

**Charakterisierung genetischer,
viraler und immunologischer Eigenschaften
von HIV-1 Langzeit Nicht-Progressierenden Patienten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrads
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann-Wolfgang Goethe Universität
in Frankfurt am Main

von
Sascha Martin Antoni
aus Hanau, Hessen

Frankfurt 2008

D30

Vom Fachbereich 14 (Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

ZUSAMMENFASSUNG

Verglichen mit normal progredierenden HIV-1 Infizierten weisen Langzeit Nicht-Progredierende (LTNP), trotz chronischer Infektion und ohne antivirale Therapie, keinerlei Anzeichen einer klinischen Progression sowie stabil hohe CD4⁺-Zellzahlen und eine geringe Viruslast auf. Für diesen ungewöhnlichen Infektionsverlauf wurden mehrere virologische, genetische und immunologische Ursachen in der Literatur beschrieben. Anhand einer gut charakterisierten LTNP-Kohorte und einer Kontrollgruppe mit vergleichbaren klinischen Markern, wurde hier der Einfluss der einzelnen Faktoren, vor allem der humoralen Immunantwort, auf den Infektionsverlauf analysiert.

Die Analyse viraler und patienteneigener Gene zeigt, dass keiner der LTNP die *ccr5Δ32* Mutation aufweist und auch der Vergleich der viralen Proteine Env, Nef, Rev, Tat und Vpr ergab keine zwingende Ursache für ein Ausbleiben der Progression. So zeigt sich zwar eine Anreicherung von Insertionen in den Variablen Schleifen (v.a. V1/V2) in den Env der LTNP-Viren, die Funktionalität der viralen Hüllproteine wurde jedoch mit Hilfe HIV-1 Env-rekombinanter Reporterviren aufgezeigt. Die HIV-1 Env-rekombinanten Reporterviren der LTNP unterschieden sich weder in ihrer Infektiosität, noch in der Effizienz der frühen Replikationsschritte von den korrespondierenden Viren der HIV-1 Kontrollpatienten, was einen entscheidenden Einfluss der Hüllproteine auf den Infektionsverlauf nahezu ausschließt. Seitens der zellulären Immunantwort wurden in einigen LTNP HLA-B Typen identifiziert, die in der Literatur mit einem verlangsamten Infektionsverlauf und einer ausgeprägten zellulären Immunantwort in Verbindung gebracht wurden. Die Untersuchung der zellulären Immunantwort der LTNP (außerhalb dieser Arbeit) ergab jedoch keine Besonderheiten, was den Einfluss der identifizierten HLA-B Typen auf den nicht-progredierenden Infektionsverlauf relativiert. Die humorale Immunantwort der Patienten wurde in umfassenden Neutralisationsstudien mit Hilfe der HIV-1 Env-rekombinanten Reporterviren analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die LTNP, verglichen mit den HIV-1 Kontrollpatienten, eine signifikant bessere humorale Immunantwort besitzen. Zusammen mit den zuvor gewonnenen Erkenntnissen legt dies einen entscheidenden Einfluss neutralisierender Antikörper am Nicht-Progredieren der LTNP nahe.

Durch den Einsatz HIV-1 Env-spezifischer Peptidphagen wurde die humorale Immunantwort der zwei Patientengruppen weiter untersucht, wobei einige Unterschiede zwischen der Antikörperantwort der LTNP und HIV-1 Kontrollpatienten aufgezeigt wurden. Mit Hilfe dieser Peptidphagen wurde in Versuchstieren eine HIV-1 Env-reaktive Immunantwort induziert. Die Fusion von Myelomzellen mit den B-Zellen der immunisierten Tiere und die anschließende Selektion führten zur Isolierung HIV-1 Env-spezifischer Hybridomazellen.

Um sich den Vorteil der langjährigen Antikörperreifung in den Patienten selbst zu Nutze zu machen und gezielt breit-neutralisierende Antikörper zu isolieren, wurden, ausgehend von B-Zell mRNA der LTNP, patienteneigene scF_v Phagen Display Bibliotheken erstellt. Die *in vitro* Selektion dieser scF_v Phagen Display Bibliotheken mit unterschiedlichen HIV-1 Env Varianten führte zur Isolierung einiger HIV-1 Env spezifischer scF_v-Phagen. Die Untersuchung der Bindungseigenschaften des reaktivsten scF_v-Phagens zeigte eine breite Reaktivität gegen unterschiedliche HIV-1 Env Varianten, die durch HIV-1 positives Serum kompetiert werden konnte. Das Epitop dieses scF_v-Phagens wurde in der Variablen Schleife 3 von HIV-1 Env lokalisiert.

Diese Arbeit zeigt den entscheidenden Einfluss der humoralen Immunantwort für die nicht-progredierende Infektion der hier untersuchten LTNP und gibt erste Hinweise auf mögliche Ursachen für die außergewöhnlich breite Serumreaktivität. Die Identifikation charakteristischer Eigenschaften in der humoralen Immunantwort, sowie die Identifizierung der hierfür verantwortlichen Antikörper kann bei der Entwicklung aktiver oder passiver Vakzine von entscheidendem Vorteil sein oder als Ausgangspunkt für neue therapeutische Ansätze dienen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Humanes Immundefizienz Virus Typ 1	1
1.1.1. Historie, Klassifizierung und Pandemie	1
1.1.2. Genom von HIV-1	3
1.1.3. Aufbau und Struktur	4
1.1.4. Replikationszyklus	5
1.1.5. Die Hüllproteine gp120 und gp41	7
1.1.6. Normaler, schneller und langsamer Infektionsverlauf	12
1.1.7. Mögliche Ursachen für LTNP	13
1.1.8. Neutralisierende Antikörper gegen HIV-1	16
1.2. Rekombinante Antikörper	19
1.2.1. Struktur & Funktion von Antikörpern	19
1.2.2. Organisation und Expression von Antikörpergenen	20
1.2.3. Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente	21
1.3. Phagen Display	23
1.3.1. Aufbau und Struktur des M13 Phagen	23
1.3.2. Phagen Display randomisierter Peptide	23
1.3.3. Phagen Display rekombinanter Antikörperfragmente	24
1.4. Überblick und Projektbeschreibung	25
2. Material und Methoden	27
2.1. Material	27
2.1.1. Laborgeräte	27
2.1.2. Einwegmaterial	28
2.1.3. Biochemische Kits	28
2.1.4. Chemikalien	29
2.1.5. Enzyme und Inhibitoren	31
2.1.6. Antikörper	31
2.1.7. Peptidbibliotheken	31

2.2. Medien, Lösungen und Puffer in der Molekularbiologie	32
2.2.1. Medien	32
2.2.2. Lösungen	32
2.2.3. Puffer	34
2.3. Medien, Lösungen und Puffer in der Zellkultur	34
2.3.1. Medien	34
2.3.2. Lösungen	36
2.3.3. Puffer	37
2.4. Organismen	37
2.4.1. Zelllinien	37
2.4.2. Mausstämme	39
2.4.3. Bakterienstämme	39
2.4.4. Helferphage	39
2.4.5. Viren	39
2.5. Primer	40
2.6. Plasmide	40
2.7. EDV	40
2.8. Methoden	41
2.8.1. Amplifikation von HIV-1 <i>env</i> Genen	41
2.8.2. Klonierung HIV-1 Env-rekombinanter Reporterviren (RRV)	43
2.8.3. Sequenzierung der DNA	46
2.8.4. Sequenzmusteranalyse	46
2.8.5. Bestimmung der N-Glycosylierungsstellen	46
2.8.6. Herstellung HIV-1 Env-RRV	46
2.8.7. Infektiosität HIV-1 Env-RRV	47
2.8.8. Bestimmung der Replikationskompetenz HIV-1 Env-RRV	48
2.8.9. Neutralisation HIV-1 Env-RRV	49
2.8.10. Statistik	50
2.8.11. Phagen-ELISA	51
2.8.12. Immunisierungsstudien	51
2.8.13. Expression und Aufreinigung von HIV-1 Env	52
2.8.14. HIV-1 Env-ELISA	52

2.8.15. HIV-1 Env-Westernblot	53
2.8.16. Selektion von HIV-1 spezifischen Hybridomazellen	53
2.8.17. Herstellung von scF _v -Phagen Bibliotheken	55
2.8.18. Biopanning mit scF _v -Phagen	56
3. Ergebnisse	61
3.1. Genetische Untersuchungen	61
3.1.1. Klinische Daten der untersuchten Patienten	61
3.1.2. Klonierung HIV-1 Env-RRV	62
3.1.3. Sequenzanalyse von HIV-1 Env, Nef, Rev, Tat, Vpr	63
3.1.4. <i>ccr5</i> Genotyp und HLA-B Typisierung	72
3.2. Untersuchungen HIV-1 Env-RRV	73
3.2.1. Herstellung HIV-1 Env-RRV	73
3.2.2. Infektiosität HIV-1 Env-RRV	73
3.2.3. Replikation der HIV-1 Env-RRV	74
3.2.4. Neutralisation HIV-1 Env-RRV	77
3.3. Untersuchungen mit Peptidphagen	78
3.3.1. Kreuzreaktivität der Peptidphagen	78
3.3.2. Kompetitionsstudien der Peptidphagenbindung an Serumantikörper mit trimeren HIV-1 Env	81
3.4. Expression und Aufreinigung von HIV-1 Env	82
3.5. Immunisierungsstudien	83
3.5.1. Bindungsreaktivität nach Immunisierung	83
3.5.2. Selektion HIV-1 spezifischer Hybridomazellen	86
3.6. Untersuchungen mit scF _v -Phagenbibliotheken	87
3.6.1. Biopanning mit scF _v -Phagen	87
3.6.2. Bindungsstudien HIV-1 spezifischer scF _v	90
4. Diskussion	93
4.1. Genetische Untersuchungen	93
4.1.1. Klinische Daten der untersuchten Patienten	93
4.1.2. Analyse der HIV-1 Gene <i>env</i> , <i>nef</i> , <i>ref</i> , <i>tat</i> , <i>vpr</i>	94
4.1.3. <i>ccr5</i> Genotyp und HLA-B Typisierung	99

4.2. Infektiosität und Effizienz der frühen Replikationsschritte HIV-1 Env-RRV	101
4.3. Neutralisation von HIV-1 Env-RRV	103
4.4. Untersuchungen mit Peptidphagen	106
4.4.1. Kreuzreaktivität der Peptidphagen	106
4.4.2. Kompetitionsstudien der Peptidphagenbindung an Serumantikörper mit trimeren HIV-1 Env	108
4.4.3. Bindungsreaktivität nach Immunisierung	110
4.4.4. Selektion HIV-1 spezifischer Hybridomazellen	111
4.5. Untersuchungen mit scF _v -Phagen Display Bibliotheken	112
4.5.1. Biopanning mit scF _v -Phagen	112
4.5.2. Bindungsstudien HIV-1 spezifischer scF _v	114
5. Verzeichnisse	117
5.1. Referenzen	117
5.2. Eigene Veröffentlichungen	141
5.2.1. Publikationen	141
5.2.2. Posterpräsentationen	141
5.3. Abbildungsverzeichnis	143
5.4. Tabellenverzeichnis	144
5.5. Abkürzungsverzeichnis	145
5.5.1. Allgemeine Abkürzungen	145
5.5.2. Präfixe für Größeneinheiten	148
5.5.3. Abkürzungen für Aminosäuren	149
6. Anhang	150
6.1. Verlauf der klinischen Daten	150
6.2. Alignment der untersuchten HIV-1 Env Proteine	152
6.3. Neutralisation HIV-1 Env-rekombinanter Reporterviren	160
6.4. Kompetitionsstudien der HIV-1 spezifischen Peptidphagen	161
6.5. Hybridoma-ELISA Untersuchung	162

1. Einleitung

1.1. Humanes Immundefizienz Virus Typ 1

1.1.1. Historie, Klassifizierung und Pandemie

1.1.1.1. Historie

Zu Beginn der 1980er Jahre isoliert die Gruppe um L. Montagnier am Pasteur Institut in Paris aus einem Patienten mit erworbener Immunschwäche (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) ein bisher unbekanntes T-lymphotropes Retrovirus und bezeichnet dieses als Lymphadenopathie-assoziiertes Virus (LAV)¹⁴. Zur gleichen Zeit weisen R. Gallo und seine Mitarbeiter am National Institut of Health (NIH) in Bethesda, Maryland in Patienten einen neuen Subtyp von T-Zell Leukämie Viren (HTLV Typ III) nach und zeigen, dass deren Tropismus zu einem Verlust CD4⁺ Lymphozyten und zur Ausbildung von AIDS führt^{105,106}. In den folgenden Jahren stellt sich heraus, dass es sich in beiden Fällen um das gleiche Virus handelt, weshalb das Internationale Komitee für die Taxonomie von Viren (ICTV) 1986 beschließt, die bisherigen Bezeichnungen durch die einheitliche Bezeichnung Humanes Immundefizienz Virus Typ I (HIV-1) zu ersetzen⁶². Auch im Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main wurden in der Arbeitsgruppe von H. Rübsamen-Waigmann *et al.* mehrere HIV-1 und HIV-2 Isolate isoliert und charakterisiert^{80,175}.

1.1.1.2. Klassifizierung

HIV-1 und HIV-2 zählen zur Familie der *Retroviridae*, Gattung: *Lentiviridae*. Hierbei handelt es sich um Hüllviren komplexer Struktur mit einem Dimer von Einzelstrang RNA (positive single-strand RNA; (+)ssRNA) als Genom. Die Gattungsbezeichnung Lentivirus (von lat. lenti = langsam) bezieht sich auf die langsam fortschreitenden, chronisch degenerativen Infektionen bzw. Krankheiten, die durch diese Viren ausgelöst werden. Ihre Fähigkeit, nicht teilungsaktive Zellen zu infizieren, grenzt sie von den anderen *Retroviridae* ab. Neben HIV-1 und HIV-2 gehören unter anderem SIV (Simiane Immundefizienz Viren bei Primaten), FIV (Feline Immundefizienz Viren bei Haus- und Großkatzen), BIV (Bovine Immundefizienz Viren bei Rindern) zur Gattung der Lentiviren.

Basierend auf Sequenzanalysen wird HIV-1 in drei Gruppen eingeteilt¹⁸⁷. GRUPPE M (main-group) umfasst die Subtypen A (Gruppen A1, A2), B, C, D, E (bisher nicht nachgewiesen), F (Gruppen F1, F2), G, H, J und K sowie die zirkulierenden, rekombinanten Formen (CIRCULATING RECOMBINANT FORM; CRF), welche sich nach einer Zoonose von SIVcpz (Schimpansen SIV) auf den Menschen entwickelt haben^{107,307}. GRUPPE O (outlier-group) umfasst nicht klar einzuordnende Sequenzen. Lange wurde diese Gruppe auf eine

Übertragung von SIVcpz auf den Menschen zurückgeführt, jedoch deuten neue Ergebnisse auf einen Übertritt von SIVgo (Gorilla SIV) auf den Menschen hin³³⁹. GRUPPE N (not-M, not-O group oder auch new-group) umfasst weitere, nicht zuzuordnende Sequenzen, die ebenfalls auf SIVcpz zurückgeführt werden, sich jedoch klar von den beiden anderen Gruppen unterscheidet¹⁶¹. Schimpansen und Gorillas selbst scheinen nicht das natürliche Reservoir des Virus, sondern nur ein Übergangswirt zu sein. Vielmehr wird die Rekombination verschiedener SIV-Varianten in Schimpansen oder einem bisher nicht identifizierten Wirt und die anschließende Übertragung auf den Menschen als der Ursprung von HIV-1 angesehen¹²⁹.

HIV-2 ist nur zu rund 45% homolog mit HIV-1 und stellt einen eigenen Serotyp dar. Erste Fälle von HIV-2 Infektionen wurden im Jahr 1986 in Westafrika und später in Indien dokumentiert^{61,286}. Die größte Homologie zu HIV-2 besitzen SI-Viren von Rußmangabens (engl. sooty mangabeys), sog. SIVsm. Zahlreiche, voneinander unabhängige Zoonosen dieser SIVsm auf den Menschen führten zur Entstehung der HIV-2 Subtypen (A, B, C, D, E, F, G und H)^{109,291}.

1.1.1.3. Pandemie

Die erste dokumentierte Infektion mit HIV-1 geht auf einen Patienten aus dem Jahr 1959 in Kinshasa, Demokratische Republik Kongo zurück³⁷³. Der exakte Zeitpunkt der ersten Zoonose ist wegen der geringen Probenzahl nicht exakt festzustellen, erfolgte wohl aber um das Jahr 1931 in Zentralafrika^{170,171,173}. Seither hat sich die Bedrohung durch HIV-1 zur bedeutenden Pandemie ausgeweitet, so dass sie heute eine der größten gesundheitspolitischen Herausforderungen unserer Zeit darstellt. Weltweit wird diese vor allem durch die Subtypen C und A, in Europa und den USA durch den Subtyp B getragen. Die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization; WHO) schätzt die Zahl der weltweit HIV-1 Infizierten für das Jahr 2006 auf 33,2 (30,6 - 36,1) Millionen. Die Zahl der Neuinfektionen im gleichen Jahr gibt die WHO mit 2,5 (1,8 - 4,1) Millionen, die der AIDS Toten mit 2,1 (1,9 - 2,4) Millionen an. Trotz aller Fortschritte im Kampf gegen HIV-1, verursacht das Virus nach wie vor eine chronisch fortschreitende, lebenslang persistierende Infektion, bei der sich die Infizierten weiterhin dem Krankheitsbild AIDS und dem damit einhergehenden Tod gegenüber sehen. Das bisher einzige Mittel gegen HIV-1 ist die HAART Therapie. Die optimale Versorgung der Infizierten setzt jedoch ein gut organisiertes, solides Gesundheitssystem voraus, was, neben der hohen Kosten, den Einsatz dieser Medikamente weitgehend auf die Industrieländer beschränkt. Um den Zugang der finanzschwachen, jedoch am stärksten betroffenen, Volkswirtschaften Afrikas und Asiens zu diesen Medikamenten zu verbessern, stellen Pharmafirmen ihre Medikamente diesen Ländern immer häufiger zum Selbstkostenpreis zur Verfügung. Die immensen

Nebenwirkungen der Medikamente, sowie die schnelle und umfassende Resistenzbildung des Virus stellen jedoch weitere gravierende Nachteile der HAART Therapie dar. Während die Nebenwirkungen in neueren Medikamentengenerationen sukzessive verringert werden, ist das Problem der Resistenzbildung weiterhin nicht in den Griff zu bekommen, weshalb die HAART Therapie den Verlauf der Virämie nur aufzuschieben vermag.

1.1.2. Genom von HIV-1

Das Genom von HIV-1 ist ca. 10 kbp lang und wird am 5'- und 3'-Ende von einem LONG TERMINAL REPEAT (LTR) begrenzt. Die LTRs werden in die Regionen U3, R und U5 unterteilt und stellen nicht-translatierte Bereiche des Genoms dar, die über Enhancer- und Promotorsequenzen sowie speziellen RNA-Strukturen und interagierenden Nukleoproteinen regulatorisch auf die Replikation wirken. Neben den für Retroviren kanonischen Genen *gag*, *pol* und *env*, in denen alle essentiellen Strukturproteine und Enzyme codiert sind, sind im Genom von HIV-1 noch sechs regulatorische bzw. akzessorische Proteine codiert: Rev (Regulator of virion gene Expression; p19), Tat (Transcriptional Transactivator; p14), Nef (Negative Effector; p27), Vif (Viral infectivity factor; p23), Vpr (Viral protein R; p15) und Vpu (Viral protein U; p16) (Abbildung 1).

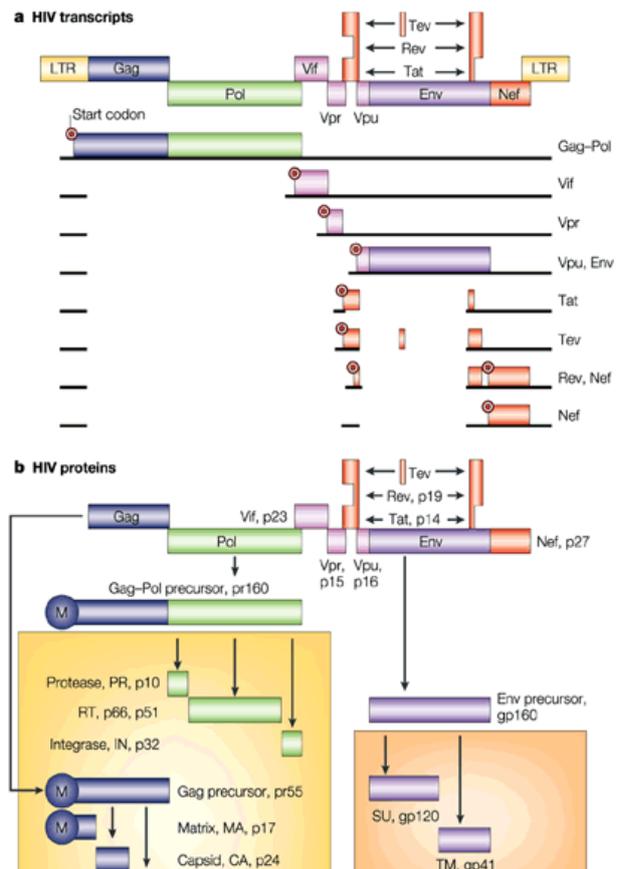


Abbildung 1: HIV-1 Genom, Transkripte & Proteine

A: Leserahmen im HIV-1 Genom, Transkripte und Spleißvarianten der mRNA zur Expression der einzelnen viralen Proteine. **B:** Proteine von HIV-1 und Prozessierung der Gag-Pol- und Env-Vorläuferproteine durch virale und zelluläre Proteasen²⁵⁷.

1.1.3. Aufbau und Struktur

HI-Viren sind membranumhüllte, sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 100 bis 120 nm³⁷². Die MEMBRANHÜLLE entstammt der infizierten Zelle und wird bei der Ausbildung neuer Viren Teil des viralen Partikels (1.1.4 unten). Sie trägt die viralen Hüllproteine gp41 und gp120 (ENVELOPE; Env). Hierbei ist gp41 in Trimeren in die Membran eingebettet (TRANSMEMBRANE UNIT; TM), während gp120 – ebenfalls in Trimeren – über nicht-kovalente Wechselwirkungen an die gp41-Trimere anlagert und auf der Virussoberfläche sitzt (SURFACE UNIT; SU)³⁵⁶. Der Komplex aus gp41/gp120 Trimeren wird als ENV-SPIKE bezeichnet und ist allein für die Fusion mit der Zellmembran verantwortlich. Ungleichmäßig in Clustern verteilt, variiert ihre Anzahl von 4 bis 35 (Mittelwert 14) je Partikel³⁷². Neben den viralen Hüllproteinen sind zelluläre Proteine (z.B. ICAM-1, Komplement- oder MHC-II Proteine) in der Membranhülle zu finden, die modulierend auf die Infektiosität wirken^{41,42,95,279,325}. An der Innenseite der Membranhülle angelagert befindet sich der ÄUßERE KERN: eine Sphäre aus Matrixproteinen (MA; p17). Im Inneren dieser Sphäre befinden sich einige Kopien der viralen Protease (PR; p11) sowie der INNERE KERN, das Kapsid. Diese kegelförmige Struktur aus Kapsidproteinen (CA; p24) umhüllt die Erbinformation des Virus. Jede vRNA bildet mit zahlreichen Nukleokapsidmolekülen (NC; p7) einen Komplex, an dem die Enzyme Reverse Transkriptase (RT; p66 mit RNaseH bzw. p51 ohne RNaseH) und Integrase (IN; p32) binden (Abbildung 2). Neben diesen für die Infektion unabdingbaren Enzymen, sind zwei Kopien der für die Initiation der Reversen Transkription notwendigen tRNA^{Lys} im Inneren Kern des Virus zu finden³³⁸.

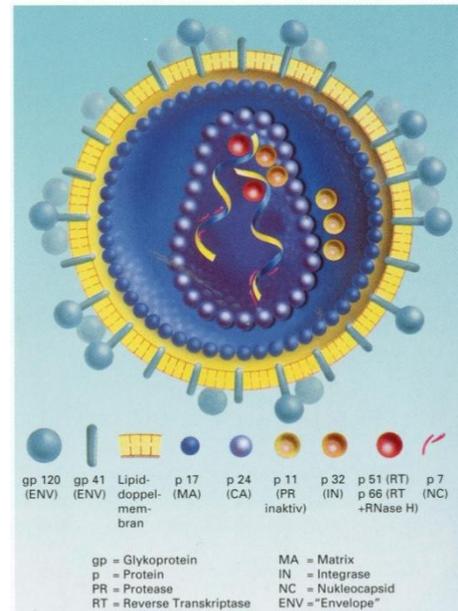


Abbildung 2: Schematischer Querschnitt von HIV-1

Die Lipidmembran (gelb) trägt mehrere gp41 Trimere, an die je ein gp120 Trimer assoziiert ist. Unter der Membran befindet sich der Äußere Kern aus Matrixproteinen. Dieser umgibt den Inneren Kern, das Kapsid, mit viraler RNA (vRNA, farbige Schleifen), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Zwischen den Kernen liegt die Protease (PR).

(aus *Klinischer Leitfaden HIV*, Abbott)

1.1.4. Replikationszyklus

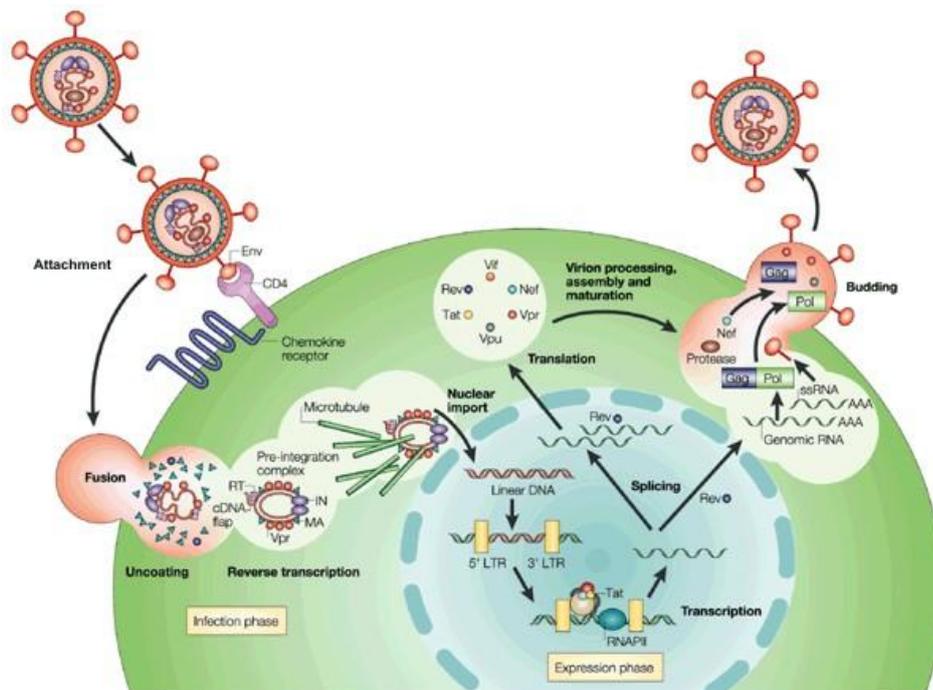


Abbildung 3: Replikationszyklus von HIV-1

Die Replikation beginnt mit der Interaktion der Hüllproteine mit CD4- und Corezeptormolekülen, was zur Fusion führt. Danach lösen sich Äußerer und Innerer Kern partiell auf und es erfolgt die Reverse Transkription der vRNA. Mit dem Transport in den Zellkern und der Integration in das Wirtszellgenom ist die frühe Phase der Replikation beendet. Der Beginn der späten Phase der Replikation wird durch Transkription der Proviren markiert. Die Transkripte dienen der Translation und als virales Genom. Reguliert durch pr55 erfolgt an der Zellmembran die Produktion neuer Viren²⁵⁹.

