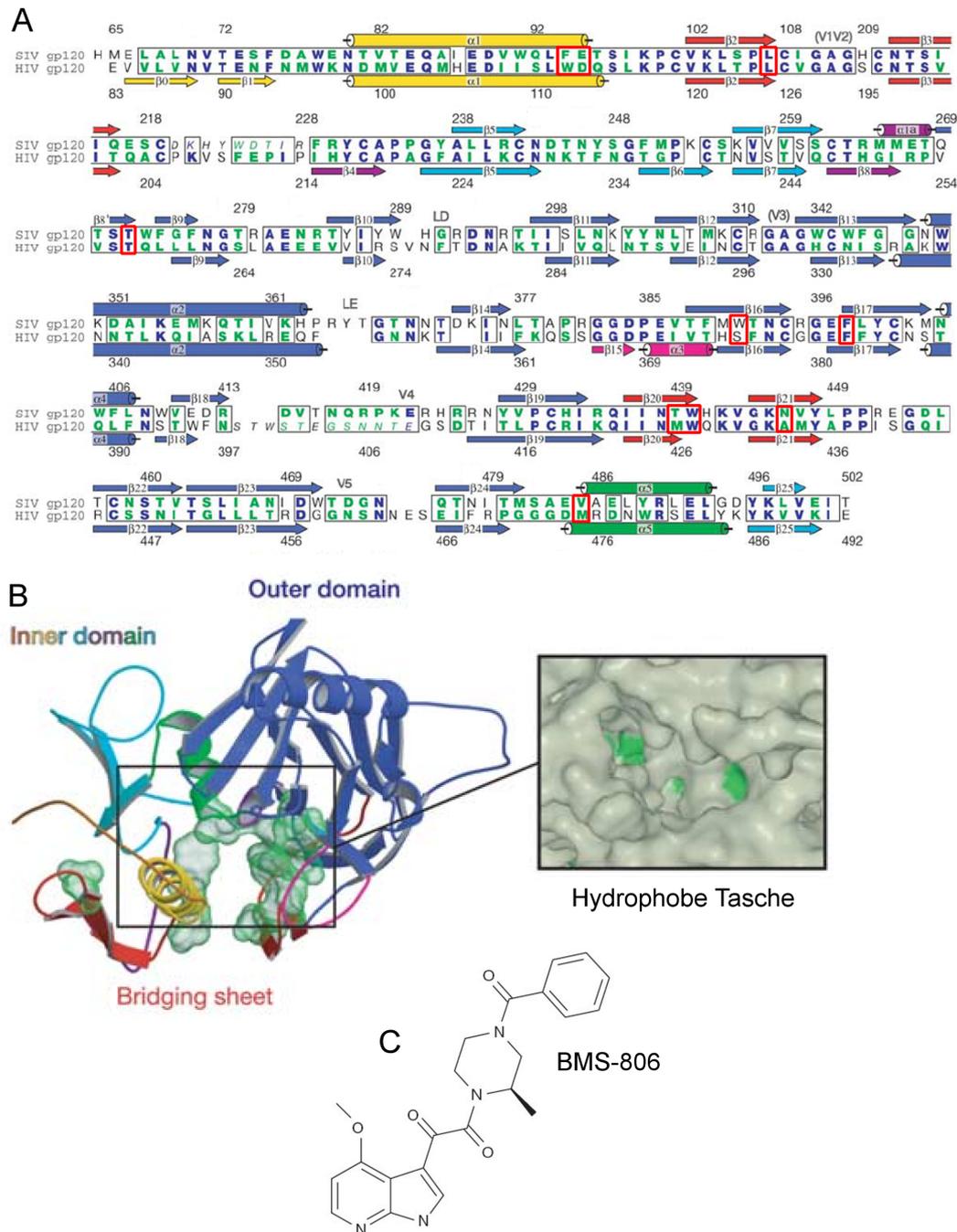


Abbildung 4: (A) Vergleich der Aminosäuresequenz von HIV-1 HXBc2 und SIVmac32 im Bereich des Gp120 (aus [9], modifiziert). Blaue Aminosäuren (AS) sind identisch, grüne sind homolog substituiert. Kursiv geschriebene AS sind delokalisiert. Die zehn AS der hydrophoben Tasche sind rot umrahmt. Die Sekundärstrukturen beider Proteine werden durch Pfeile ( $\beta$ -Faltblätter) und Zylinder ( $\alpha$ -Helices) verdeutlicht. (B) Struktur des ungebundenen HIV-1 Gp120 Kerns mit hydrophober Tasche (aus [9]). Farbgebung: Äußere Domäne: blau; Innere Domäne ist entsprechend ihren Untereinheiten gefärbt (entspricht der Farbgebung in 4A); *Bridging sheet*: rot. Bekannte, gegenüber BMS-806 resistenzvermittelnde AS der hydrophoben Tasche sind grün hervorgehoben. (C) Chemische Struktur des BMS-806 (aus [103]). Copyright © Abb. 4 (A) und (B) Nature License Number: 3767781316142 und Abb. 4 (C) Biopharmaceutics and Drug Disposition, License Number: 3767790410285

## 1.6 Fragestellung

Auf Grund seines komplexen Aufbaus und seines hohen Grades an Glykolisierung konnte die Struktur des ungebundenen HIV-1 Hüllproteins Gp120 noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Kristallstrukturanalysen des ungebundenen SIV Gp120 zeigten eine bisher unbekannte hydrophobe Tasche im SIV Hüllprotein [9]. Diese, nur im ungebundenen Zustand existierende Tasche, wird von zehn Aminosäuren ausgekleidet. Mittels eines Sequenzvergleichs war es möglich, die korrespondierenden Aminosäuren des Gp120 im HIV-1 zu ermitteln. Es besteht eine große Übereinstimmung zu einer Reihe von Aminosäuren, deren Mutation bei HIV-1 zur Resistenzbildung gegenüber dem neuentwickelten Attachment-Inhibitor BMS-806 führt [57]. Die genaue Bindungsstelle dieses niedermolekularen HIV-1 Inhibitors ist noch umstritten. Welche Bedeutung diese zehn Aminosäuren und die hydrophobe Tasche für das HI-Virus besitzen, ist weitgehend unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, welchen Einfluss die zehn Aminosäuren im Hüllprotein des HIV-1 auf die Infektiosität, die Replikationsfähigkeit sowie die Sensitivität gegenüber BMS-806 und anderen Entry-Inhibitoren haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Eukaryote Zelllinien

#### Suspensionszelllinien

- PBMC: (engl.: *peripheral blood mononuclear cell*) periphere Blutmonozyten, abgeleitet aus peripherem Blut vom Menschen (*homo sapiens*)

#### Adhärente Zelllinien

- 293T: Humane Nierenepithelzellen, die mit Adenovirus Typ 5 transformiert wurden und das SV40 (*simian virus 40*) large T-Antigen exprimieren (DuBridge et al., 1987)
- TZM-bl: HeLa-Zelllinie, die CD4, CCR5 und CXCR4 exprimiert. Sie verfügt über Luciferase und  $\beta$ -Galaktosidase Gene, die unter Kontrolle des HIV-1 Promotors stehen
- U373-CCR5-/CXCR4-Zellen: Humane Glioblastomzellen, die das Gen für humane CD4 sowie das Gen für  $\beta$ -Galaktosidase unter Kontrolle des HIV-1-Promotors enthalten. Sie wurden stabil mit einem Expressionsvektor für CCR5 bzw. CXCR4 transfiziert (Labrosse et al., 1998)

### 2.2 Bakterien

***Escherichia coli* XL2-Blue<sup>TM</sup>**: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]* (Bullock et al., 1987) (Stratagene; Heidelberg)

## 2.3 Nukleinsäuren

### Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden von biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen:

1	5'NL43NdeI	5'-GATGCTAAGCATATGATACAGAGG-3'
2	3'NL43StuI	5'-GGATACCTTTGGACAGGCCTGTGTA-3'
3	5'NL43StuI	5'-GTCATTACACCAAAGG-3'
4	3'NL43NheI	5'-GCAAAATGGACCACTT-3'
5	5'NL43NheI	5'-GCAAAATGGAATGCCACTT-3'
6	3'NL43BamHI	5'-GCTCCGCAGATCCCAG-3'
7	3'NL43W112Alef	5'-CCTTAGGCTTTGATCAGCTAAACTG-3'
8	5'NL43W112Arig	5'-CAGTTTAGCTGATCAAAGCCTAAAG-3'
9	3'NL43D113Alef	5'-GCTTTAGGCTTTGAGCCATAAAC-3'
10	5'NL43D113Arig	5'-GTTTATGGGCTCAAAGCCTAAAGC-3'
11	3'NL43L125Alef	5'-CTTTAAACTAACACAAGCTGGGGTT-3'
12	5'NL43L125Arig	5'-AACCCCAGCTTGTGTTAGTTTAAA-3'
13	3'NL43T257Alef	5'-CAGCAGTTGAGCTGATACTACTG-3'
14	5'NL43T257Arig	5'-CAGTAGTATCAGCTCACCTGCTG-3'
15	3'NL43S375Alef	5'-CCTCAATTAAGCGTGCGTTAC-3'
16	5'NL43S375Arig	5'-GTAACGCACGCTTTTAATTGTGGAGG-3'
17	3'NL43F382Alef	5'-GAATTACAGTAGAAAGCTTCCCCTCC-3'
18	5'NL43F382Arig	5'-GGAGGGGAAGCTTTCTACTGTAATTC-3'
19	3'NL43M426Alef	5'-CCTACTTCCTGCCAAGCGTTTATAA-3'
20	5'NL43M426Arig	5'-TTATAACGCTTGGCAGGAAGTAGG-3'
21	3'NL43W427Alef	5'-TCCTACTTCCTGAGCCATGTTTAT-3'
22	5'NL43W427Arig	5'-ATAAACATGGCTCAGGAAGTAGGA-3'
23	3'NL43A433Llef	5'-GAGGGGCATACATTAGTTTTCTAC-3'
24	5'NL43A433Lrig	5'-GTAGGAAAATAATGTATGCCCTC-3'
25	3'NL43M475Alef	5'-GGAGGAGGCGATGCTAGGGACAATTG-3'
26	5'NL43M475Arig	5'-GGAGGAGGCGATGCTAGGGACAATTG-3'

## Plasmide

Alle verwendeten Plasmide enthalten das Ampicillinresistenzgen zur Selektion in Bakterienstämmen.

- PCR2.1-TOPO-TA-Vektor: Vektor zum Klonieren der PCR-Fragmenten von Invitrogen (Karlsruhe)
- pBR NL4-3: Modifizierter pBR322-Vektor, der das gesamte provirale Genom des pathogenen HIV-1 pNL4-3 Klon (SuptypB, X4-trop) enthält
- pBR-NL4-3 005pf135: Modifizierter pBR NL4-3-Vektor, dessen V3-Loop gegen einen CCR5-tropen V3-Loop aus einem primärem Isolat ausgetauscht wurde [?]
- pCAGGS-NL4-3env: pCAGGS-Variante, in die direkt aus NL4-3 über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI das env-Gen kloniert wurde

## Längenstandard

“1-kb-Leiter” Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)

## Nukleotide für die Polymerase-Ketten-Reaktion

dNTPs für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

## 2.4 Enzyme

### Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (Schwalbach, Traunstein) bezogen und in den von den Herstellern empfohlenen Puffersystemen verwendet.

### Sonstige Enzyme

Taq-DNA-Polymerase	Stratagene Europe AG (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
RNAse A aus Rinderpankreas	Boehringer (Mannheim)
Trypsin aus Rinderpankreas	Stratagene Europe AG (Heidelberg)
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Boehringer (Mannheim)

## 2.5 Reagenzien und Laborhilfsmittel

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dTTP	Amersham-Buchler (Braunschweig)
Agarose	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (München)
Ampicillin	Bayer (Leverkusen)
Dithiothreitol (DTT)	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma (München)
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Sigma (München)
Ficoll-Paque	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure	Serva (Heidelberg)
Hygromycin B	Roche (Mannheim)
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Merck (Darmstadt)
Interleukin-2 (IL-2)	Sigma (München)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kleenex	Kimberley-Clark (Koblenz)
L-Glutamin	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
LiChrosolv- $\text{H}_2\text{O}$	Merck (Darmstadt)
Magermilchpulver, 1% Fett	Nestlé (Frankfurt)
Natriumazid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (München)
Hybond ECL Nitrozellulose-Membranen	Amersham Pharmacia (Freiburg)
NuPAGE® Novex Bis-Tris Gele	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
NuPAGE® Reducing Agent	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Oligo (dT) <sub>12-18</sub>	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Penicillin G	Sigma (München)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck (Darmstadt)
Phosphat-Buffered-Saline (PBS)	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Phytohämagglutinin (PHA)	Murex (Burgwedel)
Poly A	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Röntgenfilme	Kodak (Stuttgart)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (München)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
Whatman Papier	Whatman (Maidstone, Kent; England)

## 2.6 Inhibitoren

T-20	IPF Pharmaceuticals
T-1249	IPF Pharmaceuticals
BMS-806	DAIDS, NIAID
AMD3100	DAIDS, NIAID
TAK-779	DAIDS, NIAID
SCH-D690	DAIDS, NIAID

## 2.7 Reagenzsysteme (Kits)

GeneClean® II Kit	Dianova (Hamburg)
HIV-1 p24 Kapsid-Antigen-ELISA	AIDS Repository (Frederick, MD; USA)
TA Cloning® Kit	Invitrogen (Breda; Niederlande)
Takara DNA Ligationskit	Boehringer Ingelheim (Heidelberg)
Wizard <sup>TM</sup> Plus Midipreps	Promega (Madison, WI; USA)
NuPAGE® Novex Bis-tris-Gele für Western-Blot	Invitrogen (Karlsruhe)
Tropix-Gal Screen® system	Applied Biosystems (USA)
Ultra Clean <sup>TM</sup> 15	MOBIO Laboratories INC. (USA)

## 2.8 Medien

### Zellkulturmedien

- Adhärente Zellen: DMEM (Invitrogen/Gibco; Karlsruhe) mit 350 µg/ml L-Glutamin, 120 µg/ml Streptomycinsulfat, 120 µg/ml Penicillin und 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FKS.
- Suspensionszellen: RPMI-1640 Medium (Invitrogen/Gibco; Karlsruhe) mit 350 µg/ml L-Glutamin, 120 µg/ml Streptomycinsulfat, 120 µg/ml Penicillin und 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FKS.

### Bakterienkulturmedien

- LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 8 g/l NaCl, 1 g/l Glukose; Zugabe von 100 mg/l Ampizillin vor Gebrauch. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt.
- LBAMP Agar: 15 g/l Agar und 100 mg/l Ampicillin in LB-Medium

- 
- SOC-Medium: 20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 2,5 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose

## 2.9 Lösungen und Puffer

### Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Resuspensionspuffer (P1), Lysispuffer (P2), Neutralisationspuffer (P3) (Qiagen, Hilden), 70% EtOH, 90% Isopropanol, LiChrosolv-H<sub>2</sub>O.

### Calcium-Phosphat-Transfektion

- 2xHBS: (10xStock): 8,18 % NaCl (w/v); 5,94 % HEPES (w/v); 0,2 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (w/v). Die Lösung wurde sterilfiltriert und der pH-Wert mit 1M NaOH auf 7,12 eingestellt.
- 2M CaCl<sub>2</sub>

### HIV p24 Kapsid-Antigen-ELISA

- Lösung zur Lyse der Viruspartikel: 10 ml Triton X-100 (Sigma, München), ad 100 ml H<sub>2</sub>O
- Waschpuffer: 25 ml 20\* Waschkonzentrat (KPL, Maryland), ad 500 ml mQ-H<sub>2</sub>O
- Probenpuffer: 89,8 ml RPMI-1640, 10 ml 10 % BSA diluent (KPL; Maryland), 200 µl Tween 20 (Sigma; München)
- Lösung für den 1. Antikörper: 10 % FKS and 2 % Normal Mouse Serum (NMS) (Sigma, München) in RPMI- 1640
- Lösung für den 2. Antikörper: 2 % Normal Mouse Serum (NMS) (Sigma, München), 5 % Normal Goat Serum (NGS) (Gibco/BRL, Eggenstein), 0,01 % Tween 20 in RPMI-1640
- Substrat: TMB Peroxidase Substrat System (KPL, Maryland)
- Stopplösung: 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## Western-Blot

- RIPA-I-Puffer: 1 % Triton X-100 (v/v), 0,15 M NaCl, 50 mM Tris HCl (pH 7,4), 5 mM EDTA, 1 mM PMSF
- Kathoden Puffer: 12,5 ml 2 M Tris, 3,24 g 6-Aminocaproic Säure, 200 ml Methanol, mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.
- Anoden Puffer I: 15 ml 2 M Tris, 200 ml Methanol, mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.
- Anoden Puffer II: 150 ml 2 M Tris, 200 ml Methanol, mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.
- Blockpuffer: PBS<sub>o</sub> mit 0,4 % Tween 20 (v/v) und 5 % Magermilchpulver (w/v);
- Antikörperpuffer: PBS<sub>o</sub> mit 0,05 % Tween 20 (v/v) und 5 % Magermilchpulver (w/v);
- ECL-Detektion: Lösung A (Luminol) mit 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) und 1 % Lösung B (*Enhancer*), Gemisch lichtempfindlich;

## Reverse Transkriptase-Test

- RT-Arbeitslösung (für 200 ml): 10 ml 1M Tris-Lösung, pH 7,8; 5 ml 3 M KCl-Lösung; 4 ml 0,1 M Dithiothreitol-Lösung; 6,6 ml 0,15 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung; 10 ml 100 µg/ml poly-A-Lösung; 10ml 31,5 µg/ml oligo-dT-Lösung; 200 µl 10 µCi/ml α<sup>32</sup>-P-dTTP-Lösung; 5 ml 2 % NP40-Lösung; 149,2 ml ddH<sub>2</sub>O;
- 20xSSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat.

## Sonstige Lösungen und Puffer

- PBS: 137 mM NaCl; 7,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,47 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 2 mM MgCl<sub>2</sub>
- PBS<sub>o</sub>: PBS ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>;
- 50x TAE-Puffer: 500 mM Tris, 250 mM Natriumacetat, 50 mM Na<sub>2</sub>EDTA.