Die Replikation beginnt mit einer unspezifischen Anlagerung des Virus an die Zellmembran. Hierauf bindet Env an CD4-Rezeptoren, den primären Rezeptoren von HIV-1, was zu Umlagerungen in Env und Freilegung der Corezeptorbindungsstelle (CRBs) führt (Abbildung 3, ATTACHMENT)³². Als Corezeptor dienen verschiedene Chemokinrezeptoren, wobei nur die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 von klinischer Bedeutung sind. Die Primärinfektion erfolgt in der Regel über den CCR5 Chemokinrezeptor, während im späteren Verlauf der Infektion häufig der CXCR4 Chemokinrezeptor als Corezeptor dient. Erfolgt die Infektion über den CCR5 Chemokinrezeptor, bezeichnet man die Viren als R5-Isolate, dient CXCR4 als Corezeptor, werden die Isolate als X4-Isolate bezeichnet. Sind die Viren befähigt beide Corezeptoren zu nutzen, nennt man sie R5X4-Isolate^{16,22,78,82,229}. Durch die Corezeptorbindung kommt es zu erneuter Umlagerung im Env, die zur Membranfusion führen (Abbildung 3). Das ins Cytosol eingebrachte Kapsid löst sich nun auf und aus vRNA, tRNA^{Lys} (als Primer), RT, IN und weiteren Proteinen formiert sich der Reverse-Transkription Komplex (REVERSE TRANSCRIPTION COMPLEX; RTC) in dem die Reverse

Transkription der vRNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgt^{88,115}. Nach Synthese der cDNA bildet sich der Prä-Integrations Komplex (PRE-INTEGRATION COMPLEX; PIC), der über Mikrofilamente zur Kernmembran transportiert wird, wo ein aktiver, Importin-basierender Transport in den Zellkern erfolgt^{4,35,104,130,312,329,363}. Dies ermöglicht HIV-1 neben aktiven auch ruhende oder vollständig ausgereifte Zellen wie Makrophagen und Microgliazellen zu infizieren und so ‚versteckte‘ Reservoirs aufzubauen^{26,104,347}. Im Zellkern assoziiert der PIC mit der chromosomalen DNA und die Integrase vermittelt mit Hilfe der LTR die Integration der cDNA in aktive Bereiche (HOT-SPOTS) des Genoms^{51,345}. Durch die Bindung von TAT an das Transaktivator Response Element (TAR) im 5' LTR wird die basale Transkription des PROVIRUS durch die RNA-Polymerase II verstärkt (Abbildung 3)^{56,71,94}. Es kommt zur Ausbildung über 30 unterschiedlich gespleißter mRNA Varianten, deren Konzentration durch Rev und das REV RESPONSIVE ELEMENT (RRE) in *env* reguliert wird. Werden in der frühen Phase der Genexpression, hauptsächlich mehrfach gespleißte mRNAs zur Synthese regulatorischer Proteine (z.B. Tat, Rev, Nef) genutzt, so kommen in der späten Phase der Genexpression wenig und nicht-gespleißte mRNA Varianten zum Einsatz. Diese dienen zur Translation der Vorläuferproteine Gag-Pol (p160; 160 kDa MW) und Env (gp160; 160 kDa MW; glykosyliert), sowie als vRNA^{263,269}. Im Cytosol spaltet die virale Protease den Gag-Pol Vorläufer in einen Gag Vorläufer (p55; 55 kDa MW), Protease, Reverse Transkriptase und Integrase, während die Proteolyse von gp160 im Endoplasmatischen Retikulum durch die zelluläre Protease Furin oder Furin-ähnliche Proteasen erfolgt (Abbildung 1)^{251,356}. Nach Synthese aller Proteine erfolgt an der Zellmembran die Ausreifung neuer Viren. Protagonist hierbei ist pr55, dessen Strukturelemente für die Bindung an die Zellmembran (Myristoylierung der MA-Domäne), Multimerisierung (CA, p2, NC), Bindung der vRNA (Verpackungssignal Ψ) und Interaktion mit dem cytoplasmatischen Ende (CT) der gp41/120-Trimere in der Zellmembran sorgen^{99,100}. Bei der Membranbindung bevorzugt pr55 Cholesterin- und Glykolipid-reiche Membranmikrodomänen, wodurch ein hoher Cholesterin- bzw. Glykolipidgehalt in der Virusmembran und somit die Ausbildung möglichst großer Mengen hochinfektöser Viren sichergestellt wird^{193-195,242,248}. Die Knospung viraler Partikel an der Zelloberfläche wird wiederum durch die Late-Domäne von pr55 stimuliert. Nachdem sich die viralen Partikel von der Zelloberfläche abgeschnürt haben, vollendet die virale Protease die Prozessierung der Gag bzw. GagPol Proteine und es kommt zum Aufbau des Inneren und Äußeren Kerns (Abbildung 1, blaue Box). Dieser als Reifung bezeichnete Prozess ist für die Ausbildung infektiöser Viren unabdingbar^{100,144}.

Im Zusammenhang mit Dendritischen Zellen (DC) oder Makrophagen kann es zu einer *trans*-Infektion von CD4⁺-Zellen kommen. Über spezielle Rezeptoren (DC-SIGN, Mannose-rezeptor) binden Viren an die Zelloberfläche der Dendritischen Zellen oder Makrophagen, wo sie verbleiben oder in das Endosom der Zelle überführt und zerstört werden. Ein kleiner

Bruchteil der Viren im Endosom bzw. auf der Oberfläche der Zellen, bedient sich der Zellen dessen ungeachtet als ‚Trojanisches Pferd‘: Nach der Interaktion dieser Zellen mit CD4⁺ T-Zellen im Lymphknoten kommt es bei der Ausbildung der immunologischen Synapse zur Infektion der CD4⁺ T-Zellen^{69,85,112,123,176}.

1.1.5. Die Hüllproteine gp120 und gp41

1.1.5.1. Gen und Prozessierung

Die Hüllproteine werden in einem gemeinsamen Leserahmen (*env*) als Vorläuferprotein gp160 codiert. N-terminal befindet sich ein Signalpeptid (SP) gefolgt von gp120 und gp41. Am Übergang von gp120 zu gp41 befinden sich zwei Proteaseschnittstellen. Sequenzanalysen zeigen, dass gp120 hochdivergent ist, die Mehrheit der Mutationen allerdings konzentriert in fünf Bereichen, den Variablen Regionen (VARIABLE REGION; V) V1 bis V5 vorliegen. Diese sind im Wechsel mit den konservierteren Sequenzbereichen, den Konservierten Regionen (CONSERVED REGION; C) C1 bis C5 über die Sequenz von gp120 verteilt. Hochkonservierte Disulfidbrücken an den Rändern von V1-V4 bewirken, dass sich diese, ebenso wie V5, zu sogenannten VARIABLEN SCHLEIFEN

falteten^{224,293,349}. Gp41 wird in eine Extrazelluläre Domäne (ECTO Domain), eine Transmembran Domäne (MEMBRANE-SPANNING DOMAIN; MSD) und ein Cytoplasmatisches Ende (CYTOPLASMIC TAIL; CT) unterteilt. Die ECTO Domäne wird wiederum in das Fusionspeptid (FUSION PEPTID; FP), den N-terminalen Heptadrepeat (N-TERMINAL HEPTAD REPEAT; N-HR), die Schleifen Region (LOOP REGION; LR), den C-terminalen Heptadrepeat (C-TERMINAL HEPTAD REPEAT; C-HR) und die für die Trimerisierung wichtige Membran-nahe Externe Region (MEMBRANE-PROXIMAL EXTERNAL REGION; MPER) gegliedert (Abbildung 4)^{49,83,348}. Das N-terminale Signalpeptid bewirkt, dass gp160 kotranslational in das Lumen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) sezerniert und dort glykosyliert wird^{101,295}. Das synthetisierte gp160 formiert sich nun zu Trimeren, bindet an Calnexin/Calreticulin und wird durch zelluläre Chaperone und Disulfidisomerasen gefaltet. Hierbei dienen die Glykosylierungen als Faltungskontrolle: nur richtig gefaltetes gp160 kann sich von Calnexin/Calreticulin lösen

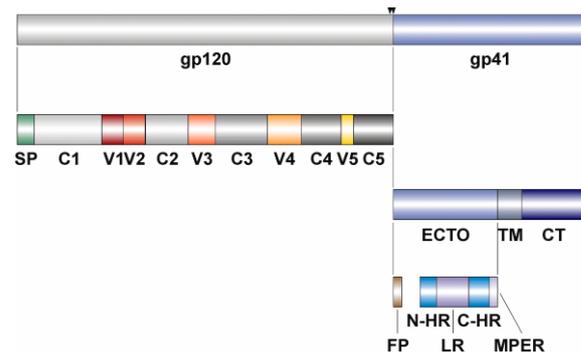


Abbildung 4: Domänen von gp160

Oben: gp120 (grau), gp41 (blau), Proteaseschnittstellen (schwarze Dreiecke). **Mitte:** Domänen von gp120: Signalpeptid (SP, grün), V1-V5 (rot - gelb), C1-C5 (hellgrau - dunkelgrau) bzw. gp41: ECTO (hellblau), TM (stahlblau) CT (dunkelblau). **Unten:** Unterbereiche der ECTO Domäne: Fusionspeptid (FP, braun), N-HR und C-HR (cyan), Loop Region (LR, stahlblau), MPER (graublau).

und das ER verlassen. Die Trimere werden in den Golgi-Apparat eingebracht, wo eine Umwandlung der Glykosylierungen erfolgt. Hiernach machen Zuckerreste mehr als die Hälfte der Masse aus³⁷. Die Prozessierung der Glykosylierungen bleibt jedoch unvollständig, so dass ein ungewöhnlich hoher Anteil an Mannose-reichen Glykosylierungen im fertigen Hüllprotein vorliegt²⁹⁵. Im trans-Golgi Netzwerk erfolgt abschließend die Spaltung von gp160 durch Furin oder Furin-ähnliche Proteasen, worauf die Trimere in die Zellmembran eingebracht werden. Aufgrund der relativ schwachen, nicht-kovalenten Interaktion zwischen gp41 und gp120 kann es zum Ablösen des gp120 Trimers (sog. SHEDDING) kommen, was zum Verlust der Funktionalität der gp120-freien Env-Spikes führt^{55,126,354,356}.

1.1.5.2. Struktur der Hüllproteine

Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen mit SI- und HI-Viren verhelfen zu einem immer detaillierteren Bild der Env-Spikes *in situ*. Zurzeit gibt es zwei Modelle, die beide eine dreiachsige Symmetrie der Env-Spikes erkennen lassen, sich allerdings deutlich in den Details voneinander unterscheiden. Gibt Zanetti *et al.* das gp41-Trimer als komplexe Struktur ohne Hinweis auf die drei gp41-Untereinheiten an, unterteilt das Strukturmodell von Zhu *et al.* das gp41-Trimer in die Monomere, die radial von der Achse des Env-Spikes wegweisen und separat in der Membran verankert sind (Abbildung 5, LEG und FOOT). Weitere Unterschiede werden in der Struktur des gp120-Trimers deutlich: erscheint dieses bei Zanetti *et al.* kompakt und ohne Ausbuchtungen oder Vertiefungen, postulieren Zhu *et al.* mehrere strukturelle Ausbuchtungen in den Monomeren (Abbildung 5, MAIN LOBE, LATERAL LOBE, PROXIMAL LOBE, PEAK). Die Dimension der Env-Spikes geben beide Modelle mit 13,7 nm x 10,5 nm bzw. 12,0 nm x 11,0 nm ähnlich an^{285,362,372}.

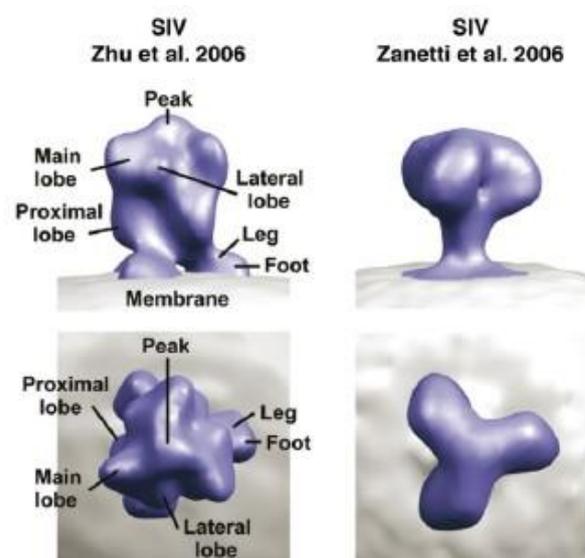


Abbildung 5: Kryoelektronenmikroskopische Modelle von SIV Env-Spikes

Aufsicht und Seitenansicht der Cryo-EM basierten Modelle eines SIV Env-Spikes nach Zhu *et al.* bzw. Zanetti *et al.*²⁸⁵.

Die Struktur deglykosylierter gp120 Proteinkerne (gp120 ohne die Variablen Domänen V1/V2, V3 und V4) sind durch kristallographische Untersuchungen detailliert beschrieben worden^{50,142,179,180}. Besonders auffällig hierbei ist die hohe strukturelle Homologie dieser gp120 Proteinkerne, gleich ob es sich um eine Labor-adaptierte oder primäre Variante des

HI-Virus handelt. Die gp120 Proteinkerne haben eine ellipsoide Struktur mit einer Größe von 5•5•2,5 nm und werden in drei Domänen unterteilt: Innere Domäne (INNER DOMAIN), Äußere Domäne (OUTER DOMAIN) und Brücken Domäne (BRIDGING SHEET) (Abbildung 6)^{251,354,356}. Die Innere Domäne (innen im Bezug auf N- und C-Terminus) ist weitgehend frei von Glykosylierungen und beinhaltet die Regionen C1 und C5, sowie die Variablen Schleifen V1/V2. Sie ist für die Interaktion mit gp41 verantwortlich^{180,230,231,353}. Die Äußere Domäne besteht aus den Variablen Schleifen V3, V4 und V5, sowie den Regionen C2, C3, C4 und ist hochgradig glykosyliert^{180,181}. Verbunden werden die beiden Domänen durch die Brücken Domäne²⁹³. Da zur Kristallisation der gp120 Proteinkerne, die Variablen Schleifen zum Großteil deletiert wurden, kann die Struktur dieser Variablen Schleifen im CD4-Rezeptor ungebundenen gp120 nur anhand biochemischer Beobachtungen und davon abgeleiteten Strukturmodellen beschrieben werden. Man geht davon aus, dass sich V3 und V1/V2 übereinander partiell über die Rezeptorbindungsstellen legen und diese maskieren. Gestützt wird dies durch Untersuchungen die zeigen, dass Mutationen in diesen Bereichen die Sensitivität des Virus gegen V3-, CD4-Rezeptor- und Corezeptorbindungsstelle gerichtete Antikörper beeinflussen^{43,87,260,288,328,355,376}.

Basierend auf ihrer Anordnung im Trimer und der Immunogenität unterteilt man die Oberfläche von gp120 in drei Bereiche. Große Teile der Inneren Domäne bilden das NON-NEUTRALIZING FACE. Da dieses im trimeren Env-Spike durch Interaktionen der einzelnen Untereinheiten verdeckt ist, ist es für Antikörper nicht zugänglich. Erst nach einem eventuellen Abfallen des gp120 Trimers können Antikörper an diesen Bereich von gp120 binden, die allerdings keine neutralisierenden Eigenschaften besitzen³⁵⁶. Die Brücken Domäne und Teile der Inneren bzw. Äußeren Domäne, die zur Bindung des CD4- und Corezeptors beitragen, bilden das NEUTRALIZING FACE, in dem die Rezeptorbindungsstellen einen zentralen Angriffspunkt für Antikörper darstellen³⁵⁴. Der Großteil der Äußeren Domäne und einige Teile der Inneren Domäne bilden das hoch-glykosylierte SILENT FACE. Da die Glykosylierungen vom Immunsystem als körpereigen erkannt werden, maskiert dieses Zuckerschild (GLYCAN SHIELD) den entsprechenden Oberflächenbereich von gp120 und verhindert eine Immunantwort gegen selbigen^{70,213,272,295,346}.

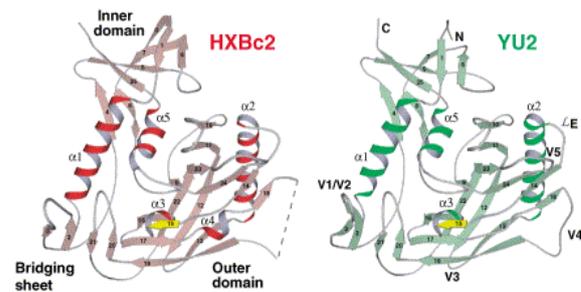


Abbildung 6: Strukturmodel von HXBc2 und YU2 gp120 Proteinkernen

Zu beachten ist die strukturelle Homologie dieser Labor-adaptierten bzw. primären Variante von HIV-1. HXBc2 in rot (α -Helices) und rosa (β -Faltblatt), YU2 in grün (α -Helices) und hell-grün (β -Faltblatt)¹⁷⁹.

Das 41 kDa große, glykosylierte Transmembranprotein gp41 besteht aus ca. 344 Aminosäuren, wovon 172 AS zur ECTO Domäne, 21 AS zur Transmembrandomäne (MSD) und rund 150 AS zur CT zählen. Über die Struktur von gp41 im CD4-Rezeptor ungebundenen Env-Spike ist nur wenig bekannt. Heutige Fusionsmodelle gehen davon aus, dass gp41 vor der Fusion globulär gefaltet vorliegt und sich das Fusionspeptid nahe der viralen Membran befindet^{49,348}.

1.1.5.3. Funktion der Hüllproteine

Wie beschrieben sind für die Fusion der viralen und zellulären Membran mehrere Interaktionen der Hüllproteine mit Rezeptoren der Zellmembran und der Zellmembran selbst notwendig (1.1.4 oben). Als Erstes erfolgt eine Interaktion zwischen gp120 und dem CD4-Rezeptor. Die hieran beteiligte CD4-Rezeptorbindungsstelle (CD4bs) liegt in einer Vertiefung zwischen Innerer-, Äußerer- und Brücken Domäne und hat eine Fläche von ~800 Å^{180,354}. Insgesamt sind 22 AS des CD4-Rezeptors und 26 AS von gp120 an der Bindung beteiligt. Diese lassen sich auf sechs ‚Cluster‘ in den Regionen C1-C5 und V5 verteilen (6.2 unten)^{66,67,183,247,287}. Zentrale Bedeutung besitzt die Aminosäure Phe43 des CD4-Rezeptors, die sich tief in der CD4bs in die sog. ‚Phe43-Höhle‘ einlagert und mit mehreren hoch-konservierten Aminosäuren von gp120 interagiert¹⁸⁰. Viele gp120-Aminosäuren im Bereich der CD4bs sind jedoch variabel, was auf ihre Lokalisation in mehreren Ausbuchtungen in der CD4bs beruht. In diesen gibt es keine Kontakte zwischen AS der beiden Interaktionspartner, was den Aminosäuren der ‚Höhlenwände‘ eine hohe Variabilität ermöglicht. Darüber hinaus beschränken sich viele Interaktionen auf Hauptkettenatome. Dies ermöglicht die Ausbildung variabler Sequenzbereiche inmitten der CD4bs, sog. ‚ANTI-HOTSPOTS‘^{179,180,356}.

Die Analyse CD4-Rezeptor gebundener und ungebundener Strukturen zeigt, dass es in Folge der CD4-Rezeptorbindung, zu massiven Umlagerungen in gp120 kommt^{50,371}. So formieren sich je zwei getrennte β-Blätter aus Innerer und Äußerer Domäne zu einer Einheit, wodurch die Brücken Domäne eine völlig neue Struktur erhält (Abbildung 7). Zusätzlich kommt es zu Umlagerungen in V2 und V3, was

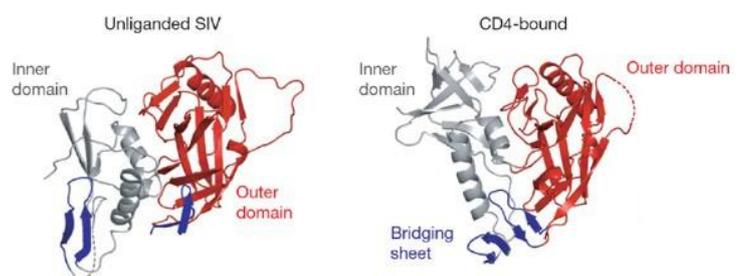


Abbildung 7: Struktur von CD4-ungebundenem SIV gp120 (links) und CD4-gebundenem HIV-1 gp120 (rechts)

Durch Bindung von CD4 kommt es zu Umlagerungen in der Inneren Domäne (grau) und der Brücken Domäne (blau). Die Äußere Domäne bleibt strukturell nahezu unverändert (rot)³⁷¹.

zur Ausbildung neuer Oberflächenstrukturen, den sog. CD4-induzierten Epitopen (CD4i-EPI TOPE) und der Corezeptorbindungsstelle (CRbs) in der Brücken Domäne führt^{180,354}. Untersuchungen zeigen, dass eine HIV-1 Infektion, zumindest *in vitro*, CD4-Rezeptor-unabhängig, allein in Anwesenheit des Corezeptors, erfolgen kann^{136,141,305}. Dies erklärt sich dadurch, dass gp120 in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen ungebundener und CD4-Rezeptor gebundener Konformation vorliegt und es so zu einer latenten Exposition der CD4i-Epitope und der CRbs kommt, die durch die CD4-Rezeptorbindung stabilisiert wird^{180,249,334}.

Die CRbs baut sich aus Aminosäuren von V1/V2, V3 und der Brücken Domäne auf^{278,280}. Hierbei ist V3 eine wichtige Determinante: neben Glykosylierungen in V1/V2 sowie V3, legt die Ladung der Spitze von V3 fest, welchen Corezeptor (CCR5 und/oder CXCR4) das Virus zur Infektion benutzt und ist essentiell für die Bindung an den Corezeptor^{43,66,245,264,309}. Die hierfür notwendigen Bereiche in V3 sind in ihrer Sequenz und Struktur konserviert. In

der CD4-Rezeptor gebundenen Konformation bildet V3 einen 30 Å langen Vorsprung, der zur Zellmembran hin ausgerichtet ist (Abbildung 8)¹⁴². Durch die Corezeptorbindung rückt das Virus näher an die Zellmembran heran und es kommt zu erneuten Umlagerungen im gp120-Trimer. Die einzelnen gp120 Monomere entfernen sich von der zentralen Achse des Env-Spikes und machen Platz für das TM-Trimer, welches für die Membranfusion verantwortlich ist^{45,142,285,348}. Das bisher globuläre gp41 Trimer, bildet nun helikale Strukturen im N- und C-Heptadrepeat und es kommt zu einer Streckung der Loop Region, wodurch das Fusionspeptid in die Zellmembran eingelagert wird. Da die drei N- und C-HRs nur vorübergehend in dieser gestreckten Drei-Helix Struktur (THREE-HELIX ROD) vorliegen, bezeichnet man diese intermediäre Struktur als PREHAIRPIN INTERMEDIAT. Durch die Rückbildung der Loop Region kommt es zur Anlagerung der C-HR an die Drei-Helix-Struktur der N-HR und zur Ausbildung des SIX-HELICS-BUNDLE. Hierdurch werden Virus- und Zellmembran in unmittelbaren Kontakt zu einander gebracht und fusionieren^{49,348}.

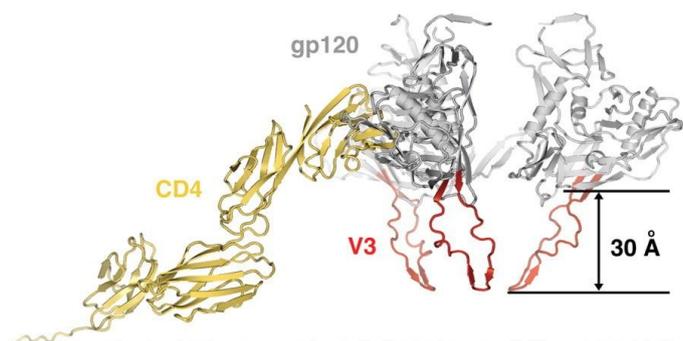


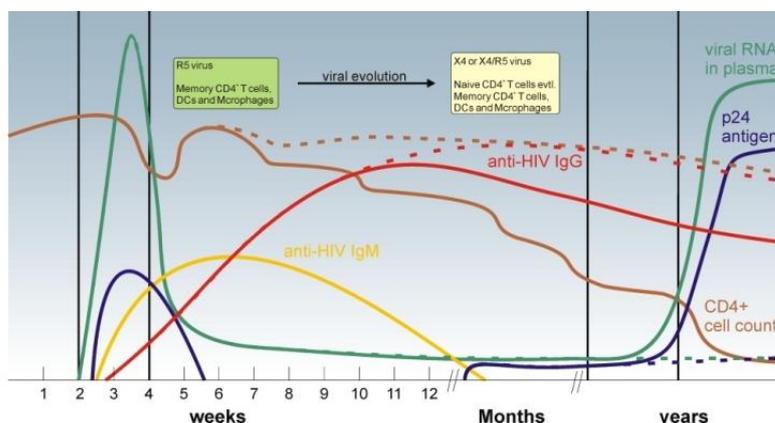
Abbildung 8: Strukturmodell eines CD4-Rezeptor gebundenen gp120 Trimers mit V3

Durch Bindung an den CD4-Rezeptor wird die CRbs optimal zur Zellmembran hin ausgerichtet. Gp120 Monomer (grau), V3 (rot), CD4-Rezeptor (gelb), Zellmembran (schwarzer Balken)¹⁴².

1.1.6. Normaler, schneller und langsamer Infektionsverlauf

1.1.6.1. Normaler Infektionsverlauf

Während der Primärinfektion mit HIV-1 kommt es zur Infektion von CD4⁺/CCR5⁺-Zellen (z.B. Makrophagen) durch R5-Isolate⁷⁸. Die ersten ein bis drei Wochen bleiben symptomfrei und das noch nicht nachweisbare Virus vermehrt sich unbemerkt (INCUBATION PHASE). In den darauffolgenden ein bis drei Wochen kommt es zur akuten HIV-1 Infektion (ACUTE PHASE) (Abbildung 9). Diese ist geprägt durch eine hohe



	Incubation phase	Acute phase	Asymptomatic phase	Symptomatic phase	AIDS
RP			6 - 30 month	+	+
normal	1-3 weeks	1-3 weeks	about six years	+	+
LTNP			at least eight years	-	-

Abbildung 9: Verlauf klinischer Marker während einer HIV-1 Infektion

Durchgezogene Linien stellen den normalen Infektionsverlauf dar, gestrichelte Linien einen LTNP-typischen Infektionsverlauf. CD4⁺-Zellzahl (braun), virale RNA im Plasma (grün), p24 (blau), α-HIV IgG (rot) und α-HIV IgM (gelb). +: Phase vorhanden, -: Phase nicht vorhanden.

Viruslast im Blut und einem Rückgang der CD4⁺-Zellzahl²⁴. Noch bevor Antikörper gegen das Virus aufgebaut sind, sorgt eine zelluläre Immunantwort für einen signifikanten Rückgang der viralen Last und eine Erholung der CD4⁺-Zellzahl^{28,174,228}. Dieser initiale Wert der viralen Last wird als VIRAL SET POINT bezeichnet und dient als prognostischer Marker für den weiteren Infektionsverlauf. Je geringer die virale Last, desto besser ist die Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf^{184,214}. Nach der akuten Infektion folgt eine unterschiedlich lange, symptomfreie Phase, die als Asymptomatische Phase bezeichnet wird (ASYMPTOMATIC PHASE). Bei normalem Krankheitsverlauf erstreckt sich diese, ohne Therapie, über ca. sechs Jahre. Die virale Last sowie die Zahl der CD4⁺-Zellen bleiben während dieser Phase relativ konstant, wobei es zu einer schleichenden Verringerung der CD4⁺-Zellen kommt. Infiziert das Virus anfänglich ausschließlich CD4⁺/CCR5⁺ Zellen, kann es zum Ende der Asymptomatischen Phase zu einem Wechsel des viralen TROPISMUS kommen. Das Virus infiziert nun CD4⁺/CXCR4⁺-Zellen oder hat die Eigenschaft erlangt, sowohl CD4⁺/CCR5⁺- als auch CD4⁺/CXCR4⁺-Zellen zu infizieren. Durch die Infektion mit X4- oder R5/X4-Isolaten kommt es dabei zur Ausbildung von SYNZYTIEN der infizierten

Zellen^{16,22,209,303}. In der folgenden Symptomatischen Phase (SYMPTOMATIC PHASE) kommt es zu einem weiteren Abfall der CD4⁺-Zellzahl (<200 Zellen/ μ l), zum Zusammenbruch des Immunsystems und einem Anstieg der viralen Last. In Folge des Fehlens der protektiven Wirkung des Immunsystems, kommt es zu opportunistischen Infektionen, AIDS und letztendlich zum Tod.

Durch den Einsatz der HAART Therapie kann die Viruslast im Blut der Patienten verringert werden, wodurch sich die Progression der Infektion verlangsamt. Ein primäres Ziel der Therapie ist hierbei das Erreichen eines möglichst geringen Viral Set Points, was zu einer möglichst langsamen Progression führen soll. Dies setzt allerdings eine schnelle Diagnose der Infektion voraus. Im späterem Krankheitsverlauf wird die HAART Therapie eingesetzt und immer wieder der aktuellen Situation angepasst (Verträglichkeit und Resistenzbildung), um die Viruslast unter einem Grenzwert (<50-500 Viren/ml) zu halten.