## 2.10 Antikörper für die Western-Blots

HIV-1 Gp120 Rabbit Antiserum	Advanced Biotechnologies; USA
Rabbit anti-HIV-1 p24	AIDS Repository; Fredrick; USA
Phosphatase konjugierte Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch; USA

## 2.11 DNA-Methoden

### Standard-Methoden

Folgende Methoden wurden nach Protokollen von Maniatis *et al.*, 1989, durchgeführt:

- Isolierung von Plasmid-DNA nach alkalischer Lyse der Bakterien
- Ethanol- und Isopropanolfällung der DNA
- Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Auftrennen von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese
- Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

### Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA für Klonierungen wurde durch alkalische Lyse von Bakterien und anschließende Isolierung und Reinigung der DNA gewonnen (Maniatis *et al.*, 1989). Für Sequenzierreaktionen oder die Transfektion eukaryoter Zellen wurden die Präparationen mit dem Wizard<sup>TM</sup> Plus Midipreps Kit (Promega; Madison, WI, USA) oder dem QIAwell 8 Minipräp Kit (Qiagen; Hilden) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die DNA-Konzentrationen wurden in einem Spektralphotometer (Eppendorf) bestimmt.

### Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, unter Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und die DNA-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit dem GeneClean® II Kit (Dianova, Hamburg) entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert.

**Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)** Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (PTC-100<sup>TM</sup>, MJ Reserach) durchgeführt mit den PCR-Reagenzien von Promega (USA). Die gewünschten Punktmutationen im Bereich des externen Glykoproteins (Gp120) wurden mittels SOE-PCR erzeugt.

### PCR zum Einfügen einer Punktmutation

Folgende Einstellungen wurden gewählt: (1) Initiale Denaturierung: 94°C für 2 min; (2) Denaturierung: 94°C für 1 min; (3) Anlagerung: 50°C für 1 min; (4) Elongation: 72°C (1 min/kb); (5) Wiederholungen: 25; (6) Letzte Elongation: 72°C für 8 min; Zusammensetzung (bei 50 µl Gesamtmenge): H<sub>2</sub>O (37,5 µl), Puffer (5,0 µl), dNTPs (5,0 µl), Polymerase (0,5 µl), Primer 1 (1,0 µl), Primer 2 (1,0 µl), DNA-Vorlage (0,1 µl)

### PCR zur Fusion der beiden überlappenden PCR-Fragmente

Folgende Einstellungen wurden gewählt: (1) Initiale Denaturierung: 94°C für 2 min; (2) Denaturierung: 94°C für 1 min; (3) Anlagerung: 42°C für 1 min; (4) Elongation: 72°C (1 min/kb); (5) Wiederholungen: 10; (6) Denaturierung: 94°C für 1 min; (7) Anlagerung: 52°C für 1min; (8) Elongation 72°C (1 min/kb); (9) Wiederholungen: 20; (10) Letzte Elongation: 72°C für 8 min; Zusammensetzung (bei 50 µl Gesamtmenge): H<sub>2</sub>O (34,5 µl), Puffer (5,0 µl), dNTPs (5,0 µl), Polymerase (0,5 µl), Primer 1 (1,5 µl), Primer 2 (1,5 µl), DNA-Vorlage 1 (1,0 µl), DNA-Vorlage 2 (1,0 µl)

### Ligation von DNA

Ligationen wurden mit dem Takara DNA Ligationskit (Boehringer Ingelheim, Heidelberg) durchgeführt. Plasmid-DNA und Insert-DNA wurden im Verhältnis von 1 : 3 nach den Protokollen der Hersteller eingesetzt.

### DNA-Sequenzierung

Sequenzierreaktionen wurden kommerziell bei der Firma MWG-Biotech AG in Auftrag gegeben. 2 µg DNA wurden bei 58°C eingedampft und eingeschickt.

## 2.12 Bakterienkultur

Alle verwendeten Plasmide enthalten ein Ampicillin-Resistenzgen. Transformierte Bakterien wurden daher durch Zusatz von Ampicillin (100µg/ml) zum Kulturmedium selektioniert. Verwendet wurde der *Escherichia coli*-Stamm XL2<sup>TM</sup>-Blue. Die Kulturen wurden für mindestens 12h bei 37°C in LB<sub>amp</sub>-Flüssigmedium geschüttelt oder auf LB<sub>amp</sub>-Agar Platten inkubiert. Bakterienstocks wurden durch Vermischen von 500µl Bakterienkultur mit 500µl Glycerin erstellt und bei -80°C eingefroren.

## Transformation von *Escherichia coli* XL2<sup>TM</sup>-Blue

Nach dem Auftauen der kompetenten Zellen auf Eis wurden 3 µl des Ligationsansatzes zu jeweils 12 µl der kompetenten Zellen zugegeben. Im Anschluss wurden die Bakterien für 20 min auf Eis, für 30 sec bei 42°C im Wasserbad und für weitere 2 min 30 sec auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 200 µl SOC-Medium und einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Bakteriensuspension auf LB<sub>amp</sub>-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

## 2.13 Zellkultur

### Kultur adhärenter Zellen

Die adhärenenten Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in DMEM mit 1 % L-Glutamin (Gibco; Karlsruhe), 1 % Penicillin-Streptomycin (Gibco; Karlsruhe) sowie 10 % Hitze-inaktiviertem FKS (Gibco; Karlsruhe) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 bis 1:20 gesplittet.

### Kultur von Suspensionszellen

Die Suspensionszellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in RPMI-1640 mit 1 % L-Glutamin (Gibco; Karlsruhe), 1 % Penicillin-Streptomycin (Gibco; Karlsruhe) sowie 10 % Hitze-inaktiviertem FKS (Gibco; Karlsruhe) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 bis 1:20 gesplittet.

### Isolierung primärer Blutlymphozyten aus Buffy coat

Zur Isolierung primärer Blutlymphozyten (PBL „*primary blood lymphocyte*“ oder PBMC „*peripheral blood mononuclear cells*“) wurde Buffy Coat (Lymphozytenkonzentrat aus 500 ml Vollblut) von der Blutspendenzentrale Ulm bezogen und 1:3 in PBS<sub>o</sub> verdünnt. Anschließend wurde das verdünnte Buffy Coat über 20 ml Ficoll (Biochrome) geschichtet und über Dichtegradientenzentrifugation für 45 min bei 1700 rpm aufgetrennt. Die angereicherten Lymphozyten wurden aus der Interphase abgenommen und dreimal in PBS<sub>o</sub> gewaschen (5 min, 1200 rpm, 20°C). Anschließend wurden sie in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in RPMI-1640 mit 1 % L-Glutamin (Gibco; Karlsruhe), 1 % Penicillin-Streptomycin (Gibco; Karlsruhe) und 10 % Hitze-inaktiviertem FKS (Gibco; Karlsruhe) aufgenommen, und mit 3 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA) und 10 ng/ml Interleukin stimuliert. 2-3 Tage nach Stimulation wurden sie in 96-Well-Platten ausgesät, und mit den entsprechenden Virusstämmen infiziert.

## 2.14 Herstellung von HIV-1 Gp120-Mutanten

Die HIV NL4-3 Gp120 Mutanten wurden mittels *splice overlap extension* (SOE)-PCR hergestellt. Als Template dienten molekulare Klone des pBR-NL43-Plasmids. In ersten Standard-PCR-Reaktionen wurde mit den spezifischen 5'Primern bzw. 3'Primern und dem jeweils entsprechenden, die gewünschte Punktmutation tragenden Primern zwei Fragmente erzeugt, die sich im Bereich der Mutation überlappten. Die Produkte aus diesen PCR-Reaktionen wurden über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt, die DNA aus dem Gel isoliert und die jeweils zueinander gehörenden PCR-Fragmente als Template in einer zweiten PCR mit den zugehörigen spezifischen Primern amplifiziert. Dieses Amplikon wurde wiederum aufgereinigt und über Standardmethode laut Hersteller in den pCR2.1-TOPO-TA Vektor kloniert. Mittels Sequenzierung aller Produkte konnte die gewünschte Mutation nachgewiesen und unerwünschte Mutationen ausgeschlossen werden. Danach erfolgte die Umklonierung der Gp120 Mutanten über die entsprechenden Schnittstellen in das Provirus pBR-NL4-3 sowie später in die Vektoren pBR-NL4-3 005pf135(R5) und pCAGGS-NL4-3env. Da die zu verändernden Aminosäuren weiträumig über den env-Bereich verteilt sind, kamen verschiedene spezifische Primerpaare bzw. Restriktionsenzyme (NdeI, StuI, NheI, BamHI) zum Einsatz.

Primerpaar	Mutation
5'NL43NdeI und 3'NL43StuI	W112A, D113A, L125A
5'NL43StuI und 3'NL43NheI	T257A
5'NL43NheI und 3'NL43BamHI	S375A, M426A, W427A, A433L, M475A

## 2.15 Herstellung von Viren

### Kalzium-Phosphat-Transfektion von 293T-Zellen

Die Transfektion der 293T-Zellen wurde nach der Kalzium-Phosphat-Präzipitat-Methode durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 %igen CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion zu 50-75 % konfluent. Für die DNA-Arbeitslösung wurden 5 µg DNA mit 13 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde tropfenweise zu 100 µl 2xHBS zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur bildete sich ein milchiges Präzipitat. Der Transfektionscocktail wurde auf das Medium der Zellkulturen getropft und die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium (DMEM: 10 % FKS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin) erneuert. 48 h nach der Transfektion wurden die Überstände

abgenommen und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Die aliquotierten Virusstämme wurden bei -80°C eingefroren.

### **HIV p24 Kapsid Antigen-ELISA**

Die Konzentration viralen Antigens in Virusüberständen wurde mittels HIV p24 Kapsid-Antigen-ELISA (AIDS Repository; Frederick, MD; USA) bestimmt. Das durch Lyse mit Triton X-100 freigesetzte HIV-Kapsidprotein p24 bindet an einen monoklonalen Maus-Antikörper. Ungebundenes Material wurde durch Waschen entfernt. Die Quantifizierung des Kapsidproteins erfolgte durch die sogenannte „sandwich“-ELISA-Methode. Zuerst wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen zugegeben, der an das Kapsidprotein p24 bindet. Der gebundene Antikörper wurde mit Anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziegen, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist, inkubiert. Durch Zugabe des Substrates (TMB) kommt es zu einer Farbänderung der Lösung. Die Reaktion wurde durch 4 N Schwefelsäure gestoppt. Die Quantifizierung des gefärbten Produktes erfolgt bei den Wellenlängen 450 nm und 650 nm. Die gemessene Farbkonzentration ist proportional zu der Menge an Kapsidprotein und wird in ng/ml p24 angegeben. Um Messwerte zu erhalten, die im linearen Bereich des Messsystems liegen, wurden die lysierten Proben 1:100 und 1:500 mit Probenpuffer verdünnt.

## **2.16 Bestimmung der viralen Infektiosität, Sensitivität und Replikation**

Für die gesamte Versuchsreihe wurden TZM-bl Zellen verwendet. Diese Zellreihe exprimiert stabil CD4, CXCR4 und CCR5.

### **Infektion**

Je 5000 TZM-bl Zellen pro Well wurden in 96-Well-Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die verschiedenen Virusstämme mit DMEM auf 1 bzw. 5 ng p24 Antigen in 100µl Gesamtvolumen normalisiert und diese anschließend auf die Zellkulturen übertragen. Zwei Tage nach der Infektion wurde die virale Infektiosität mittels eines  $\beta$ -Galactosidase-Tests bestimmt.

### **Sensitivitätstests gegenüber Inhibitoren**

Je 5000 TZM-bl Zellen pro Well wurden in 96-Well-Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in Triplets

mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren AMD3100, BMS-806, SCH-D, T-20, T-1249, TAK-779 versetzt und mit den gleichen Mengen HIV NL4-3 Gp120 Mutanten und WT-Virus infiziert. Zuvor wurden die Viruskonzentrationen mittels der Ergebnisse der p24-Antigen Messung (ELISA) angeglichen. Zur Kontrollmessung wurden die Zellen auch in Abwesenheit der Inhibitoren infiziert. Zwei Tage nach der Infektion wurde die virale Infektiosität durch den  $\beta$ -Gal-Assay) bestimmt. Zur Berechnung der relativen viralen Infektiosität wurde die  $\beta$ -Gal Aktivität (RLU) für jede Inhibitorkonzentration durch die  $\beta$ -Gal Aktivität in Abwesenheit von Inhibitoren dividiert. Die Inhibitorkonzentration, bei der eine 50 % Hemmung der Virusaktivität ( $IC_{50}$ ) vorlag, wurde mittels des Softwareprogramms GraphPad Prism 5 berechnet.

### **$\beta$ -Galactosidase-Test**

TZM-bl-Zellen exprimieren CD4, CCR5 und CXCR4 und enthalten das Gen für  $\beta$ -Galaktosidase unter Kontrolle der HIV-1-LTR. Nach der Virusinfektion kommt es zu einer Tat vermittelten Expression von  $\beta$ -Galaktosidase, die sich durch Lumineszenzmessung nachweisen lässt. Um die Veränderung der Infektiosität bei den verschiedenen HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten bzw. die Auswirkungen der eingefügten Mutationen auf die Sensitivität der Viruspartikel gegenüber verschiedenen Inhibitoren zu untersuchen, wurden die Zellen einen Tag nach Aussaat mit den Virusstämmen (1 bis 5 ng p24-Antigen) in einem konstanten Volumen infiziert und für 48 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen in 40  $\mu$ l einer 1:1  $\beta$ -Gal-Screen/PBS-Lösung aufgenommen. Nach 60 min Inkubation bei 37°C wurden 35  $\mu$ l in Lumistripes überführt und anschließend im Chiron<sup>TM</sup>-Luminometer vermessen.

### **Reverse Transkriptase Test**

Die Reverse Transkriptase verfügt über vier enzymatische Aktivitäten: Sie kann als RNaseH, RNA-Endonuklease, DNA-abhängige DNA-Polymerase und RNA-abhängige DNA-Polymerase aktiv sein. Ihre Aktivität als RNA-abhängige DNA-Polymerase wird im RT-Test als Maß für die virale Replikation quantifiziert. Dazu wurden die Zellen ausgesät, am nächsten Tag mit einer definierten Menge an viralem Antigen infiziert und danach wie beschrieben kultiviert. Im Abstand von drei Tagen wurde Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren. Um das Replikationsvermögen der einzelnen Virusmutanten zu untersuchen, wurde zu 6  $\mu$ l Kulturüberstand 25  $\mu$ l RT-Arbeitslösung gegeben und dies für 2h bei 37°C inkubiert. Die Komponenten des RT-Mix haben folgende Funktionen: SDS und NP-40 schließen das Virus-Kapsid auf. Die polyA-Stränge dienen der RT als Matrize, während die Desoxythimidin-Oligomere die Primer für die

reverse Transkription bilden. Stabilisiert durch zweiwertige Ionen, nutzt die RT nun die radioaktiv markierten dTTPs zur Synthese des komplementären DNA-Stranges. Nach der Reaktion wurden 6 µl des Reaktionsgemisches auf Whatman Filterpapier aufgetropft und für 10-20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Je nach Radioaktivität auf den Filtern wurden diese 3-5-mal mit 2xSSC-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift sollte in der SSC-Lösung keine Radioaktivität nachweisbar sein. Danach wurden die Filter zweimal für 1min in 96 % Ethanol gewaschen und für 1 h bei 60°C getrocknet. Die Aktivitäten der Proben wurden mit Hilfe eines Phospho-Imagers (BAS2000, Fuji Photo Film Co., Ltd.; Japan) ermittelt und mit Hilfe der Computerprogramme Basread, Aida und Excel ausgewertet.

## **2.17 Nachweis viraler Proteine durch Western Blot Analyse**

### **Herstellung der Zelllysate**

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden in 6-Well-Platten mit 5 µg proviraler DNA transfizierte 293T-Zellen verwendet. Zur Gewinnung einer Positivkontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit HIV-1 NL4-3 WT transfiziert, als Negativkontrolle dienten untransfizierte 293T-Zellen. Drei Tage nach der Transfektion wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen jeweils mit 1ml PBS vom Boden gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese Zellen wurden für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, und der Überstand abpipettiert. Zu den Zellpellets in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde jeweils 150 µl RIPA I Puffer hinzugegeben und bei 4°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei -20°C gelagert.

### **Herstellung der Viruslysate**

Die Virusstämme wurden für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Viruskonzentrationen der verschiedenen Proben wurden durch die entsprechende Hinzugabe von DMEM auf 200 ng p24 angeglichen. Danach wurden die Proben für 5 h bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgezogen. Zu den verbleibenden Viruspellets wurde jeweils 60 µl RIPA I Puffer hinzugegeben (pro ml 20 µl PMSF) und die Proben über Nacht bei -20°C aufbewahrt.

## Western-Blot

Jeweils 6  $\mu\text{l}$  der Virus- und Zelllysate wurden mit 7,5  $\mu\text{l}$  Tris-Glycine Sample Buffer und 1,5  $\mu\text{l}$  NuPAGE® Reducing Agent gemäß den Herstellerangaben gemischt. Anschließend wurden die Proben für 2 min auf 85°C erhitzt. Jeweils 15  $\mu\text{l}$  der Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze auf ein NuPAGE Novex Bis-Tris Polyacrylamidgels aufgetragen und mit Hilfe einer XCell SureLock Mini-Cell Elektrophoresekammer aufgetrennt (Invitrogen). Nach dem Prinzip des Semi-Dry-Blots wurden die aufgetrennten Proteine dann mit einem Trans-Blot SD Gerät (BioRad, USA) auf Nitrozellulosemembran übertragen. Diese wurden über Nacht in einer 5 % Milchlösung leicht geschwenkt und am nächsten Morgen 3-mal mit 10 ml PBS/Tween für 10 min gewaschen. Anschließend wurde der für das zu detektierende Protein spezifische Antikörper entsprechend den Herstellerangaben zugesetzt und die Membran für eine weitere Stunde geschwenkt, bevor die ungebundenen Antikörper in drei Waschschrritten a 5 min mit PBS/Tween entfernt wurden. Durch Inkubation der Membran für 1 h mit einem spezifisch an den ersten Antikörper bindenden zweiten Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase markiert war (KPL), wurden nach weiteren drei Waschschrritten die Proteine durch Zugabe von BCIP/NBT Substrat (KPL, USA) in einer enzymatischen Reaktion direkt auf der Membran nachgewiesen.

## 2.18 Zellfusions-Test

Je  $5 \cdot 10^5$  293T-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und am zweiten Tag mit den unterschiedlichen pCAGGS-NL4-3env und SIV-TAT Expressionsplasmiden kotransfiziert. Ebenfalls am zweiten Tag wurden die TZM-bl Zellen in 96-Well-Platten ( $10^4$  Zellen pro 100  $\mu\text{l}$ ) ausgesät. TZM-bl-Zellen exprimieren CD4, CCR5 und CXCR4 und enthalten das Gen für  $\beta$ -Galaktosidase unter Kontrolle der HIV-1-LTR. Am Morgen des dritten Tages wurde das Medium der 293T Zellen erneuert. Zehn Stunden später wurden die transfizierten 293T-Zellen vorsichtig aus den 6-Well-Platten gelöst und jeweils  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen zu den TZM-bl in 96-Well-Platten gegeben. Bei erfolgreicher Zellfusion kommt es zu einer Tat-vermittelten Expression von  $\beta$ -Galaktosidase, die sich durch Lumineszenz-Messung nachweisen lässt. Am sechsten Tag wurden das alte Medium vollständig aus den 96-Well-Platten entfernt und die Zellen in 40  $\mu\text{l}$  einer 1:1  $\beta$ -Gal-Screen/PBS-Lösung aufgenommen. Nach 60 min Inkubation bei 37°C wurden 35  $\mu\text{l}$  in Lumistripes überführt und anschließend im Chiron™-Luminometer vermessen.

## 2.19 Computerprogramme und Datenquellen

Die HIV-Sequenzen wurden von folgender Seite bezogen: <http://www.hiv.lanl.gov>

Für die Auswertung von Aminosäure- und DNA-Sequenzen wurden folgende Programme benutzt:

- Sequenz-Alignment Programm MultAlin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/>)
- Sequence Reverse Complementor (<http://molbiol.virtualave.net/revcomp.html>)
- Expasy-Tool (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>)
- Gene Construction Kit V2.0
- Chromas Version 1.62
- GraphPad Prism 5 zur Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte und die statistische Analyse

## 2.20 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Dreifachmessungen dargestellt, berechnet mit Excel und Prism.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Funktionelle Analyse der hydrophoben Tasche im ungebundenen HIV-1 NL4-3 Gp120

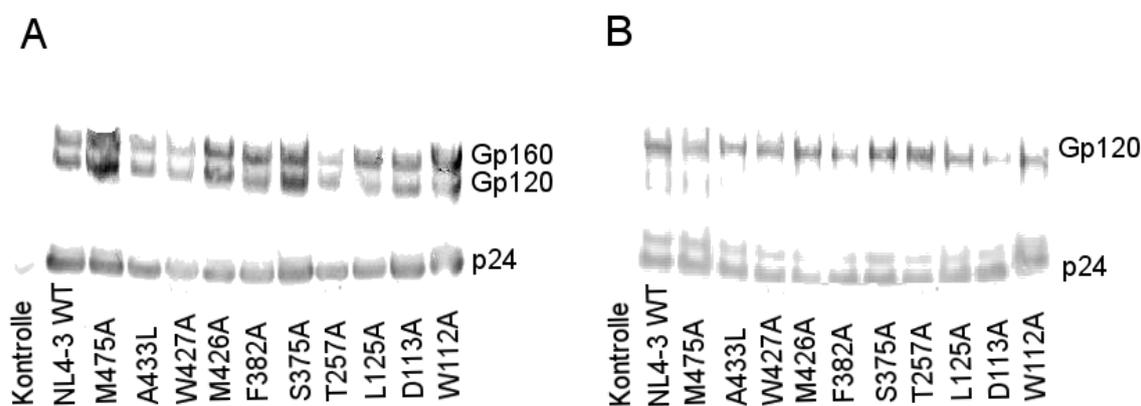
Die hydrophobe Tasche im ungebundenen Hüllprotein Gp120 des HIV-1 [9] wird von zehn hochkonservierten Aminosäuren begrenzt. Um ihre Bedeutung im Rahmen der viralen Replikation und Pathogenese zu analysieren, wurde mittels SOE-PCR jeweils eine dieser zehn Aminosäuren in Alanin umgewandelt. Das an Position 433 bereits vorhandene Alanin wurde durch Leucin ersetzt. Das Erzeugen unerwünschter Mutationen, verursacht durch die geringe Lese-Schreib-Genauigkeit der Taq-DNA-Polymerase, konnte unter Zuhilfenahme einer anschließenden Kontrollsequenzierung ausgeschlossen werden. Eine Übersicht über alle eingefügten Mutationen ist in Abb. 5 dargestellt. Nach ihrer Fertigstellung wurden die PCR-Produkte in die proviralen Plasmide pBR-NL4-3 (X4-trop) und pBR-NL4-3 005pf135 (R5-trop) sowie in das Expressionsplasmid pCAGGS-NL4-3env kloniert. Die Konzentration der damit jeweils erzeugten Virusstämme wurde mittels p24-Kapsid-Antigenmessung (ELISA) bestimmt. Somit konnten die folgenden Experimente mit einer angeglichenen Viruskonzentration und in einem konstanten Volumen durchgeführt werden. Die Vektoren und die damit erzeugten Virusstämme konnten anschließend dafür verwendet werden, die Expression des Hüllproteins sowie Replikation, Infektiosität und Korezeptortropismus der Mutationsträger zu untersuchen.

	113	125	257	375	382	425 427	433	475
<b>NL4-3 WT</b>	I <b>SLW</b> DQSL//LT <b>P</b> L <b>C</b> V//VV <b>S</b> T <b>Q</b> LL//V <b>T</b> H <b>S</b> F <b>N</b> C <b>G</b> G <b>E</b> <b>F</b> F <b>Y</b> C//F <b>I</b> <b>M</b> <b>W</b> Q <b>E</b> V <b>G</b> K <b>A</b> <b>M</b> <b>Y</b> A//GG <b>D</b> <b>M</b> RD <b>N</b>							
<b>W112A</b>	---A---//-----//-----//-----//-----//-----//-----//-----							
<b>D113A</b>	---A---//-----//-----//-----//-----//-----//-----//-----							
<b>L125A</b>	-----//---A---//-----//-----//-----//-----//-----//-----							
<b>T257A</b>	-----//-----//---A---//-----//-----//-----//-----//-----							
<b>S375A</b>	-----//-----//-----//---A---//-----//-----//-----//-----							
<b>F382A</b>	-----//-----//-----//-----//---A---//-----//-----//-----							
<b>M426A</b>	-----//-----//-----//-----//-----//---A---//-----//-----							
<b>W427A</b>	-----//-----//-----//-----//-----//-----//---A---//-----							
<b>A433L</b>	-----//-----//-----//-----//-----//-----//-----//---L---//-----							
<b>M475A</b>	-----//-----//-----//-----//-----//-----//-----//-----//---A---							

**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz im HIV-1 NL4-3 Gp120 (Wild-Typ) und der erzeugten Mutationen.** Die zehn Aminosäuren, die in der Tertiärstruktur des ungebundenen Hüllproteins die hydrophobe Tasche bilden, sind hervorgehoben (oberste Zeile). Die Nummerierung der Aminosäuren basiert auf der Nummerierung für die HIV-1 HXB2 Envelope-Sequenz in der Los Alamos Datenbank. „//“ ersetzt einen längeren identischen Sequenzabschnitt. „-“ bezeichnet dieselbe Aminosäuresequenz. Die erste Spalte zeigt eine Übersicht der erzeugten Mutanten des HIV-1 (NL4-3).

### 3.1.1 Expression und Prozessierung des Hüllproteins der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten

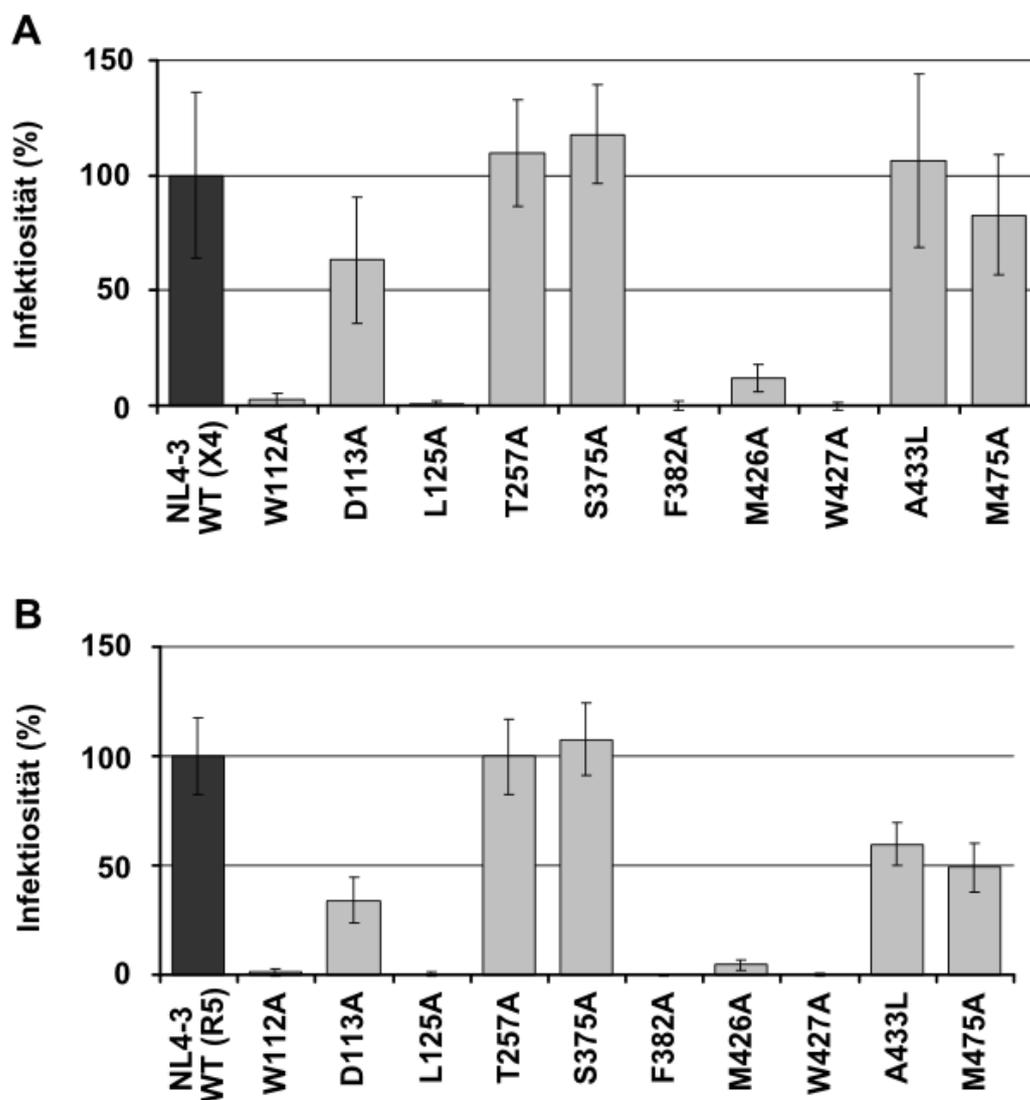
Um den Effekt der eingefügten Mutationen auf die Expression und die Prozessierung der veränderten Hüllproteine zu bestimmen, wurde das Lysat transfizierter Zellen sowie das Lysat der Viruspartikel unter Anwendung des Western Blot Verfahren untersucht. Der Nachweis des p24 Antigens fungierte als Positivkontrolle für Virusprotein in den Proben. Das Hüllprotein wurde mittels HIV-1 Gp120 Rabbit Antiserum nachgewiesen. Wie die Abb. 6A und 6B zeigen, konnte sowohl p24- als auch Gp120 in allen Proben nachgewiesen werden. Die Doppelbande in den Zellysatsproben entsteht durch die zusätzliche Bindung des Gp120 Antikörpers an das ungespaltene Vorläuferprotein Gp160. Die Analyse der aufgetrennten Zellysate ließ keine Unterschiede zwischen dem NL4-3 WT und den Gp120 Mutanten bei der Expression der Hüllproteine erkennen. Ebenso ergaben sich aus den aufgetrennten Viruslysaten keine Hinweise auf eine Störung der posttranslatorischen Prozessierung. Das lässt darauf schließen, dass die eingefügten Mutationen keinen Einfluss auf die Expression und Prozessierung des Hüllproteins haben.



**Abbildung 6: Expression und Prozessierung des Hüllproteins der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten.** Zur Überprüfung der viralen Genexpression und der posttranslatorischen Prozessierung der veränderten Hüllproteine wurden (6A) die Zellysate bzw. (6B) die zellfreien Überstände von transfizierten 293T Zellen zentrifugiert. Anschließend wurden die Virus- sowie die Zellysate-Pellets nach Auftrennung mittels Western Blot Verfahren mit Antikörpern gegen das Hüllprotein Gp120 und den Kapselbaustein p24 inkubiert. Zum Vergleich wurde jeweils eine NL4-3 Wildtyp Probe mituntersucht. Die Ergebnisse konnten in einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt werden.

### 3.1.2 Infektiosität der HIV-1 NL4-3 (X4) und HIV-1 NL4-3 005pf135 (R5) Mutanten in TZM-bl-Zellen

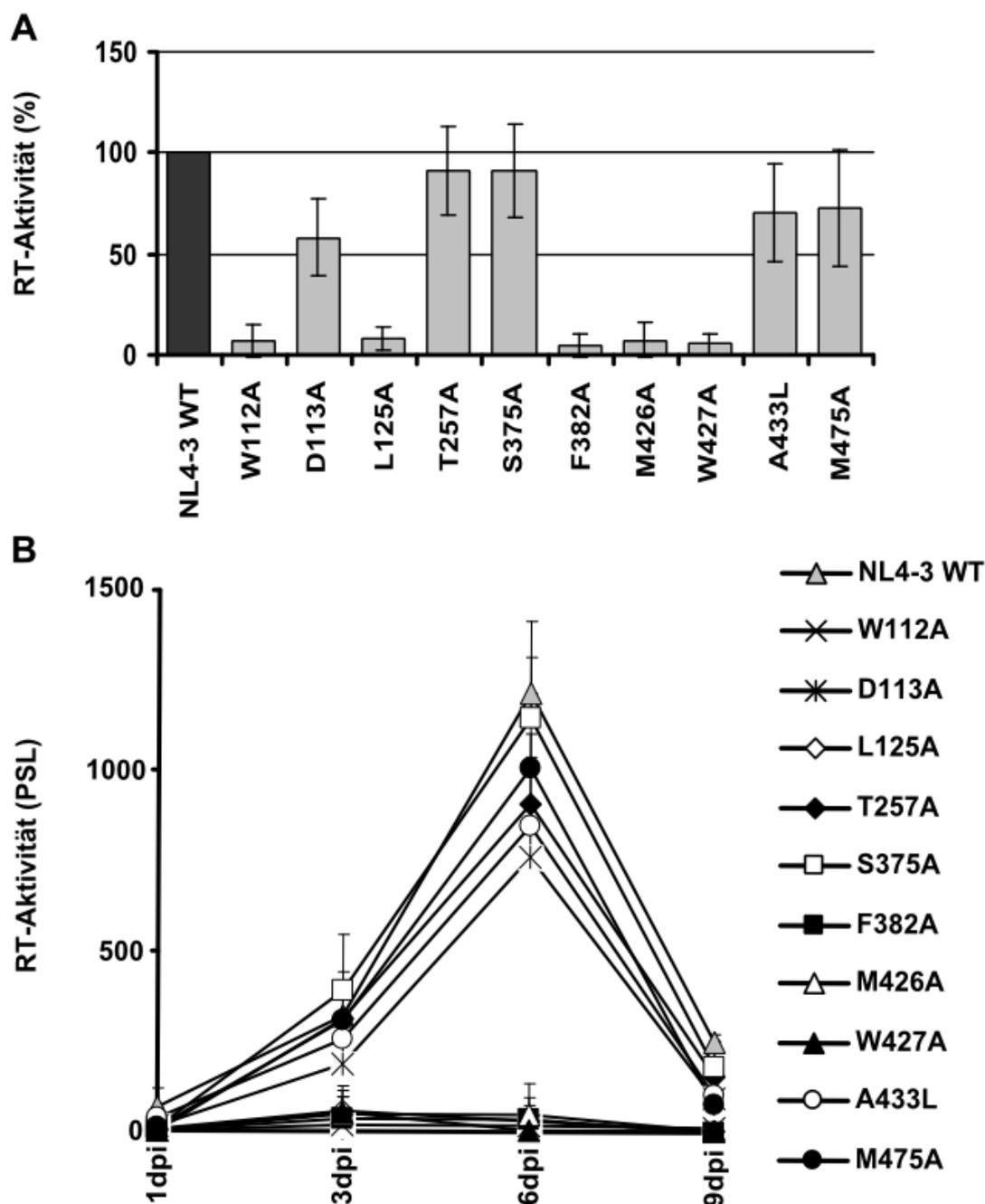
Für die Infektion einer Wirtszelle benötigt das HI-Virus ein funktionelles Hüllprotein. Der Austausch einer der hochkonservierten Aminosäuren in der hydrophoben Tasche könnte die Infektiosität des Virus beeinflussen. Zur Überprüfung der Infektiosität wurden TZM-bl-Zellen mit den zehn Gp120 Mutanten sowie dem NL4-3 WT infiziert. Um auszuschließen, dass ein Wechsel des Korezeptortropismus die Infektiosität der Gp120 Mutanten beeinflusst, wurden auch die entsprechenden R5-tropen HIV-1 NL4-3 005pf135 Mutanten getestet. Da TZM-bl-Zellen neben CD4 und CXCR4 ebenfalls CCR5 exprimieren, konnten sie in beiden Versuchsreihen verwendet werden. In den mit HIV-1 infizierten Reporterzellen kommt es zu einer Tat vermittelten Expression der  $\beta$ -Galaktosidase, die sich mit einer Lumineszenz-Messung quantifizieren lässt. Durch den Vergleich der NL4-3 WT Werte mit denen der Gp120 Mutanten konnte die relative Infektiosität der Viren ermittelt werden. Diese war bei den X4-tropen Mutationen T257A, S375A, A433L und M475A mit dem NL4-3 WT vergleichbar. Die Mutante D112A verfügte über eine leicht reduzierte Infektiosität. Die anderen fünf Gp120 Mutanten besaßen keine (W112A, L125A, F382A, W427A) bzw. eine deutlich herabgesetzte (M426A) Infektiosität. Bei den R5-tropen Virusstämmen führten die Mutationen W112A, L125A, F382A und W427A zu einem vollständigen Verlust der Infektiosität, während die Mutationen T257A und S375A keinen negativen Einfluss hatten. Die Mutanten D113A, A433L und M475A zeigten im Vergleich zum NL4-3 WT und zu ihren CXCR4-tropen Mutanten eine nur leichte Minderung der Infektiosität, wohingegen die Infektiosität des Mutanten M426A erneut stark reduziert war. Somit wird, unabhängig vom Korezeptortropismus, nur der Austausch von sechs der zehn Aminosäuren in der hydrophoben Tasche toleriert. Die vier anderen sind essenziell für den Viruseintritt.