1.1.6.2. Schnell- und Langzeit Nicht-Progredierende Patienten

Der zuvor beschriebene Infektionsverlauf, kann in der Dauer seiner Asymptomatischen Phase stark variieren. Dauert dieses nur wenige Jahre oder gar nur einige Monate an, bezeichnet man die Patienten als Schnell-Progredierende (RAPID PROGRESSOR; RP). Ist die Asymptomatische Phase ohne Therapie deutlich länger (>10 Jahre), werden die Patienten als Langsam-Progredierende (SLOW PROGRESSOR; SP), Spät-Progredierende (LATE PROGRESSOR; LP), Nicht-Progredierende (NON-PROGRESSOR; NP) oder Langzeit Nicht-Progredierende (LONG-TERM NON-PROGRESSOR; LTNP) bezeichnet. Die Einteilung in die einzelnen Gruppen erfolgt anhand der Dauer der Asymptomatischen Phase, unterliegt allerdings keiner festen Regel, weshalb die Gruppen fließend ineinander übergehen. Von besonderem Interesse ist die Gruppe der LTNP, die neben ihrer nicht-progredierenden Infektion eine konstant hohe CD4⁺-Zellzahl und geringe virale Last aufweisen. Ca. 5-8% aller HIV-1 Infizierten sind durch diesen ungewöhnlichen Infektionsverlauf gekennzeichnet (Abbildung 9)²²¹. Vor wenigen Jahren wurde eine Untergruppe der LTNP eingeführt. Diese, als Elite Suppressoren (ELITE SUPPRESSOR; ES) bezeichneten Patienten, weisen eine extrem geringe virale Last (<50 vRNA/ml), eine stabile und hohe CD4⁺-Zellzahl und eine mindestens 15 Jahre lange, symptomfreie Infektion auf^{9,25,221}.

1.1.7. Mögliche Ursachen für LTNP

Der Krankheitsverlauf einer HIV-1 Infektion wird durch das Zusammenspiel viraler, genetischer und immunologischer Faktoren bestimmt. In verschiedenen Studien sind bereits eine Vielzahl solcher Faktoren beschrieben worden, die im Folgenden zusammengefasst werden.

1.1.7.1. Defekte in viralen Genen

Mögliche Ursachen einer nicht-progredierenden Infektion wurden sowohl in essentiellen, als auch akzessorischen Genen und einigen Hilfsgenen identifiziert. Die Untersuchung von *gag* und *pol* in Viren von LTNP führten zur Identifikation LTNP-spezifischer Polymorphismen. Diese führen jedoch nur in Ausnahmefällen zum Ausbleiben der Progression oder einem Verlust der Infektiosität^{3,148}. Aufgrund ihrer zentralen Funktion sind auch die Hüllproteine Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, um den Effekt von Mutationen auf die Funktionalität der Viren und den Krankheitsverlauf zu bestimmen^{133,275,328}. So wurde gezeigt, dass die Diversität von *env* in LTNP und NP deutlich höher ist, als in HIV-1 Kontrollpatienten. Dies wird auf den Selektionsdruck des Immunsystems der Patienten zurückgeführt, welcher das Virus zu Anpassung zwingt. Bleibt dieser Selektionsdruck während der frühen Infektionsphase aus, kommt es zur vermehrten Virusreplikation und zu einer schnelleren Progression^{221,289,365,366}. Darüber hinaus gelingt es LTNPs den Tropismuswechsel von HIV-1 zu unterdrücken. Hierfür sind möglicherweise Insertionen in V1/V2 verantwortlich, die bisher ausschließlich in SPs und NPs gefunden wurden^{210,310,344}. Weitere LTNP-assoziierte Mutationen wurden in V3 identifiziert, die ebenfalls Konsequenzen einer starken Immunantwort zu sein scheinen²⁸³. Nef besitzt aufgrund seiner immunregulatorischen Funktion *in vivo* eine zentrale Bedeutung für die Replikation von HIV-1 *in vivo*. Es ist für die Verringerung der CD4-Rezeptoren und MHC-I Moleküle auf der Zelloberfläche verantwortlich und wirkt so auf den Krankheitsverlauf ein^{63,162,298,299,304}. In mehreren Untersuchungen wurden LTNP-spezifische Mutationen in Nef aufgezeigt^{147,196,205,266,331,340}. Am auffälligsten ist die Studie einer australischen Kohorte, deren Patienten über ein kontaminiertes Blutprodukt mit dem gleichen Virus infiziert wurden, das größere Deletionen in Nef aufweist. Während alle Empfänger dieser Studie sich zunächst zu LTNP entwickelten, zeigen Folgeuntersuchungen bei einigen Patienten eine Progression in Anwesenheit der attenuierten Viren^{74,186}. Weitere LTNP-assoziierte Polymorphismen wurden in Vpr (R77Q, sowie eine Mutation im N-terminalen Helixmotiv) und Rev (L78I) identifiziert und charakterisiert^{58,154,202,225,343}. Studien mit *tat* und LTR führten zwar zur Identifikation LTNP-typischer Polymorphismen, diese haben jedoch keine Auswirkung auf die Funktionalität des Virus und den Infektionsverlauf^{274,366}. Dies zeigt wie schwierig es ist, aus einem Genotyp einen entsprechenden Phänotyp abzuleiten und rät die Ergebnisse einfacher Sequenzanalysen vorsichtig zu interpretieren. In weiteren Untersuchungen konnten auch Mutationen in den Hilfsgenen *vif*, *vpu*, *rev* aufgezeigt werden, jedoch wurden diese bisher nicht funktionell untersucht^{3,25,221,318,359}.

1.1.7.2. Chemokinrezeptoren und Chemokine

Die am Besten charakterisierte wirtsgenetische Ursache für LTNP ist eine 32bp Deletion in *ccr5* (*ccr5Δ32*). Die mutierten Rezeptoren werden nicht auf der Zelloberfläche präsentiert, was zu einer partiellen, bei homozygotem Genotyp nahezu vollständigen, Resistenz gegen HIV-1 führt^{21,197}. Bereits der heterozygote Genotyp kann zu einem verlangsamten Infektionsverlauf führen^{75,145,206,217,262,322}. Die Prävalenz dieser Mutation erreicht in kaukasischen Bevölkerungen rund 10%, sinkt in Asien auf 2-5% ab und ist in Afrika, Amerika und Ozeanien nur in seltenen Fällen anzutreffen²⁰⁹. Neben einer verringerten Rezeptordichte auf der Zelloberfläche kann auch eine erhöhte Konzentration der natürlichen Liganden (RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β bei R5-Isolaten und SDF-1 bei X-Isolaten) eine Infektion verhindern oder zu einem verlangsamten Infektionsverlauf beitragen^{204,256}.

1.1.7.3. Zelluläre Immunantwort

Die zelluläre Immunantwort spielt sowohl bei der Kontrolle der akuten, als auch persistenten HIV-1 Infektion eine entscheidende Rolle. Durch die Präsentation viraler Peptide auf den MHC-II Komplexen Antigen präsentierender Zellen, werden sowohl CD4⁺-T-Helferzellen Typ 1 und Typ 2 (T_H1 bzw. T_H2) aktiviert. Hierdurch kommt es zur Ausschüttung unterschiedlicher Cytokine und der Aktivierung der humoralen Immunantwort durch T_H2-Zellen und der zellulären Immunantwort durch T_H1-Zellen. Erkennt eine CD8⁺-T-Zelle (CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTE; CTL) nun virale Peptide in den MHC-I Komplexen HIV-1 infizierter Zellen, wird die infizierte Zelle lysiert. Neben der Stärke dieser CD8⁺-T-Zellantwort, wird vor allem ihre Qualität und Breite sowie die Fähigkeit der schnellen Proliferation HIV-1 spezifischer CD8⁺-T- und CD4⁺-T-Zellen mit einem Nichtprogredieren der Infektion in Verbindung gebracht^{11,17,44,73,219,284}. Eine genetische Prädisposition für eine effektive T-Zellantwort scheint in den HLA-Allelen der Infizierten zu liegen. Diese sind für die Ausbildung der MHC-I und MHC-II Komplexe und somit für die Initialisierung der CD8⁺-T-Zellantwort verantwortlich. Hierbei scheint die Expression unterschiedlicher HLA-Allele Einfluss auf den Infektionsverlauf zu haben^{131,160}. Vor allem die HLA-B Allele *27 und *5701 wurden in mehreren Studien mit dem LTNP-Status korreliert^{9,77,113,220}. Dagegen lassen neuere Studien vermuten, dass allein die Existenz dieser HLA-Allele in einem infizierten nicht für das Ausbleiben der Progression verantwortlich ist und weitere Voraussetzungen zur Kontrolle der Virämie erfüllt sein müssen^{17,218,219}.

1.1.7.4. Humorale Immunantwort

Die Bedeutung der humoralen Immunantwort für die Kontrolle der Infektion war lange Zeit Gegenstand kontroverser Diskussionen (1.1.8 unten). Mehrere Untersuchungen weisen nunmehr auf einen Zusammenhang von NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖPERN (nAK) und einem

nicht-progredierenden Krankheitsverlauf hin^{44,153,250,259}. Hierbei unterscheidet die Breite und Stärke der Antikörperantwort, sowie ihre andauernde Persistenz LTNP von Progressoren^{45,48,76,226,370}. Untersuchungen zur Art der humoralen Immunantwort in LTNP, weisen auf einen erhöhten Anteil von 2G12-ähnlichen Antikörpern hin³⁴. Die Ausreifung Neutralisierender Antikörper nimmt einige Wochen Zeit in Anspruch, was dem Virus ermöglicht durch Mutationen der Immunantwort zu entrinnen^{102,259,277}. Dies hat zur Folge, dass die Neutralisation kontemporärer autologer Viren oft ausbleibt, während ‚ältere‘ autologe Isolate neutralisiert werden^{227,228}. Die Kapazität des Virus, der humoralen Immunantwort durch Mutationen zu entkommen, ist jedoch aufgrund der notwendigen Funktionalität von Env begrenzt. Die Existenz breit-reaktiver Neutralisierender Antikörper ist auf diese konservierten Epitope zurückzuführen⁷⁶.

1.1.8. Neutralisierende Antikörper gegen HIV-1

Da die Kontrolle der Primärinfektion lange Zeit allein der zellulären Immunantwort zugeschrieben wurde, wurde den Neutralisierenden Antikörpern kaum Bedeutung zugemessen. Dies führte dazu, dass Immunisierungen ausschließlich auf die Induktion einer breiten zellulären Immunantwort abzielten (1.1.6.1 oben)^{12,13,189,190,341}. Die Identifikation nAk und deren erfolgreicher Einsatz in Affenmodellen, passiven Vakzinierungsstudien, der Inhibition von Mutter-Kind-Übertragungen (MOTHER TO CHILD TRANSMISSION, MTCT) und die Beobachtung dass neutralisierende Antikörper bereits drei bis vier Wochen nach der Primärinfektion nachweisbar sind, führten allmählich zum Umdenken^{6,84,92,137,211,261,297,319,335,358,378}. Zur Zeit geht man davon aus, dass eine Vakzine sowohl eine zelluläre als auch humorale Immunantwort stimulieren muss, wobei die viralen Hüllproteine für die Induktion der humoralen Immunantwort im Mittelpunkt stehen^{319,374}. Die hohe Variabilität von HIV-1 stellt jedoch einen effektiven Mechanismus dar, um der Immunantwort zu entrinnen. Zusätzlich schützt das Virus konservierte Bereiche der Hüllproteine durch ihre Anordnung im Inneren der Env-Spikes, maskiert sie mit Variablen Schleifen und umfangreichen Glykosylierungen und dirigiert so die Antikörperantwort gegen hochvariable Bereiche (1.1.5.2 oben)^{1,28,122,170,178,228,346}. Verlaufsuntersuchungen HIV-1 Infizierter zeigen, dass gegen die jeweilige dominante Virusvariante eine Immunantwort gebildet wird, es aber regelmäßig zur Ausbildung von Fluchtmutanten kommt^{277,346}. Das Immunsystem ist somit ständig dazu gezwungen neue Antikörper zu selektieren, um das Virus zu kontrollieren^{254,277}. Dieses Wechselspiel erfolgt in der Regel bis zum Zusammenbruch des Immunsystems. In seltenen Fällen gelingt es dem Immunsystem allerdings konservierte, für die Replikation essentielle Epitope zu identifizieren und so breit-neutralisierende Antikörper aufzubauen³⁷. Da diese oft konformelle und schwer zugängliche Epitope erkennen, ist ihre Induktion mittels Immunisierung mit monomeren Env allerdings nicht möglich und auch trimere Env Vakzine

erweisen sich als schwierig^{33,96,108,163,192}. So bleibt die Isolation breit-neutralisierender Antikörper aus HIV-1 Infizierten deren einzige Quelle, wobei sich im Laufe der Jahre vor allem LTNP besonders bewährt haben^{116,143,179,180,234,292,336,375}.

1.1.8.1. Neutralisierende Antikörper gegen gp120

Mehrere Epitope breit neutralisierender Antikörper konnten auf der Oberfläche von gp120 und gp41 identifiziert werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Monoklonale neutralisierende Antikörper gegen HIV-1

Name	Epitope	CDRH3 Länge*	Ursprung
b12	CD4bs	18	F _{ab} Phagen Display Bibliothek
17b	CD4i	19	F _{ab} Phagen Display Bibliothek
X5	CD4i	22	F _{ab} Phagen Display Bibliothek
447-52D	V3	20	Hybridoma
2G12	Glycan-Shield	14	Hybridoma
2F5	gp41 (MPER)	22	Hybridoma
4E10	gp41 (MPER)	18	Hybridoma

*) ermittelt mit VBASE2

Hierbei handelt es sich um konservierte und für die Replikation essentielle Strukturen. So überlagert das Epitop des Antikörpers b12 die CD4bs und umfasst mehrere für die CD4-Rezeptorbindung wichtige Aminosäuren, was dem Antikörper eine ungewöhnlich breite Reaktivität verleiht. Der aus einer Patienten F_{ab}-Phagen Bibliothek isolierte Antikörper besitzt eine auffallend lange CDRH3 Schleife, die in die Phe43-Höhle eingelagert wird und die Bindung des CD4-Rezeptors verhindert. Diese auffallend lange CDRH3-Schleife ist ein besonderes Merkmal von b12 sowie der meisten breit-neutralisierenden HIV-1 spezifischen Antikörper. Während die CDRH3-Schleife der in Tabelle 1 aufgeführten Antikörper aus 14 bis 22 Aminosäuren aufgebaut sind, besteht die durchschnittliche CDRH3-Schleife humaner Antikörper nur aus 11,6 Aminosäuren (mehrheitlich 10-14 Aminosäuren)³⁵². Die Epitope der Antikörper X5 und 17b gehören zu den CD4i-Epitopen und überlagern Teile der für die Corezeptorbindung wichtigen Brücken Domäne. Beide Antikörper wurden aus F_{ab}-Phagen Bibliotheken HIV-1 Infizierter isoliert und besitzen eine breite Neutralisationskapazität^{143,179,180}. Im IgG Format verlieren die F_{ab} Fragmente hingegen ihre neutralisierende Wirkung. Untersuchungen zeigen, dass die Epitope nach Bindung an den CD4-Rezeptor zur Zellmembran hin ausgerichtet und schwer zugänglich sind. Diese sterische Hinderung hat zur Folge, dass sich die Neutralisationskapazität dieser Antikörper antiproportional zur Größe des Antikörperfragments verhält ($scF_v > F_{ab} > F_{ab2} > IgG$)^{182,327}. Verwunderung rief die Identifizierung des Epitops des nAk 447-52D hervor. Obwohl das Epitop dieses Antikörpers in der Spitze von V3 liegt (GPGR/Q), ist 447-52D in der Lage, eine Vielzahl

Labor-adaptierte und primäre R5- oder X4-Isolate zu neutralisieren^{116,119,120}. Um gegen die semi-konservierte Sequenz und Struktur von V3 eine solch breite Reaktivität zu erlangen, bedient sich 447-52D eines raffinierten Bindungsmusters: Interaktionen zwischen der CDR des Antikörpers und variablen Bereichen von V3 erfolgen über Hauptkettenatome, die konservierten Aminosäuren an der Spitze von V3 werden hingegen über ihre Seitenketten gebunden. Hierbei kommt es zur Ausbildung eines gemischten β -Faltblatts zwischen CDRH3 und V3, wobei die konservierte Spitze von V3 an der Basis der CDRH3 Schleife bindet^{19,116,321,375}. Ebenfalls ungewöhnlich ist das Epitop von 2G12, welches in der Silent Face von gp120 liegt. Trotz der intensiven Glykosylierung ist 2G12 in der Lage, diesen nicht-immunogenen Bereich von gp120 als fremd zu erkennen und zu binden. Es erscheint konsequent, dass Glykosylierungen einen entscheidenden Anteil des Epitops dieses Antikörpers ausmachen^{290,296,354}. Die Erkennung der ‚eigenen‘ Glykosylierungen als ‚fremd‘ erfolgt über die konformelle Anordnung konservierter Oligomannosestrukturen auf der Oberfläche von gp120³⁷. Die Grundlage für dieses ungewöhnliche Bindungsverhalten bildet die Struktur von 2G12: die schweren Ketten des Antikörpers sind gekreuzt, wodurch der Antikörper eine I-förmige Struktur erlangt und zusätzlich zu den zwei normalen Antigenbindungsflächen (V_L - V_H) noch eine weitere entsteht (V_H - V_H)³⁸.

1.1.8.2. Neutralisierende Antikörper gegen gp41

Die hochkonservierten Epitope der nAk 2F5 und 4E10 liegen beide in der MPER von gp41³⁷⁷. Die Antikörper erkennen kurze, lineare Sequenzen im C-HR, die jedoch nur partiell auf der Oberfläche intakter Viren präsentiert werden. Allerdings kommt es durch die Umlagerungen in Env während der Interaktion mit dem CD4- bzw. Corezeptor zu einer transienten Exposition. Kommt es hierbei zur Bindung der Antikörper an ihre Epitope führt dies zur Inhibition der Membranfusion^{237,238,243,270,294,324}. Auch diese Antikörper besitzen eine ausgeprägt lange CDRH3 Schleife, die allerdings nur an ihrer Basis mit dem jeweiligen Epitop interagiert. Da die Verkürzung dieser Schleife zum Verlust der Bindungs- und Neutralisationskapazität beider Antikörper führt und membranständige MPER-Peptide besser gebunden werden als freie MPER-Peptide, wird davon ausgegangen, dass die lange CDRH3 Schleife mit der Virusmembran interagiert^{125,244,377}.

1.2. Rekombinante Antikörper

Weil eine vorhergehende Doktorarbeit von Michael Humbert erste Hinweise auf eine möglicherweise herausragende Bedeutung der humoralen Immunantwort für den verlangsamten Infektionsverlauf der hier untersuchten LTNP zu Tage förderte, ist der Schwerpunkt dieser Dissertation auf die Überprüfung dieser These ausgerichtet. Neben den allgegenwärtigen genetischen und molekularbiologischen Techniken und Methoden ist hierbei das Phagen Display von Peptiden oder rekombinanten Antikörperfragmenten von zentraler Bedeutung. Im Folgenden werden Aufbau, Struktur und Expression von Antikörpern und Antikörperfragmenten sowie das Phagen Display eingehender beschrieben.

1.2.1. Struktur & Funktion von Antikörpern

Antikörper sind die Effektoren der humoralen Immunantwort. Sie werden in B-Zellen membranständig oder sekretorisch in Plasmazellen produziert. Es handelt sich um Heterodimere aus je zwei leichten und schweren Ketten (LIGHT CHAIN; L BZW. HEAVY CHAIN; H). Aufgrund ihrer Sequenzvariabilität werden diese in mehrere Regionen unterteilt. Die ersten 100-110 N-terminalen AS der H- und L-Ketten sind hochvariabel und werden V_L - bzw. V_H -Region genannt (VARIABLE REGION; der Suffix steht für die Kette). Die übrigen Bereiche der L- und H-Ketten sind deutlich konservierter und werden in ebenfalls 100-110 Aminosäuren lange sogenannte C-Regionen (CONSTANT REGION) unterteilt (C_H1 , C_H2 , C_H3 evtl. C_H4 und C_L). Hierbei legen die C-terminalen Regionen den Subtyp der L- und H-Kette fest: κ oder λ bei der L-Kette bzw. α , δ , ϵ , γ oder μ für die H-Kette. Anhand der H-Kettensubtypen werden die Antikörper in Klassen und Subklassen unterteilt: IgA1(α 1), IgA2(α 2), IgD(δ), IgE(ϵ), IgG1(γ 1), IgG2(γ 2), IgG3(γ 3), IgG4(γ 4) und IgM(μ). Weil Antikörper der IgG Klassen über 80% der Antikörpergesamtmenge ausmachen, werden sich nachfolgende Beschreibungen auf diese Antikörperklasse konzentrieren. Zwischen C_H1 und C_H2 befindet sich eine prolinreiche Subdomäne, HINGE. Über nicht-kovalente Wechselwirkungen und zwei Disulfidbrücken in der Hinge-Region sind

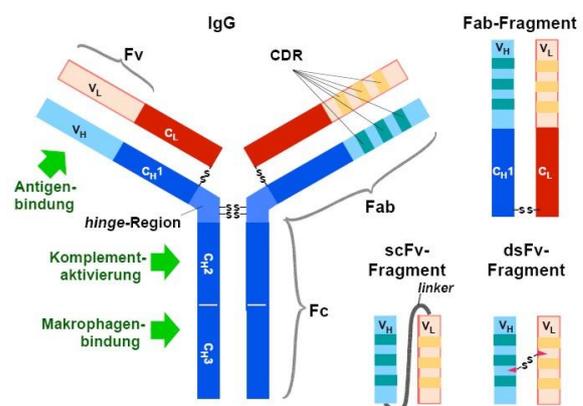


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus eines IgG-Antikörpers und einiger daraus abgeleiteter Antikörperfragmente

F_{ab} Fragmente werden durch die natürliche Disulfidbrücke stabilisiert. F_v -Fragmente müssen über einen Linker oder eine Disulfidbrücke zu einem single-chain F_v - (scF_v) bzw. Disulfid stabilisiertes F_v -Fragment (dsF_v) verbunden werden³⁰⁰.

Zwischen C_H1 und C_H2 befindet sich eine prolinreiche Subdomäne, HINGE. Über nicht-kovalente Wechselwirkungen und zwei Disulfidbrücken in der Hinge-Region sind

die H-Ketten miteinander verbunden. Disulfidbrücken zwischen C_L und C_{H1} und mehrere nicht-kovalente Bindungen verbinden jede der 25 kDa großen L-Ketten mit einer 50 kDa großen H-Kette (Abbildung 10). Der modulare Aufbau der Antikörper führt zu einer klaren Aufgabenteilung. Während die hochvariablen V_L und V_H für die Antigenbindung verantwortlich sind, vermitteln die C-Regionen die biologische Aktivität (Komplementaktivierung, Makrophagenbindung, ADCC).

Strukturanalysen zeigen, dass jede der V- bzw. C-Domäne eine charakteristische Struktur besitzt, die als Immunglobulin Faltung bezeichnet wird (IMMUNGLOBULIN FOLD). Diese besteht aus einem Sandwich zweier β -Faltblätter aus mehreren antiparallelen β -Strängen. Diese sind über flexible, unterschiedlich lange Schleifen verbunden und untereinander stabilisiert. Die drei Schleifen der V_L - und V_H -Domäne bilden in dieser Struktur die Spitze der V_L - und V_H -Region und sind für die Antigenbindung verantwortlich. Sie bauen eine zum Antigen komplementäre Struktur auf, die als CDR bezeichnet wird (COMPLEMENTARITY DETERMINING REGION). Die Regionen der CDR weisen eine besonders hohe Sequenzvariabilität auf (HYPERVARIABLE REGION), während die übrigen als FRAMEWORK REGION (FR) bezeichneten Regionen von V_L und V_H deutlich weniger Variabilität besitzen und als strukturelles Gerüst für die CDR dienen (Abbildung 11).

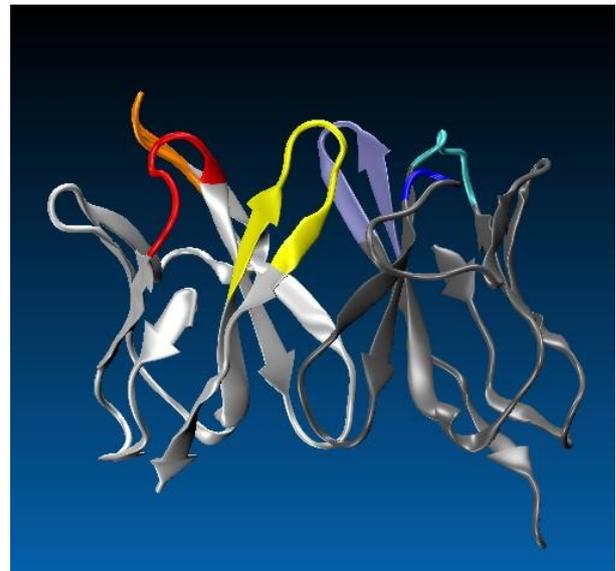


Abbildung 11: Beispiel der Immunglobulin Faltung eines scF_v-Fragments

Leichte Kette (weiß), schwere Kette (grau). Die CDR sind farblich dargestellt: L1 (rot), L2 (orange), L3 (gelb), H1 (blau), H2 (cyan), H3 (hellblau).

1.2.2. Organisation und Expression von Antikörpergenen

Um jedem potentiellen Pathogen einen Antikörper entgegenbringen zu können, stellt das Immunsystem ein Arsenal von $>10^{10}$ unterschiedlichen Antikörpern zur Verfügung. Die hierfür notwendigen genetischen Informationen liegen in modularer Form im Genom vor, weil es aufgrund der ‚Datenfülle‘ unmöglich wäre, jeden Antikörper in einem einzelnen Gen zu kodieren. Um aus einem begrenzten, modularen Genpool eine so hohe Antikörperdiversität abzuleiten, sind mehrere Schritte notwendig, die im Folgenden kurz aufgelistet und beschrieben werden.

In naiven B-Zellen werden die genetischen Informationen für κ und λ L-Ketten sowie die H-Ketten in drei unterschiedlichen, aus mehreren Gensegmenten bestehenden, MULTIGEN-FAMILIEN codiert. Während der Ausreifung der B-Zellen werden diese Gensegmente zufällig miteinander zu einer Antikörper mRNA rekombiniert, so dass jede B-Zelle einen Antikörper produziert. Für die Ausbildung der schweren Kette erfolgt zunächst die Verbindung eines D und eines J Segments (DJ-JOINING) und danach die Verbindung des DJ-Segments mit einem V-Segment (VDJ-JOINING). Für die Ausbildung der leichten Kette (κ oder λ) ist die Rekombination eines V und eines J Segments (VJ-JOINING) ausreichend. Abschließend erfolgt die Anlagerung eines C-Segments (κ oder λ), wodurch die mRNA komplettiert wird. Bereits durch diese genetische Rekombination erreicht die Komplexität des Antikörperreservoirs einen beachtlichen Wert (Tabelle 2).

Tabelle 2: Kombinationsmöglichkeiten der humanen Antikörper Multigenfamilien

Name	Segmente			Anzahl möglicher Kombinationen
	V	D	J	
κ -L Kette	40	0	5	200
λ -L Kette	31	0	4	124
H Kette	51	27	6	8.262
Mögliche Kombinationen von L- und H-Kette (200·124·8.262)				$\sim 2,5 \cdot 10^6$

Um die Diversität weiter zu steigern, erfolgt der Zusammenschluss der einzelnen Segmente über einen unpräzisen Mechanismus (JUNCTIONAL FLEXIBILITY) und es kann zur Ausbildung inverser Verbindungen einzelner Segmente kommen. Zusätzlich können während der Umlagerung mehrere Basen in die Verbindungsstellen eingelagert werden (P- bzw. N-ADDITION) und es erfolgt in den CDRs, nach Abschluss aller Umlagerungen, eine sog. Somatische Hypermutation (SOMATIC HYPERMUTATION): durch die Bindung einer Antikörper-präsentierenden B-Zelle wird diese selektiv vermehrt (KLONALE SELEKTION), wobei es bei jeder Zellteilung mit einer Frequenz von 10^{-3} pro Basenpaar zu Punktmutationen in den CDRs kommt.

In der Summe der Mechanismen erreicht der Organismus somit eine Diversität von $>10^{10}$ unterschiedlichen Antikörpern, die dem Immunsystem als Antwort auf jede erdenkliche immunologische Herausforderung zur Verfügung stehen.

1.2.3. Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente

Die Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) war lange auf die Immortalisierung von B-Zellen und deren Selektion beschränkt. Dies setzt die Immunisierung von Versuchstieren voraus. Nach der Immunisierung kann aus dem Blut der Tiere polyklonales Antiserum und aus den B-Zellen der Tiere monoklonale Antikörper gewonnen werden. Hierzu werden die

B-Zellen aus der Milz isoliert und *in vitro* mit Myelomzellen zu Hybridomazellen fusioniert. Diese produzieren den Antikörper der ursprünglichen B-Zelle und besitzen die uneingeschränkte Teilungskapazität der Myelomzelle. Durch die Selektion und Isolierung gewünschter Hybridomazellen können anschließend monoklonale Antikörper gewonnen werden. Die Notwendigkeit eines Versuchstiers bringt jedoch einige Nachteile mit sich. Neben dem zeitlichen Bedarf einer Immunisierung, kann dies beispielsweise eine zu geringe Immunogenität des Antigens sein. Ebenso können Antigene pathogen oder toxisch sein, wodurch eine Immunisierung unmöglich wird. Gelingt es dennoch monoklonale Antikörper zu isolieren, müssen diese noch für den Einsatz im Menschen angepasst werden (HUMANISIERUNG), um eine Immunreaktion gegen das Therapeutikum durch humane α -Maus Antikörper (HUMAN α -MOUSE ANTIBODIES; HAMA) zu verhindern. Ein weiterer Nachteil liegt in der Beschränkung der Antikörperstruktur. So sind Mäuse z.B. nicht in der Lage verlängerte CDRH3-Schleifen menschlicher Antikörper aufzubauen. Diese stellen jedoch gerade bei viralen Pathogenen oft ein entscheidendes Kriterium dar⁶⁴. Der Einsatz transgener Mäuse, deren eigene Multigenfamilien inaktiviert und durch humane Multigenfamilien ersetzt wurden, vermeidet zumindest eine Humanisierung und ermöglicht den Aufbau ‚humaner‘ Antikörper^{156,200}.

Diese Nachteile werden von humanen, rekombinanten Antikörpern umgangen. Auf gentechnologischem Weg werden die F_V -, F_{ab} -Fragmente isolierter B-Zell mRNA amplifiziert und heterolog exprimiert. Dies kann in einer Vielzahl pro- und eukaryotischer Organismen oder *in vitro* erfolgen³⁰⁰. Aufgrund der Tatsache, dass Antikörper für eine korrekte Faltung auf die Ausbildung ihrer Disulfidbrücken und somit auf ein oxidierendes Milieu angewiesen sind, ist die Expression in *E. coli* nur durch das Einbringen eines Signalpeptids möglich, welches den zu produzierenden Antikörper in das Periplasma dirigiert³¹³. Dies ermöglicht die *in vitro* Expression und Selektion humaner, monoklonaler Antikörperfragmente in unterschiedlichsten Systemen (z.B.: Surface Display, Ribosome Display, Phage Display)^{90,98,103,128,357}.

Die exakte Kontrolle der Bedingungen des Biopannings *in vitro* ermöglicht hierbei die Selektion von Antikörpern, die *in vivo* nicht induziert werden können. Dies können Antikörper gegen Epitope transienter Konformationen, hochgiftiger Substanzen, tödlicher Keime oder auch evolutionär hochkonservierter Antigene sein. Molekulargenetische Modifikationen der isolierten Antikörperfragmente ermöglichen die Herstellung unterschiedlichster Antikörperfragmente (Diabody, Triabody etc.), sowie die Fusion des antigenspezifischen F_{ab} - oder F_V -Fragment mit alternativen Effektorproteinen, wodurch die molekularbiologische Produktion rekombinanter Proteine mit völlig neuen Eigenschaften ermöglicht wird (Abzyme, u.a.)^{20,46,114,140,150,152,169,282,330,332}.

1.3. Phagen Display

1.3.1. Aufbau und Struktur des M13 Phagen

Der filamentöse Bakteriophage M13, Familie *Inoviridae*, gehört zu den am häufigsten zum Phagen Display genutzten Phagen. Im Aufbau ähnelt M13 einem Zylinder mit einer Länge von 930 nm und einem Durchmesser von nur 6,5 nm (Abbildung 12). Der Mantel des Zylinders besteht aus ca. 2700 Kopien pVIII (Protein VIII). An einem Ende wird dieser pVIII-Zylinder von je fünf Molekülen pVII und pIX, am gegenüber liegenden Ende von je fünf Molekülen pIII und pVI

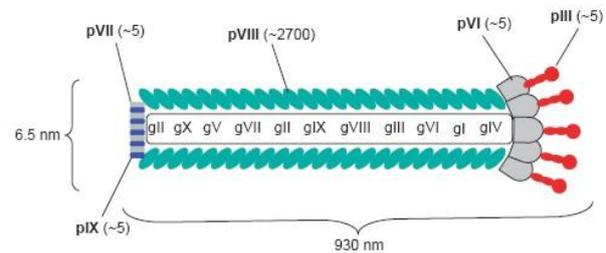


Abbildung 12: Aufbau der M13-Phage

Schematische Darstellung der M13-Phage. Im Inneren des pVIII-Zylinders (blau) befindet sich das Genom aus ssDNA. An einem Ende wird der Zylinder von je fünf Kopien pVII und pIX begrenzt, am anderen Ende von je fünf Kopien pVI und pIII (rot). Für das Phagen Display werden die zu untersuchenden Peptide oder Proteine als Fusion mit pVIII oder pIII präsentiert²³⁵.

begrenzt. Im Inneren des Zylinders liegt das ca. 6,5 kbp große Genom aus ssDNA auf dem neben den Strukturproteinen noch sechs weitere Proteine für die Replikation codiert sind¹⁰. Die Infektion von *E. coli* erfolgt selektiv über den F-Pilus und führt zu einer lysogenen Replikation des Bakteriophagen. Weil es somit in Folge der Replikation des Bakteriophagen nicht zur Lyse der Bakterien kommt, ist dies einer der Gründe für den regelmäßigen Einsatz von M13 in Phagen Display Systemen. Weitere Vorteile sind seine Stabilität und die Toleranz gegenüber genetischen Insertionen. Wird Fremd-DNA in den Phagen eingebracht, passt sich die Zylinderlänge entsprechend an. Der entscheidende Vorteil des Phagen Displays ist jedoch die Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp. Molekulargenetisch eingebrachte Peptide oder Proteine können in M13 als N-terminale Fusion mit den Proteinen pIII oder pVIII präsentiert und selektiert werden. Da zugleich die genetische Information des rekombinanten Proteins in der ssDNA codiert ist, ist die Bestimmung der Peptid- oder Proteinsequenz mittels PCR ebenso einfach wie ein eventuelles Umklonieren genetischer Informationen.

1.3.2. Phagen Display randomisierter Peptide

Die Phagen Display Technologie wurde erstmals Ende der 80er Jahre beschrieben und hat sich seither einen zentralen Platz in der modernen Mikrobiologie erobert³¹⁴. Randomisierte Peptid Phagen Display Bibliotheken gehören zu den gebräuchlichsten Phagen Display Bibliotheken. Die Phagen dieser Bibliotheken präsentieren kurze,

randomisierte Peptidsequenzen als pIII- oder pVIII-Fusion, wobei die Komplexität dieser Banken bis zu 100 Mio. unterschiedlicher Peptidphagen umfassen kann. Sie werden unter anderem in Selektionen mit mono- und polyklonalen Antikörpern, Enzymen, Rezeptordomänen oder Tumorzellen eingesetzt und ermöglichen so die Epitopanalyse und Charakterisierung bekannter Antikörper, die Ableitung von Bindungsdomänen und die Identifizierung spezifischer Tumorzellmarker^{271,306,311,315,323}.

1.3.3. Phagen Display rekombinanter Antikörperfragmente

Das Phagen Display rekombinanter Antikörperfragmente vereint zwei leistungsfähige molekularbiologische Technologien und eröffnet neue Wege für Diagnostik und Therapie. Für das Phagen Display werden F_{ab}- oder scF_v-Antikörperfragmente eingesetzt und als pIII-Fusion auf der Oberfläche des Bakteriophagen präsentiert^{10,165,300}. Aufgrund des modularen Antikörperaufbaus enthalten diese, die in der Sequenz und der Struktur der V_L und V_H Ketten kodierten Informationen zur Antigenbindung (Abbildung 10). Erfolgt die Herstellung einer F_{ab}- oder scF_v-Phagen Display Bibliothek aus einem ‚gesunden‘ Individuen, bezeichnet man die Bibliotheken als naiv, weil das Antikörperreservoir dieser Menschen keiner *in vivo* Selektion unterlag. Wird hingegen das Antikörperreservoir eines kranken Menschen, z. B. eines HIV-1 Infizierten, zur Herstellung genutzt, spricht man von einer Immunbibliothek. Diese bieten gegenüber naiven Bibliotheken den Vorteil einer ‚Präselektion‘ im Patienten, was zur Anreicherung ausgereifter, antigenspezifischer Antikörper führt. Über *in vitro* Selektion (BIOPANNING) an immobilisierten Zielstrukturen, können antigenspezifische Phagen angereichert, analysiert und zur Herstellung monoklonaler, rekombinanter Antikörper herangezogen werden^{18,72,152,215}.

1.4. Überblick und Projektbeschreibung

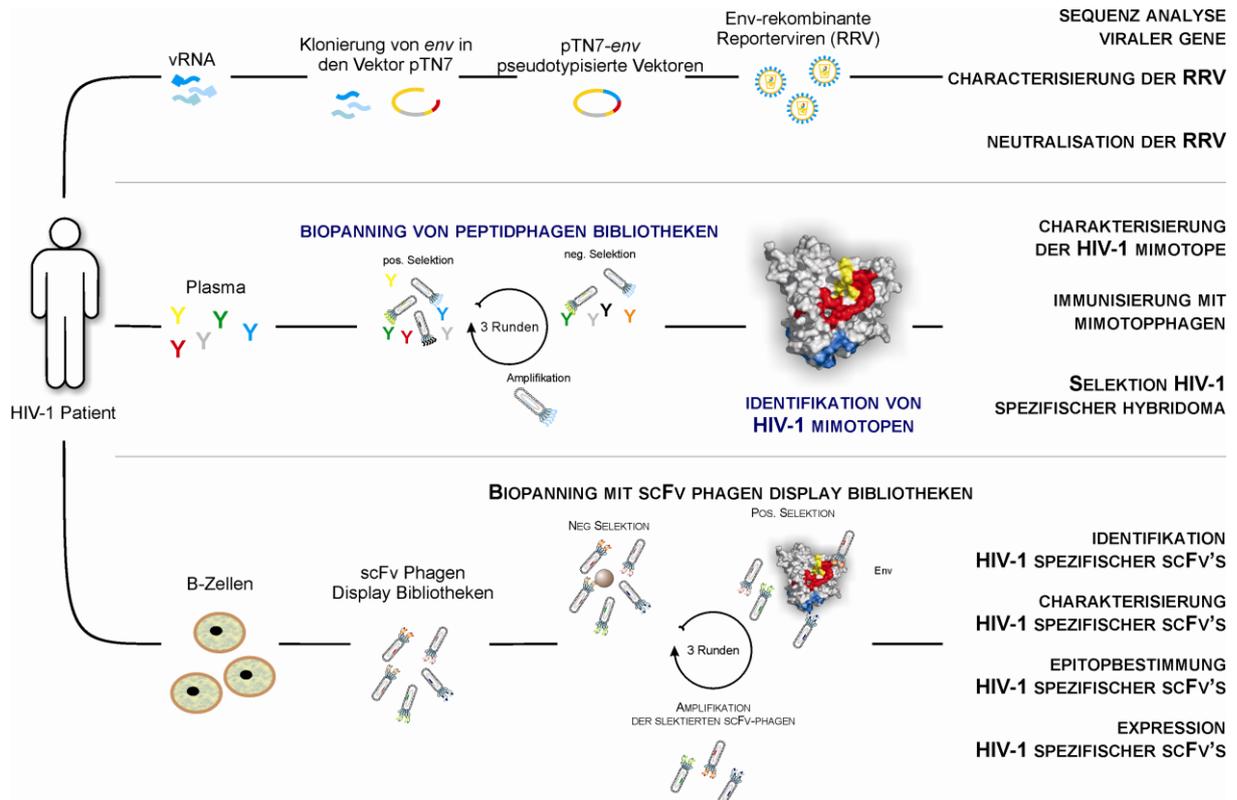


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Projektübersicht

Oben: Aus dem Blut der LTNP oder Kontrollpatienten isolierte virale RNA (vRNA) diente zur Amplifikation verschiedener viraler Gene und zur Herstellung HIV-1 Env-rekombinanter Reporterviren (RRV). Anhand der viralen Sequenzen und der Charakterisierungen der RRV wurde ein möglicher Einfluss viraler Faktoren auf den nicht-progredierenden Krankheitsverlauf untersucht. **Mitte:** Der Einfluss der humoralen Immunantwort wurde durch Neutralisationsstudien und mit Hilfe zuvor selektio- nierter HIV-1 spezifischer Mimotopphagen untersucht. Immunisierungsstudien der HIV-1 spezifi- schen Mimotopphagen dienen zur Induktion einer entsprechenden Immunantwort und der Selektion HIV-1 spezifischer Hybridioma. **Unten:** Zur weiteren Untersuchung der humoralen Immunantwort wur- den scF_v Phagen Display Bibliotheken der LTNP Patienten erstellt, über Biopanningexperimente HIV-1 spezifische scF_v Phagen isoliert und im Anschluss charakterisiert.

Die in der Doktorarbeit von Michael Humbert durchgeführten Experimente sind blau gekennzeichnet.

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist eine kleine Gruppe HIV-1 infizierter Langzeit Nicht- Progredierender Patienten (LONG-TERM NON-PROGRESSORS, LTNP). Diese symptomfreie Gruppe HIV-1 Infizierter ist in der Lage, ohne antivirale Therapie (HIGHLY ACTIVE ANTI- RETROVIRAL THERAPIE; HAART) die Infektion über einen längeren Zeitraum (> acht Jahre) zu kontrollieren. Mehrere virale und patienteneigene Aspekte wurden mit diesem außerge- wöhnlichen Krankheitsverlauf korreliert. Hierzu zählen genetische Aspekte, die Infektiosität und Funktionalität der Viren, sowie die zelluläre und humorale Immunantwort.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit ist es zu bestimmen welchen Anteil die einzelnen Aspekte am nicht-progredierenden Krankheitsverlauf der untersuchten Patienten haben. In einer vorangegangenen Dissertation von Michael Humbert ergaben sich erste Hinweise auf die Beteiligung HIV-1 neutralisierender Antikörper an der Kontrolle der Virämie und mit Hilfe der LTNP Seren wurden HIV-1 spezifische Peptidphagen isoliert und in ersten Immunisierungsstudien eingesetzt. Der zweite Teil dieser Arbeit greift diese Vorarbeiten auf und es erfolgt eine weiterführende Charakterisierung der HIV-1 spezifischen Peptidphagen und der zugehörigen humoralen Immunantwort. Zusätzlich wird versucht über die isolierten Peptidphagen eine HIV-1 spezifische Immunantwort zu induzieren und entsprechende Hybridomazellen zu generieren. Der dritte Teil der Arbeit besteht in der Herstellung von scF_v Phagen Display Bibliotheken aus dem Antikörperrepertoire der untersuchten LTNP, sowie der Isolierung und anschließender Charakterisierung HIV-1 spezifischer scF_v Phagen mittels Biopanning aus den erstellten scF_v Phagen Display Bibliotheken (Abbildung 13).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte

Modell	Hersteller/ Vertrieb
ABIPRISM 3100-Avant	Applied Biosystems, HITACHI, Foster City, USA
Analysewaage 420-42	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Brutschrank FunctionLine	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Casy TT	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
DNA-Elektrophorese Apparatur	BioRad, München, Deutschland
ELISA Reader SpectraMax 340	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
ELISA Washer ELx405	BIOTEK Instruments, Vermont, USA
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Heizblock, DRI-BLOCK DB2D	Techne, Duxford, England
Hypercassette™ RPN 11642	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Kippschüttler Rockomat	Tecnomara, Zürich, Schweiz
Kühl-/Gefrierschränke GlassLine	Liebherr, Biberach, Deutschland
LumiStar Galaxy	BMG LABTECH, Offenburg, Deutschland
Magnetrührer KM02	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland
Mikroskop DM E, Binokular	Leica, Bensheim, Deutschland
Mini-PROTEAN® 3	BioRad, München, Deutschland
NanoDrop	NanoDrop Technologies, USA
pH-Meter HI 9321	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten (2,5, 10, 20, 200, 1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator TH25 und TH30	Johanna Otto, Hechingen, Deutschland
Spannungsquelle Power Pac 1000	BioRad, München, Deutschland
Sterilbank Biosafe 1.2	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
T3 Thermocycler	Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry	BioRad, München, Deutschland
UV-Transilluminator GelDoc 2000	BioRad, München, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender und Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen: Biofuge 15R, Biofuge 17RS Megafuge 1.0R, Minifuge Mikro20 Beckmann Avanti J-20	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland Beckmann Instruments Inc. CA, USA

2.1.2. Einwegmaterial

Produkt	Hersteller/Vertrieb
96-Vertiefung-Microlon Platte, F-Form	Greiner Bio-One, Frickhausen, Deutschland
Dynalbeads M-280 Tosylaktiviert	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hyperfilm™ ECL	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Kryo-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickhausen, Deutschland
Kulturflaschen	Becton-Dickson, Heidelberg, Deutschland
Kulturplatten (96-, 48-, 24-, 6-Vertiefung)	Costar, Corning, USA
Kulturschalen (ø 10 cm)	Greiner Bio-One, Frickhausen, Deutschland
Microlite™ 2 FB Microtiter® Platten	Thermo Electron, Dreieich, Deutschland
Nitrozellulosemembran OPTITRAN® BA-S 83	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pipetten (2-, 5-, 10 ml)	Costar, Corning, USA
Pipettenspitzen (10-, 200-, 1.000 µl)	Greiner Bio-One, Frickhausen, Deutschland
Plattenabdichter	Dunn Labortechnik, Aasbach, Deutschland
Plattenabdichter ‚Area Seal‘	Dunn Labortechnik, Aasbach, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,2-, 1,5-, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsröhrchen (15 bzw. 50 ml)	Becton-Dickson, Heidelberg, Deutschland
Safetytips (10-, 200-, 1.000 µl)	Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag, Deutschland
Skalpelle	Swann-Morton, Sheffield, England
Sterilfilter (0,45 bzw. 0,22 µm)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Vivacell 100 (MWCO 300 kDa)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zellsiebe (70 µm)	Becton-Dickson, Heidelberg, Deutschland

2.1.3. Biochemische Kits

Produkt	Hersteller/Vertrieb
CaPhos Transfection	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ECL™ Western Blotting System	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Innotest™ HIV Antigen mAB	Innogenetics, Heiden, Deutschland
Nucleo Bond PC100 bzw. 500	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nucleo Spin Extract II	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Protino® Ni-IDA 150	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
QIAamp® Viral RNA Mini	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuickPrep mRNA Purification	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
<i>Renilla</i> Luciferase Assay System	Promega Corporation, Madison WI, USA

2.1.4. Chemikalien

Produkt	Hersteller/Vertrieb
5-Brom-4-Chlor-Indoyl- β -D-Galaktosid (Xgal)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis- (30%), Rotiphorese	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Adenosin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Agarose	Qbiogene Inc., Carlsbad, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bacto-Trypton	Becton-Dickson, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Hefeextrakt	Becton-Dickson, Heidelberg, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
β -Mercaptoethanol (50 mM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cytidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, Deutschland
dNTPs	NatuTec, Frankfurt/Main, Deutschland
Dubecco's Modified Eagle Medium, DMEM/F12	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EDTA-Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Erythrocyten Lysispuffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Essigsäure 99%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99,8%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Fetal Calf Serum, dialysiert	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd 37%	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
G418 (Neomycin)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Galanthus nivalis</i> Lectin Agarose-konjugiert	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol/Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Guanosin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HAT Medium Supplement Hybri-Max™	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HCFS (Hybridoma Cloning and Fusion Supplement)	Roche, Mannheim, Deutschland

HEPES-Lösung (1 M)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HT Medium Supplement Hybri-Max™	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hygromycin	MP Biomedical, Eschwege, Deutschland
Interferon- γ Maus rekombinant	MP Biomedical, Eschwege, Deutschland
Isopropylthiogalactoside (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
LB-Agar	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamine (200 mM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
L-Methionin Sulfoximin (L-MSX)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methyl- α -D-manno-pyranosid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Milchpulver	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NEAA (Nichtessentielle Aminosäuren)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD Protein-Marker IV	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Phosphat-Citrat Puffer Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS) 1x bzw. 10x	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Polyethylenglykol (PEG) 1.500	Roche, Mannheim, Deutschland
Polyethylenglykol (PEG) 6.000	Merck, Darmstadt, Deutschland
Polyethylenglykol (PEG) 10.000	Merck, Darmstadt, Deutschland
Puromycin	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Quick-Load™ 1 kb DNA Ladder	New England BioLabs, Bad Soden, Deutschland
Random Primer (dN6)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (Titrisol®)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS) 99%	Carl, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetracyclin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thymidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tween-20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Uridin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.5. Enzyme und Inhibitoren

Produkt	Hersteller/Vertrieb
BioTherm™ Polymerase	Genecraft, Lüdinghausen, Deutschland
Calf Intestinal Phosphatase, (CIP)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DNA Restriktionsendonukleasen: <i>NcoI</i> , <i>BstEII</i>	New England BioLabs, Bad Soden, Deutschland
HiFi-DNA Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail (für Zellkulturmedien)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RNase OUT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RT Super Script RNase- Transkriptase II	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
T4-DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4-DNA Polymerase	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.6. Antikörper

Name	Hersteller / Vertrieb
Maus α -M13 gp8 monoklonaler AK	Abcam, Cambridge, England; Prod.-Nr.: ab9225
447-52D	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 V3 Monoclonal Antibody (447-52D) from Dr. Susan Zolla-Pazner
Md-1	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: Human Monoclonal Antibody to HIV-1 (Md-1) from Robert A. Myers
HRP-konj. Esel α -Human IgG (H+L)	Dianova, Hamburg, Deutschland; Prod.-Nr.: 709-035-149
HRP-konj. Ziege α -Maus IgG (H+L)	Dianova, Hamburg, Deutschland; Prod.-Nr.: 109-005-003
HRP-konj. Ziege α -Human IgG (H+L)	Dianova, Hamburg, Deutschland; Prod.-Nr.: 109-035-064
Ziege α -Human PE	Dianova, Hamburg, Deutschland; Prod.-Nr.: 109-116-088

2.1.7. Peptidbibliotheken

Name	Hersteller / Vertrieb
HIV-1 Consensus Group M Env (15mer) Peptides – Complete Set	AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. Cat-Nr: 9487
HIV-1 Consensus Group B Env (15mer) Peptides – Complete Set	AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. Cat-Nr: 9480
HIV-1 Consensus Group C Env (15mer) Peptides – Complete Set	AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. Cat-Nr: 9499
HIV-1 Mn Env (15mer) Peptides – Complete Set	AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. Cat-Nr: 6451

2.2. Medien, Lösungen und Puffer in der Molekularbiologie

2.2.1. Medien

LB-Medium (autoklaviert)

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
dH ₂ O	ad 1 l

2YT-Medium (autoklaviert)

Bacto Tryptone	16 g
Bacto Yeast Extract	10 g
NaCl	5 g
dH ₂ O	ad 1 l

2.2.2. Lösungen

Antibiotika-Stocklösungen

Ampicillin in dH ₂ O lösen (1.000fach Stocklösung)	100 mg/ml
Kanamycin in dH ₂ O lösen (100fach Stocklösung)	10 mg/ml
Tetracyclin in Ethanol lösen (250fach Stocklösung)	10 mg/ml

10% APS

Ammoniumperoxodisulfat, Lagerung bei -20°C	0,1 mg/ml
--	-----------

50 mM CaCl₂-Lösung

CaCl ₂	0,56 g
dH ₂ O	ad 100 ml

50% Glycerin

Glycerin	50 ml
dH ₂ O	ad 100 ml

IPTG-Stock (0,5 M; 1.000x)

IPTG	1 g
dH ₂ O	ad 8,4 ml
sterilfiltrieren (0,22 µm) und bei -20°C lagern	

Methyl-α-D-manno-pyranosid Lösung (0,5 M)

Methyl-α-D-manno-pyranosid	97 g
PBS	ad 500 ml
autoklavieren und bei 4°C steril lagern.	

0,1 M MgCl₂-Lösung

MgCl ₂	0,95 g
dH ₂ O	ad 100 ml

5% Milchpulver/PBS/0,5% Tween-20 (5% MPBST)

Milchpulver	5 g
10x PBS	10 ml
Tween-20	500 µl
dH ₂ O	ad 100 ml

0,5% PBST ELISA und Western-Blot Waschlösung

10fach PBS	100 ml
Tween-20	500 µl
dH ₂ O	ad 1 l

20% PEG-10.000, 0,9 % NaCl-Lösung (autoklaviert)

PEG-10.000	200 g
NaCl	9 g
dH ₂ O	ad 1 l

20% PEG-6.000, 15 % NaCl-Lösung (autoklaviert)

PEG-6.000	200 g
NaCl	150 g
dH ₂ O	ad 1 l

4% Sammelgel (SDS PAGE)

30% Rotiphorese	13 ml
0,5 M Tris pH 6.8	25 ml
10% SDS	1 ml
dH ₂ O	ad 100 ml

10% SDS

SDS	20 g
dH ₂ O	ad 200 ml

12% Trenngel (SDS PAGE)

30% Rotiphorese	40 ml
1,5 M Tris pH 8.8	25 ml
10% SDS	1 ml
dH ₂ O	ad 100 ml

XGal-Stocklösung

XGal	200 mg
DMF	ad 1 ml

2.2.3. Puffer

10fach Probenpuffer (SDS PAGE)

100% Glycerin	5 ml
SDS	1,5 mg
3 M Tris pH 8.0	1,66 ml
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
Bromphenolblau	5 mg
dH ₂ O	ad 10 ml

TAE-Puffer

Tris	4,84 g
Essigsäure	1,2 g
EDTA	0,29 g
dH ₂ O	ad 1 l

10fach TGS Laufpuffer (SDS PAGE)

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
dH ₂ O	ad 1 l

10fach Towbin Transfer Puffer (Western Blot)

Tris	30 g
Glycin	144 g
dH ₂ O	ad 1 l

Für 1x Puffer 50 ml 10x Puffer und 100 ml Methanol mit dH₂O auf 500 ml auffüllen.

2.3. Medien, Lösungen und Puffer in der Zellkultur

2.3.1. Medien

293T und TZM-bl Kulturmedium

DMEM Medium	500 ml
10% FCS	50 ml
200 mM L-Glutamin (entspricht 4 mM)	10 ml
1% Penicillin/Streptomycin	5 ml

CRL1597 (Myeloma) Kulturmedium

DMEM/F12 Medium	500 ml
10% FCS	50 ml
200 mM L-Glutamin (entspricht 4 mM)	10 ml
1 M HEPES Lösung (entspricht 10 mM)	5 ml

HAT Hybridomakulturmedium

DMEM/F12 Medium	500 ml
HAT Medium Supplement	10 ml
HCFS Medium Supplement	10 ml
1 M HEPES Lösung (entspricht 10 mM)	5 ml
200 mM L-Glutamin (entspricht 2 mM)	5 ml
1% Penicillin/Streptomycin	5 ml
Gentamycin	5 ml
50 mM β -Mercaptoethanol (entspricht 100 μ M)	1 ml

HT Hybridomakulturmedium

DMEM/F12 Medium	500 ml
FCS Medium Supplement	50 ml
HAT Medium Supplement	10 ml
1 M HEPES Lösung (entspricht 10 mM)	5 ml
200 mM L-Glutamin (entspricht 2 mM)	5 ml
NEAA	5 ml
1% Penicillin/Streptomycin	5 ml
Na-Pyruvat	5 ml
Gentamycin	2,5 ml
50 mM β -Mercaptoethanol (entspricht 50 μ M)	0,5 ml

Lec⁻-CHO ADA.C1 und CHO-neg Kulturmedium

GMEM Medium	500 ml
Dialysiertes FCS (Glutamine-frei)	50 ml
Nucleosid-Lösung (50x)	10 ml
NEAA	5 ml
L-Glutamat/L-Asparagin-Lösung	5 ml
Sodium Pyruvat	5 ml
1% Penicillin/Streptomycin	2,5 ml
L-MSX-Lösung	0,125 ml

U87.CD4.CCR5 und U87.CD4.CXCR4 Kulturmedium

DMEM Medium	500 ml
15% FCS	75 ml
2% L-Glutamin	10 ml
1% Penicillin/Streptomycin	5 ml
300 μ g/ml G418 (Neomycin) [1 g/ml]	177 μ l
1 μ g/ml Puromycin [25 μ g/ μ l]	24 μ l

2.3.2. Lösungen

3% Formaldehyd-Lösung

37% Formaldehyd	3,24 ml
dH ₂ O	ad 40 ml

L-Glutamat/L-Asparagin-Lösung

L-Glutamat	600 mg
L-Asparagin	600 mg
dH ₂ O	ad 100 ml
sterilfiltrieren; Lagerung bei 4°C	

L-MSX Stocklösung

L-MSX	18 mg/ml in PBS
sterilfiltrieren; in 1ml Aliquots bei -20°C lagern	

Natriumbutyrat

Natriumbutyrat	1,1 g
PBS	ad 10 ml
sterilfiltrieren; in 1 ml Aliquots bei -20°C lagern	

Nucleosidlösung

Adenosin	35 mg
Guanosin	35 mg
Cytidin	35 mg
Uridin	35 mg
Thymid	12 mg
dH ₂ O	ad 100 ml
sterilfiltrieren; Lagerung bei 4°C	

XGal-Färbelösung

200 mg/ml X-Gal	(Stocklösung: 1 g in 5 ml DMF)	40 µl
1 M MgCl ₂	(Stocklösung: 10,17 g in 50 ml dH ₂ O)	40 µl
100 mM Ferricyanid	(Stocklösung: 1,65 g in 50 ml dH ₂ O)	1,2 ml
100 mM Ferrocyanid	(Stocklösung: 2,11 g in 50 ml dH ₂ O)	1,2 ml
dH ₂ O	ad 40 ml	

In 11 ml aliquotieren; Lagerung bei -20°C; vor Benutzung erwärmen und sterilfiltrieren (0,22 µm).