**Abbildung 7: Infektiosität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten in TZM-bl-Zellen.** Abb. 7A zeigt die Infektiosität der X4-tropen Stämme, Abb. 7B zeigt die Infektiosität der R5-tropen Stämme. Die TZM-bl-Zellen wurden in 3-fach Ansätzen mit 2 verschiedenen Virusstämmen infiziert (n=3). Die verwendeten Virusstämme enthielten die 1 bzw. 5 ng p24. Als Maß für die virale Infektiosität wurde 3 Tage nach Infektion die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Zelllysaten ermittelt. Die durchschnittliche  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität  $\pm$  Standardabweichung ist in% der NL4-3 WT Infektiosität angegeben. **Abkürzungen:** p24: Virus-Kapselbaustein WT: wildtype

### 3.1.3 Replikation der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten

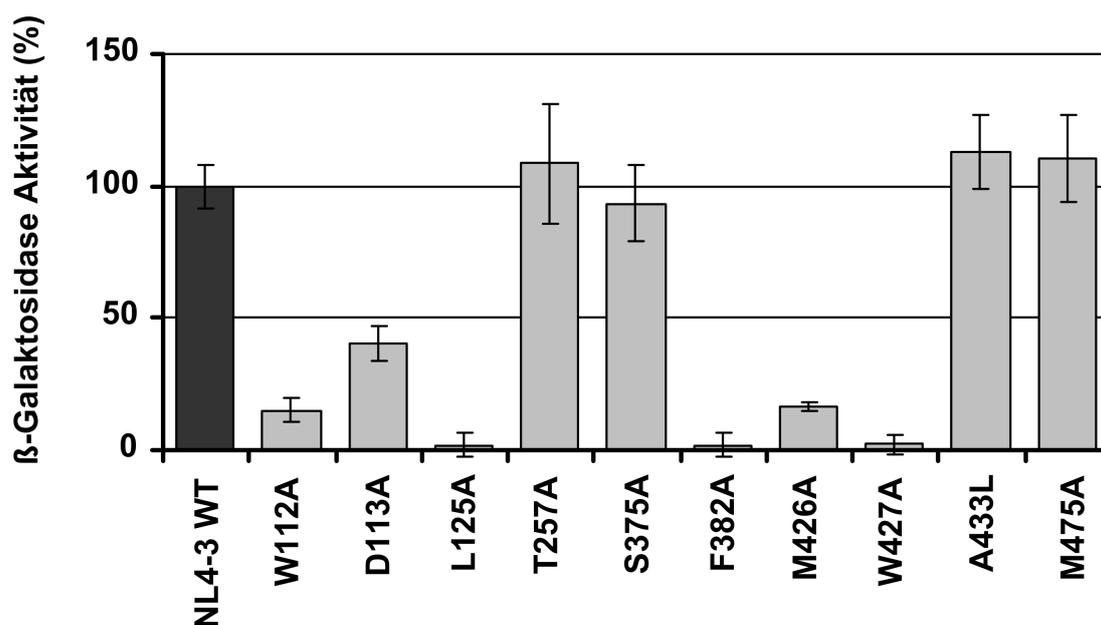
Das Ziel dieses Versuches war, den Einfluss der in das Hüllprotein eingeführten Mutationen auf das Replikationsverhalten des Virus zu untersuchen. Dazu wurden stimulierte humane PBMC's jeweils mit 0,4 bzw. 2 ng Virus infiziert. Alle drei Tage wurden die Überstände abgenommen. Anschließend konnte die jeweilige Replikationsrate durch Bestimmung der Reverse Transkriptase in den Virionen ermittelt werden. Die in Abb. 8A dargestellte kumulative Reverse Transkriptase Aktivität zeigt deutlich, dass fünf der Gp120 Mutanten (W112A, L125A, F382, M426, W427A) nicht zu einer effektiven Replikation befähigt waren. Die Mutanten T257A und S375A besaßen eine dem NL4-3 WT vergleichbare kumulative Reverse Transkriptase-Aktivität, wohingegen bei den Mutanten D113A, A433L und M475A eine signifikante Reduktion der Replikationsrate nachweisbar war. Sowohl die mutationstragenden Virenstämme als auch das NL4-3 WT Virus hatten nach sechs Tagen ihre maximale Replikationsrate erreicht. Sie fiel danach auf Grund des Mangels an weiteren infizierbaren Zellen rasch wieder ab. Zusammengefasst zeigen die Daten der Replikationsexperimente, dass von den insgesamt zehn untersuchten Gp120 Mutanten fünf (W112A, L125A, F382A, M426A, W427A) nicht zur Replikation fähig sind. Die anderen fünf in dem Experiment untersuchten Mutanten (D113A, T257A, S375A, A443L, M475A) zeigen eine dem NL4-3 WT vergleichbare bzw. leicht verminderte Replikationsrate. Damit bestätigen die Replikationsexperimente die Ergebnisse der vorausgegangenen Infektiositätsstudien.



**Abbildung 8: Replikation der HIV-1 Gp120 NL4-3 Mutanten.** Stimulierte PBMC's (*peripheral blood mononuclear cells*) wurden mit 0,4 und 2 ng Virus infiziert und im Abstand von 3 Tagen Überstände abgenommen. Die Menge an im Überstand vorhandener Reverse Transkriptase diente als Maß für die virale Replikation. Die Ergebnisse errechneten sich aus dem Mittel von einem Experiment mit 2 unabhängigen Stocks sowie 2 PBMC-Spendern. **Abb. 8A** zeigt die kumulative RT-Aktivität in % der NL4-3 WT RT-Aktivität vom 3.-9. Tag  $\pm$  Standardabweichung. **Abb. 8B** zeigt die jeweilige RT-Aktivität im Verlauf der ersten 9 Tage. **Abkürzungen:** RT: Reverse Transkriptase, PSL: *photo stimulated light emission*; dpi: *days post infection*

### 3.1.4 Fusogenität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten

Die Fusion von Virus- und Zellmembran ist ein essenzieller Schritt bei der Infektion der Wirtszelle und wird von den eingelagerten Hüllproteinen Gp120 und Gp41 vermittelt. Dabei kommt es im Hüllprotein zu einer Reihe komplexer Umlagerungen. In dem folgenden Zell-Zell-Fusionstest wurde untersucht, welchen Einfluss die eingefügten Mutationen auf die Fusogenität des Hüllproteins haben. Die Ergebnisse (Abb. 9) zeigten, dass die Mutationen T257A, S375A, A433L und M475A die Fusogenität im Vergleich zum NL4-3 nicht beeinflussen. Die Fusogenität des Gp120 mit der Mutation D113A war um die Hälfte reduziert. Die vier nicht infektiösen Mutanten (W112A, L125A, F382A, W427A) waren inklusive des schwach infektiösen M426A Mutanten nicht fähig, eine effiziente Fusion zu vermitteln. Dieses Ergebnis steht auch in Übereinstimmung mit den Resultaten des Replikationstests.



**Abbildung 9: Fusogenität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten.** Für den Zell-Zell-Fusionstest wurden 293T-Zellen (*effector*-Zellen) mit den Expressionsplasmiden pCAGGS-NL4-3env (3 µg) und SIV-TAT (3 µg) kotransfiziert, wodurch die Zellen sowohl das regulatorische Protein Tat als auch die unterschiedlichen Gp120 Hüllproteine exprimierten. Nach 24h wurden je  $2,5 \cdot 10^4$  293T-Zellen in 96-Well Platten mit bereits ausgesäten TZM-bl Zellen überführt. Diese *target*-Zellen exprimierten stabil eine große Menge an CD4, CXCR4 und CCR5. Bildeten sich in den nächsten zwei Tagen Synzytien, führte dies zu einer Tat vermittelten Expression der β-Galaktosidase in den TZM-bl Zellen. Diese konnte mit einem β-Galaktosidase-Test quantitativ nachgewiesen werden. Die β-Galaktosidase-Aktivität (Durchschnitt von je 3 unabhängigen Transfektionen ± Standardabweichung) ist in % der NL4-3 WT-Aktivität angegeben.

### 3.1.5 Korezeptortropismus der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten

Der Korezeptortropismus des HI-Virus wird überwiegend von Struktur und Ladung der V3-Region des Gp120 bestimmt. Bereits der Austausch einer Aminosäure kann zu einem Korezeptorwechsel führen. Aber auch andere Anteile des Hüllproteins nehmen Einfluss, insbesondere die angrenzende V1/V2-Region. Deshalb wäre es möglich, dass das Einfügen der Mutationen in die eng benachbarte hydrophobe Tasche des Gp120 Einfluss auf den Korezeptortropismus nimmt. Aus diesem Grund wurden sowohl die X4-tropen HIV-1 NL4-3 Mutanten als auch die R5-tropen HIV-1 NL4-3 005pf135 Mutanten untersucht. Für diesen Versuch wurden die Zelllinien U373-CXCR4 und U373-CCR5 verwendet. Sie exprimieren CD4 und jeweils nur CXCR4 oder CCR5. Jede Zelllinie wurde mit beiden Stämmen (Mutanten und WT) infiziert und die Infektiosität mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Test bestimmt (Tab. 1). Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen deutlich, dass die X4-tropen Virusmutanten nur Zellen infizieren konnten, die auch CXCR4 exprimierten. Umgekehrt konnten die R5-tropen Virusmutanten nur die Zelllinie mit CCR5-Rezeptoren infizieren. Die Einführung der Mutation hat weder bei X4-tropen noch bei R5-tropen-Mutanten einen Einfluss auf den Korezeptortropismus.

**Tabelle 1: Infektiosität der HIV-1 NL4-3 Mutanten in U373-CXCR4- und U373-CCR5-Zellen.** Die Zellen wurden mit 1 und 5 ng in 3-fach Ansätzen und mit 2 verschiedenen Virusstämmen infiziert. Als Maß für die virale Infektiosität wurde 3 Tage nach der Infektion die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Zellysaten ermittelt. Die durchschnittlich gemessene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ist in % der NL4-3 WT-Infektiosität angegeben. **Abkürzungen:** HIV-1 NL4-3 (X4): X4-trope HI-Viren, HIV-1 NL4-3 005pf135 (R5): R5-trope HI-Viren, X4.15 Zellen: exprimieren den Korezeptor X4, R5.15 Zellen: exprimieren den Korezeptor R5

Mutation	HIV-1 NL4-3 (X4)		HIV-1 NL4-3 005pf135 (R5)	
	X4.15 Zellen	R5.15 Zellen	X4.15 Zellen	R5.15 Zellen
W112A	4±4	0	0	0±1
D113A	37±7	0	0	44±5
L125A	0±2	0	0	0±2
T257A	87±14	0	0	102±11
S375A	74±13	0	0	91±15
F382A	0±3	0	0	0±1
M426A	17±4	0	0	7±3
W427A	0±2	0	0	0±1
A433L	96±11	0	0	54±6
M475A	69±12	0	0	33±6
NL4-3 WT (X4)	100±14	0	100±14	0
NL4-3 WT (R5)	1±3	100±12	1±3	100±17

### 3.2 Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber Entry-Inhibitoren

In den folgenden Experimenten wurde die Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber verschiedenen HIV-1 Entry-Inhibitoren untersucht. Hierfür wurden nur diejenigen Gp120 Mutanten verwendet, welche in den vorangegangenen Experimenten eine ausreichende Infektiosität nachweisen konnten. Diese Voraussetzung wurde von folgenden Mutanten erfüllt: D113A, T257A, S375A, M426A, A433L und M475A. Als Referenz diente X4-trope NL4-3 WT bzw. R5-trope NL4-3 005pf135. Die Mutation M426A verfügte im Vergleich zum NL4-3 WT nur über eine stark reduzierte Infektiosität. Um auszuschließen, dass dies die Sensitivität gegenüber den Inhibitoren beeinflussen könnte, wurde auch eine “*WT-low*”-Variante untersucht. Die Konzentration des NL4-3 WT Virus wurde für diese Variante um 80 % verringert. Der Attachment-Inhibitor BMS-806 ist für die Sensibilitätsuntersuchung von besonderem Interesse, da seine Bindungsstelle in der hydrophoben Tasche des ungebundenen Gp120 vermutet wird. Die anderen untersuchten Entry-Inhibitoren binden entweder direkt an die transmembrane Untereinheit Gp41 (T-20, T1249) oder blockieren durch Bindung an den Korezeptor den Kontakt zur Korezeptorbindungsstelle (AMD3100, TAK-779, SCH-D). Da die hierbei beteiligten Strukturen alle in enger Nachbarschaft zur hydrophoben Tasche liegen, wurden auch diese Entry-Inhibitoren auf eine veränderte Wirksamkeit gegenüber den Gp120 Mutanten untersucht. In den vorangegangenen Infektiositätsstudien hatte das Einfügen einer Mutation in die hydrophobe Tasche keinen Einfluss auf den Korezeptortropismus. Daher wurden die beiden selektiven CCR5-Antagonisten TAK-779 und SCH-D nur mit R5-tropen Viren untersucht. Umgekehrt wurde der selektive CXCR4-Antagonist AMD3100 sowie T-20 und T1249 ausschließlich mit X4-tropen Viren getestet. Die Wirksamkeit von BMS-806 wurde sowohl mit X4- als auch mit R5-tropen Viren untersucht.

### 3.2.1 Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber dem Attachment-Inhibitor BMS-806

BMS-806 gehört zu den niedermolekularen HIV-1 Inhibitoren [53]. Die BMS-806-Bindungsstelle wird in der hydrophoben Tasche des ungebundenen Gp120 vermutet [33]. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die eingefügten Mutationen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber diesem Inhibitor haben [9]. NL4-3 WT zeigte mit einer durchschnittlichen  $IC_{50}$  von 1,4 nM eine hohe Sensitivität gegenüber BMS-806 [53]. Die *WT-low*-Variante stellte sich noch ein wenig empfindlicher dar und zeigte eine minimal nach links verschobene Sensitivitätskurve. Zwei Mutanten, M426A und S375A, besaßen eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber BMS-806. Im Gegensatz dazu bedurfte es bei den Mutationsträgern T257A und M475A einer stark erhöhten Wirkstoffkonzentration, um eine wirksame Einschränkung ihrer Infektiosität zu erreichen. Die beiden Mutanten D113A und A433L waren gegenüber BMS-806 mit einer  $IC_{50} > 100$  nM weitgehend resistent. Die Ergebnisse der X4- und R5-tropen Virusstämme standen im Einklang miteinander (Abb. 10A/B und Tab. 2). Somit hat das Einfügen der Mutationen in die hydrophobe Tasche des Gp120 einen großen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber BMS-806. Es kann die Sensitivität erhöhen (M426A, S375A), vermindern (T257A, M475A) oder sogar zur Bildung von Resistenzen führen (D113A, A433L).

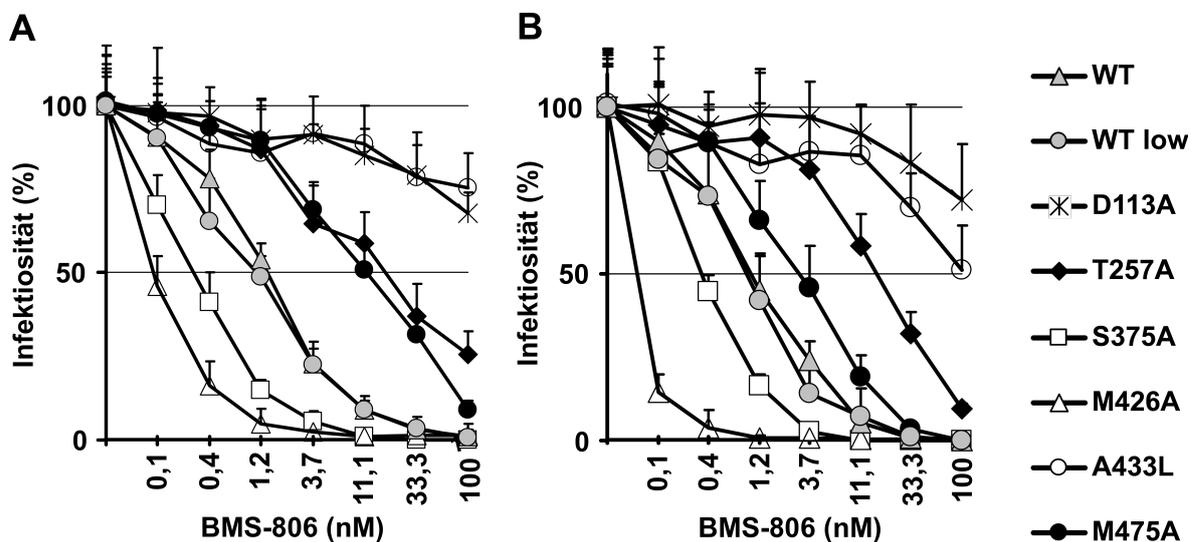


Abbildung 10: Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber dem Attachment-Inhibitor BMS-806. Abb. 10A zeigt die Sensitivität der X4-tropen Stämme, Abb. 10B zeigt die Sensitivität der R5-tropen Stämme. Die TZM-bl Zellen wurden in Gegenwart der beschriebenen Menge BMS-806 in 3-fach Ansätzen infiziert ( $n=3$ ). Die verwendeten Virusstämme enthielten 1 ng p24 (Viruskapselbaustein). Als Maß für die virale Infektiosität wurde 3 Tage nach Infektion die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Zellysaten ermittelt.