2.3.3. Puffer

Carbonatpuffer

Na ₂ CO ₃	4,24 g
NaHCO ₃	5,04 g
dH ₂ O	ad 1 l
pH	9.6

sterilfiltrieren und bei 4°C kühl lagern

FACS-Puffer

FCS	1 ml
PBS	ad 100 ml

2.4. Organismen

2.4.1. Zelllinien

293T

Die Zelllinie stammt von humanen, embryonalen Nierenzellen ab und ist stabil mit dem großen T-Antigen aus SV40 transfiziert, wodurch Plasmide mit diesem Replikationsursprung nach Transfektion in die Zelle amplifizierbar sind. Alle drei bis vier Tage werden die adhären wachsenden Zellen mit EDTA-Trypsin-Lösung abgelöst und in frischem Medium verdünnt passagiert. Die Zellen sind mit klassischen Transfektionsmethoden hoch transfizierbar.

(LGC Standards, Catalog Number: CRL-11268™)

CHO neg

Diese Zelllinie basiert auf der Chinesischen Hamster Ovar Zelllinie (CHO) und wird häufig in eukaryotischen Expressionssystemen eingesetzt. Da die Zelllinie außerstande ist Prolin zu synthetisieren, muss dies im Medium zugeführt werden. Sie wächst adhären und ist einfach zu handhaben.

Die CHO-neg Zelllinie wurde stabil mit dem Vektor pEE14 transfiziert und dient als Negativkontrolle für Expressionen mit diesem Vektorsystem. Der Vektor bringt das Gen Glutaminsynthetase mit, welche für die Umwandlung von Glutamat in Glutamin verantwortlich ist. Durch Zugabe von geringen Mengen L-MSX wird die zelleigene Glutaminsynthetase inaktiviert und die im Vektor codierte Glutaminsynthetase kann in Glutamin-freiem Medium als Selektionsmarker dienen.

(NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Catalog Number: 2238)

CRL1597

Hierbei handelt es sich um eine Maus-B-Lymphoblasten Zelllinie (Myeloma), die zur Gewinnung von Hybridomazellen eingesetzt wird. Die Zellen wachsen in Suspension und können bis zu einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml kultiviert werden. Alle drei bis vier Tage wird ein Teil der Kultur in frisches Medium übergehoben und die Zellen bei 37°C und mit 5% CO₂ inkubiert.

(LGC Standards, Catalog Number: CRL-1597™)

Lec⁻-CHO ADA.C1

Um bei glykosylierten Konstrukten eine homogenere Expression zu erhalten, wurde das Glykosylierungssystem der Zellen modifiziert (Lec⁻-CHO). In diesen Zellen exprimierte Glykoproteine besitzen nur noch die Mannose-reichen Glykosylierungen des Endoplasmatischen Retikulums. Diese Zellen exprimieren eine gp140 Variante von HIV-1 Env. Zur besseren Expression wurde dem Konstrukt (pEE14-ADA.C1) eine Kozaksequenz vorgeschaltet und zur Steigerung der Sekretion das HIV-1 Signalpeptid durch eine tPA-Signalsequenz ersetzt. Um eine Expression von HIV-1 Env Trimeren zu erlangen, wurde die primäre Schnittstelle zwischen gp120 und gp41 mutiert. Die Expressionskassette enthält die komplette Sequenz von HIV-1 Env (Isolat ADA) bis zur Lysin-Aminosäure des ELDKWA-Motivs. Die Expression von ADA.C1 führt zur Anreicherung von mono-, di- und trimeren gp140 Konstrukten im Zellkulturüberstand³⁶⁴.

TZM-bl

Früher als JC53-bl (Klon 13) bezeichnet, leiten sich die TZM-bl Zellen von HeLa Zellen ab. Sie exprimieren stabil große Mengen an CD4, CCR5 und CXCR4. Als Reporter wurden die Gene der Luciferase und β-Galactosidase unter der Kontrolle des HIV-1 Promotors integriert. Die Zelllinie ist hochsensitiv für Infektionen mit verschiedenen HIV-1 Isolaten und erlaubt durch beide Reporterenzyme eine leichte und quantitative Analyse der HIV-1 Infektion (z.B. Titerbestimmung) durch Messung der β-Gal- oder Luciferaseexpression.

(NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Catalog Number: 8129)

U87.CD4.CCR5

Diese Zelllinie stammt von menschlichen Glioblastoma-Zellen ab (U87MG) und ist stabil mit den Genen für die humanen Rezeptoren CD4 und CCR5 transfiziert, die unter der Kontrolle eines MLV Promotors stehen. Die Zellen sind sehr adhärent, wachsen langsam und sollten bei einer Dichte von maximal 80% nicht zu dünn passagiert werden.

(NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Catalog Number: 4035)

2.4.2. Mausstämme

IMRI-Maus

Die IMRI Maus entstand durch eine Auszucht der ImmortoMouse mit NMRI Mäusen. Der aufgrund der Auszucht breitere genetische Hintergrund soll eine ‚bessere‘ Immunantwort ermöglichen. Darüber hinaus ermöglicht das temperatursensitive große Tumorantigen der ImmortoMouse nach Induktion mit Interferon γ eine Kultivierung primärer Zellen bei einer Temperatur von 30°C.

2.4.3. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
BL21-DE3 Gold	F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ER2738	F' proA+B+ lacIq Δ (lacZ)M15 zcf::Tn10(TetR)/ fhuA2 glnV Δ (lac-proAB) thi-1 Δ (hsdS-mcrB)5	New England BioLabs, Bad Soden, Deutschland
TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galJ galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
XL1-blue MRF'	Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI ^f Z Δ M15 Tn 10 (Tet ^f)]	Stratagene, La Jolla, USA
XL-10-Gold	Tet ^f Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^f Z Δ M15 Tn 10 (Tet ^f) Amy Cam ^f]	Stratagene, La Jolla, USA

2.4.4. Helferphage

Name	Hersteller / Vertrieb
M13-KO7	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.4.5. Viren

Name	Hersteller / Vertrieb
HIV-1 89.6	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 89.6 from Dr. Roland Collman
HIV-1 JR-CSF	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1J R-CSF from Dr. Irvin Chen

2.5. Primer

Primer	Info	Sequenz (5' → 3')
N	-, cDNA	CTG CCA ATC AGG GAA GTA GCC TTG TGT
RT-UD	-, cDNA	GGT GTG TAG TTC TGC CAA TCA GG
A	+, außen	GGC TTA GGC ATC TCC TAT GGC AGG AAG AA
6191-UD	+, außen	GAT AGA ATA AGA GAA AGA GCA GAA GAC AGT GG
9033-UD	-, außen	GTA AGT CAT TGG TCT TAA AGG TAC CTG AG
Mn	-, außen	ATT TGC GGC CGC TAG CCC TTC CAG TCC CCC CTT TTC TTT TA
C	+, innen	TTG TTG GTC ACC GTC TAT TAT GGG
C-UD	+, innen	TTG TGG GTA ACC GTC TAT TAT GGG GTA C
TNE3	-, innen	GGA TCT CCA TGG CTT ATA GCA AAA TCC TTT CCA AGC CCT GTC TTA TTC TTC TAG G
TNE3-UD	-, innen	GGA TCT CCA TGG CTT ATA GCA ATA TCC TTT CTA ACC CCT GTA TTA TTC TTC TAG G
TNE3-G	-, innen	GGA TCT CCA TGG CTT ATA GCA AAA TCC TTT CCA AGC CCT GTC TTA TTC TTG TAG G

2.6. Plasmide

Name	Hersteller / Vertrieb
pYU2	NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pYU-2 from Dr. Beatrice Hahn
pTN7- Δenv	PD Matthias T. Dittmar, Centre for Infectious Disease, Institute of Cell and Molecular Science, Barts and The London, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, London, United Kingdom
pTN7-NL4-3	PD Matthias T. Dittmar, Centre for Infectious Disease, Institute of Cell and Molecular Science, Barts and The London, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, London, United Kingdom

2.7. EDV

Name	Hersteller / Vertrieb
Bio Edit	Ibis Biosciences, Carlsbad, USA
CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Graphics Suite 11	Corel, Ottawa, Kanada
Lasergene 6	DNASar, Madison, USA
N-GlycoSite	http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html ³⁶⁷
Office 2007	Microsoft, Redmond, USA
Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
VBASE2	www.vbase2.org ²⁷⁶
VESPA	http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html ¹⁷²

2.8. Methoden

2.8.1. Amplifikation von HIV-1 *env* Genen

Zur genetischen und funktionellen Analyse des *env* Gens primärer Viren wird virale RNA aus Plasma-proben HIV-1 positiver Patienten gewonnen, in cDNA transkribiert und über PCR amplifiziert. Bei Labor-adaptierten Virusisolaten erfolgt die Isolierung der viralen RNA aus HIV-1 infizierten PBMC-Kulturen.

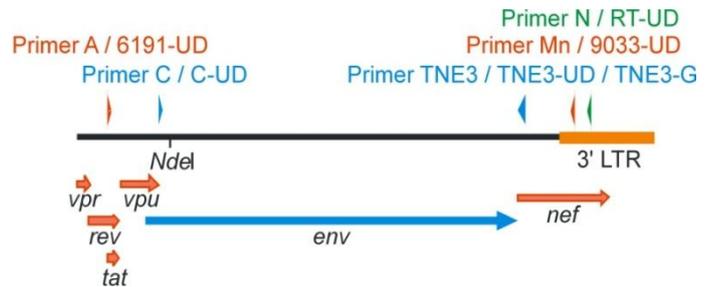


Abbildung 14: PCR-Schema der *env*-Amplifikation

Die Reverse Transkription erfolgt mit den Primern N/RT-UD (grün), die äußere PCR mit den Primern A/6191-UD und Mn/9033-UD (rot), die innere PCR mit den Primern C/C-UD und TNE3/TNE3-UD/TNE3-G (blau).

2.8.1.1. Isolierung viraler RNA

Die Isolierung viraler RNA (vRNA) erfolgte mit dem QIAmp[®] Viral RNA Mini von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Aufgrund der geringen viralen Last in den Seren der LTNP wird zur Anreicherung der HI-Viren 1 ml Plasmaprobe in einer Ultrazentrifuge bei 4°C mit 20.000 rpm für 10 min pelletiert. Der Überstand wird bis auf 180 µl mit den darin enthaltenen Antikörpern der Patienten abgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Das Pellet wird resuspendiert und zur Gewinnung der vRNA weiterverarbeitet. Die gereinigte vRNA wird in 60 µl Elutionspuffer aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.8.1.2. Reverse Transkription komplementärer DNA aus vRNA

Mit Hilfe Reverser Transkription wird vRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Synthese der cDNA erfolgt mit den Primer N oder RT-UD (Abbildung 14).

	Menge / Ansatz	
Primer [10 µM]	1,0 µl	Prämix
ddH ₂ O	1,0 µl	
vRNA	10,0 µl	
5x Super Script Puffer	4,0 µl	Reaktionsmix
DTT [0,1 M]	2,0 µl	
dNTP [je 2,5 mM]	1,0 µl	
RNase OUT	0,5 µl	
RT Super Script RNase Transkriptase II	0,5 µl	

Zu Beginn der cDNA-Synthese wird der Prämix angesetzt und für 10 min bei 65°C inkubiert, um so eine Entfaltung der RNA zu ermöglichen. Anschließend wird der Reaktionsmix zugesetzt und der durchmischte Ansatz inkubiert bei:

42°C	1,5 h
72°C	10 min
4°C	∞

2.8.1.3. Nested-PCR

Das *env* Gen wird mittels nested-PCR aus der cDNA gewonnen. Über die Primer der inneren PCR, werden die Restriktionsschnittstellen (*Bst*EII und *Nco*I) eingebracht.

	Menge / Ansatz
Templat	2,0 µl
Primer fwd [10 µM]	1,0 µl
Primer rev [10 µM]	1,0 µl
dNTP [je 2,5 mM]	1,2 µl
5x HiFi-PCR-Puffer ohne Mg ²⁺	10,0 µl
Mg ²⁺ [25 mM]	5,0 µl
5x Q-Solution (Qiagen)	10,0 µl
ddH ₂ O	19,3 µl
HiFi-Polymerase [5 U/µl]	0,5 µl

Die Amplifikation in der äußeren PCR erfolgt mit folgendem Programm:

95°C	2 min	
<hr/>		
95°C	30 sec	
57°C	40 sec	30-40 Zyklen
72°C	3 min	
<hr/>		
72°C	10 min	
4°C	∞	

Die innere Nested PCR wie folgt:

95°C	2 min	
<hr/>		
95°C	30 sec	
55°C	40 sec	30-40 Zyklen
72°C	2:30 min	
<hr/>		
72°C	10 min	
4°C	∞	

Die nested PCR wird mit einem 1%igen Agarosegel überprüft. Hierzu werden 2 µl Probe mit 8 µl destilliertem Wasser und 2 µl Probenpuffer versetzt und im Gel aufgetrennt (100 V,

30 min). Waren mehrere Amplifikate vorhanden, erfolgt eine präparative Auftrennung der Konstrukte in einem 1%igen Agarosegel. Die gewünschten Amplifikate werden mit dem ‚NucleoSpin® Extract II‘-Kit aufgereinigt.

2.8.2. Klonierung HIV-1 Env-rekombinanter Reporterviren (RRV)

Mit Hilfe des Plasmids pTN7-Δenv ist es möglich, HIV-1 Env-rekombinante Reporterviren (RRV) mit patienteneigenen Env herzustellen. Das Plasmid codiert für das env deletierte Genom von HIV-1 NL4-3 und ermöglicht über die Restriktionsschnittstellen *BstEII* und *NcoI* das Einbringen einer beliebigen env Sequenz. Als Reporter besitzt das Plasmid anstelle des viralen *nef* das Gen *Renilla* Luciferase. Dies ermöglicht, durch die Ligation mit einer HIV-1 env Sequenz, die Produktion rekombinanter, replikationskompetenter HI-Viren, deren Infektiosität durch die Expression von *Renilla* Luciferase nachgewiesen werden kann.

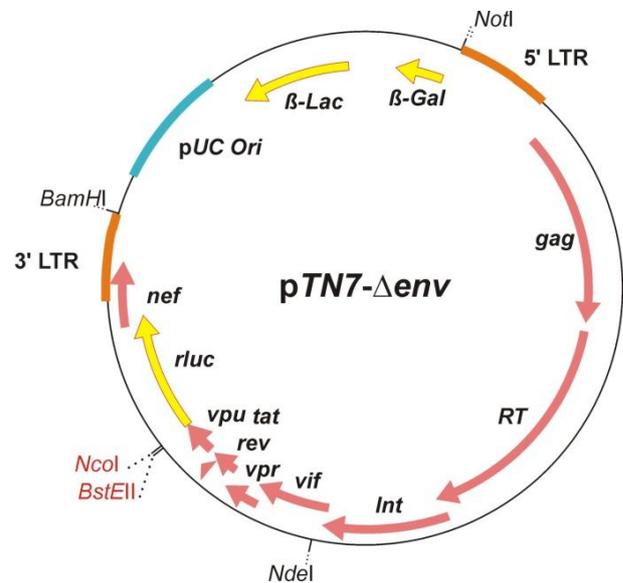


Abbildung 15: Plasmidkarte von pTN7-Δenv

Über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BstEII* kann eine heterologe env Sequenz zur Gewinnung HIV-1 Env-rekombinanter Reporterviren (RRV) eingebracht werden.

2.8.2.1. Restriktion der env Gene

Für die Ligation der amplifizierten env Gene mit pTN7-Δenv, erfolgt die Restriktion der PCR Produkte mit den Enzymen *BstEII* und *NcoI* nach folgendem Ansatz:

	Menge / Ansatz
PCR-Produkt	48,0 µl
Puffer (10x)	6,0 µl
BSA (10x)	6,0 µl
Restriktionsenzyme	je 1,0 µl

37°C über Nacht
 65°C 20 min
 4°C ∞

Das restringierte PCR-Produkt wird nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 20 µl eluiert (Nucleo Spin Extract II).

2.8.2.2. Restriktion und Dephosphorylierung von pTN7- Δenv

Der Vektor pTN7- Δenv wird ebenfalls mit den Enzymen *BstE*I und *Nco*I verdaut:

	Menge / Ansatz
Plasmid-DNA	40,0 μ l
Puffer (10x)	5,0 μ l
BSA (10x)	5,0 μ l
Restriktionsenzym	je 2,5 μ l

37°C über Nacht
65°C 20 min

Im Anschluss wird die restringierte Plasmid-DNA aufgereinigt und in 40 μ l eluiert. Durch die Behandlung mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP) werden die 5'-Phosphatenden der Schnittstellen entfernt und somit gewährleistet, dass die Ligation vom Insert ausgeht:

	Menge / Ansatz
restringierte Plasmid-DNA	40,0 μ l
Puffer (10x)	5,0 μ l
CIP	5,0 μ l

Der Ansatz wird für 4 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss die dephosphorylierte Plasmid-DNA aufgereinigt (Nucleo Spin Extract II), auf eine Konzentration von 25 ng/ μ l eingestellt und bei -20°C gelagert. Die Präparation des Vektors wird auf einem 1%igem Agarosegel überprüft. Als Kontrolle dient hierbei der unverdaute Vektor. Die Qualität der Dephosphorylierung wird durch eine Transformation ohne Ligase kontrolliert.

2.8.2.3. Ligation der *env* PCR-Produkte mit pTN7- Δenv

Zur Ligation von pTN7- Δenv mit den amplifizierten *env* Genen werden der aufgearbeitete Vektor und *env* PCR-Produkte eingesetzt:

	Menge / Ansatz
pTN7- Δenv (25 ng/ μ l)	1,0 μ l
<i>env</i> Amplifikat (ca. 50 ng/ μ l)	2,0 – 4,0 μ l
10x Ligasepuffer	1,0 μ l
PEG 1.000 Lösung	1,0 μ l
ddH ₂ O	2,0 – 4,0 μ l
T4-Ligase [1 U/ μ l]	1,0 μ l

22°C 2 h
65°C 10 min
4°C ∞

Nach der Ligation wird der Ansatz in *E.coli* XL10 oder TOP10 Zellen transformiert. 10 µl des Transformationsansatzes werden auf einer LB_{Amp} Kulturplatte ausgestrichen. Mit dem verbleibenden Volumen werden 100 ml LB_{Amp} Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wird anhand von zehn Klonen die Ligations-effizienz der Ansätze überprüft, von der Flüssigkultur mit 50% Glycerinlösung mehrere Glycerinstocks angelegt und eine Plasmid-DNA-Präparation durchgeführt.

2.8.2.4. Herstellung transformationskompetenter *Escherichia coli*

Zur Transformation von *Escherichia coli* (TOP10 oder XL10-Gold) mit Ligationsprodukten oder vollständigen Plasmiden werden zunächst kompetente Bakterien hergestellt. Mit 2 ml einer *E.coli* Übernachtskultur werden 200 ml LB-Medium angeimpft und bei 30°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 - 0.7 kultiviert. Im Anschluss werden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und hiernach bei 4°C abzentrifugiert (10 min, 4°C, 1.500 rpm). Von nun an sind alle Schritte auf Eis durchzuführen. Zunächst wird das Zellpellet in 20 ml kalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert (10 min, 4°C, 1.500 rpm). Das Pellet wird ein zweites Mal in 20 ml 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert (10 min, 4°C, 1.500 rpm) und vorsichtig in 2 ml 50 mM CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerin resuspendiert. Abschließend werden die Zellen aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Kompetenz erfolgt mit einer Verdünnungsreihe eines zirkulären Vektors mit einer Größe von ca. 5 kbp im Bereich von 10⁻⁵ bis 10⁻¹⁰.

2.8.2.5. Transformation kompetenter *Escherichia coli*

Ein 50 µl Aliquot kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut, mit einem Ligationsansatz vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wird das Gemisch für 30 sec im 42°C warmen Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt, erneut für 2 min auf Eis inkubiert und danach 450 µl LB-Medium zugesetzt. Der Ansatz wird für 45 min in einem Schüttler bei 37°C und anschließend über Nacht bei 37°C auf einer LB-Agar Platte mit entsprechenden Antibiotika inkubiert.

2.8.2.6. Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgt nach Herstellerangaben im Miniformat (bis 2 ml Kultur) mit dem ‚Nucleo Spin Extract II‘-Kit, im Midi- und Maxiformat (100-500 ml Kultur) mit dem ‚Nucleo Bond PC100 bzw. PC500‘-Kit.

2.8.3. Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung nach Sanger erfolgt mit Hilfe eines Kapillarsequenziergeräts (3100-Avant Genetic Analyzer) und dem ‚Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit‘ der Firma Applied Biosystems. Für eine Sequenzreaktion wurden ca. 500 ng Templat eingesetzt und nach Herstellerangaben bearbeitet. Die Sequenzanalyse erfolgt mit dem Programm Lasergene 6.

2.8.4. Sequenzmusteranalyse

Die Identifizierung potenzieller Sequenzmuster erfolgt mit dem Online-Tool VESPA. Zunächst werden die zu untersuchenden Proteinsequenzen mit dem ClustalW Algorithmus in dem Program BioEdit aligned. Anschließend werden die Sequenzen der LTNP und HIV-1 Kontrollpatienten getrennt, in zwei separaten Dateien gespeichert und als Queryset (LTNP) und Kontrollset (HIV-1 Kontrollpatienten) in VESPA eingeladen und analysiert (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/P-vespa/vespa.html>)¹⁷². Für die Analyse von Nef wird ein Referenzset (Nef HIV-1 Subtyp B; Jahr 2005) der HIV-1 DATABASE als Kontrollset herangezogen (http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/SUBTYPE_REF/align.html).

2.8.5. Bestimmung der N-Glycosylierungsstellen

Zur Bestimmung potenzieller N-Glycosylierungsstellen wurde das Programm N-GlycoSite benutzt. Hierzu wurden die Proteinsequenzen der HIV-1 Env zunächst in BioEdit in ein Alignment gebracht, als Datei gespeichert und anschließend mit N-GlycoSite analysiert (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html>)³⁶⁷.

2.8.6. Herstellung HIV-1 Env-RRV

2.8.6.1. Transfektion von 293T Zellen zur Erzeugung HIV-1 Env-RRV

Mittels Transfektion von 293T Zellen mit den pTN7-*env* Konstrukten werden HIV-1 Env-rekombinante Reporterviren im S3-Labor (Biosicherheitslevel S3) hergestellt. Die Transfektion erfolgt nach der klassischen Calciumphosphat-Methode, welche eine einfache Handhabung mit hoher Effizienz verbindet.

In einer großen Zellkulturflasche (T-175) werden am Vortag der Transfektion $3 \cdot 10^7$ Zellen ausgebracht. Zwei Stunden vor der Transfektion werden die Zellen mit PBS gewaschen und in 40 ml frischem Medium aufgenommen. Pro Transfektionsansatz werden 25 µg Plasmid und 120 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung mit dH₂O auf 1,2 ml verdünnt und vermischt. Die Lösung wird unter Blasenbildung langsam, tropfend zu 1,2 ml vorgelegtem 2fach HEPES Puffer zugegeben, das Gemisch kurz gevortext und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wird der Transfektionsansatz auf die Zellen getropft, die Kulturflaschen vorsichtig geschwenkt und

über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag werden 20 ml frisches Medium zugesetzt und die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Für die Ernte der rekombinanten Viren werden die Überstände abgenommen, durch zehnmütiges Zentrifugieren mit 1.500 rpm bei 4°C von Zelltrümmern befreit und sterilfiltriert (0,45 µm). Zur späteren Bestimmung der Replikationskompetenz werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 20 ml PBS resuspendiert. 1 ml der Zellsuspension wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß übertragen, für 5 min bei 4°C mit 3.000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 500 µl *Renilla* Luciferase Lysis-Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.8.6.2. Aufkonzentrieren von HIV-1 Env-rekombinanten Reporterviren

Je nach Verwendung der HIV-1 Env-RRV werden diese direkt nach der Ernte nach einer der folgenden Methoden aufkonzentriert. Zur Neutralisationsmessung (2.8.9 unten) werden die gefilterten Viren in der Zentrifuge mit Konzentratoren (MWCO 300 kDa, Vivacell) 1:20 aufkonzentriert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Zur Bestimmung der Infektiosität und der Replikationskompetenz erfolgt eine PEG-Fällung. Hierzu werden die gefilterten Überstände in 50 ml Reaktionsröhrchen mit einem Volumen PEG 10.000-Lösung vermischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die gefällten Viren für 30 min bei 4°C mit 2.000 rpm pelletiert, in 200 µl PBS aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

2.8.7. Infektiosität HIV-1 Env-RRV

Die Infektiosität einer Viruspräparation wird als der Quotient infektiöser Viren zur Gesamtzahl aller Viren angegeben. Die Anzahl infektiöser Partikel pro Milliliter wird mit einem Infektionstest bestimmt, die Gesamtzahl der Viren mit einem p24-Antigentest ermittelt.

2.8.7.1. Titerbestimmung Env-rekombinanter Reporterviren

Die Bestimmung des Titers der RRV Präparationen erfolgt mit Hilfe der TZM-bl Zellen. Diese Zelllinie exprimiert den für die Infektion mit HIV-1 notwendigen Rezeptor CD4, die beiden Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 und trägt ein β-Galaktosidasegen unter Kontrolle des HIV-1 Promotors. Hierdurch erscheinen infizierte Zellen nach der Zugabe einer XGal-Lösung blau, was eine einfache Auswertung ermöglicht.

Am Vortag werden 10⁴ TZM-bl Zellen in 100 µl Medium pro Vertiefung einer 96-Vertiefung-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wird das Medium von den Zellen abgenommen und mindestens vier Stufen einer 5fach-Verdünnungsreihe (ausgehend von 1:5 zw. 1:10) der Viren mit frischem Medium angesetzt. In Triplikaten werden die Zellen mit 100 µl Virusverdünnung infiziert und für 44 h im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Zellen mit 180 µl PBS gewaschen, drei Minuten mit 60 µl Fixierlösung fixiert, erneut gewaschen, mit 100 µl XGal-Färbelösung überschichtet und über Nacht bei

Raumtemperatur inkubiert. Die gefärbten Zellen jeder Verdünnung werden am folgenden Tag ausgezählt und der Titer der Präparation bestimmt. Dieser wird in Infektiosen Einheiten pro ml (IU/ml) angegeben:

$$\text{Titer} \left[\frac{\text{IU}}{\text{ml}} \right] = \sum \text{blaue Zellen} \left[\frac{\text{IU}}{100\mu\text{l}} \right] \cdot \text{Verdünnung} \cdot 10$$

2.8.7.2. Bestimmung der p24 Konzentration

Die Bestimmung der p24 Konzentration der Viruspräparationen erfolgt mit dem INNOTEST™ HIV Antigen mAb Kit der Firma *Innogenetics* nach Herstellerangaben. Mit diesem Test ist es möglich, die Menge an Kapsidprotein (p24) einer Viruspräparation zu ermitteln. Zur Bestimmung der p24-Menge werden je Präparation acht Stufen einer Verdünnungsreihe gemessen und alle Werte im linearen Bereich des Assays zur Auswertung herangezogen. Nach Layne *et al.* wird anschließend mit Hilfe der ermittelten p24-Menge die Gesamtzahl der Viren berechnet¹⁸⁵:

$$\text{Viren} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{p24} \left[\frac{\text{g}}{\text{ml}} \right]}{5 \cdot 10^{-17} \left[\frac{\text{g}}{\text{U}} \right]}$$

2.8.8. Bestimmung der Replikationskompetenz HIV-1 Env-RRV

2.8.8.1. *Renilla* Luciferase-Aktivitätstest

Mit dem ‚*Renilla* Luciferase Assay System‘ kann die Aktivität von *Renilla* Luciferase (Reporterenzym) in Säugetierzellen quantifiziert werden. In der Zelle katalysiert *Renilla* Luciferase die Oxidation von Coelenterazin in Coelenteramide, wodurch Photonen freigesetzt werden. Dank des *Renilla* Luciferase Gens der HIV-1 Env-RRV ist es möglich, die Infektion einer Zelle mit diesen Viren zu bestimmen. Durch die Expression der *Renilla* Luciferase in den pTN7-*env* Konstrukten nach der Zelltransfektion, kann zusätzlich die Replikationskompetenz der HIV-1 Env-RRV ermittelt werden. Hierzu wird die Aktivität an *Renilla* Luciferase nach Zellinfektion (U87.CD4.CCR5) auf die *Renilla* Luciferase Aktivität der transfizierten Zellen (293T) normiert. Der Quotient gibt Aufschluss über Unterschiede in den Env-vermittelten Schritten der frühen Phase der Infektion.