### 3.2.2 Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber den Fusions-Inhibitoren T-20 und T1249

Die beiden Fusions-Inhibitoren T-20 und T1249 bestehen jeweils aus einem synthetischen Peptid, das die Struktur des C-terminalen *heptad repeats* (HR-2) imitiert [60]. Auf Grund ihrer sehr ähnlichen, jedoch abgewandelten Struktur binden sie an zwei überlappende Regionen des HR-1. Als Folge davon wird die Bildung der *six-helix bundle* verhindert [98]. Die bisher entdeckten resistenzvermittelnden Punktmutationen liegen überwiegend im Bereich des HR-1 "GIV"-Motivs, einem Teil des transmembranen Gp41. Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob die in die hydrophobe Tasche des Gp120 eingefügten Mutationen die Sensitivität gegenüber T-20 und T1249 beeinflussen. Steigende Konzentrationen des Fusions-Inhibitors T-20 führten sowohl beim NL4-3 WT als auch bei den Gp120 Mutanten rasch zu einer Abnahme ihrer Infektiosität. Diese Beobachtung konnte ebenfalls bei Experimenten mit T1249 gemacht werden. Die  $IC_{50}$ -Werte für NL4-3 WT lagen bei T-20 um 68 nM und bei T1249 um 1,2 nM. Die  $IC_{50}$ -Werte der Gp120 Mutanten lagen für beide Inhibitoren in einem gegenüber dem NL4-3 WT vergleichbaren Bereich (Abb. 10 und Tab. 2). Kleine Abweichungen lassen sich am ehesten durch die begrenzte Messgenauigkeit erklären. Die Wirksamkeit der Fusions-Inhibitoren T20 und T1249 wird folglich nicht durch die in die hydrophobe Tasche eingefügten Mutationen beeinflusst.

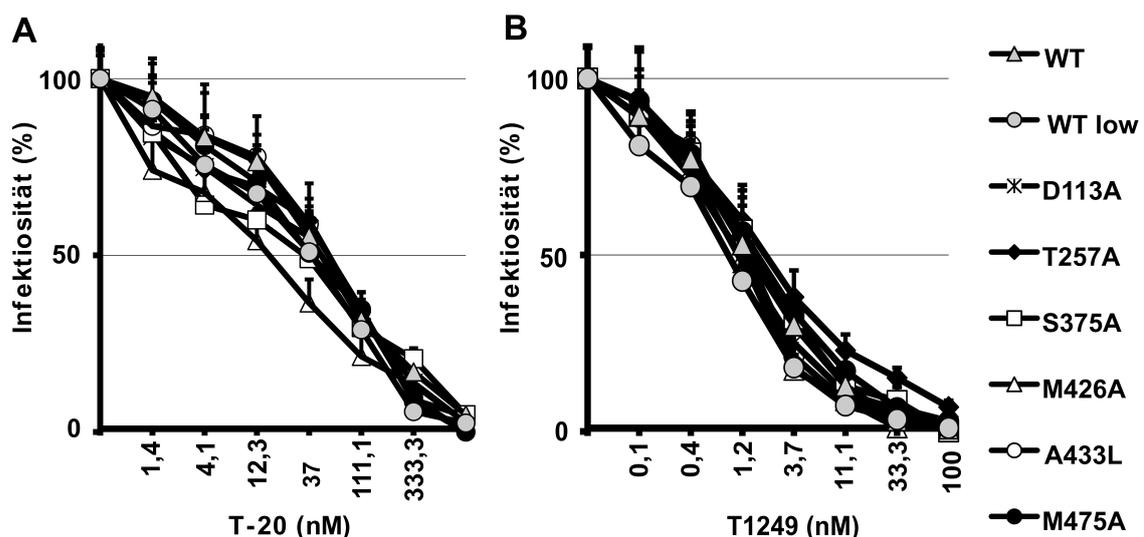


Abbildung 11: Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber Fusions-Inhibitoren. Abb. 11A: Sensitivität gegenüber T-20. Abb. 11B: Sensitivität gegenüber T1249. Die TZM-bl Zellen wurden in Gegenwart der beschriebenen Menge T-20 bzw. T1249 in 3-fach Ansätzen infiziert (n=3). Die verwendeten Virusstämme enthielten 1 ng p24 (Viruskapselbaustein). Als Maß für die virale Infektiosität wurde 3 Tage nach Infektion die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Zellysaten ermittelt.

### 3.2.3 Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber den CCR5-Antagonisten SCH-D und TAK-779

SCH-D und TAK-779 gehören zur Gruppe der CCR5-Antagonisten [91, 1]. Durch die Bindung in die transmembrane Tasche des zellulären Rezeptors CCR5 können sie dessen Interaktion mit der Korezeptorbindungsstelle auf Gp120 unterbinden. Da die CCR5-Antagonisten keine Wirkung auf X4-trope Virusstämme haben, wurden in den folgenden Sensitivitätstests nur die R5-tropen HIV-1 005pf135 Gp120 Mutanten verwendet. In den durchgeführten Experimenten besaßen beide CCR5-Antagonisten gegenüber dem NL4-3 WT sowie gegenüber sämtlichen G120-Mutanten eine gute Wirksamkeit (Abb. 12 und Tab. 2). Sowohl im Verlauf der Infektiositätskurve unter ansteigenden Inhibitorkonzentrationen als auch in den jeweiligen  $IC_{50}$ -Werten stimmten bei beiden Inhibitoren die Resultate des NL4-3 WT und der Gp120 Mutanten überein. Somit hat das Einfügen der Mutationen in die hydrophobe Tasche des Gp120 keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber den CCR5-Antagonisten SCH-D und TAK-779.

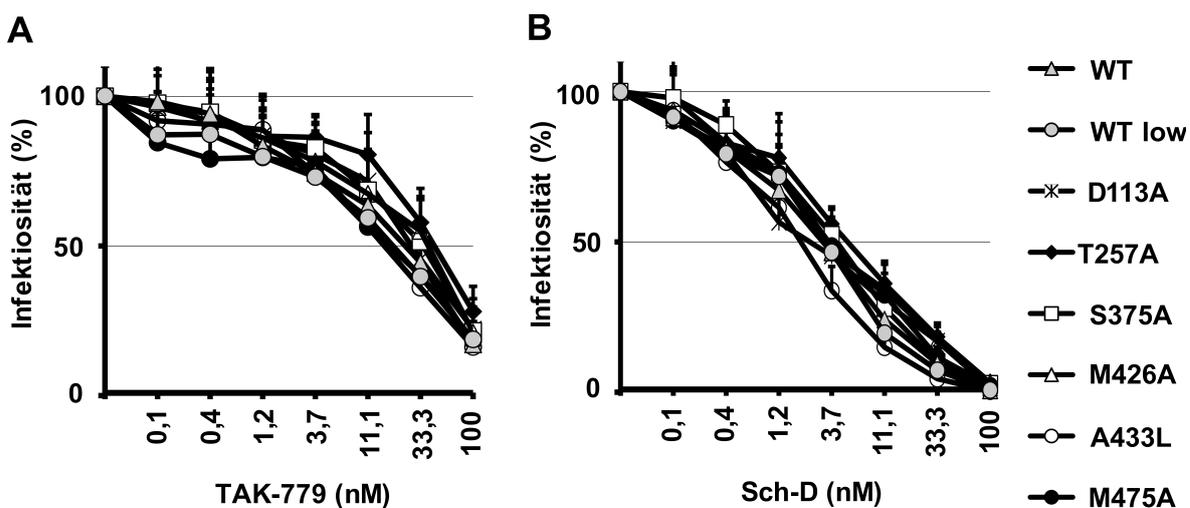


Abbildung 12: Sensitivität der HIV-1 NL4-3 005pf135 Gp120 Mutanten gegenüber CCR5-Antagonisten. Abb. 12A: Sensitivität gegenüber TAK-779. Abb. 12B: Sensitivität gegenüber SCH-D. Die TZM-bl Zellen wurden in Gegenwart der beschriebenen Menge SCH-D bzw. TAK-779 in 3-fach Ansätzen infiziert (n=3). Die Virusstämme enthielten 1 ng p24 (Viruskapselbaustein). Als Maß für die virale Infektiosität wurde 3 Tage nach Infektion die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Zelllysaten ermittelt.

### 3.2.4 Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber dem CXCR4-Antagonisten AMD3100

AMD3100 bindet an oberflächennahe Teile der Ligandenbindungstasche von CXCR4 unter Beteiligung der die Bindungstasche umgebenden Transmembrandomänen I, II, IV, VI und VII [18]. Auf diese Weise blockiert AMD3100 die Bindungsstelle des HIV-Korezeptors sowie des natürlichen Liganden SDF-1 $\alpha$ . Da der CXCR4-Antagonist keine Wirkung auf R5-trope Virusstämme besitzt, wurden in den folgenden Sensitivitätstests nur die X4-tropen Gp120 Mutanten verwendet. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten deutlich, dass sowohl NL4-3 WT als auch alle Gp120 Mutanten hochsensitiv gegenüber dem getesteten Inhibitor waren (Abb. 13 und Tab. 2). Für den NL4-3 WT konnte eine IC<sub>50</sub> von 1,1 nM ermittelt werden, die IC<sub>50</sub> der Gp120 Mutanten lagen zwischen 0,8 und 1,5 nM. Somit haben die eingefügten Mutationen im Gp120 keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber dem CXCR4-Antagonisten AMD3100.

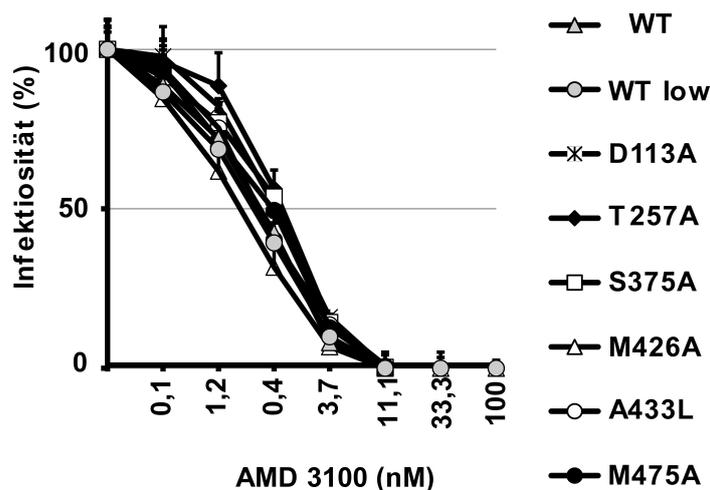


Abbildung 13: Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber dem CXCR4 Antagonisten AMD3100. Die TZM-bl Zellen wurden in Gegenwart der beschriebenen Menge AMD3100 in 3-fach Ansätzen mit Virusstämmen infiziert (n=3). Die Virusstämme enthielten 1 ng p24 (Viruskapselbaustein). Als Maß für die virale Infektiosität wurde 3 Tage nach Infektion die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Zelllysaten ermittelt.

3.2.5 Tabellarische Zusammenstellung aller IC<sub>50</sub>-Werte

**Tabelle 2: Zusammenstellung aller IC<sub>50</sub>-Werte.** <sup>1</sup>Getestet wurde der CXCR4-trope HIV-1 NL4-3. <sup>2</sup>Getestet wurde der CCR5-trope HIV-1 NL4-3 005pf135. <sup>3</sup> Die IC<sub>50</sub> Werte (in nM) wurden aus 3 unabhängigen Experimenten mit Graph Pad Prism ermittelt. <sup>4</sup> N-fache Reduktion der Sensitivität gegenüber dem HIV-1 NL4-3 WT

Mutation des HIV-1 NL4-3	BMS-806 <sup>1</sup>		AMD3100 <sup>1</sup>	
	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup> (nM)	N-fold <sup>4</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup> (nM)	N-fold <sup>4</sup>
WT	1,5±0,4	1,0	1,1±0,2	1,0
WT low	0,9±0,3	0,6	1,1±0,4	1,0
D113A	>100	-	1,3±0,5	1,2
T257A	22,3± 9,7	14,9	1,5±0,2	1,3
S375A	0,6±0,0	0,4	1,3±0,2	1,2
M426A	0,2±0,1	0,1	0,8±0,3	0,8
A433L	>100	-	1,0±0,3	0,9
M475A	11,5± 3,5	7,7	1,1±0,3	1,0

Mutation des HIV-1 NL4-3	T-20 <sup>1</sup>		T-1249 <sup>1</sup>	
	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup> (nM)	N-fold <sup>4</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup> (nM)	N-fold <sup>4</sup>
WT	68,3±20,3	1,0	1,4±1,0	1,0
WT low	54,3±11,8	0,8	1,3±0,9	0,9
D113A	64,0±21,2	0,9	1,4±1,0	1,0
T257A	78,0±15,1	1,1	1,6±1,2	1,2
S375A	60,7±19,9	0,9	2,3±1,6	1,6
M426A	24,7±8,5	0,4	1,3±0,9	0,9
A433L	78,3±7,1	1,1	1,4±1,0	1,0
M475A	56,0±6,5	0,8	1,7±1,2	1,2

Mutation des HIV-1 NL4-3	SCH-D <sup>2</sup>		TAK-779 <sup>2</sup>	
	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup> (nM)	N-fold <sup>4</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup> (nM)	N-fold <sup>4</sup>
WT	4,3±1,9	1,0	41,0±17,3	1,0
WT low	3,9±1,5	0,9	24,0±13,2	0,6
D113A	2,9±0,4	0,7	24,0± 6,2	0,6
T257A	5,9±0,7	1,4	54,0± 8,5	1,3
S375A	4,7±1,3	1,1	39,3±20,0	1,0
M426A	6,3±1,0	1,5	28,0±17,0	0,7
A433L	2,2±0,9	0,5	17,2± 6,3	0,4
M475A	5,1±2,0	1,2	28,4±17,6	0,7

## 4 Diskussion

Das virale Hüllprotein Gp120/41 ermöglicht HIV-1 die Plasmamembran der Wirtszelle zu überwinden [101]. Dieser initiale Schritt des viralen Replikationszyklus wird von den beiden env-Untereinheiten Gp41 und Gp120 vermittelt. Die komplexe Struktur und die hochgradige Glykolisierung des Hüllproteins haben bis heute eine vollständige Aufklärung der Konformation des ungebundenen HIV Gp120 verhindert [52]. Mittels Kristallstrukturanalyse gelang es 2005 die räumliche Struktur des ungebundenen HIV Gp120 zu entschlüsseln [9]. In dieser Konformation enthält das Hüllprotein eine bisher unbekannt hydrophobe Tasche. Sie liegt im Übergangsbereich zwischen der inneren und der äußeren Domäne und wird von zehn weitgehend konservierten Aminosäuren begrenzt (siehe Abb. 4). Mit Hilfe eines Sequenzvergleiches ist es möglich, die korrespondierenden Aminosäuren im HIV-1 Gp120 zu ermitteln. Ein Vergleich der zehn Aminosäuren der hydrophoben Tasche mit den Ergebnissen einer zuvor veröffentlichten Studie über resistenzvermittelnde Mutationen gegenüber dem Attachment Inhibitor BMS-806 zeigt eine weitgehende Übereinstimmung [57]. Daher gilt die hydrophobe Tasche als die wahrscheinlichste Bindungsstelle für BMS-806 und als eine potenzielle Bindungsstelle für weitere neu zu entwickelnde Inhibitoren [9]. Das Ziel dieser Promotionsarbeit ist, die jeweilige Bedeutung der zehn Aminosäuren für die Infektiosität und das Replikationsverhalten des Virus zu untersuchen sowie ihren Einfluss auf die Sensitivität gegenüber BMS-806 und weitere Entry-Inhibitoren zu bestimmen.

Voraussetzung für die Charakterisierung der hydrophoben Tasche war die Herstellung von Gp120 Mutanten, bei denen selektiv eine der zehn begrenzenden Aminosäuren mittels SOE-PCR (*splice-overlap-extension*) zu Alanin mutiert wurde. Das an Position 433 bereits vorhandene Alanin wurde durch Leucin ersetzt. Die hier angewandte Methode der *Alanin Scanning Mutagenesis (ASM)* ist eine einfache und weit verbreitete Technik zur Analyse der jeweiligen Funktion einzelner Aminosäuren in komplexen Proteinen. Die Substitution durch Alanin führt zu einer Elimination der Seitenkette jenseits der  $\beta$ -Carboxy-Gruppe. Die unerwünschten elektrostatischen und sterischen Effekte auf die Konformation der Hauptkette sind mit *Alanin Scanning Mutagenesis* somit vergleichsweise am geringsten [15]. Ein Austausch einer funktionell oder strukturell essenziellen Aminosäure eines Proteins gegen Alanin hat in der Regel den Verlust der Proteinfunktion zur Folge. Die alleinige Interpretation einer Substitutionsanalyse gestattet es aber nicht, sicher zu differenzieren, ob ein Funktionsverlust des Proteins durch die Veränderung eines direkten physischen Kontaktes der substituierten Aminosäure oder durch indirekte sterische Effekte auf die nähere Umgebung dieser hervorgerufen wurde [32].