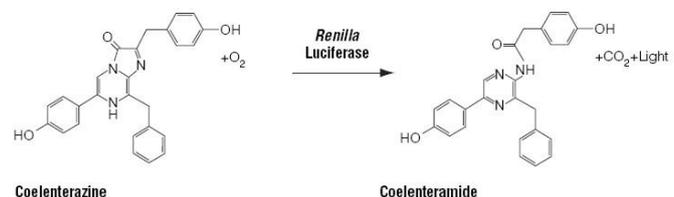


Abbildung 16: Biolumineszenzreaktion von *Renilla* Luciferase

Die Umsetzung von Coelenterazin in Coelenteramide führt zur Freisetzung von Photonen, welche im Lumino-meter quantifiziert werden.

(nach dem Produktblatt, Promega)

2.8.8.2. Infektion von U87.CD4.CCR5-Zellen mit HIV-1 Env-RRV

Ein Tag vor der Infektion werden pro Vertiefung einer 96-Vertiefung-Platte 10^4 U87.CD4.CCR5 Zellen in 100 μ l Medium ausgebracht. Tags darauf werden die Zellen mit 100 μ l Virus/Medium-Gemisch einer 5fach Verdünnungsreihe infiziert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 44 h werden die Zellen mit 180 μ l PBS gewaschen, die Platte ausgeklopft und die Zellen in 60 μ l *Renilla* Luciferase Lysispuffer aufgenommen. Anschließend werden die Zellen 20-30 min bei RT auf einem Schüttler lysiert. Zur Auswertung werden 20 μ l Zelllysate in eine weiße Mikrotiterplatte übertragen, der Rest bei -20°C eingefroren.

Vor der Messung wird das Luminometer zunächst gründlich mit Wasser gespült. Anschließend wird das Flüssigkeitssystem des Geräts mit 1,5 ml Substratlösung befüllt. Zur Messung werden 100 μ l Substratlösung zu den vorgelegten Zelllysaten dispensiert und die emittierte Lichtmenge vom Gerät mit einer Verzögerung von 1 sec integriert. Hierbei werden folgende Geräteeinstellungen gewählt und die Werte auf 1 ml Virusmenge normiert:

<i>Microplatte:</i> Dynatech 96	<i>Testtyp:</i> Well Modus	<i>Verstärkung:</i> 255
<i>Intervale:</i> 30	<i>Messzeitintervall [s]:</i> 0,3	<i>Ges. Integ.Zeit/Well [s]:</i> 9
<i>Leserichtung:</i> horizontal	<i>Verzögerung [s]:</i> 1	<i>Evaluation:</i> Summierung

2.8.8.3. Bestimmung der *Renilla* Luciferase Aktivität der Transfektionsansätze

Zur Bestimmung der Luciferase Aktivität wird eine Verdünnungsreihe der in *Renilla* Luciferase Lysis-Puffer aufgenommenen transfizierten 293T Zellen in *Renilla* Luciferase Lysis-Puffer angelegt. 20 μ l der einzelnen Verdünnungen werden in eine weiße Mikrotiterplatte übertragen und wie beschrieben auf ihre Aktivität hin ausgewertet (2.8.8.2 oben).

2.8.9. Neutralisation HIV-1 Env-RRV

Mit Hilfe der HIV-1 Env-RRV ist es möglich, die Neutralisationskapazität eines Patientenserums, Antikörpers o. ä. zu bestimmen. Diese drückt sich direkt in der Reduktion des *Renilla* Luciferase Signals der infizierten Zellen aus (Abbildung 17). Je geringer dieses Signal, desto besser die Neutralisation, die anschließend im Bezug auf entsprechende Kontrollen berechnet werden.

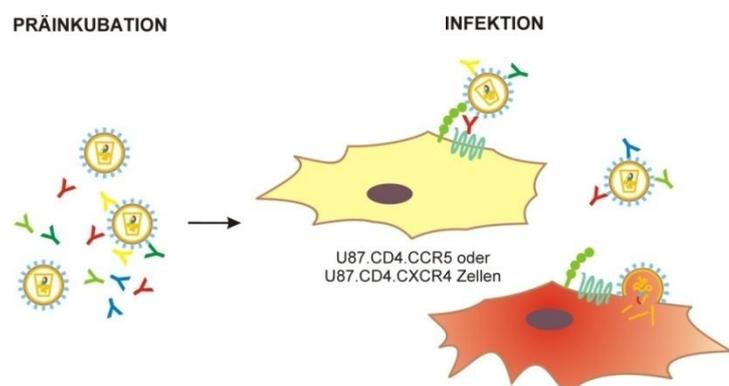


Abbildung 17: Darstellung des Neutralisationsassays

Nach einstündiger Präinkubation der HIV-1 Env-RRV mit dem Serum werden U87.CD4.CCR5 oder U87.CD4.CXCR4 Zellen infiziert. Das Maß der Infektion wird nach zwei Tagen anhand der *Renilla* Luciferase Aktivität bestimmt (rote Zelle).

In einer 96-Vertiefung-Platte werden hierzu am Vortag 10^4 U87.CD4.CCR5 oder U87.CD4.CXCR4 Zellen pro Vertiefung in 100 μ l Medium ausgebracht. Am nächsten Tag wird eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Probe angesetzt, wobei pro Vertiefung 100 IU Viren eingesetzt werden, was einer MOI von 0,01 entspricht. Da jede Verdünnung in Triplikaten gemessen wird, werden 300 IU pro Verdünnungsstufe benötigt. Diese 300 IU werden in insgesamt 300 μ l Medium mit der zu untersuchenden Probe aufgenommen und eine Stunde bei 37°C mit 200 rpm präinkubiert, um ein Binden der Antikörper an die Viren zu ermöglichen. Danach wird das virusfreie Medium von den Zellen entfernt, je 100 μ l Virus/Proben-Gemisch pro Vertiefung zugegeben und der Ansatz für 44 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen, lysiert und die *Renilla* Luciferase Aktivität am Luminometer bestimmt. Als Kontrolle und zur Berechnung dient die mittlere *Renilla* Luciferase Aktivität virusinfizierter Zellen ohne Serumzugabe (2.8.8.3 oben):

$$\text{Inhibition[\%]} = \left(1 - \left(\frac{\text{Mittelwert RLU}_{\text{Probe}}}{\text{Mittelwert RLU}_{\text{pos. Kontrolle}}} \right) \right) \cdot 100$$

Mit Hilfe der Kontrollen werden die gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) in eine prozentuale Inhibition inkl. Standardabweichung (StabW) umgerechnet:

$$\text{StabW[\%]} = \left(\frac{\text{StabW RLU}_{\text{Probe}}}{\text{Mittelwert RLU}_{\text{pos. Kontrolle}}} \right) \cdot 100$$

Für die Berechnung der Inhibitorischen Konzentration 50 bzw. 90 (IC50 bzw. IC90) wird von den Neutralisationswerten ein logarithmischer Fit abgeleitet (Microsoft Excel®) und mit Hilfe der Funktionsgleichung die Werte für IC50 und IC90 berechnet.

2.8.10. Statistik

Die Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte wird mit dem - speziell für kleine Probenmengen entwickeltem - Studentischen T-Test berechnet. Die beiden Gruppen werden je als Teil einer heteroskedastischen, zweiseitigen Lösungsmatrix angesehen. Dies ermöglicht die größte Zahl an Freiheitsgraden, weil beiden Gruppen unterschiedliche Varianzen zugestanden werden. Dem T-Test wird die Nullhypothese zu Grunde gelegt, bei der sich die Werte nicht signifikant unterscheiden. Es wird ein Signifikanzniveau (α) von 5% festgelegt. Bei Prüfwerten (p -Wert < 0,05) wird die Nullhypothese verworfen, d.h. die Werte werden mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 95% als signifikant unterschiedlich angesehen. Sind die p -Werte größer 0,05, kann die Nullhypothese nicht widerlegt werden, und mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 95% liegen keine signifikanten Unterschiede vor.

2.8.11. Phagen-ELISA

Für die Bestimmung der Reaktivität von Serumantikörpern mit Peptidphagen werden 100 µl in Carbonatpuffer verdünntes Serum (1:3.000) je Vertiefung auf einer Mikrotiterplatte ausgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wird die Platte dreimal mit je 300 µl ELISA-Waschlösung pro Vertiefung gewaschen und freie Oberflächenbereiche mit 200 µl 5% MPBST-Lösung je Vertiefung eine Stunde bei 37°C geblockt. Hiernach wird die Platte erneut wie beschrieben gewaschen und mit 100 µl Phagenlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wird die Platte mit 100 µl in 5% MPBST-Lösung verdünntem α -M13-HRP Antikörper (1:3.000) versetzt, für mind. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, sechsmal mit je 300 µl Waschlösung/Vertiefung gewaschen und mit OPD-Lösung entwickelt. Die Entwicklung wird spätestens nach 6 Minuten durch Zugabe von 100 µl H₂SO₄ je Vertiefung gestoppt und am ELISA-Reader ausgelesen (492-620 nm).

Die Durchführung der Kompetitions-ELISAs erfolgt wie beschrieben, allerdings wird nach dem Blocken 100 µl Phagen-Kompetitor-Mix (50 µl Phagenlösung gemischt mit 50 µl ADA.C1 Überstand; Verdünnung von ADA.C1 in Medium wie angegeben) je Vertiefung auf die Platten gegeben und über Nacht inkubiert.

2.8.12. Immunisierungsstudien

In Biopanning Studien mit immobilisierten Antikörpern der LTNP konnte Michael Humbert HIV-1 spezifische Peptidphagen anreichern und identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass die selektionierten Phagen entweder eine primäre oder strukturelle Homologie zu HIV-1 Env haben, also potentielle Mimotope HIV-1 spezifischer Antikörper darstellen¹⁵¹. Entsprechend ihrer Homologie wurden je vier bis sieben Phagen gruppiert und für Immunisierungsstudien eingesetzt. Als Kontrollen diente der M13-Wildtyp Phage (wt) und eine Gruppe von Phagen ohne Homologie zu HIV-1 Env (neg).

Die Immunisierung erfolgt in vier bis sechs Wochen alten IMRI Mäusen der F1-Generation. Im Abstand von je zwei bis drei Wochen werden die Mäuse mit je $2 \cdot 10^{12}$ Phagen pro Tier sechsmal s.c. immunisiert (Tag 0, 14, 28, 42, 56, 70 bzw. 0, 14, 28, 49, 70, 91). Zehn Tage nach der letzten Immunisierung (Tag 80 bzw. 101) werden die Mäuse getötet, das Serum gesammelt, hitzeinaktiviert und bei -20°C gelagert (Immunisierungsstudie 2006). Die Immunisierungsstudie 2007 erfolgt ebenfalls in vier bis sechs Wochen alten IMRI Mäusen der F1-Generation. An den Tagen 0, 14, 28, 49, 70, 91 und 92 werden jedem Tier $2 \cdot 10^{12}$ Phagen s.c. injiziert. Am Tag 95 werden die Mäuse getötet, das Serum isoliert, hitzeinaktiviert und bei -20°C gelagert. Darüber hinaus werden die B-Zellen aus der Milz der Mäuse isoliert. Hierzu wird die Milz mit dem Stempel einer 10 ml Spritze durch ein 70 µm Zellsieb gepresst und in 20 ml serumfreien DMEM aufgenommen. Die isolierten

Zellen werden anschließend mit einer Zentrifuge bei 1.400 rpm und 4°C für 10 min pelletiert und in 20 ml frischem serumfreien DMEM-Medium resuspendiert. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt und die Zellen letztlich in 4 ml Einfriermedium aufgenommen und in Aliquots von je 1 ml in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.8.13. Expression und Aufreinigung von HIV-1 Env

$5 \cdot 10^6$ Lec⁻-CHO ADA.C1 Zellen werden in einer Zellkulturflasche (T-175) in 40 ml Lec⁻-CHO Kulturmedium ausgebracht und bis zu einer Konfluenz von 90%-95% angezüchtet (ca. 3 Tage). Nun werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 50 ml frischem GMEM-MSX Medium aufgenommen. Die Expression von ADA.C1 wird mit 100 µl 500x Natriumbutyrat induziert und für fünf bis sechs inkubiert. Nach der Expression wird der Überstand geerntet, 20 min mit 2.000 rpm bei 4°C zentrifugiert, sterilfiltriert (0,22 µm) und 1:1.000 mit Proteaseinhibitor versetzt bei -20°C gelagert. Ebenso erfolgte die Expression der Negativkontrolle mit der CHO-neg Zelllinie. Die Aufreinigung von HIV-1 Env erfolgte mit einer *Galanthus nivalis* Lectinsäule. Das an Agarosebeads gebundene Lectin bindet selektiv Glykoproteine mit Mannose $\alpha(1 \rightarrow 2)$ Mannose Glykosylierungen und ermöglicht so eine Aufreinigung von HIV-1 Env. Aus 2 ml Säulenmaterial (1 mg Lectin gecoatete Beads) wird in einem 10 ml Säulenrohling eine Lectinsäule gegossen. Nach dem Absetzen des Trägermaterials wird die Säule mit 10 Volumen PBS unter Einsatz einer Peristaltikpumpe gespült (0,2 ml/min). Über Nacht werden 100 ml HIV-1 Env oder CHO-neg Überstand bei 4°C auf die Säule aufgetragen (0,1 ml/min). Tags darauf wird die Säule mit 30 ml PBS gespült und das gebundene HIV-1 Env mit 20 ml 0,5 M Methyl α -D-manno-pyranoside PBS-Lösung in 2 ml Fraktionen eluiert. Der Nachweis von HIV-1 Env erfolgt im Westernblot (2.8.15 unten). Fraktionen mit HIV-1 Env werden vereint und mit 50 kDa Centricon Röhrchen in PBS umgepuffert, aufkonzentriert und mit Proteaseinhibitor versetzt.

2.8.14. HIV-1 Env-ELISA

Zur Bestimmung der Expressionseffizienz oder der Bindungseigenschaften von scF_v-Phagen oder Mäuseseren wird der ADA.C1 bzw. CHO-neg Zellkulturüberstand 1:20 in Carbonatpuffer verdünnt und 100 µl des Gemischs je Vertiefung auf eine Mikrotiterplatte gegeben (positiv und negativ Platte) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Platten dreimal mit je 300 µl Waschlösung pro Vertiefung gewaschen, eine Stunde bei 37°C mit 5% MPBST-Lösung geblockt und erneut gewaschen. Hiernach wird das zu untersuchende Substrat in 5% MPBST-Lösung verdünnt in die Vertiefungen gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation der sekundären und eventuell tertiären Antikörper erfolgt wie für den Phagen-ELISA beschrieben (2.8.11 oben). Im Anschluss an die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Antikörper werden die Platten

dreimal mit 300 µl Waschlösung pro Vertiefung gespült und mit OPD-Lösung entwickelt. Nach maximal sechs Minuten Entwicklung wird diese durch Zugaben von 100 µl H₂SO₄ pro Vertiefung gestoppt und die Platten werden am ELISA-Reader ausgelesen (492-620 nm).

2.8.15. HIV-1 Env-Westernblot

Der Nachweis der unterschiedlichen Oligomere von HIV-1 Env erfolgt mit einem Westernblot. 10 µl Probe werden mit 2,5 µl Probenpuffer ohne DTT versetzt, aufgekocht und in einem Gel (8% Trenngel und 4% Sammelgel) aufgetrennt (130 V). Hiernach erfolgt ein ‚semi-dry‘ Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (120 mA, 90 min). Der Westernblot wird für eine Stunde mit 5% MPBST-Lösung geblockt und im Anschluss mit dem ersten Antikörper in 5% MPBST-Lösung verdünnt über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran dreimal mit 30 ml Waschlösung gewaschen, mit dem sekundär Antikörper inkubiert (1 h bei RT), erneut gewaschen und entwickelt (ECL™ Western Blotting System).

2.8.16. Selektion von HIV-1 spezifischen Hybridomazellen

Die aus den immunisierten Mäusen isolierten B-Zellen werden mit den Myelomzellen CRL 1597 zu Hybridomen fusioniert, um monoklonale HIV-1 Antikörper zu gewinnen.

2.8.16.1. Fusion der Myeloma- und B-Zellen

Zwei Tage vor einer geplanten Fusion wird eine frische Myelomzellenkultur gesplittet, so dass die Zellen sich zum Zeitpunkt der Fusion im logarithmischen Wachstum befinden, um die besten Fusionseigenschaften zu gewährleisten. Am Tag der Fusion wird 1 ml PEG 1.500 Lösung, 330 ml DMEM/F12 ohne Zusätze und 350 ml HAT-Medium sowie ein Becherglas mit 500 ml Wasser auf 37°C vorgewärmt. Ein Aliquot der tiefgefrorenen B-Zellen wird aufgetaut in 20 ml DMEM/F12 (ohne Zusätze) aufgenommen und bei 1.400 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Zellen in 20 ml frischem DMEM/F12 (ohne Zusätze) resuspendiert. Die vorbereiteten Myelomzellen werden ebenfalls abzentrifugiert und insgesamt dreimal in 30 ml DMEM/F12 (ohne Zusätze) resuspendiert und gewaschen. Nach dem Waschen der Zellen wird die Zellzahl der B-Zellen und der Myelomzellen in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Hierzu wird 10 µl der Zellsuspension 1:10 in DMEM/F12 (ohne Zusätze) verdünnt. 50 µl dieser verdünnten Zellsuspension werden mit 40 µl Erythrozyten Lysispuffer und 10 µl Trypanblau vermischt und in die Zählkammer gegeben. Für die Fusion werden $6 \cdot 10^7$ Myelomzellen und $3 \cdot 10^7$ B-Zellen eingesetzt. Die Zellen werden in einem 50 ml Plastikröhrchen vermischt und bei 1.000 rpm für 8 Minuten bei RT pelletiert. Währenddessen wird 1 ml des vorgewärmten PEG1500 in eine 1 ml Spritze mit einer 20-gauge

Nadel und 1 ml DMEM/F12 (ohne Zusätze) in einer zweiten 1 ml Spritze mit 20-gauge Nadel aufgenommen. Der Überstand der zu fusionierenden Zellen wird vorsichtig aber vollständig abgenommen, das Zellpellet durch leichtes Klopfen gelöst und das Plastikröhrchen mit den Zellen in das 37°C warme Becherglas mit Wasser gehalten. Nun wird – über die Dauer von 90 Sekunden – das vorgelegte PEG 1.500 tropfenweise auf die Zellen gegeben, die dabei ständig leicht geschüttelt werden, um eine Fusion der Zellmembranen zu gewährleisten. Anschließend wird zuerst 1 ml DMEM/F12 (ohne Zusätze) über die Dauer von einer Minute und dann weitere 19 ml DMEM/F12 (ohne Zusätze) über 5 Minuten hinweg zugetropft. Hierbei werden die Zellen im 37°C warmen Wasser belassen und leicht geschüttelt. Im Anschluss wird der Ansatz für 10 Minuten in Ruhe bei Raumtemperatur inkubiert und die Zellen im Anschluss mit 1.000 rpm für 8 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig verworfen und die Zellen in 350 ml vorgewärmten HAT-Medium aufgenommen, auf fünfzehn 96-Vertiefung-Platten (200 µl/Vertiefung) verteilt und im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert (sog. Stammplatten). In den folgenden Tagen werden die Zellen regelmäßig überprüft und das Wachstum vorhandener Heterofusionen mikroskopisch beobachtet.

2.8.16.2. Hybridoma-ELISA

Die Selektion HIV-1 spezifischer Hybridomazellen erfolgt mit einem ELISA. Hierfür wird je eine Mikrotiterplatte mit 100 µl Substratlösung (Lec⁻-CHO ADA.C1 bzw. CHO-neg Kulturüberstand 1:20 verdünnt in Carbonatpuffer) beschichtet und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am folgenden Tag werden die Mikrotiterplatten für eine Stunde bei 37°C mit 200 µl 5% MPBST-Lösung geblockt und anschließend 50 µl 5% MPBST-Lösung je Vertiefung vorgelegt. Nun wird 50 µl Hybridomaüberstand auf die vorbereiteten Mikrotiterplatten transferiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag erfolgt eine zweistündige Inkubation mit 100 µl α-Maus-HRP-Antikörper (1:5.000 in 5% MPBST) bei RT. Zwischen den einzelnen Schritten werden die Platten dreimal mit 300 ml 0,05% PBST gewaschen und ausgeschlagen. Nach der Inkubation mit dem HRP-konjugiertem Antikörper werden die Platten ein letztes Mal gewaschen und mit 100 µl OPD-Substratlösung je Vertiefung versetzt. Die Entwicklung wird nach 5-10 Minuten mit 100 µl 1 N H₂SO₄ pro Vertiefung gestoppt und die umgesetzte Substratmenge im Spektrometer bestimmt (492-620 nm).

2.8.16.3. Subklonierung von Hybridomazellen

Zur Gewinnung von monoklonalen Hybridomazellen werden ELISA-reaktive Zellen einer Stammplatte mehrmals vereinzelt und subkloniert. Hierzu werden 200 µl Medium pro Vertiefung einer 96-Vertiefung-Platte vorgelegt. Bei den ersten zwei Subklonierungen wird HAT-Medium eingesetzt, bei weiteren Subklonierungen HAT Medium. Die reaktiven Zellen aus einer Vertiefung einer Stammplatte werden in 100 µl Medium resuspendiert und mit

dem Medium in Vertiefung A1 der neuen Platte vermischt. Anschließend wird eine serielle Verdünnung von A1 bis H1 erstellt. Hierzu werden 100 µl zwischen den jeweiligen Vertiefungen überhoben, die letzten 100 µl werden verworfen. Nun erfolgt eine Verdünnungsreihe (ebenfalls 100 µl überheben) von Spalte 1 bis 12, wobei die letzten 100 µl werden zur Spalte 1 zugegeben werden. Die Zellen werden anschließend bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und regelmäßig kontrolliert.

2.8.17. Herstellung von scF_v-Phagen Bibliotheken

Mit Hilfe der mRNA der LTNP wurden von unserem Kooperationspartner der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Dübel an der Technischen Universität Braunschweig scF_v-Phagen Bibliotheken erstellt, die zur Selektion HIV-1 spezifischer scF_v-Phagen dienen.

2.8.17.1. Isolierung von LTNP mRNA

Aus frisch isolierten PBMC der LTNP Patienten wird die mRNA mit dem QuickPrep mRNA Purification Kit von Amersham Bioscience isoliert. Die Aufreinigung der PBMC erfolgt durch unseren Kooperationspartner Dr. Vicente Soriano am Department of Infectious Diseases, Hospital Carlos III in Madrid, Spanien nach der Ficoll-Hypaque Methode. Nach der Isolierung der PBMC werden diese in 500 µl Extraktionspuffer aufgenommen, bei -80°C eingefroren und auf Trockeneis verschickt. Durch die Lagerung in Extraktionspuffer wird die Degradation der mRNA verhindert. Nach der Aufreinigung wird die in 750 µl Elutionspuffer aufgenommene mRNA mit 50 µl 2,5 M Kaliumacetatlösung, 10 µl Glykogen [5-10 mg/ml Glykogen] und 1,5 ml abs. Ethanol vermischt und 30 min bei -20°C präzipitiert. Im Anschluss wird die gefällte RNA für 5 min mit 13.000 rpm bei 4°C pelletiert, in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.8.17.2. Transkription von LTNP mRNA in cDNA

Ausgehend von der mRNA wird die cDNA der Patienten synthetisiert:

	Menge / Ansatz	Info	
random Primer (dN6) [10 µM]	2,5 µl	50-250 ng	Prämix
dNTP [je 2,5 mM]	5,0 µl	500 µM	
mRNA	9,0 µl	1,5 µM	
5x Superscript-Puffer	5,0 µl		Reaktionsmix
DTT [0,1 M]	2,5 µl		
RNase Inhibitor	0,5 µl		
Superscript II [200 U/µl]	1,0 µl	200 U	

Zu Beginn der cDNA-Synthese wird der Prämix angesetzt und die mRNA für 5 min bei 70°C denaturiert. Nach Zugabe des Reaktionsmix wird der Ansatz wie folgt inkubiert:

25°C	10 min
42°C	50 min
70°C	15 min
4°C	∞

Die fertige cDNA wird bei -20°C gelagert und zur Klonierung der scF_v-Phagen-Bibliotheken eingesetzt. Die fertigen Bibliotheken werden mit Helferphagen verpackt, aufgereinigt und können direkt für das Biopanning eingesetzt werden.

2.8.18. Biopanning mit scF_v-Phagen

Zur Identifizierung HIV-1 Env spezifischer scF_v-Phagen aus den synthetisierten Phagen-Bibliotheken werden diese auf unterschiedlichen HIV-1 Env Konstrukten selektiert. Das Biopanning erfolgt über drei Runden abwechselnd mit HIV-1 Env bzw. einer negativ Kontrolle, wodurch eine Anreicherung HIV-1 Env spezifischer scF_v-Phagen erreicht wird.

2.8.18.1. Koppeln der tosylaktivierten Beads

Vor Beginn des Biopannings muss das HIV-1 Env auf den tosylaktivierten Beads immobilisiert werden. Hierzu werden 210 µl tosylaktivierte Beads (ca. $4 \cdot 10^8$ Beads) in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Puffer B (siehe Herstellerangabe) fünf Minuten bei RT gewaschen. Danach werden die Magnetkügelchen im Magneten separiert, mit 5 µg HIV-1 Env pro $5 \cdot 10^7$ Beads versetzt und mit Puffer B auf 500 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird über Nacht bei RT (auch 4°C oder 37°C) im Rotator inkubiert. Hierbei ist darauf zu achten, dass sich die Beads nicht absetzen. Als Negativkontrolle wird die gleiche Anzahl Beads mit einem Kontrollprotein oder alleine inkubiert. Am folgenden Tag werden die Magnetkügelchen zweimal mit 1 ml eiskaltem Puffer C gewaschen, in 1 ml Puffer D aufgenommen und mit diesem über Nacht bei RT (auch 4°C oder 37°C) im Rotator inkubiert, um freie Bindungsstellen zu inaktivieren. Danach werden die Beads dreimal mit PBS gewaschen und in 0,02% Natriumazid/PBS bei 4°C gelagert.

2.8.18.2. FACS-Analyse

Mit Hilfe der FACS-Analyse wird das Koppeln der unterschiedlichen HIV-1 Env Varianten auf den paramagnetischen Kügelchen quantifiziert. $1-2 \cdot 10^6$ Kügelchen werden nach dem Koppeln in 500 µl PBSG aufgenommen, mit 1 µl des primären Antikörpers versetzt und für eine Stunde im Rotator bei RT inkubiert. Hiernach werden die Kügelchen magnetisch separiert, vom Überstand getrennt, dreimal in 500 µl PBSGT gewaschen, erneut in 500 µl PBSG mit 1 µl sekundär Antikörper aufgenommen und lichtgeschützt für eine Stunde im

Rotator bei 4°C inkubiert. Abschließend werden die Beads dreimal wie beschrieben gewaschen, in 100 µl PBS aufgenommen, in ein FACS Röhrchen überführt und am FACS-Calibur gemessen. Die Auswertung erfolgt mit der geräteeigenen Software CellQuest Pro.

2.8.18.3. Durchführung der scF_v-Phagen Biopannings auf Magnetkügelchen

Für das Biopanning werden je scF_v-Phagen Bibliothek $5 \cdot 10^7$ Beads eingesetzt. Die Magnetkügelchen werden zu Beginn fünfmal mit 1 ml PBSGT gewaschen und in 1 ml PBSG für 2 h bei 37°C im Rotator inkubiert, um freie Bereiche der Oberfläche mit Gelatine zu blockieren. Danach werden 10^{10} scF_v-Phagen je Bibliothek (κ und λ -Bibliothek) zu den Negativbeads zugegeben und mit diesen für 2 h bei Raumtemperatur im Rotator präinkubiert, um unspezifischen scF_v-Phagen die Gelegenheit zur Bindung zu geben. Nach der Inkubation werden die Negativbeads mit dem Magneten separiert, der Überstand auf die geblockten HIV-1 Env Beads übertragen und über Nacht bei 4°C im Rotator inkubiert. Am folgenden Tag werden je Panningansatz 25 ml 2YT_{Tet} Medium 1:100 mit einer Übernachtskultur des Phagenwirts (XL1-blue MRF' oder ER2738) inokuliert und bei 200 rpm und 37°C bis zu OD600 von 0.35 inkubiert. Währenddessen werden die HIV-1 Env beschichteten Magnetkügelchen im Magneten separiert und der Überstand mit den ungebundenen Phagen verworfen (Abbildung 18). Danach werden die Beads fünfmal mit 1 ml PBSGT gewaschen und in 200 µl Trypsinlösung aufgenommen. Durch das Trypsin kommt es zu einer Abspaltung des Phagenteils an der Schnittstelle zwischen scF_v und pIII und somit zur Elution der gebundenen Phagen. Diese wird für 30 min bei 37°C im Rotator inkubiert und im Anschluss werden die Beads im Magneten von den eluierten Phagen

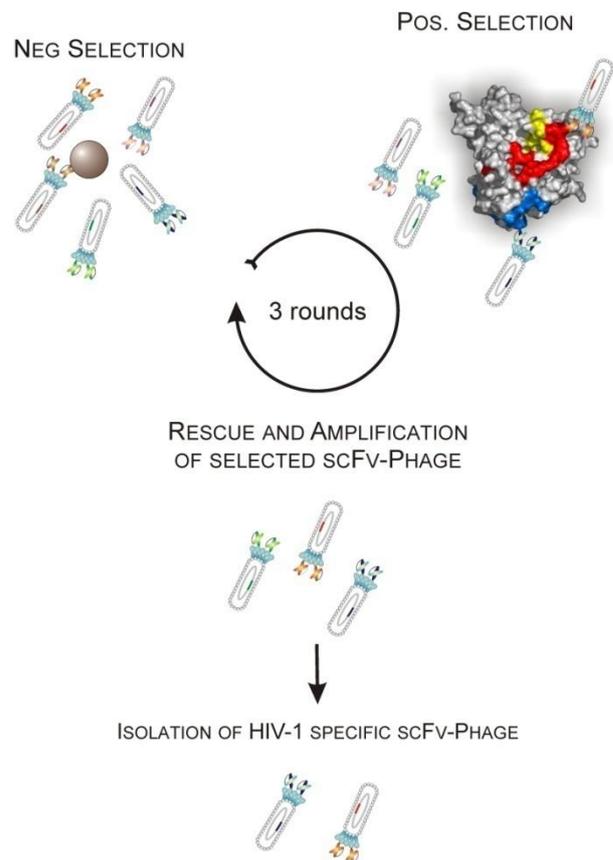


Abbildung 18: Prinzip des scF_v-Phagen Biopannings auf Magnetkügelchen

Die scF_v-Phagen werden abwechselnd auf unspezifischen (Neg. Selektion) und spezifischen Beads (Pos. Selektion) inkubiert, um HIV-1 spezifische scF_v-Phagen anzureichern. Hiernach erfolgt die Amplifikation der isolierten Phagen. Nach insgesamt drei Runden werden die Phagen untersucht und HIV-1 spezifische scF_v-Klone identifiziert.

getrennt. Diese enthalten die genetische Information der scF_v-Fragmente, die an die HIV-1 Env gekoppelten Beads gebunden haben. Mit 190 µl der eluierten Phagen werden 20 ml Phagenwirtskultur infiziert, durchmischt und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit den verbleibenden 10 µl wird eine Verdünnungsreihe angelegt und 50 µl Aliquots des Phagenwirts infiziert, um den Titer der eluierten Phagen zu bestimmen. Nach 30 min werden die infizierten Phagenwirtskulturen der Titerbestimmung auf kleinen Petrischalen mit 2YT_{Glucose/Amp.} Agar ausgestrichen, die 20 ml Phagenwirtskultur für 5 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert, das Pellet in ca. 200 µl Medium aufgenommen und auf einer großen Petrischale mit 2YT_{Glucose/Amp.} Agar ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.8.18.4. Durchführung der scF_v-Phagen Biopannings auf Mikrotiterplatten

Das Biopanning von scF_v-Phagen auf Mikrotiterplatten entspricht im Prinzip dem zuvor beschriebenen Biopanning auf Magnetkügelchen (2.8.18.3 oben).

Für jedes Biopanning wird eine Vertiefung mit 3 µg HIV-1 Env in 200 µl PBS versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Für die Negativselektion wird die gleiche Anzahl an Vertiefungen mit einem Kontrollprotein inkubiert. Am folgenden Tag werden die Vertiefungen dreimal gewaschen und mit 300 µl Blockinglösung (5% MPBST, PBSGT o.ä.) versetzt und für 1 h bei RT inkubiert, um freie Oberflächenbereiche zu blockieren. Danach werden die Negativvertiefungen erneut gewaschen und mit 10¹⁰ scF_v-Phagen je Bibliothek (κ- und λ-Bibliothek) in insgesamt 200 µl Blockinglösung versetzt und 1 h bei RT inkubiert, um unspezifischen scF_v-Phagen die Gelegenheit zur Bindung zu geben. Im Anschluss werden die Positivvertiefungen gewaschen und der Überstand der Negativvertiefungen auf diese übergehoben und erneut für 1 h bei RT inkubiert. Nach dieser Stunde werden die Positivvertiefungen mit PBST gewaschen (10ml pro Vertiefung in der ersten Biopanningrunde, 20ml in der Zweiten bzw. 30ml in der Dritten) und anschließend mit 200 µl Trypsinlösung versetzt. Das weitere Vorgehen stimmt mit der Durchführung der scF_v-Phagen Biopannings auf Magnetkügelchen überein (2.8.18.3 oben).

2.8.18.5. Verpackung isolierter scF_v-Phagen mit M13KO7 Helferphage

Nach dem Biopanning werden die mit scF_v-Phagen infizierten Klone mit 5 ml 2YT von den großen Petrischalen abgeschwemmt, pelletiert, mit je 1 ml 50%ige Glycerinlösung und 2YT Medium vermischt und bei -80°C eingefroren. Mit 50-100 µl des Glycerinstocks werden 50 ml 2YT_{Glucose/Amp.} Medium angeimpft und bei 200 rpm und 37°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,35 inkubiert. Hier werden 5 ml der Bakterien (entspricht ca. 2·10⁹) mit 4·10¹⁰ Helferphagen (MOI 20) infiziert und für 30 min in Ruhe bei 37°C und anschließend weitere 30 min bei 200 rpm bei 37°C im Schüttler inkubiert. Im Anschluss werden die Bakterien pelletiert und über Nacht bei 30°C und 200 rpm in 30 ml frischem 2YT_{Kan/Amp.} Medium inkubiert. Durch die

Doppelselektion wachsen nur doppelinfizierte Bakterien, die ihre Resistenzen vom Helferphagen bzw. scF_v-Phagen erlangen. Hierdurch und durch eine Deletion im Verpackungssignal im Helferphagen genom kommt es zur Verpackung von scF_v-Phagen mit scF_v-Phagemid. Am nächsten Tag werden die Bakterien für 10 min bei 4°C und 4.000 rpm pelletiert. Hierbei verbleiben die Phagen im Überstand, der in frischen 50 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml PEG 6.000/NaCl-Lösung (25% Endkonzentration) versetzt und für eine Stunde auf Eis inkubiert wird. Im Anschluss werden die ausgefällten Phagen für 30 min bei 4°C mit 6.000 rpm pelletiert und in 1,5 ml PBS aufgenommen. Nun schließt sich eine zweite Fällungsrunde mit entsprechend angepasstem Volumen an, an deren Ende die Phagen in 250 µl PBS aufgenommen und bei 4°C gelagert werden. Zur Bestimmung des Phagentiters werden 50 µl Phagenwirtskultur mit 10 µl Phagenverdünnung (10⁻⁶ bis 10⁻¹⁰) infiziert und auf 2YT_{Glucose/Amp.}-Agarplatten inkubiert.

2.8.18.6. Expression von scF_v

Zur Expression monoklonaler scF_v, wird eine 96-Vertiefung-Platte mit 180 µl 2YT_{Glucose/Amp.}-Medium je Vertiefung versetzt. Je Vertiefung werden 20 µl Übernachtskultur der zu untersuchenden Klone zugegeben. Die Platte wird für zwei Stunden bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Hiernach wird die Platte für zehn Minuten mit 4.000 rpm zentrifugiert, das überstehende Medium abgenommen und durch 200 µl 2YT_{IPTG}-Medium ersetzt, um die Expression zu induzieren. Diese erfolgt für mindestens vier Stunden bei 30°C und 200 rpm im Inkubator. Hiernach wird die Platte erneut zentrifugiert und der Überstand zur Identifizierung HIV-1 spezifischer scF_v-Klone im ELISA eingesetzt.

2.8.18.7. scF_v-Phagen-ELISA

Nach der dritten Runde des Biopannings werden min. 92 Phagenklone von den Titer- oder der Panningplatte gepickt und in einer 96-Vertiefung-Platte in 200 µl 2YT_{Glucose/Amp.} Medium über Nacht bei 37°C amplifiziert (je zwei positiv und negativ Kontrollen). Ausgehend von der Stammpalte wird eine 96-Vertiefung-Platte mit frischem 2YT_{Glucose/Amp.} Medium 1:10 inokuliert und die Stammpalte mit Glycerin versetzt und bei -80°C tiefgefroren. Die frisch infizierte 96-Vertiefung-Platte wird 2-3 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Danach erfolgt ein Mediumwechsel auf 2YT_{Amp.} Medium mit 50 µM IPTG zur Induktion der Expression des scF_v-Fragments. Die Platte wird über Nacht (min. 4 h) bei 30°C und 300 rpm inkubiert. Für den ELISA-Test wird je eine Mikrotiterplatte mit 100 µl Substratlösung (positives oder negatives Substrat verdünnt in Carbonatpuffer) beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Am folgenden Tag werden die Mikrotiterplatten für eine Stunde mit 200 µl 5% MPBST bei 37°C geblockt und anschließend 50 µl 5% MPBST-Lösung je Vertiefung vorgelegt. Nun werden die Bakterien für 10 min bei 4°C mit 4.000 rpm pelletiert und 50 µl scF_v-Kulturüberstand auf die vorbereiteten

Mikrotiterplatten transferiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nun folgt eine Inkubation mit 100 µl Maus α -myc-Antikörper (1:5.000 in 5% MPBST) bei 4°C über Nacht und eine zweistündige Inkubation mit 100 µl α -Maus-HRP-Antikörper (1:5.000 in 5% MPBST) bei RT. Zwischen den einzelnen Schritten werden die Platten dreimal mit 300 ml 0,05% PBST gewaschen und ausgeschlagen. Nach der Inkubation mit dem HRP-konjugierten Antikörper werden die Platten ein letztes Mal gewaschen und mit 100 µl OPD-Substratlösung je Vertiefung versetzt. Die Entwicklung wird nach 5 min mit 100 µl 1 N H₂SO₄ pro Vertiefung gestoppt und die umgesetzte Substratmenge im Spektrometer bei 492 und 620 nm bestimmt.

2.8.18.8. Genetische Analyse der HIV-1 spezifischen scF_v-Klone

Die genetische Analyse der selektierten HIV-1 spezifischen scF_v-Klone erfolgt mit dem Programm VBASE2 (<http://www.vbase2.org>)²⁷⁶. Hierzu wird die DNA Konsensussequenz der Klone in zwei Schritten analysiert. Zunächst erfolgt die Analyse der Schweren Variablen Kette (V_H), danach die Auswertung der Leichten Variablen Kette (V_L). VBASE2 analysiert, welche V-, D- und J-Gene die größte Homologie zur eingegebenen Sequenz aufweisen, wobei das Programm auf die umfassenden Daten der EMBL-Datenbank zurückgreift (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>). Die Ergebnisse der Analyse werden in einer übersichtlichen Form dargestellt und können direkt in eine Tabelle kopiert werden, um die Analyse mehrerer Klone zu vergleichen.

3. Ergebnisse

3.1. Genetische Untersuchungen

3.1.1. Klinische Daten der untersuchten Patienten

In Tabelle 3 sind die klinischen Daten (virale RNA und CD4⁺-Zellzahl) der in dieser Arbeit verwendeten Patienten angegeben.

Tabelle 3: Klinische Daten der untersuchten Patienten

	Patient	infiziert seit	CD4 ⁺ [Zellen/μl]	virale RNA [Kopien/ml]	Virus Subtyp
LTNP	MH01	1990	522	2.388	B
	MH02	1990	962	9.920	B
	MH03	<1986	616	<50	B
	MH04	<1987	558	2.288	B
	MH05	<1985	540	66	B
	MH06	<1986	1.320	4.936	B
	MH07	<1986	1.023	52	B
	MH08	1988	437	19.000	C
HIV-1 Kontrollpatienten	S6	<1988	419	<500	B
	S19	1993	470	900	B
	P10	1995	91	688.000	B
	A6N3	2001	863	59	B
	H0E6	2002	855	4.460	B
	P5T5	2001	1.008	769	B
	S3R8	2003	844	2.500	B
p-Wert*			0,5705	0,3717	

*) p-Werte einer heteroskedastischen, zweiseitigen T-Testanalyse.

Die erste Patientengruppe umfasst die LTNP MH01-MH08. Hierbei weisen die Patienten MH01 bis MH07 die für LTNP typischen Werte für CD4⁺-Zellzahl (>500 Zellen/μl) und virale RNA (<10.000 Kopien/ml) auf. Die in der Tabelle angegebenen Werte beziehen sich auf einen Zeitpunkt 11 bis 16 Jahre nach der Infektion, spiegeln jedoch im Grunde die CD4⁺-Zellzahl und Viruslast über den gesamten Infektionsverlauf wieder (6.1 unten). Die Infektion dieser Patienten erfolgte vor 17-22 Jahren, führte jedoch bis heute – ohne jegliche Therapie – nicht zum Zusammenbruch des Immunsystems und dem Auftreten von AIDS-Symptomen. Jeder dieser Patienten ist mit einer Subtyp B Variante von HIV-1 infiziert. LTNP MH08 erfüllt streng betrachtet die Grenzwerte der klinischen Marker nicht. Mit

437 Zellen/ μ l ist die CD4⁺-Zellzahl etwas verringert und es liegt für LTNPs eine erhöhte Viruslast im Blut vor (19.000 Kopien/ml). Die Infektion mit einem Subtyp C Virus führte über 17 Jahre hinweg nicht zur Progression, im Jahr 2005 wurde jedoch mit einer antiviralen Behandlung begonnen. Aufgrund seines Subtyps wurde dieser Patient dennoch in die Studie aufgenommen.

Die zweite Patientengruppe umfasst sieben HIV-1 infizierte Kontrollpatienten, die aufgrund vergleichbarer klinischer Marker ausgewählt wurden (p -Wert_{CD4⁺-Zellen} = 0,5705; p -Wert_{vRNA} = 0,3717) (Tabelle 3). Die Patienten S6, S19 und P10 sind sogenannte schnell-progredierende HIV-1 Infizierte. Patient S6 und S19 befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme unter HAART-Therapie. Die Probe von Patient P10 wurde vor Beginn der HAART-Therapie entnommen und weist aus diesem Grund signifikant abweichende klinische Marker auf, die das Zusammenbrechen des Immunsystems zu diesem Zeitpunkt wiedergeben. Nach Therapiebeginn passen sich die klinischen Marker jedoch den von uns vorgegebenen Sollwerten an (6.1 unten). Die Patienten A6N3, P5T5, H0E6 und S3R8 befinden sich in der normalen Latenzphase ihrer Infektion und wurden bis zur Probenentnahme nicht therapiert. Alle Patienten dieser Gruppe sind mit einer HIV-1 Subtyp B Variante infiziert. Bei diesen Patienten kann keine Aussage über den weiteren Infektionsverlauf gemacht werden. Da LTNP jedoch nach neuesten Schätzungen nur rund 5% der HIV-1 Infizierten ausmachen, sind alle vier Patienten mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 81,5 nicht den LTNP zuzurechnen.

3.1.2. Klonierung HIV-1 Env-RRV

Aufgrund der geringen viralen Last im Blut von LTNP ist es schwierig, deren primäre Viren *in vitro* zu kultivieren. Um dieses Problem zu umgehen, wurden HIV-1 Env-rekombinante Reporterviren hergestellt, weil die Hüllproteine das primäre Ziel der hier im Mittelpunkt stehenden, neutralisierenden Antikörper sind und auch die ersten Infektionsschritte weitgehend durch die Hüllproteine determiniert werden. Hierzu wurde die virale RNA aus dem Plasma der Patienten isoliert, in cDNA umgeschrieben und *env* mit einer Nested-PCR amplifiziert. Die Amplifikate wurden mit einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, die gewünschte Bande (ca. 2,5 kbp) isoliert und aufgereinigt. Die *env* Amplifikate wurden restringiert, mit dem Vektor pTN7- Δenv ligiert und HIV-1 Env-rekombinante Reporterviren generiert (Abbildung 14 und Abbildung 15). Die Herstellung replikationskompetenter HIV-1 Env-rekombinanter Reporterviren gelang von je vier LTNP (MH01, MH03, MH06 und MH08) und HIV-1 Kontrollpatienten (H0E6, P5T5, S3R8 und S19) (Tabelle 4). Zusätzlich wurden von den Labor-adaptierten Stämmen D117.III, 89.6 und YU-2 HIV-1 Env-rekombinante Reporterviren erstellt (Tabelle 5).

3.1.3. Sequenzanalyse von HIV-1 Env, Nef, Rev, Tat, Vpr

Soweit es die geringe virale Last zuließ, wurden die Sequenzen der Proteine Env, Nef, Rev, Tat und Vpr auf Mutationen, die zu einem verlangsamten Infektionsverlauf beitragen könnten, analysiert (Tabelle 4). Die Sequenzen wurden von der viralen RNA abgeleitet und in Alignments mit HxB2R Nummerierung umgesetzt. Wurden auch die entsprechenden Proteine der HIV-1 Kontrollpatienten analysiert, sind diese in den jeweiligen Alignments gezeigt (Tabelle 4, Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 24, 6.2 unten).

Tabelle 4: Genetische Merkmale der Patienten und Viren

	Patient	HLA-B Typen	CCR5 Genotyp	Leserahmen sequenziert					HIV-1 RRV
				<i>nef</i>	<i>vpr</i>	<i>rev</i>	<i>tat</i>	<i>env</i>	
LTNP	MH01	B*44, *51	wildtyp	par.	ja	ja	ja	ja	ja
	MH02	B*50, *52	wildtyp	ja	ja	ja	ja	ja	n.d.
	MH03	B*15, *5701	wildtyp	par.	n.d.	ja	ja	ja	ja
	MH04	B*14, *38	wildtyp	ja	ja	ja	ja	ja	n.d.
	MH05	B*15, *50	wildtyp	ja	ja [#]	n.d.	ja	n.d.	n.d.
	MH06	B*27, *51	wildtyp	ja	ja	ja	ja	ja	ja
	MH07	B*14, *39	wildtyp	ja	ja [#]	n.d.	ja	n.d.	n.d.
	MH08	B*07, *44	wildtyp	par.	ja	ja	ja	ja	ja
HIV-1 Kontrollpatienten	S6	n.d.	n.d.	n.d.	ja	n.d.	ja	n.d.	n.d.
	S19	n.d.	n.d.	n.d.	ja	ja	ja	ja	ja
	P10	n.d.	n.d.	n.d.	ja	ja	ja	ja	n.d.
	A6N3	n.d.	n.d.	n.d.	ja	n.d.	ja	n.d.	n.d.
	H0E6	n.d.	n.d.	n.d.	ja	n.d.	n.d.	ja	ja
	P5T5	n.d.	n.d.	n.d.	ja	ja	ja	ja	ja
	S3R8	n.d.	n.d.	n.d.	ja	ja	ja	ja	ja

n.d.: nicht getestet; par.: nur partiell sequenziert

3.1.3.1. Env Sequenzanalyse

Trotz teilweise nicht nachweisbarer viraler Last, gelang es von sechs LTNP (MH01-MH04, MH06 und MH08) und fünf HIV-1 Kontrollpatienten (S19, P10, P5T5, H0E6 und S3R8) die Sequenz von Env zu bestimmen. Im Anhang sind diese zusammen mit den Sequenzen von HIV-1 HXB2R, 89.6, D177.III, JR-CSF und YU-2 in einem Alignment dargestellt (6.2 unten).

Alle Patienten weisen einen funktionellen Leserahmen auf. Funktionell wichtige Elemente sind in den Sequenzen beider Patientengruppen hochgradig konserviert. So sind die für die Ausbildung der Variablen Schleifen notwendigen Cysteine in allen Sequenzen konserviert (Tabelle 5). Die primäre gp120/41-Schnittstelle (⁵⁰⁸REKR⁵¹¹) ist in allen Sequenzen, die

sekundäre Schnittstelle (⁵⁰⁰(K/R)A(K/R)RR⁵⁰⁴) außer bei Patient MH008 ((K/R)500D) vollständig konserviert. Eine Expression funktioneller Hüllproteine scheint somit möglich. An der CD4- bzw. Corezeptorbindung beteiligte Aminosäuren sind weitgehend konserviert bzw. finden sich in beiden Gruppen identische oder vergleichbare Mutationen (6.2 unten).

Tabelle 5: Eigenschaften der HIV-1 Env Proteine

	Patient	Aminosäurezahl der Variablen Schleifen					Zahl potentieller N-Glykosylierungen	konservierte Disulfidbrücken
		V1	V2	V3	V4	V5		
LTNP	MH01	24	49	34	31	13	32	ja
	MH02	39	40	33	40	14	30	ja
	MH03	26	40	35	33	11	27	ja
	MH04	44	45	35	37	11	32	ja
	MH06	42	46	35	32	11	31	ja
	MH08	48	42	35	34	15	37	ja
HIV-1 Kontrollpatienten	S19	30	42	35	32	15	29	ja
	P10	31	43	35	30	14	29	ja
	H0E6	31	42	35	31	13	31	ja
	P5T5	26	40	35	32	11	31	ja
	S3R8	36	40	35	29	13	29	ja
Labor-adaptiert	HXB2R	27	40	36	34	11	31	ja
	89.6	29	41	35	30	12	30	ja
	D117III	26	42	35	34	12	28	ja
	JR-CSF	25	41	35	30	11	28	ja
	YU-2	26	40	35	26	11	29	ja

Der Hauptanteil der Variationen liegt innerhalb der Variablen Schleifen (V1-V5). Hier sind zahlreiche Insertionen und Mutationen zu finden, die zu Längenpolymorphismen führen (Tabelle 5). Im Bereich V1/V2 ist dies am deutlichsten ausgeprägt. Bei den LTNP variiert die Länge dieses Bereichs zwischen 65 und 89 Aminosäuren (Mittelwert 78,0), bei den HIV-1 Kontrollpatienten von 65 bis 75 Aminosäuren (Mittelwert 71,2). Für die untersuchten Labor-adaptierten Stämme ergeben sich Werte zwischen 65 und 69 Aminosäuren (Mittelwert 66,4) (Abbildung 19). Bei diesen Werten ist zu beachten, dass die beiden Variablen Schleifen ein gemeinsames Cystein besitzen, das in Tabelle 5 für beide Schleifen

mitgezählt wurde. Die Unterschiede zwischen beiden primären Gruppen erreicht kein signifikantes Niveau ($p\text{-Wert}_{\text{LTNP/HIV-1 Kontrollpatienten}} = 0,206$), während die Werte der HIV-1 Kontrollpatienten und der Labor-adaptierten Stämme signifikant unterschiedlich sind ($p\text{-Wert}_{\text{HIV-1 Kontrollpatienten/Labor-adaptierte Stämme}} = 0,044$). Der Unterschied zwischen den Gruppen der LTNP und der Labor-adaptierten Stämme verfehlt die statistische Signifikanz nur knapp ($p\text{-Wert}_{\text{LTNP/Labor-adaptierte Isolate}} = 0,057$).

Allerdings besitzen die Werte der LTNP Gruppe eine hohe Streuung, was hinsichtlich der geringen Datenmenge zu einem Verlust der Signifikanz führen kann. In den Bereichen V3, V4, V5 führen die Mutationen in der Regel lediglich zu geringen Längenvariation. Zwei Ausnahmen bilden die Sequenzen MH02 bzw. MH04, deren V4 eine Länge von 40 bzw. 37 AS besitzen, die Zahl der Aminosäuren bei den Labor-adaptierten Stämmen hingegen zwischen 26 und 34 liegt. Während alle LTNP außer MH03 eine (MH01 und MH08), zwei (MH02 und MH06) oder drei (MH04) verlängerte Variable Schleifen aufweisen, besitzt bei den HIV-1 Kontrollpatienten lediglich S3R8 eine verlängerte Variable Schleife 1 (Tabelle 5).

Die Zahl der potentiellen N-Glykosylierungsstellen variiert innerhalb der LTNP von 27 bis 32 (Mittelwert 30,4) für die Subtyp B Patienten MH01 bis MH07 (Abbildung 20, Tabelle 5). Patient MH08 besitzt 37 potenzielle N-Glykosylierungsstellen. Hierbei handelt es sich jedoch um eine Subtyp C Sequenz. In der Gruppe der HIV-1 Kontrollpatienten erstreckt sich die Variation von 29 bis 31 (Mittelwert 29,8) und für die Labor-adaptierten Stämme von 28 bis 31 N-Glykosylierungsstellen (Mittelwert 29,2). Keine der Gruppen unterscheidet sich signifikant

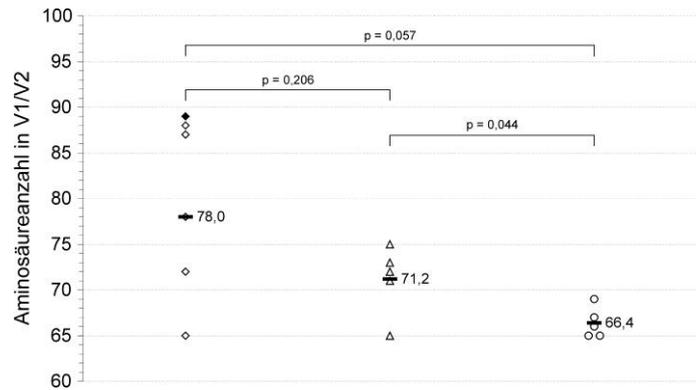


Abbildung 19: Aminosäureanzahl in V1/V2 von Env

LTNP (◇), HIV-1 Kontrollpatienten (△), Labor-adaptierte Isolate (○). Der Wert für MH08 (◆) ist nur der Vollständigkeit wegen mit angegeben und wurde nicht in der Analyse berücksichtigt. Die Mittelwerte (—), sowie die p-Werte der Signifikanzanalysen sind gegeben.

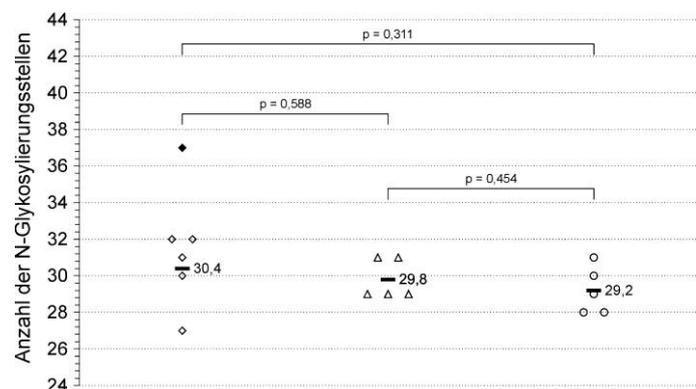


Abbildung 20: Anzahl der potentiellen N-Glykosylierungsstellen in Env

LTNP (◇), HIV-1 Kontrollpatienten (△), Labor-adaptierte Isolate (○), Mittelwerte (—). Der Wert für MH08 (◆) ist nur zur Vollständigkeit angegeben, wurde jedoch nicht in die Analyse einbezogen.

von den anderen ($p\text{-Wert}_{\text{LTNP/HIV-1 Kontrollpatienten}} = 0,588$; $p\text{-Wert}_{\text{LTNP/Labor-adaptierte Stämme}} = 0,311$; $p\text{-Wert}_{\text{HIV-1 Kontrollpatienten/Labor-adaptierte Stämme}} = 0,454$). Auch bei den N-Glykosylierungsstellen liegt die Mehrheit der Mutationen in den Variablen Schleifen (6.2 unten).

Im Bereich von gp41 sind die Sequenzen hochgradig konserviert. Die Länge in diesem Teil der Sequenz variiert nur bei den Patienten S3R8 (Insertion T514) und MH08 (Insertion 787; SSLKGLQ). Konservierte Cysteine und potentielle N-Glykosylierungen sind in beiden Gruppen im gleichen Maße vorhanden.