## 4.1 Funktionelle Analyse der hydrophoben Tasche im ungebundenen HIV-1 NL4-3 Gp120

Alle zehn mutierten Gp120 Varianten konnten drei Tage nach Transfektion mittels Western Blot Verfahren im Lysat der infizierten Zellen sowie im Lysat der Viruspartikel nachgewiesen werden (Abb. 6). Die veränderten Gensequenzen haben somit keinen Einfluss auf die Expression und die posttranslatorische Prozessierung des Hüllproteins. Obwohl alle Virusvarianten nachweislich über das für die Infektion notwendige Gp120 Protein verfügen, zeigen die Infektiositätsmessungen ein sehr heterogenes Bild: Das Einfügen der Mutationen W112A, L125A, F382A, W427A in Gp120 führt zu einem fast vollständigen Verlust der Infektiosität. Die Variante M426A ist in ihrer Infektiosität deutlich eingeschränkt. Bei den Mutationsträgern D112A, T257A, S375A, A433L und M475A kann hingegen keine negative Auswirkung auf die Infektiosität festgestellt werden. Der jeweilige Korezeptortropismus der Virusstämme hat auf die Infektiosität in den TZM-bl keinen Einfluss (Abb. 7). In einer früheren Studie [57] wurde bereits die Infektiosität von fünf der zehn Gp120-Mutationen (W112A, D113A, T257A, S375A, A433L) untersucht. Hierfür wurden CD4 und CXCR4/CCR5 exprimierende Hundethymozyten (Cf2Th) mit Luciferase exprimierenden, rekombinanten HIV-1 Gp120-Mutanten (HXBc2) infiziert. In dieser Studie wurde eine normale Infektiosität für die Mutation T257A ermittelt sowie eine etwas verminderte Infektiosität für die Varianten D112A und A433L. Die Infektiosität der Mutationen W112A war deutlich reduziert (<1% des WT). Im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit besaß die Mutation S375A bei Madani et al. nur eine stark verminderte Infektiosität. Die Ergebnisse der Infektiositätsstudien werden im direkten Vergleich mit dem untersuchten Replikationsverhalten der HI-Viren in humanen PBMC's bestätigt. Nur bei den fünf in TZM-bl Zellen infektiösen Mutationsträgern D113A, T257A, S375A, A433L und M475A kann eine relevante Reverse Transkriptase Aktivität nachgewiesen werden. Der Verlauf der Reverse Transkriptase Aktivität des NL4-3 WT kann stellvertretend für das natürliche Replikationsverhalten des HIV-1 angesehen werden (Abb. 8). Die Reverse Transkriptase Aktivitäten der fünf infektiösen Mutationsträger besitzen hierzu einen qualitativ sehr ähnlichen Verlauf mit einer maximalen Aktivität nach 6 Tagen, gefolgt von einem raschen Abfall. Quantitative Unterschiede in der Höhe der maximalen Aktivität können durch die unterschiedliche Infektiosität der Mutationsträger erklärt werden. Dementsprechend würde die nicht-messbare Reverse Transkriptase Aktivität der Mutationsträger W112A, L125A, F382A, M426A und W427A durch ihre unzureichende Infektiosität bedingt sein. Um den Verlust der Infektiosität einzelner Gp120 Mutanten und die damit verbundene Unfähigkeit zur Replikation weiter aufzu-

klären, wurde die Fusogenität jedes veränderten Hüllproteins untersucht. Hierfür wurden Zell-Zell-Fusionstests mit env-exprimierenden 293T-Zellen sowie CD4, CXCR4 und CCR5 exprimierenden TZM-bl-Zellen durchgeführt (Abb. 9). In großer Übereinstimmung mit den Infektiositätsraten besitzen die Virusmutanten W112A, L125A, F382A, M426A und W427A eine stark verminderte Fähigkeit, eine Zellfusion herbeizuführen. Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass die stark verminderte Infektiosität dieser Mutationen durch einen Verlust der fusogenen Eigenschaften ihres mutierten Hüllproteins bedingt ist.

Die zehn Aminosäuren, welche die hydrophobe Tasche des Gp120 auskleiden, liegen in der Primärstruktur des Proteins weit voneinander entfernt und sind daher über verschiedene Untereinheiten verteilt. Erst in der Tertiärstruktur des ungebundenen Hüllproteins kommt es zu der großen räumlichen Annäherung. Obwohl die komplizierten Umlagerungsprozesse und die Funktionen der inneren Domäne und ihrer Untereinheiten bisher nur unvollständig aufgeklärt wurden, können die bereits gewonnenen Daten dazu beitragen, mögliche Erklärungen für die in den Experimenten gemachten Beobachtungen zu finden. Eine potenzielle Erklärung für die stark reduzierte Infektiosität der Gp120 Variante W112A wird in einer kürzlich veröffentlichten *molecular-docking*-Studie [16] gegeben. Die Anlagerung des CD4 an Gp120 induziert und stabilisiert eine hydrophobe Bindungstasche bestehend aus den Aminosäuren Val 255, Thr 257, Phe 382, Trp 427, Tyr 435 und Met 475 [16]. Das auf der  $\alpha$ -1-Helix der inneren Domäne gelegene Trp112 lagert sich an diese Bindungstasche an. Dieses Zwischenstadium ermöglicht die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den  $\beta$ 2/ $\beta$ 3- und  $\beta$ 20/ $\beta$ 21 Strängen (siehe Abb. 2) und somit die Bildung der *bridging sheet*. Da et al. konnte zeigen, dass das zu Alanin mutierte Trp112 nicht mehr zur Anlagerung an die Bindungsstelle geeignet war, mit der Folge, dass die Ausbildung der *bridging sheet* ebenfalls unterblieb. Da die Bildung der *bridging sheet* für die stabile Bindung von CD4 und des Korezeptors und damit für den Viruseintritt in die Zelle eine zentrale Rolle spielt [48], stellen die von Da et al. gewonnenen Ergebnisse eine plausible Erklärung für die geringe Infektiosität und Fusogenität der Gp120 Variante W112A dar [57]. Die Mutation der Aminosäuren Leu 125, Phe 382, Trp 427 zu Alanin führt ebenfalls zu einem vollständigen Verlust der Infektiosität. Ein Vergleich von 250 Gensequenzen unterschiedlicher HIV-1 Subtypen aus der Los Alamos Datenbank zeigt keine natürlich vorkommenden Mutationen an diesen Positionen. Ebenfalls sind sie in der von Chen et al. [9] untersuchten SIVmac32-Variante konserviert. Der hohe Grad der Konservierung und die Beteiligung der Aminosäuren Phe 382 und Trp 427 an der Trp 112-Bindungstasche lassen auf eine Beteiligung dieser an der Ausbildung der *bridging sheet* schließen. Die Aminosäure Leu 125 liegt im  $\beta$ 21-Strang und ist damit Teil der

*bridging sheet* selbst.

Der ebenfalls untersuchte Korezeptortropismus der HI-Viren wird maßgeblich von der Struktur und der Ladung der Seitenketten in der Spitze der V3-Schleife bestimmt [37, 27]. Es genügt in diesem Bereich schon der Austausch einzelner Aminosäuren, der mit einer Vergrößerung der positiven Ladung einhergeht, um einen Wechsel des Korezeptortropismus von CCR5 auf CXCR4 herbeizuführen [79, 27]. Für die Erkennung und Bindung der Korezeptoren sind neben der V3-Schleife einige hochkonservierte Bereiche der *bridging sheet*, insbesondere die  $\beta$ 19 Region, von entscheidender Bedeutung [3, 71, 10]. Aktuelle Bindungsmodelle beschreiben eine primäre Assoziation des *extra cellular loop 2* (ECL2) des Chemokinrezeptors an die Spitze der V3-Schleife, die die folgende Bindung des N-Terminus des Korezeptors im Bereich der *bridging sheet* und der Basis der V3-Schleife vermittelt [41]. Einige der Aminosäuren aus dem Bereich der hydrophoben Tasche im Gp120 (L125A, M226A, W227A, A443L) sind ebenfalls Teil der *bridging sheet*. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen der Gp120 Mutanten in der korezeptorspezifischen Zelllinie (U373) erbringen jedoch weder bei den X4-tropen noch bei den R5-tropen HI-Virusstämmen einen Hinweis auf einen durch das Einfügen der Mutationen ausgelösten Wechsel des Korezeptortropismus (Tab. 1). Somit gibt es auch keine Anhaltspunkte für einen Einfluss der hydrophoben Tasche auf die Wahl des Korezeptors.

## 4.2 Sensitivität der HIV-1 NL4-3 Gp120 Mutanten gegenüber Entry-Inhibitoren

In den vorangegangenen Infektiositätsmessungen konnten sechs Gp120 Mutanten (D113A, T257A, S375A, M426A, A433L, M475A) mit nachgewiesener, jedoch zum Teil unterschiedlicher Infektiosität selektiert werden. Zusammen mit dem als Referenz dienenden NL4-3 WT Virus wurden diese auf eine Beeinflussung ihrer Sensitivität gegenüber sechs Entry-Inhibitoren (AMD3100, Tak-779, Sch-D, T-20, T-1249, BMS-806) untersucht. In den zuvor von anderen Forschungsgruppen durchgeführten Untersuchungen hatten die differierenden Infektiositätsraten der verschiedenen Gp120 Mutanten keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber den getesteten Entry-Inhibitoren [57, 80]. Diese Beobachtung konnte durch die übereinstimmenden Ergebnisse der Sensitivitätsmessungen mit verdünntem (1:5) und unverdünntem NL4-3 WT Virus bestätigt werden (Tab. 2).

Die Entry-Inhibitoren AMD3100, Tak-779 und Sch-D sind Antagonisten der HIV-1 Korezeptoren. Eine Bindung der Inhibitoren an CXCR4 bzw. CCR5 bewirken eine Konformationsänderungen dieser. Die veränderte Bindungsstelle kann von der viralen

V3-Schleife und *bridging sheet* nicht mehr erkannt werden [41, 10, 88], so dass die Bindung des HIV-Hüllproteins an den Korezeptor unterbleibt. Bereits bekannte resistenzvermittelnde Mutationen liegen im Bereich der Basis und Spitze der V3-Schleife [89] sowie in den Gp120 Regionen V2, C3 und V4 [67, 58]. Sie ermöglichen trotz Anwesenheit des Inhibitors eine suffiziente Bindung des Gp120 an den Korezeptor. Bei keinem der in dieser Arbeit untersuchten Gp120 Mutanten ist eine veränderte Sensitivität gegenüber den 3 Korezeptor-Antagonisten nachgewiesen worden (Abb. 12 und 13, Tab. 2). Es ergeben sich folglich keine Hinweise auf einen Einfluss der in der hydrophoben Tasche liegenden Aminosäuren auf den Korezeptorerkennungs- und Bindungsprozess.

Der Fusionsinhibitor T-20 (Enfurvitide) und dessen Weiterentwicklung T-1249 imitieren die Struktur des *heptad repeats-2* (HR-2). Durch Anlagerung an das HR-1 im Transmembranprotein Gp41 kann die Bildung der *six helix bundle* zuverlässig verhindert werden [69]. Die in die hydrophobe Tasche des Gp120 eingefügten Mutationen haben keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von T-20 und T-1249 (Abb. 11 und Tab. 2). Dies steht in Übereinstimmung mit bisherigen Forschungsergebnissen, die die Entwicklung einer Resistenz des HI-Virus gegenüber den beiden Fusionsinhibitoren nur durch den Erwerb verschiedener Punktmutationen im Bereich des HR-1 "GIV"-Motivs nachweisen konnten [56, 10].

Der neuartige Wirkstoff BMS-806 ist ein niedermolekularer und daher peroral applizierbarer HIV-1 Inhibitor mit einer mittleren  $IC_{50}$  von 12 nM [96, 53]. Der Wirkmechanismus und die exakte Bindungsstelle konnten bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte Sensitivitätstestung der sechs infektiösen Gp120 Mutanten mit BMS-806 ergibt in Abhängigkeit von der eingefügten Mutation deutliche Unterschiede (Abb. 10 und Tab. 2): Das Einfügen der Mutationen S375A und M426A führt zu einer leicht erhöhten Sensitivität gegenüber dem Attachment-Inhibitor. Die Mutanten T257A und M475A besitzen eine etwas verminderte Sensitivität. Den deutlichsten Effekt hatte aber das Einfügen der Mutationen D113A und A433L. Mit einer  $IC_{50}$  von  $> 100$  nM verleihen die beiden Mutationen HIV-1 eine weitgehende Resistenz gegenüber BMS-806 (Abb. 10, Tab. 2). Einige der hier gewonnenen Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit mehreren unabhängigen Publikationen [53, 33, 57]. Diese Arbeiten wurden aber vor Veröffentlichung der Struktur des ungebundenen SIV Gp120 durch Chen et al. [9] durchgeführt und liefern daher im Gegensatz zu dieser Untersuchung keine vollständige Charakterisierung der hydrophoben Tasche im Gp120. Madani et al. [57] konnte nachweisen, dass neben den oben beschriebenen Mutationen D113A und A433L die Mutationen W112A, T257R, S375W, F382L, M426L und M475S ebenfalls zu einer stark verminderten Sensitivität gegenüber BMS-806 führen. Diese Resistenz wird bei den Mutationen W112A, S375W, F382L und M426L im

HXBc2-Stamm jedoch von einer im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduzierten Infektiosität begleitet (<1% des WT) [57]. Dies spricht zusammen mit der geringen Anzahl von natürlich vorkommenden Mutationen unter HIV-1 Stämmen im Bereich der hydrophoben Tasche für eine bedeutende Rolle dieser Region im viralen Eintrittsprozess. In dem resistenten Mutanten S375W führt das Einfügen des Tryptophans durch ein teilweises Auffüllen der *Phe-43 cavity* zu einer Konformationsänderung im ungebundenen Gp120 [102]. Diese veränderte Konformation weist große Ähnlichkeit mit der Konformation des an CD4 gebundenen Gp120 auf, so dass eine suffiziente Anlagerung des Inhibitors BMS-806 nicht mehr möglich ist [33]. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für resistenzvermittelnde Substitutionen des Thr 257 denkbar. Diese Aminosäure befindet sich ebenfalls in der Wand der *Phe-43 cavity* und in direkter Nachbarschaft zu Ser 375 [48]. Das Einfügen kurzkettiger Aminosäuren an dieser Position (T257A und T257G) ist nur mit einer geringgradigen Resistenz gegenüber BMS-806 verbunden. Die lange Seitenkette des Arginins der Mutation T257R führt jedoch zu einer hochgradigen Resistenz gegenüber BMS-806 [57]. Da die Mutation von Ser 375 und Thr 257 zu kurzkettigen Aminosäuren zu keiner oder nur geringgradiger Resistenz gegenüber BMS-806 führt, scheint die Resistenz an diesen Positionen am ehesten durch die Konformationsänderung des Proteins und nicht durch den Verlust des Kontaktes zwischen der mutierten Aminosäure und dem Inhibitor bedingt zu sein. Im Gegensatz dazu führen die Mutationen W112A, D113A, F382L, M426L und A433L zwar zu einer Resistenz gegenüber BMS-806, sie sind jedoch mit keiner relevanten Vergrößerung der Seitenkette verbunden. Die Ursache der Resistenz könnte in diesen Fällen der Verlust der an den Inhibitor bindenden Seitenkette sein [57]. Weitere, aber weniger stark ausgeprägte Resistenzen wurden nach Einfügen von Mutationen in direkt an die hydrophobe Tasche angrenzenden Aminosäuren (N377L, K429L, M434I) beobachtet [53, 57]. Sie sind am ehesten durch die räumliche Nähe und damit verbundener Konformationsänderungen in der Bindungstasche erklärbar [53]. Der Wirkmechanismus von BMS-806 ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Eine Bindung des Inhibitors an Gp120 vor dessen Kontakt mit CD4 gilt als sicher [53, 85, 39]. Über die Folgen dieser Interaktion wurden jedoch verschiedene Hypothesen aufgestellt: BMS-806 könnte durch eine Bindung in die *Phe-43 cavity* den Kontakt zwischen Gp120 und CD4 im Sinne eines kompetitiven Antagonisten blockieren. Hinweise hierauf wurden in mehreren Versuchen mit sCD4 gefunden [53, 33, 45, 39]. Die hierfür benötigte Inhibitorkonzentration lag mit ca. 100 nM jedoch mehrfach über der zur Virushemmung notwendigen [53]. Im direkten Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse anderer Untersuchungen, die keinerlei Einfluss von BMS-806 auf die Bindung zwischen Gp120 und CD4 feststellen konnten [31, 57, 85]. Würden BMS-806 und CD4 um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, dann sollte

die Mutation der entsprechenden Aminosäuren im Gp120 einen Einfluss sowohl auf die Bindung von BMS-806 als auch auf die von CD4 besitzen. Aus einer Reihe von Mutanten (D368R, E370R, W427V und D457R), welche nachweislich eine Bindung zwischen CD4 und Gp120 verhindern [48], war lediglich der in der hydrophoben Tasche liegende Mutant W427V nicht in der Lage, BMS-806 zu binden [33]. Ebenfalls lässt sich mit der beschriebenen Hypothese nicht die gute Wirkung des Inhibitors auf CD4-unabhängige Virusstämmen erklären [81]. Alternativ wäre eine Bindung von BMS-806 auch außerhalb der *Phe-43 cavity* denkbar. Seine Anlagerung an Gp120 könnte die durch den Kontakt mit CD4 ausgelösten komplexen Konformationsänderungen des Gp120 [9, 85] oder deren Weiterleitung in das assoziierte Gp41 [81] verhindern. Weiteren Aufschluss über den Wirkmechanismus könnte die Bestimmung der exakten Bindungsstelle des Inhibitors erbringen. Die Position der bekannten resistenzvermittelnden Aminosäuren ermöglicht es, indirekt hierüber wichtige Informationen zu gewinnen [65]. In dem an CD4 gebundenen Gp120 stehen die fünf resistenzvermittelnden Aminosäuren Trp 112, Thr 257, Ser 375, Phe 382 und Met 426 in engem Kontakt mit der *Phe-43 cavity* [48, 47]. Von der *Phe-43 cavity* ausgehend, besteht über einen mit Wassermolekülen gefüllten Kanal eine Verbindung zu der Oberfläche des Hüllproteins. Dieser Kanal wiederum wird unter anderem von den ebenfalls resistenzvermittelnden Aminosäuren Trp 112, Asp 113, Phe 382, Met 426 und Ala 433 ausgekleidet [57]. Zwei *molecular docking* Studien konnten zeigen, dass eine Bindung von BMS-806 im Bereich einer dieser beiden Strukturen ohne größere sterische Konflikte möglich wäre [87, 45]. Sie werden daher in einem Teil der Publikationen als wahrscheinlichste Bindungsstelle bewertet [53, 33]. In dieser Hypothese bleiben jedoch die weitreichenden Umlagerungsprozesse, welche das Hüllprotein Gp120 nach Kontakt mit CD4 durchläuft [9], völlig unberücksichtigt. Sie spielen aber auf der Suche nach der BMS-806-Bindungsstelle eine entscheidende Rolle, da die Bindung von BMS-806 an Gp120 bereits vor dem Kontakt zu CD4 [53], und damit in einer anderen Gp120 Konformation erfolgt. Kristallstrukturanalysen des ungebundenen SIV Gp120 haben eine hydrophobe Tasche im SIV Hüllprotein zur Darstellung gebracht [9]. Ein Vergleich zwischen den Aminosäuren der hydrophoben Tasche und den bekannten resistenzerzeugenden Mutationen zeigt, dass jede höhergradige Resistenzbildung gegenüber BMS-806 durch die Mutation einer der zehn Aminosäuren in der hydrophoben Tasche des ungebundenen Gp120 bedingt ist. Für eine letztendlich eindeutige Aufklärung des Bindungsortes und des Wirkmechanismus von BMS-806 erscheint die bis heute leider nicht vorliegende Struktur des ungebundenen HIV-1 Gp120 unabdingbar. Zusammengenommen sprechen aber die Struktur des ungebundenen SIV Gp120 und die Position der resistenzvermittelnden Aminosäuren für die hydrophobe Tasche im Gp120 als wahrscheinlichsten Bindungsort von BMS-806.

## 5 Zusammenfassung

Das virale Hüllprotein ermöglicht es dem Humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1) die Plasmamembran der Wirtszelle zu überwinden. Dieser initiale Schritt des viralen Replikationszyklus wird von den beiden Glykoproteinuntereinheiten Gp41 und Gp120 vermittelt. Eine Aufklärung der Konformation des ungebundenen HIV-1 Gp120 ist bis heute auf Grund der komplexen Struktur und der hochgradigen Glykolisierung nicht gelungen. Die vorliegende Struktur des ungebundenen Gp120 des Simiane Immundefizienz-Virus (SIV) offenbarte eine bisher unbekannte, von zehn Aminosäuren begrenzte, hydrophobe Tasche [9]. Einige Mutationen der korrespondierenden Aminosäuren im HIV-1 gehen mit einer Resistenz gegenüber dem niedermolekularen Attachment-Inhibitor BMS-806 einher. Das Ziel dieser Promotionsarbeit ist, die Bedeutung der hydrophoben Tasche im HIV-1 Gp120 für die Infektiosität und das Replikationsverhalten des Virus zu untersuchen sowie ihren Einfluss auf die Sensitivität gegenüber BMS-806 und weitere Entry-Inhibitoren zu bestimmen.

Hierzu wurden die zehn Aminosäuren der hydrophoben Tasche mittels SOE-PCR (*splice overlap extension polymerase chain reaction*) jeweils zu Alanin mutiert. Das PCR-Produkt wurde in einen auf HIV-1 basierenden Vektor (pBR-NL43) kloniert und anschließend 293T-Zellen zur Virusherstellung transfiziert. Von den zehn untersuchten Gp120 Mutanten besaßen die Mutationsträger D113A, T257A, S375A, A433L und M475A eine annähernd unveränderte Infektiosität. Die stark eingeschränkte Infektiosität der Mutanten W112A, L125A, F382A und W427A beruht auf der Unfähigkeit der veränderten Hüllproteine eine Fusion zwischen der Virus- und Zellmembran herbeizuführen. Hierfür ist eine durch die mutierten Aminosäuren blockierte Ausbildung der bridging sheet als Ursache zu vermuten. Ein Einfluss der eingefügten Mutationen auf das Replikationsverhalten und den Korezeptortropismus des Virus war nicht nachweisbar. Für die Resistenzmessungen gegenüber den Entry-Inhibitoren wurden die sechs Gp120-Mutanten ausgewählt, deren ausreichende Infektiosität in den vorangegangenen Untersuchungen belegt werden konnte. Das Einfügen der Mutationen D113A und A433L führt zu einer Resistenz gegenüber BMS-806. Eine Kreuzresistenz gegenüber AMD3100, Tak-779, Sch-D, T-20 und T-1249 konnte nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutation von vier der zehn Aminosäuren der hydrophoben Tasche zu Alanin mit einem Verlust der viralen Infektiosität einhergeht. Die Hüllproteine der nicht-infektiösen Mutationsträger waren nicht mehr in Lage, eine Fusion zwischen der Virus- und der Zellmembran herbeizuführen. Von den sechs infektiösen Mutanten besitzen die Mutanten D113A und A433L eine Resistenz gegenüber BMS-806. Kreuzresistenzen gegen weitere untersuchte

Entryinhibitoren konnten nicht nachgewiesen werden.

## Literaturverzeichnis

- [1] M. Baba, O. Nishimura, N. Kanzaki, M. Okamoto, H. Sawada, Y. Iizawa, M. Shirais-hi, Y. Aramaki, K. Okonogi, Y. Ogawa, K. Meguro, and M. Fujino. A small-molecule, nonpeptide ccr5 antagonist with highly potent and selective anti-hiv-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 5698–5703 (1999)
- [2] F. Barré-Sinoussi, J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. Isolation of a t-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (aids). *Science*, 220: 868–871 (1983)
- [3] Stéphane Basmaciogullari, Gregory J Babcock, Donald Van Ryk, Woj Wojtowicz, and Joseph Sodroski. Identification of conserved and variable structures in the human immunodeficiency virus gp120 glycoprotein of importance for cxcr4 binding. *J Virol*, 76: 10791–10800 (2002)
- [4] Berger, E.A, Doms R. W. Fenyo E. M. Korber B. T. Littman D. R. Moore J. P. Sat-tenau Q. J. Schuitemaker H. Sodroski J. und Weiss R.A. A new classification for hiv-1. *Nature*, 391: 240 (Brief an den Herausgeber) (1998)
- [5] Joel N Blankson, Deborah Persaud, and Robert F Siliciano. The challenge of viral reservoirs in hiv-1 infection. *Annu Rev Med*, 53: 557–593 (2002)
- [6] Verónica Briz, Eva Poveda, and Vincent Soriano. Hiv entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother*, 57: 619–627 (2006)
- [7] D. C. Chan, D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim. Core structure of gp41 from the hiv envelope glycoprotein. *Cell*, 89: 263–273 (1997)
- [8] D. C. Chan and P. S. Kim. Hiv entry and its inhibition. *Cell*, 93: 681–684 (1998)
- [9] Bing Chen, Erik M Vogan, Haiyun Gong, John J Skehel, Don C Wiley, and Stephen C Harrison. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature*, 433: 834–841 (2005)
- [10] Chih chin Huang, Min Tang, Mei-Yun Zhang, Shahzad Majeed, Elizabeth Montabana, Robyn L Stanfield, Dimiter S Dimitrov, Bette Korber, Joseph Sodroski, Ian A Wilson, Richard Wyatt, and Peter D Kwong. Structure of a v3-containing hiv-1 gp120 core. *Science*, 310: 1025–1028 (2005)
- [11] F. Clavel, D. Guétard, F. Brun-Vézinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, and C. Rouzioux. Isolation of a new human retrovirus from west african patients with aids. *Science*, 233: 343–346 (1986)

- [12] J. Coffin, A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, and P. Vogt. What to call the aids virus? *Nature*, 321: 10 (1986)
- [13] R. I. Connor, K. E. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe, and N. R. Landau. Change in coreceptor use correlates with disease progression in hiv-1–infected individuals. *J Exp Med*, 185: 621–628 (1997)
- [14] Emmanuel G Cormier and Tatjana Dragic. The crown and stem of the v3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the ccr5 coreceptor. *J Virol*, 76: 8953–8957 (2002)
- [15] B. C. Cunningham and J. A. Wells. High-resolution epitope mapping of hgh-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*, 244: 1081–1085 (1989)
- [16] Lin-Tai Da, Jun-Min Quan, and Yun-Dong Wu. Understanding of the bridging sheet formation of hiv-1 glycoprotein gp120. *J Phys Chem B*, 113: 14536–14543 (2009)
- [17] Steven G Deeks. Treatment of antiretroviral-drug-resistant hiv-1 infection. *Lancet*, 362: 2002–2011 (2003)
- [18] G. A. Donzella, D. Schols, S. W. Lin, J. A. Esté, K. A. Nagashima, P. J. Maddon, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, G. Henson, E. De Clercq, and J. P. Moore. Amd3100, a small molecule inhibitor of hiv-1 entry via the cxcr4 co-receptor. *Nat Med*, 4: 72–77 (1998)
- [19] G. Dornadula, H. Zhang, B. VanUitert, J. Stern, L. Livornese, M. J. Ingerman, J. Witek, R. J. Kedanis, J. Natkin, J. DeSimone, and R. J. Pomerantz. Residual hiv-1 rna in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA*, 282: 1627–1632 (1999)
- [20] T. Dragic, V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton. Hiv-1 entry into cd4+ cells is mediated by the chemokine receptor cc-ckr-5. *Nature*, 381: 667–673 (1996)
- [21] D. M. Eckert and P. S. Kim. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*, 70: 777–810 (2001)
- [22] Terri G Edwards, Stéphanie Wyss, Jacqueline D Reeves, Susan Zolla-Pazner, James A Hoxie, Robert W Doms, and Frédéric Baribaud. Truncation of the cytoplasmic domain induces exposure of conserved regions in the ectodomain of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol*, 76: 2683–2691 (2002)
- [23] Hind Fadel and Zelalem Temesgen. *Maraviroc*. *Drugs Today (Barc)*, 43: 749–758 (2007)

- [24] Y. Feng, C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger. Hiv-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272: 872–877 (1996)
- [25] D. Finzi, J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T. C. Quinn, R. E. Chaisson, E. Rosenbergs, B. Walker, S. Gange, J. Gallant, and R. F. Siliciano. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*, 5: 512–517 (1999)
- [26] C. Flexner. HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med*, 338: 1281–1292 (1998)
- [27] R. A. Fouchier, M. Groenink, N. A. Kootstra, M. Tersmette, H. G. Huisman, F. Miedema, and H. Schuitemaker. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol*, 66: 3183–3187 (1992)
- [28] Karlissa Foy and Salomé N. Juethner. Enfuvirtide (t-20): potentials and challenges. *J Assoc Nurses AIDS Care*, 15: 65–71 (2004)
- [29] Stephen A. Gallo, Catherine M. Finnegan, Mathias Viard, Yossef Raviv, Antony Dimitrov, Satinder S. Rawat, Anu Puri, Stewart Durell, and Robert Blumenthal. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta*, 1614: 36–50 (2003)
- [30] F. Gao, E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 397: 436–441 (1999)
- [31] M. S. Gottlieb, R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*, 305: 1425–1431 (1981)
- [32] N. S. Greenspan and E. Di Cera. Defining epitopes: It's not as easy as it seems. *Nat Biotechnol*, 17: 936–937 (1999)
- [33] Qi Guo, Hsu-Tso Ho, Ira Dicker, Li Fan, Nannan Zhou, Jacques Friborg, Tao Wang, Brian V. McAuliffe, Hwei-Gene Heidi Wang, Ronald E. Rose, Hua Fang, Helen T. Scarnati, David R. Langley, Nicholas A. Meanwell, Ralph Abraham, Richard J. Colonna, and Pin-Fang Lin. Biochemical and genetic characterizations of a novel human immunodeficiency virus type 1 inhibitor that blocks gp120-CD4 interactions. *J Virol*, 77: 10528–10536 (2003)

- [34] H. F. Günthard, S. D. Frost, A. J. Leigh-Brown, C. C. Ignacio, K. Kee, A. S. Perelson, C. A. Spina, D. V. Havlir, M. Hezareh, D. J. Looney, D. D. Richman, and J. K. Wong. Evolution of envelope sequences of human immunodeficiency virus type 1 in cellular reservoirs in the setting of potent antiviral therapy. *J Virol*, 73: 9404–9412 (1999)
- [35] B. H. Hahn, G. M. Shaw, K. M. De Cock, and P. M. Sharp. Aids as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*, 287: 607–614 (2000)
- [36] Scott M Hammer, Joseph J Eron, Peter Reiss, Robert T Schooley, Melanie A Thompson, Sharon Walmsley, Pedro Cahn, Margaret A Fischl, Jose M Gatell, Martin S Hirsch, Donna M Jacobsen, Julio S G Montaner, Douglas D Richman, Patrick G Yeni, Paul A Volberding, and International AIDS Society-USA. Antiretroviral treatment of adult hiv infection: 2008 recommendations of the international aids society-usa panel. *JAMA*, 300: 555–570 (2008)
- [37] Oliver Hartley, Per Johan Klasse, Quentin J Sattentau, and John P Moore. V3: Hiv’s switch-hitter. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 21: 171–189 (2005)
- [38] Craig W Hendrix, Ann C Collier, Michael M Lederman, Dominique Schols, Richard B Pollard, Stephen Brown, J. Brooks Jackson, Robert W Coombs, Marshall J Glesby, Charles W Flexner, Gary J Bridger, Karin Badel, Ronald T MacFarland, Geoffrey W Henson, Gary Calandra, and A. M. D3100 HIV Study Group. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of amd3100, a selective cxcr4 receptor inhibitor, in hiv-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 37: 1253–1262 (2004)
- [39] Hsu-Tso Ho, Li Fan, Beata Nowicka-Sans, Brian McAuliffe, Chang-Ben Li, Gregory Yamanaka, Nannan Zhou, Hua Fang, Ira Dicker, Richard Dalterio, Yi-Fei Gong, Tao Wang, Zhiwei Yin, Yasutsugu Ueda, John Matiskella, John Kadow, Paul Clapham, James Robinson, Richard Colonno, and Pin-Fang Lin. Envelope conformational changes induced by human immunodeficiency virus type 1 attachment inhibitors prevent cd4 binding and downstream entry events. *J Virol*, 80: 4017–4025 (2006)
- [40] R. Hogg, V. Lima, J.A. Sterne, S. Grabar, M. Battegay, M. Bornarek, A. D’Armino Monforte, A. Esteve, M.J. Gill, R. Harris, A. Justice, A. Hayden, F. Lampe, A. Mocroft, M.J. Mugavero, S. Staszewski, J.C. Wasmuth, A. van Sighem, M. Kitahata, J. Guest, M. Egger and M. May. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*, 372: 293–299 (2008)
- [41] Chih-Chin Huang, Son N Lam, Priyamvada Acharya, Min Tang, Shi-Hua Xiang, Syed Shahzad-Ul Hussan, Robyn L Stanfield, James Robinson, Joseph Sodroski, Ian A

- Wilson, Richard Wyatt, Carole A Bewley, and Peter D Kwong. Structures of the ccr5 n terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with hiv-1 gp120 and cd4. *Science*, 317: 1930–1934 (2007)
- [42] S. S. Hwang, T. J. Boyle, H. K. Lyerly, and B. R. Cullen. Identification of the envelope v3 loop as the primary determinant of cell tropism in hiv-1. *Science*, 253: 71–74 (1991)
- [43] Mark A Jensen and Angélique B van 't Wout. Predicting hiv-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev*, 5: 104–112 (2003)
- [44] D. Klatzmann, F. Barré-Sinoussi, M. T. Nugeyre, C. Danquet, E. Vilmer, C. Griscelli, F. Brun-Veziret, C. Rouzioux, J. C. Gluckman, and J. C. Chermann. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (lav) for helper-inducer t lymphocytes. *Science*, 225: 59–63 (1984)
- [45] Ren Kong, Jian Jun Tan, Xiao Hui Ma, Wei Zu Chen, and Cun Xin Wang. Prediction of the binding mode between bms-378806 and hiv-1 gp120 by docking and molecular dynamics simulation. *Biochim Biophys Acta*, 1764: 766–772 (2006)
- [46] B. Korber, M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, A. Lapedes, B. H. Hahn, S. Wolinsky, and T. Bhattacharya. Timing the ancestor of the hiv-1 pandemic strains. *Science*, 288: 1789–1796 (2000)
- [47] P. D. Kwong, R. Wyatt, S. Majeed, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. Structures of hiv-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure*, 8:1329–1339 (2000)
- [48] P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. Structure of an hiv gp120 envelope glycoprotein in complex with the cd4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393: 648–659 (1998)
- [49] Jacob P Lalezari, Keith Henry, Mary O’Hearn, Julio S G Montaner, Peter J Piliero, Benoit Trottier, Sharon Walmsley, Calvin Cohen, Daniel R Kuritzkes, Joseph J Eron, Jain Chung, Ralph DeMasi, Lucille Donatucci, Claude Drobnes, John Delehanty, Miklos Salgo, and T. O. R. O. 1 Study Group. Enfuvirtide, an hiv-1 fusion inhibitor, for drug-resistant hiv infection in north and south america. *N Engl J Med*, 348: 2175–2185 (2003)
- [50] Max Lataillade and Michael J Kozal. The hunt for hiv-1 integrase inhibitors. *AIDS Patient Care STDS*, 20: 489–501 (2006)
- [51] Adriano Lazzarin, Bonaventura Clotet, David Cooper, Jacques Reynes, Keikawus Arastéh, Mark Nelson, Christine Katlama, Hans-Jürgen Stellbrink, Jean-François Del-frayssy, Joep Lange, Les Huson, Ralph DeMasi, Cynthia Wat, John Delehanty, Claude

- Drobnes, Miklos Salgo, and T. O. R. O. 2 Study Group. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant hiv-1 in europe and australia. *N Engl J Med*, 348: 2186–2195 (2003)
- [52] C. K. Leonard, M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 265: 10373–10382 (1990)
- [53] Pin-Fang Lin, Wade Blair, Tao Wang, Timothy Spicer, Qi Guo, Nannan Zhou, Yi-Fei Gong, H-G. Heidi Wang, Ronald Rose, Gregory Yamanaka, Brett Robinson, Chang-Ben Li, Robert Fridell, Carol Deminie, Gwendeline Demers, Zheng Yang, Lisa Zadajura, Nicholas Meanwell, and Richard Colonna. A small molecule hiv-1 inhibitor that targets the hiv-1 envelope and inhibits cd4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 11013–11018 (2003)
- [54] Susan J Little, Sarah Holte, Jean-Pierre Routy, Eric S Daar, Marty Markowitz, Ann C Collier, Richard A Koup, John W Mellors, Elizabeth Connick, Brian Conway, Michael Kilby, Lei Wang, Jeannette M Whitcomb, Nicholas S Hellmann, and Douglas D Richman. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with hiv. *N Engl J Med*, 34:385–394 (2002)
- [55] Jun Liu, Alberto Bartesaghi, Mario J Borgnia, Guillermo Sapiro, and Sriram Subramaniam. Molecular architecture of native hiv-1 gp120 trimers. *Nature*, 455: 109–113 (2008)
- [56] Jing Lu, Steven G Deeks, Rebecca Hoh, George Beatty, Benjamin A Kuritzkes, Jeffrey N Martin, and Daniel R Kuritzkes. Rapid emergence of enfuvirtide resistance in hiv-1-infected patients: results of a clonal analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 43: 60–64 (2006)
- [57] Navid Madani, Ana Luisa Perdigoto, Kumar Srinivasan, Jason M Cox, Jason J Chroma, Judith LaLonde, Martha Head, Amos B Smith, and Joseph G Sodroski. Localized changes in the gp120 envelope glycoprotein confer resistance to human immunodeficiency virus entry inhibitors bms-806 and 155. *J Virol*, 78: 3742–3752 (2004)
- [58] Andre J Marozsan, Shawn E Kuhmann, Thomas Morgan, Carolina Herrera, Enid Rivera-Troche, Serena Xu, Bahige M Baroudy, Julie Strizki, and John P Moore. Generation and properties of a human immunodeficiency virus type 1 isolate resistant to the small molecule ccr5 inhibitor, sch-417690 (sch-d). *Virology*, 338: 182–199 (2005)
- [59] H. Masur, M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Stouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray, and S. Cunningham-Rundles.

- An outbreak of community-acquired pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med*, 305: 1431–1438 (1981)
- [60] Tom Matthews, Miklos Salgo, Michael Greenberg, Jain Chung, Ralph DeMasi, and Dani Bolognesi. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of hiv-1 into host cd4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov*, 3: 215–225 (2004)
- [61] Sherene Min, Ivy Song, Julie Borland, Shuguang Chen, Yu Lou, Tamio Fujiwara, and Stephen C. Piscitelli. Pharmacokinetics and safety of s/gsk1349572, a next-generation hiv integrase inhibitor, in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 254–258 (2010)
- [62] S. Modrow, B. H. Hahn, G. M. Shaw, R. C. Gallo, F. Wong-Staal, and H. Wolf. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol*, 61: 570–578 (1987)
- [63] Hiroshi Mohri and Martin Markowitz. In vitro characterization of multidrug-resistant hiv-1 isolates from a recently infected patient associated with dual tropism and rapid disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 48: 511–521 (2008)
- [64] John P Moore and Robert W Doms. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 10598–10602 (2003)
- [65] Penny L Moore, Tonie Cilliers, and Lynn Morris. Predicted genotypic resistance to the novel entry inhibitor, bms-378806, among hiv-1 isolates of subtypes a to g. *AIDS*, 18: 2327–2330 (2004)
- [66] W. G. Nichols, H. M. Steel, T. Bonny, K. Adkison, L. Curtis, J. Millard, K. Kabeya, and N. Clumeck. Hepatotoxicity observed in clinical trials of aplaviroc (gw873140). *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 858–865 (2008)
- [67] Robert A Ogert, Lei Ba, Yan Hou, Catherine Buontempo, Ping Qiu, Jose Duca, Nicholas Murgolo, Peter Buontempo, Robert Ralston, and John A Howe. Structure-function analysis of human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acid mutations associated with resistance to the ccr5 coreceptor antagonist vicriviroc. *J Virol*, 83: 12151–12163 (2009)
- [68] Armin Papkalla, Jan Münch, Claas Otto, and Frank Kirchhoff. Nef enhances human immunodeficiency virus type 1 infectivity and replication independently of viral coreceptor tropism. *J Virol*, 76: 8455–8459 (2002)
- [69] Theodore C Pierson, Robert W Doms, and Stefan Pöhlmann. Prospects of hiv-1 entry inhibitors as novel therapeutics. *Rev Med Virol*, 14: 255–270 (2004)

- [70] B. Ramratnam, J. E. Mittler, L. Zhang, D. Boden, A. Hurley, F. Fang, C. A. Macken, A. S. Perelson, M. Markowitz, and D. D. Ho. The decay of the latent reservoir of replication-competent hiv-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med*, 6: 82–85 (2000)
- [71] C. Rizzuto and J. Sodroski. Fine definition of a conserved ccr5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16: 741–749 (2000)
- [72] Stefano Rusconi, Andrea Scozzafava, Antonio Mastrolorenzo, and Claudiu T Supuran. An update in the development of hiv entry inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 7: 1273–1289 (2007)
- [73] Katherine Samaras. Metabolic consequences and therapeutic options in highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-1 infection. *J Antimicrob Chemother*, 61: 238–245 (2008)
- [73] Michael Schindler, Jan Münch, Olaf Kutsch, Hui Li, Mario L Santiago, Frederic Bibollet-Ruche, Michaela C Müller-Trutwin, Francis J Novembre, Martine Peeters, Valerie Courgnaud, Elizabeth Bailes, Pierre Roques, Donald L Sodora, Guido Silvestri, Paul M Sharp, Beatrice H Hahn, and Frank Kirchhoff. Nef-mediated suppression of t cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to hiv-1. *Cell*, 125: 1055–1067 (2006)
- [74] Paul E. Sax, Edwin DeJesus, Anthony Mills, Andrew Zolopa, Calvin Cohen, David Wohl, Joel E. Gallant, Hui C. Liu, Lijie Zhong, Kitty Yale, Kirsten White, Brian P. Kearney, Javier Szwarcberg, Erin Quirk, Andrew K. Cheng, and G. S-U. S-236-0102 study team . Co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir versus co-formulated efavirenz, emtricitabine, and tenofovir for initial treatment of hiv-1 infection: a randomised, double-blind, phase 3 trial, analysis of results after 48 weeks. *Lancet*, 379: 2439–2448 (2012)
- [75] Michael Schindler, Jan Münch, Olaf Kutsch, Hui Li, Mario L Santiago, Frederic Bibollet-Ruche, Michaela C Müller-Trutwin, Francis J Novembre, Martine Peeters, Valerie Courgnaud, Elizabeth Bailes, Pierre Roques, Donald L Sodora, Guido Silvestri, Paul M Sharp, Beatrice H Hahn, and Frank Kirchhoff. Nef-mediated suppression of t cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to hiv-1. *Cell*, 125: 1055–1067 (2006)
- [76] R. W. Shafer and D. A. Vuitton. Highly active antiretroviral therapy (haart) for the treatment of infection with human immunodeficiency virus type 1. *Biomed Pharmacother*, 53: 73–86 (1999)

- [77] P. M. Sharp, E. Bailes, R. R. Chaudhuri, C. M. Rodenburg, M. O. Santiago, and B. H. Hahn. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356: 867–876 (2001)
- [78] Kazuya Shimura, Eiichi Kodama, Yasuko Sakagami, Yuji Matsuzaki, Wataru Watanabe, Kazunobu Yamataka, Yasuo Watanabe, Yoshitsugu Ohata, Satoki Doi, Motohide Sato, Mitsuki Kano, Satoru Ikeda, and Masao Matsuoka. Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (jtk-303/gs-9137). *J Virol*, 82: 764–774 (2008)
- [79] T. Shioda, S. Oka, S. Ida, K. Nokihara, H. Toriyoshi, S. Mori, Y. Takebe, S. Kimura, K. Shimada, and Y. Nagai. A naturally occurring single basic amino acid substitution in the v3 region of the human immunodeficiency virus type 1 env protein alters the cellular host range and antigenic structure of the virus. *J Virol*, 68: 7689–7696 (1994)
- [80] Z. Si, M. Cayabyab, and J. Sodroski. Envelope glycoprotein determinants of neutralization resistance in a simian-human immunodeficiency virus (shiv-hxhc2p 3.2) derived by passage in monkeys. *J Virol*, 75: 4208–4218 (2001)
- [81] Zhihai Si, Navid Madani, Jason M Cox, Jason J Chruma, Jeffrey C Klein, Arne Schön, Ngoc Phan, Liping Wang, Alyssa C Biorn, Simon Cocklin, Irwin Chaiken, Ernesto Freire, Amos B Smith, and Joseph G Sodroski. Small-molecule inhibitors of hiv-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 5036–5041 (2004)
- [82] K. E. Squires. An introduction to nucleoside and nucleotide analogues. *Antivir Ther*, 6: 1–14 (2001)
- [83] B. R. Starcich, B. H. Hahn, G. M. Shaw, P. D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E. S. Parks, W. P. Parks, S. F. Josephs, and R. C. Gallo. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of htlv- iii/lav, the retrovirus of aids. *Cell*, 45: 637–648 (1986)
- [84] Mario Stevenson. Hiv-1 pathogenesis. *Nat Med*, 9: 853–860 (2003)
- [85] François Stricher, Loïc Martin, Philippe Barthe, Vivian Pogenberg, Alain Mechulam, André Menez, Christian Roumestand, Francisco Veas, Catherine Royer, and Claudio Vita. A high-throughput fluorescence polarization assay specific to the cd4 binding site of hiv-1 glycoproteins based on a fluorescein-labelled cd4 mimic. *Biochem J*, 390: 29–39 (2005)
- [86] K. Tachibana, S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto, and T. Nagasawa.

The chemokine receptor *cxcr4* is essential for vascularization of the gastro-intestinal tract. *Nature*, 393: 591–594 (1998)

[87] C. Teixeira, N. Serradji, F. Maurel, and F. Barbault. Docking and 3d-qsar studies of bms-806 analogs as hiv-1 gp120 entry inhibitors. *Eur J Med Chem*, 44: 3524–3532 (2009)

[88] John C Tilton and Robert W Doms. Entry inhibitors in the treatment of hiv-1 infection. *Antiviral Res*, 85: 91–100 (2010)

[89] John C Tilton, Craig B Wilen, Chukwuka A Didigu, Rohini Sinha, Jessamina E Harrison, Caroline Agrawal-Gamse, Elizabeth A Henning, Frederick D Bushman, Jeffrey N Martin, Steven G Deeks, and Robert W Doms. A maraviroc-resistant hiv-1 with narrow cross-resistance to other *ccr5* antagonists depends on both n-terminal and extracellular loop domains of drug-bound *ccr5*. *J Virol*, 84: 10863–10876 (2010)

[90] Brian Tomkowicz and Ronald G Collman. Hiv-1 entry inhibitors: closing the front door. *Expert Opin Ther Targets*, 8: 65–78 (2004)

[91] Fotini Tsamis, Svetlana Gavrilov, Francis Kajumo, Christoph Seibert, Shawn Kuhmann, Tom Ketas, Alexandra Trkola, Anadan Palani, John W Clader, Jayaram R Tagat, Stuart McCombie, Bahige Baroudy, John P Moore, Thomas P Sakmar, and Tatjana Dragic. Analysis of the mechanism by which the small-molecule *ccr5* antagonists sch-351125 and sch-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol*, 77: 5201–5208 (2003)

[92] B. G. Turner and M. F. Summers. Structural biology of hiv. *J Mol Biol*, 285: 1–32 (1999)

[93] Bruce D Walker and Dennis R Burton. Toward an aids vaccine. *Science*, 320: 760–764 (2008)

[94] Laura M Walker, Sanjay K Phogat, Po-Ying Chan-Hui, Denise Wagner, Pham Phung, Julie L Goss, Terri Wrin, Melissa D Simek, Steven Fling, Jennifer L Mitcham, Jennifer K Lehrman, Frances H Priddy, Ole A Olsen, Steven M Frey, Phillip W Hammond, Protocol G Principal Investigators, Stephen Kaminsky, Timothy Zamb, Matthew Moyle, Wayne C Koff, Pascal Poignard, and Dennis R Burton. Broad and potent neutralizing antibodies from an african donor reveal a new hiv-1 vaccine target. *Science*, 326: 285–289 (2009)

[95] Sharon L. Walmsley, Antonio Antela, Nathan Clumeck, Dan Duiculescu, Andrea Eberhard, Felix Gutiérrez, Laurent Hocqueloux, Franco Maggiolo, Uriel Sandkovsky, Catherine Granier, Keith Pappa, Brian Wynne, Sherene Min, Garrett Nichols, and S.

- I. N. G. L. E Investigators . Dolutegravir plus abacavir-lamivudine for the treatment of hiv-1 infection. *N Engl J Med*, 369:1807–1818 (2013)
- [96] Tao Wang, Zhongxing Zhang, Owen B Wallace, Milind Deshpande, Haiquan Fang, Zheng Yang, Lisa M Zadjura, Donald L Tweedie, Stella Huang, Fang Zhao, Sunanda Ranadive, Brett S Robinson, Yi-Fei Gong, Keith Ricarrdi, Timothy P Spicer, Carol Deminie, Ronald Rose, Hwei-Gene Heidi Wang, Wade S Blair, Pei-Yong Shi, Pin-Fang Lin, Richard J Colonno, and Nicholas A Meanwell. Discovery of 4-benzoyl-1-[(4-methoxy-1h-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)oxoacetyl]-2-(r)-methylpiperazine (bms-378806): a novel hiv-1 attachment inhibitor that interferes with cd4-gp120 interactions. *J Med Chem*, 46: 4236–4239 (2003)
- [97] W. K. Wang, M. Y. Chen, C. Y. Chuang, K. T. Jeang, and L. M. Huang. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J Microbiol Immunol Infect*, 33: 131–140 (2000)
- [98] Carol D Weiss. Hiv-1 gp41: mediator of fusion and target for inhibition. *AIDS Rev*, 5: 214–221 (2003)
- [99] W. Weissenhorn, A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. Atomic structure of the ectodomain from hiv-1 gp41. *Nature*, 387: 426–430 (1997)
- [100] R. Wyatt, P. D. Kwong, E. Desjardins, R. W. Sweet, J. Robinson, W. A. Hendrickson, and J. G. Sodroski. The antigenic structure of the hiv gp120 envelope glycoprotein. *Nature*, 393: 705–711 (1998)
- [101] R. Wyatt and J. Sodroski. The hiv-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, 280: 1884–1888 (1998)
- [102] Shi-Hua Xiang, Peter D Kwong, Rishi Gupta, Carlo D Rizzuto, David J Casper, Richard Wyatt, Liping Wang, Wayne A Hendrickson, Michael L Doyle, and Joseph So-droski. Mutagenic stabilization and/or disruption of a cd4-bound state reveals distinct con-formations of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein. *J Virol*, 76: 9888–9899 (2002)
- [103] Zheng Yang, Lisa Zadjura, Celia D’Arienzo, Anthony Marino, Kenneth Santone, Lewis Klunk, Douglas Greene, Pin-Fang Lin, Richard Colonno, Tao Wang, Nicholas Meanwell, and Steven Hansel. Preclinical pharmacokinetics of a novel hiv-1 attachment inhibitor bms-378806 and prediction of its human pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dis-pos*, 26: 387–402 (2005)
- [104] Xiaoping Zhang, Jacob P Lalezari, Andrew D Badley, Albert Dorr, Stanley J Kolis, Tosca Kinchelov, and Indravadan H Patel. Assessment of drug-drug interaction

potential of enfuvirtide in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Clin Pharmacol Ther*, 75: 558–568 (2004)

[105] Ping Zhu, Jun Liu, Julian Bess, Elena Chertova, Jeffrey D Lifson, Henry Grisé, Gilad A Ofek, Kenneth A Taylor, and Kenneth H Roux. Distribution and three-dimensional structure of aids virus envelope spikes. *Nature*, 44: 847–852 (2006)

[106] Y. R. Zou, A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, and D. R. Littman. Function of the chemokine receptor *cxcr4* in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393: 595–599 (1998)

## Danksagung

Herrn Professor Dr. F. Kirchhoff danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut Molekulare Virologie der Universität Ulm durchführen zu können.

Herrn Professor Dr. med. Michel danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Ulm zu vertreten.

Herrn Professor Dr. J. Münch danke ich für seine exzellente Betreuung, Förderung meiner Arbeit und seine Geduld.

Herrn Dr. Raghavan Chinnadurai danke ich für seine Anleitung, ständige Diskussionsbereitschaft und sein großes Engagement.

Vielen weiteren ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Abteilung, insbesondere Steffen Lorenz, Michael Schindler und Thomas Grotthenthaler danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und die tolle Laboratmosphäre.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an meine Eltern für ihr einzigartiges Vermögen mich immer von neuem zu motivieren und dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglichten.

## Lebenslauf

**Name** Thomas Christian Eder

**Geburtstag** 14.09.1982

**Geburtsort** Göppingen

### Schulbildung

09/1989 - 08/1993 Grundschule in Eschenbach

09/1993 - 07/2002 Gymnasium in Göppingen, Abschluss: Abitur 1,4

### Studium

10/2002 - 09/2004 Universität Ulm, Humanmedizin, vorklinischer Studienabschnitt

09/2004 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Abschlussnote 2,6

10/2004 - 02/2008 Universität Ulm, Humanmedizin, klinischer Studienabschnitt

### Praktisches Jahr

02/2008 - 06/2008 Universität Ulm, Anästhesie

06/2008 - 09/2008 Spital Zimmerberg, Schweiz, Chirurgie

10/2008 - 11/2008 Universität Ulm, Innere Medizin, Infektiologie

12/2008 - 01/2009 Wellington School of Medicine, University of Otago, Neuseeland

Innere Medizin, Notfall- und Intensivmedizin

10/2009 - 11/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Abschlussnote 2,0

### Beruf

06/2010-08/2011 Assistenzarzt für Chirurgie, Seespital Horgen, Schweiz

09/2011- aktuell Assistenzarzt für Innere Medizin, Katharinen Hospital, Stuttgart

### Promotion

08/2005 „Bedeutung der hydrophoben Tasche im ungebundenen Gp120 des HIV-1-Virus für die virale Infektiosität und Sensitivität gegenüber Entry-Inhibitoren“

Betreuer: Prof. Dr. Jan Münch, Institute of Molecular

Virology, Universitätsklinik Ulm