3.1.3.2. Nef Sequenzanalyse

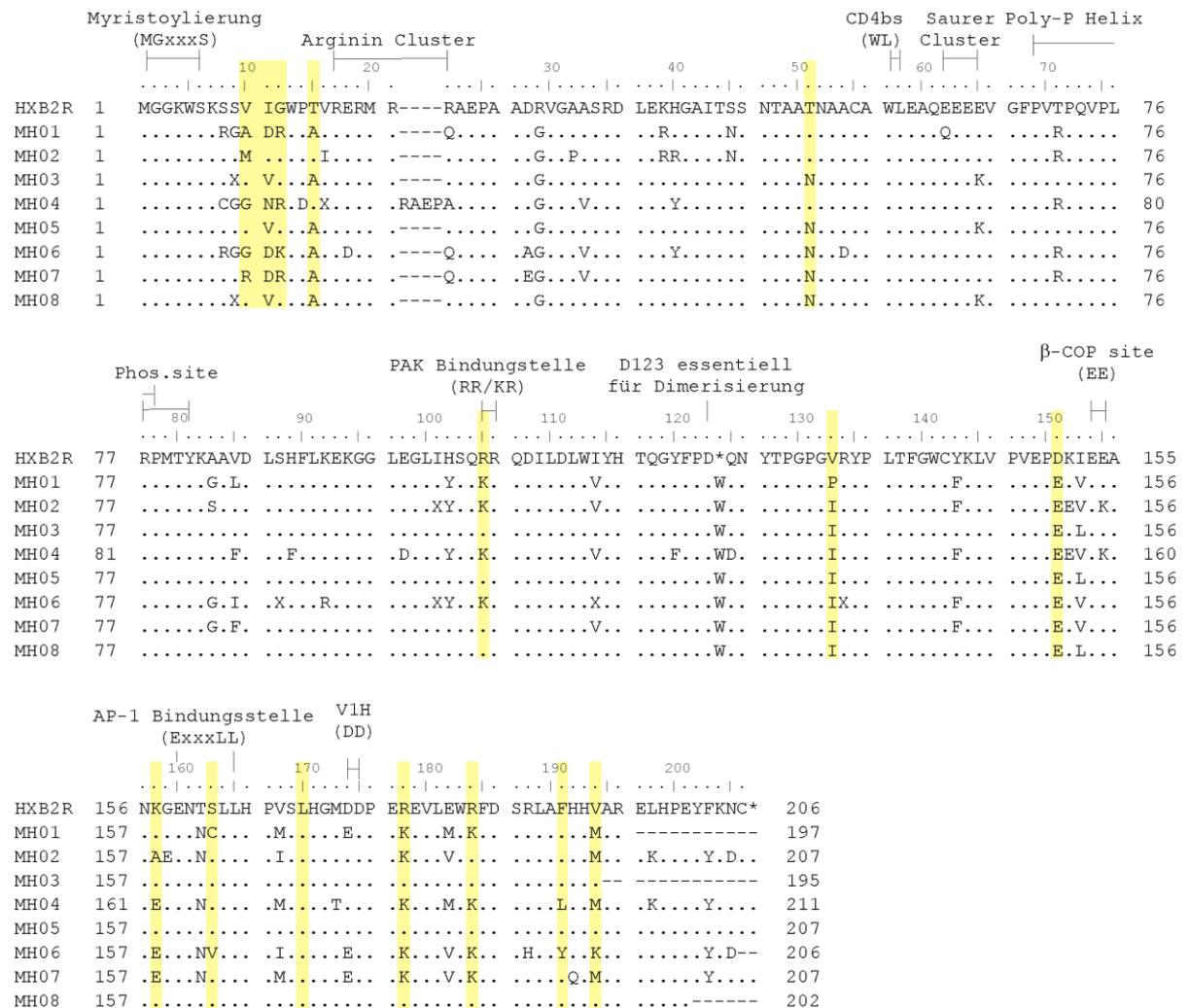


Abbildung 21: Alignment der Nef Sequenzen der LTNP mit HXB2R

Identische Aminosäuren (.), freie Positionen (-), Stopcodons (*). Nicht aufgelöste Aminosäuren sind durch ein X gekennzeichnet. Funktionelle Elemente sind über dem Alignment aufgezeigt, mit VESPA identifizierte Sequenzmuster gelb unterlegt.

Abbildung 21 zeigt die Nef Proteinsequenzen der LTNP. Vier von acht Leserahmen konnten vollständig ermittelt werden (MH02, MH04, MH05 und MH07). Bei den übrigen Sequenzen fehlen aufgrund der PCR Primer wenige AS im C-terminalen Bereich (1-12 AS, MH01, MH03, MH06 und MH08). Dies sollte jedoch keinen Einfluss auf eine Aussage zur

Funktionalität besitzen, da alle funktionell wichtige Elemente in Sequenzregionen vor diesem Bereich liegen. Unterstrichen wird dies durch Nef von HXB2R, welches, voll funktionsfähig, ein vorzeitiges Stopcodon besitzt. Alle Patientensequenzen weisen N-terminal die für die Membranassoziiierung und Funktion essentielle Myristoylierungssequenz (¹MGxxxS⁶) auf. Die für die Signaltransduktion verantwortlichen Domänen [Poly-Prolin-Helix (⁶⁹PxxPxxPxxP⁷⁸), PAK Bindungsstelle (¹⁰⁵(R/K)R¹⁰⁶), CD4 Bindungsstelle (⁵⁸WL⁵⁹)] sind vollständig konserviert, wie auch die Phosphorylierungsstelle (⁷⁷RPMTY⁸¹) und die für die Dimerisierung notwendige Aminosäure D123. Das Arginincluster (¹⁷RERMRR²²) von MH01, MH06 und MH07 besitzt eine R22Q Substitution und eine Insertion (²³AEPA²⁶) bei MH04. Das Saure Cluster (⁶²EEEE⁶⁵) weist bei MH01 (E62Q) und bei MH03, MH05 und MH08 (E65K) eine Mutation auf, während in der β-COP Site (¹⁵³EE¹⁵⁴) von MH02 und MH04 die Mutation E154K auftritt. Die an der CD4-Rezeptorregulation beteiligte V1H (¹⁷³DD¹⁷⁴) von MH01, MH06 und MH07 tragen die Mutation (D173E).

Tabelle 6: VESPA identifizierte Sequenzmuster in Nef

Position (Konsensus [#])	Aminosäure (Häufigkeit in %)		Bemerkung*
	LTNP	Subtyp B Ref.set	
10 (V)	V (28,6); G (28,6)	V (25,0); G (50,0)	
11 (V)	D (42,9); V (28,6)	D (0,0); V (33,3)	
12 (G)	R (42,9); G (42,9)	R (0,0); G (100,0)	
15 (T)	A (71,4); T (28,6)	A (50,0); T (50,0)	T15 NP; A15 Prog. ¹⁶⁴
51 (N)	N (57,1); T(42,9)	N (33,3); T(66,7)	N51 NP; T51 Prog. ¹⁶⁴
105 (K)	K (57,1); Q (0,0)	K (25,0); Q (50,0)	
133 (I)	I (85,7); V (0,0)	I (25,0); V (50,0)	
151 (E)	E (100,0); D (0,0)	E (25,0); D (75,0)	
158 (E)	K (42,9); E (42,9)	K (25,0); E (75,0)	
163 (S)	S (71,4); C (14,3)	S (25,0); C (75,0)	
170 (L)	L (100,0); Q (0,0)	L (25,0); Q (75,0)	L170 NP; Q170 Prog. ¹⁶⁴
178 (R)	K (71,4); R (28,6)	K (50,0); R (50,0)	K: ehem. Konsensus Subtyp B
184 (K)	K (57,1); R (42,9)	K (50,0); R (50,0)	
191 (F)	F (71,4); L (14,3)	F (50,0); L (50,0)	
194 (M)	M (57,1); V (28,6)	M (50,0); V (50,0)	

*) NP: Non-Progressor; Prog.: Progressor; [#]) Der Konsensus wurde der HIV-Datenbank von Los Alamos entnommen, Stand August 2004 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CONSENSUS/Consensus.html>)

Gegenüber einem Referenzset von Subtyp B Nef Sequenzen (HIV-1 Los Alamos Database; Sequenzset 2005) wurden mehrere Sequenzmuster in den LTNP-Sequenzen identifiziert (Tabelle 6). Die Aminosäuren V10, A15, N52, K105, I132, E150, E157, S162, L170, K183, F190 und M193 entsprechen der Konsensussequenz von Subtyp B. Die Mutationen T15A und R178K stimmen mit der ehemaligen Konsensussequenz von

HIV-1 Subtyp B überein. Die Polymorphismen V11D und G12R sind im Referenzset nicht vorhanden. R105 weist den, der Konsensussequenz von HIV-1 Subtyp B entsprechenden, Polymorphismus (K105R) auf. Dieser führt weder zu einem Funktionsverlust, noch zu einer Veränderung im Krankheitsverlauf. Der zuvor mit einer verlangsamten Progression assoziierte Polymorphismus (C138) ist in keiner der von uns untersuchten LNTP-Sequenz vorhanden³³¹.

3.1.3.3. Rev Sequenzanalyse

Sechs der acht LNTP Rev Sequenzen konnten vollständig bestimmt werden, bei den Patienten MH05 und MH07 fehlt ein C-terminaler Bereich von rund 40 Aminosäuren, da es nicht gelang *env* zu amplifizieren und sequenzieren. Von den HIV-1 Kontrollpatienten HOE6, S6 und A6N3 gelang nur die Sequenzierung des ersten bzw. zweiten Exons (Abbildung 22). Die vollständig vorhandenen Sequenzen besitzen alle einen funktionellen Leserahmen. Patient MH08 besitzt ein um vier Aminosäuren vorgezogenes Stopcodon. Die funktionellen Bereiche der ‚Nuclear Location Site‘ (NLS; AS 34-49) und die Leucin-reiche Effektor-domäne (⁷⁵LxxLxxLxxL⁸³) besitzen keine auffälligen Mutationen.

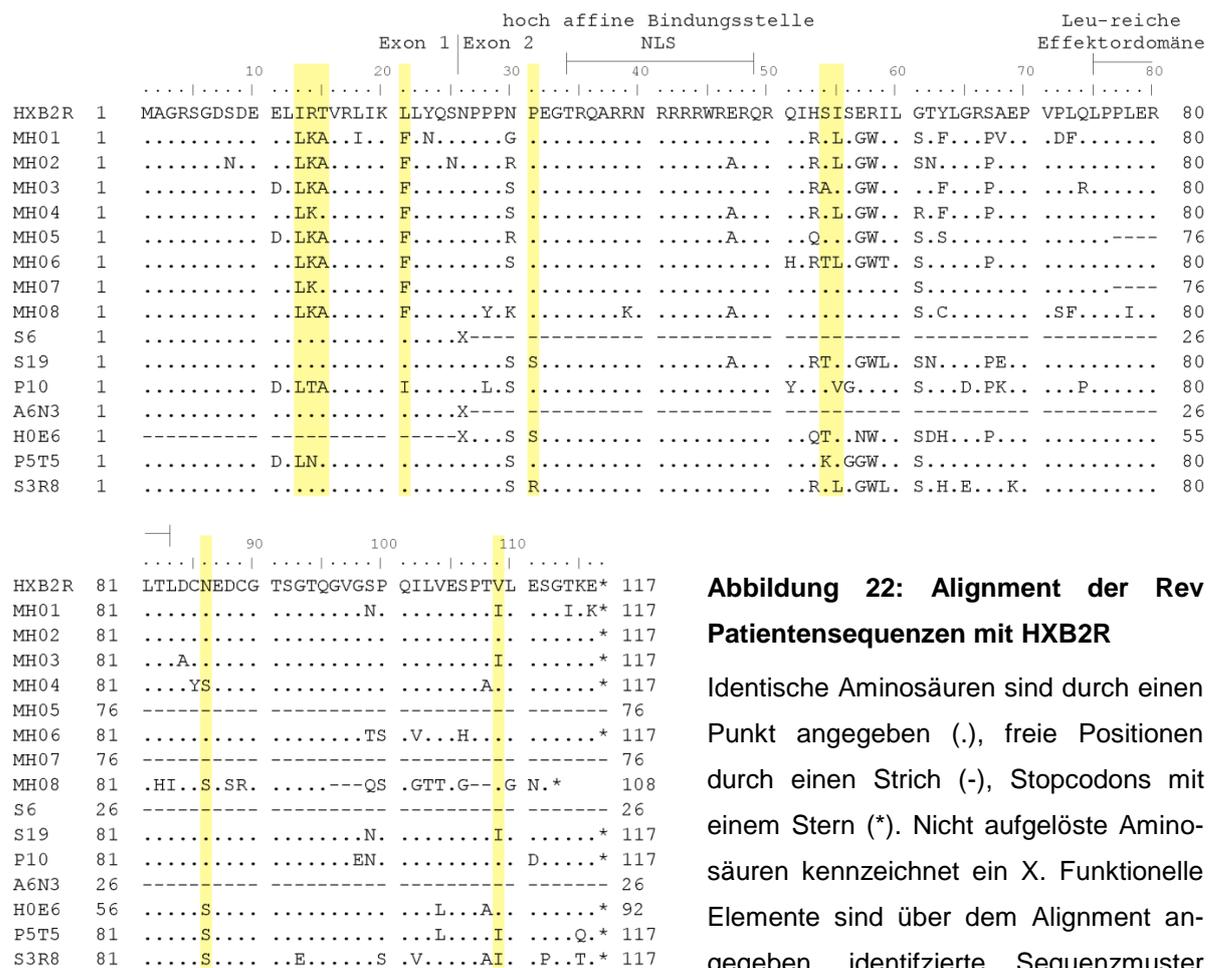


Abbildung 22: Alignment der Rev Patientensequenzen mit HXB2R

Identische Aminosäuren sind durch einen Punkt angegeben (.), freie Positionen durch einen Strich (-), Stopcodons mit einem Stern (*). Nicht aufgelöste Aminosäuren kennzeichnet ein X. Funktionelle Elemente sind über dem Alignment angegeben, identifizierte Sequenzmuster sind gelb unterlegt.

Zwischen den Sequenzen der LTNP und HIV-1 Kontrollpatienten wurden mit dem Program VESPA mehrere Sequenzmuster identifiziert (Tabelle 7). Die Aminosäuren ¹³LK¹⁴, 21F, 31P, 54S, 86N und 109V entsprechen der Konsensussequenz von Subtyp B. Bei dem Polymorphismus T15A handelt es sich um die ehemalige Konsensussequenz von HIV-1 Subtyp B. Der Polymorphismus I55L ist zum einen nur schwach ausgeprägt, zum anderen handelt es sich um eine konservative Mutation von Isoleucin zu Leucin. MH08 weist erwartungsgemäß einige HIV-1 Subtyp C spezifische Sequenzeigenschaften auf (28Y, 39K, 63C, I78, ⁸²HIDCSESR⁸⁹, ⁹⁹QSQGTTEG¹⁰⁶). Bekannte, funktionell wichtige Aminosäuren (L12, V16, L60) sind hingegen in allen Sequenzen konserviert. Die mit einem verlangsamten Krankheitsverlauf korreliert Mutation (L78I) ist in keiner der LTNP-Sequenzen vorhanden, bzw. entspricht im Fall von MH08 der Konsensussequenz des Subtyp C.

Tabelle 7: VESPA identifizierte Sequenzmuster in Rev

Position (Konsensus) [#]	Aminosäure (Häufigkeit in %)		Bemerkung
	LTNP	HIV-1 Kontrollpatienten	
13 (L)	L (100,0); I (0,0)	L (33,3); I (66,7)	
14 (K)	K (100,0); R (0,0)	K (0,0); R (66,7)	
15 (T)	A (71,4); T (28,6)	A (16,7); T (83,3)	A: ehem. Konsensus B
21 (F)	F (100,0); L (0,0)	F (0,0); L (83,3)	
31 (P)	P (100,0); S (0,0)	P (40,0); S (40,0)	
54 (S)	S (71,4); T (14,3)	S (40,0); T (40,0)	
55 (I)	L (57,1); I (42,9)	L (20,0); I (60,0)	
86 (N)	N (80,0); S (20,0)	N (40,0); S (60,0)	S: ehem. Konsensus B
109 (V)	V (60,0); I (40,0)	V (40,0); I (60,0)	

[#]) Der Konsensus wurde der HIV-Datenbank von Los Alamos entnommen, Stand August 2004 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CONSENSUS/Consensus.html>)

3.1.3.4. Tat Sequenzanalyse

In Abbildung 23 sind die Tat Sequenzen aller LTNP und von sieben der acht HIV-1 Progressoren dargestellt. In Exon 1 befinden sich zwei funktionelle Elemente. Dies sind die Cysteine (C22, C37) für die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke und eine Kernlokalisierungssequenz (NLS, ⁴⁹RKKRRQRRR⁵⁷). Beide Elemente sind in den Sequenzen vorhanden und intakt. Die Tat Proteine von MH07 und P10 besitzen ein vorzeitiges Stopcodon, welches homolog zu HXB2R ist. In der Sequenz von Patient P5T5 befindet sich ein Stopcodon zwei Aminosäuren vor dem normalen C-Terminus.

Zwischen den beiden Sequenzgruppen wurden mehrere Sequenzmuster identifiziert (Tabelle 8). Bei den Aminosäuren G42, P59, V67 und A74 handelt es sich um die Aminosäuren des Konsensus für HIV-1 Subtyp B. Die Polymorphismen N24T und D101A sind entweder schwach ausgeprägt (D101A) oder die Ergebnisse von Studien mit

unterschiedlichen Tat Varianten argumentieren gegen eine funktionelle Bedeutung (N24T)¹⁵⁷. Vier weiteren Polymorphismen (I39, A58T, D61G und V67) wurde in der gleichen Arbeit eine evtl. Bedeutung für eine verringerte Transaktivierung zugesprochen.

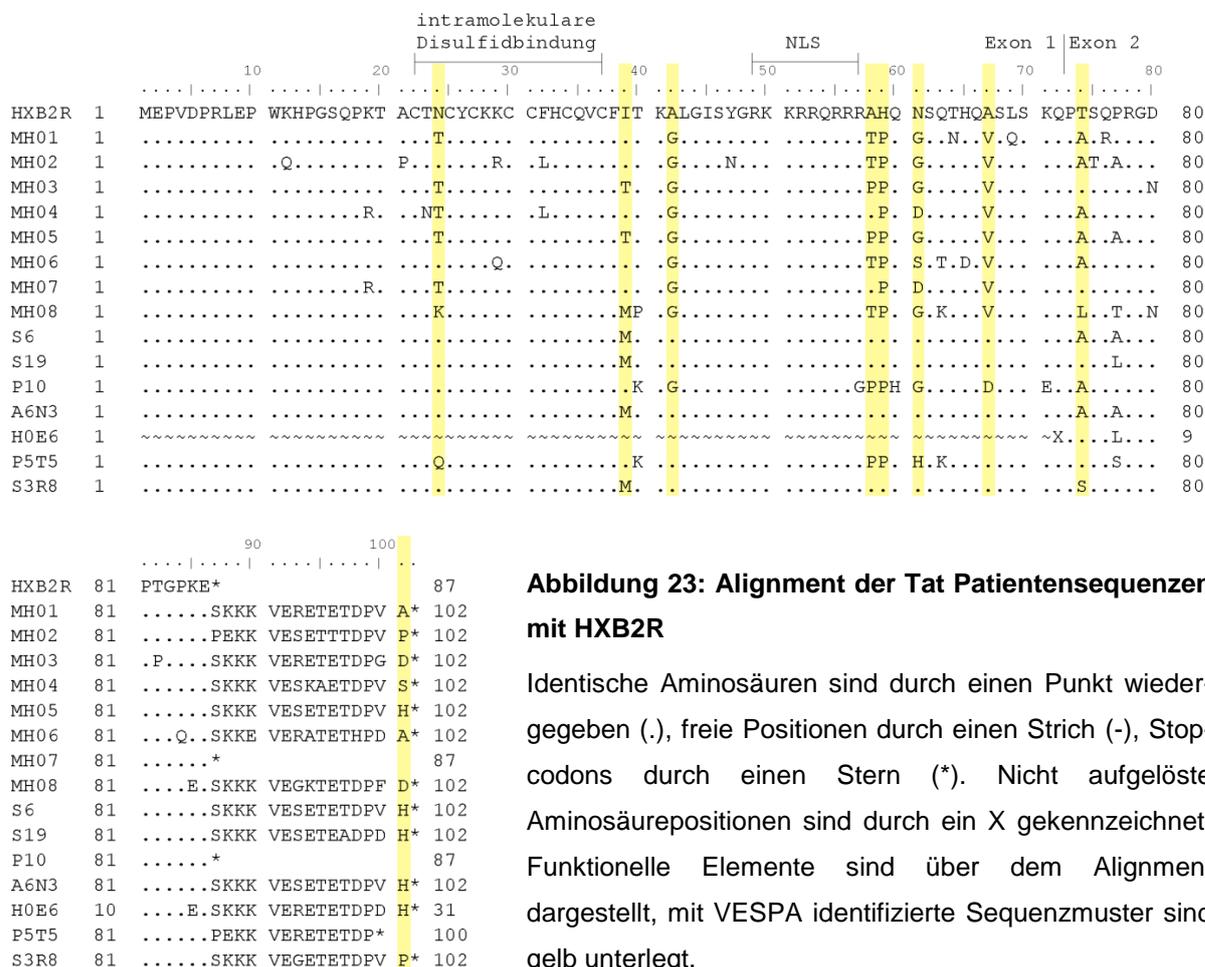


Abbildung 23: Alignment der Tat Patientensequenzen mit HXB2R

Identische Aminosäuren sind durch einen Punkt wiedergegeben (.), freie Positionen durch einen Strich (-), Stop-codons durch einen Stern (*). Nicht aufgelöste Aminosäurepositionen sind durch ein X gekennzeichnet. Funktionelle Elemente sind über dem Alignment dargestellt, mit VESPA identifizierte Sequenzmuster sind gelb unterlegt.

Tabelle 8: VESPA identifizierte Sequenzmuster in Tat

Position (Konsensus) [#]	Aminosäure (Häufigkeit in %)		Bemerkung
	LTNP	HIV-1 Kontrollpatienten	
24 (N)	T (71,4); N (28,6)	T (0,0); N (83,3)	keine Bedeutung ¹⁵⁷
39 (I)	I (71,4); M (0,0)	I (33,3); M (66,7)	evtl. von Bedeutung ¹⁵⁷
42 (G)	G (100,0); A (0,0)	G (16,7); A (83,3)	
58 (A)	T (42,9); A (28,6)	T (0,0); A (66,7)	evtl. von Bedeutung ¹⁵⁷
59 (P)	P (100,0); H (0,0)	P (33,3); H (66,7)	
61 (D)	G (57,1); N (0,0)	G (16,7); N (66,7)	evtl. von Bedeutung ¹⁵⁷
67 (V)	V (100,0); A (0,0)	V (0,0); A (83,3)	evtl. von Bedeutung ¹⁵⁷
74 (A)	A (71,4); T (28,6)	A (42,9); T (42,9)	
101 (D)	A (28,6); H (14,3)	A (0,0); H (57,1)	

[#]) Der Konsensus wurde der HIV-Datenbank von Los Alamos entnommen, Stand August 2004 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CONSENSUS/Consensus.html>)

Tabelle 9: VESPA identifizierte Sequenzmuster in Vpr

Position (Konsensus) [#]	Aminosäure (Häufigkeit in %)		Bemerkung
	LTNP	HIV-1 Kontrollpatienten	
37 (I)	T (33,3); I (16,7)	T (0,0); I (85,7)	
41 (G)	S (66,7); N (16,7)	S (0,0); N (100,0)	
77 (Q)	Q (66,7); R (33,3)	Q (14,3); R (85,7)	
83 (I)	I (100,0); V (0,0)	I (14,3); V (85,7)	

[#]) Der Konsensus wurde der HIV-Datenbank von Los Alamos entnommen, Stand August 2004 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CONSENSUS/Consensus.html>)

Zwischen den zwei Gruppen wurden vier Sequenzmuster identifiziert (Tabelle 9). Die Polymorphismen I37T sowie G41S/N sind bisher nicht weiter untersucht, jedoch vielfach in der HIV-1 Sequenzdatenbank vorhanden. Die Mutation R77Q wurde in einigen Arbeiten mit dem LTNP-Status in Verbindung gebracht und ist in fünf der acht LTNP (MH01, MH02, MH04, MH06, MH08), sowie einem der HIV-1 Kontrollpatienten P10 vorhanden. Der Polymorphismus entspricht jedoch der Konsensussequenz von HIV-1 Subtyp B und wurde in mehreren Studien nicht bestätigt^{58,93}. I83 entspricht ebenfalls der Konsensussequenz von HIV-1 Subtyp B. Zusätzlich tragen zwei der LTNP (MH02 und MH04) eine Mutation (Q3R), die mit einem verringerten zytopathischen Effekt von Vpr in Verbindung gebracht wurde³¹⁸.

3.1.4. *ccr5* Genotyp und HLA-B Typisierung

Einen großen Einfluss auf den Verlauf einer HIV-1 Infektion haben neben genetischer Ursachen der Viren auch mehrere Patienten-genetische Aspekte. Zwei der bedeutsamsten Genotypen hierbei sind der CCR5-Genotyp und die HLA-B Typisierung.

3.1.4.1. CCR5 Genotyp

CCR5 stellt den für fast alle primären HIV-1 Infektionen genutzten Corezeptor dar. Schon vor Jahren konnte gezeigt werden, dass bereits eine heterozygote 32bp-Deletion (*ccr5*Δ32) zu einer verlangsamten HIV-1 Infektion führen kann^{75,322}. In der Dissertation von Michael Humbert wird gezeigt, dass keiner der hier untersuchten LTNP diesen Genotyp besitzt und dieser als Ursache für den LTNP-Statuts ausgeschlossen werden kann (Tabelle 4).

3.1.4.2. HLA-B Typisierung

In Kooperation mit dem Blutspendedienst Hessen wurde eine vollständige HLA-B Typisierung aller untersuchten LTNP Patienten durchgeführt. Hierbei wurden die HLA-B Typen *5701 und *27 je einmal bei den Patienten MH03 bzw. MH06 und der HLA-B Typ *14 in den Patienten MH04 und MH07 nachgewiesen (Tabelle 4). Patienten mit diesen HLA-B Typen besitzen eine breite und effektive zelluläre Immunantwort, die zu einem verlangsamten Infektionsverlauf führen kann. Kontrovers sind hierbei die Ergebnisse unseres Koopera-

tionspartners, der keine breitere bzw. bessere zelluläre Immunantwort der LTNP (MH01-MH07) im Vergleich zu einer Gruppe von HIV-1 Kontrollpatienten nachweisen konnte²⁸¹.

3.2. Untersuchungen HIV-1 Env-RRV

3.2.1. Herstellung HIV-1 Env-RRV

Durch Calciumphosphat Transfektion von 293T Zellen mit den pTN7-Konstrukten wurden von je vier LTNP und vier HIV-1 Kontrollpatienten sowie fünf Laborstämmen HIV-1 Env-RRV hergestellt (2.8.6 oben). Die Viren wurden durch PEG-Fällung aus Zellkulturüberständen aufgearbeitet und für Untersuchungen viraler Eigenschaften genutzt.

3.2.2. Infektiosität HIV-1 Env-RRV

Die Infektiosität der Viruspräparationen leitet sich aus dem Quotienten infektiöser Viren zur Gesamtzahl aller Viren ab. Sie ist ein Maß für den Anteil infektiöser Viruspartikel innerhalb der Virusprobe (Abbildung 25 und Tabelle 10). Tabelle 10 gibt ferner Auskunft über die Zahl infektiöser Viren und die Gesamtzahl aller Viren der einzelnen Präparationen. Es ist zu erkennen, dass die Gesamtanzahl der Viren einzelner Präparationen sehr homogen ($1,72 \cdot 10^{11}$ bis $7,79 \cdot 10^{12}$

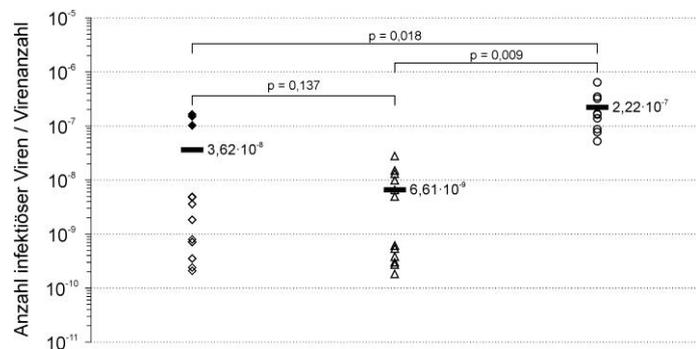


Abbildung 25: Infektiosität der untersuchten HIV-1 Env-RRV

Gegeben ist der Quotient infektiöser Viren zur Virengesamtzahl. LTNP (◇), HIV-1 Kontrollpatienten (Δ), Laboradaptierte Isolate (○). Die Mittelwerte der Gruppen (—) sind gegeben, ebenso die p-Werte.

pro ml), die Zahl infektiöser Viren in den produzierten Stocks jedoch stark unterschiedlich ist (ca. $9,01 \cdot 10^2$ bis $1,34 \cdot 10^6$ pro ml). Die Zahl infektiöser Viren in der Gruppe Laboradaptierter Stämme liegt ein bis zwei log-Stufen über den Werten der HIV-1 Env-rekombinanten Viren der LTNP bzw. HIV-1 Kontrollpatienten (Tabelle 10). Dies hat zur Folge, dass die Infektiosität der beiden Gruppen primärer Viren deutlich unter den Werten der Gruppe Laboradaptierter Stämme liegt. Die Werte der Infektiosität der LTNP Gruppe reichen von $2,09 \cdot 10^{-10}$ bis $1,64 \cdot 10^{-7}$ IU/U (Mittelwert: $3,62 \cdot 10^{-8}$ IU/U), die Quotienten der Gruppe der HIV-1 Kontrollpatienten $1,83 \cdot 10^{-10}$ bis $2,76 \cdot 10^{-8}$ IU/U (Mittelwert $6,61 \cdot 10^{-9}$ IU/U). In der Gruppe der Laboradaptierten Stämme reichen die Werte der Infektiosität hingegen von $5,23 \cdot 10^{-8}$ bis $6,40 \cdot 10^{-7}$ IU/U (Mittelwert $2,22 \cdot 10^{-7}$ IU/U). Somit erreichen die Unterschiede zwischen den zwei Patientengruppen statistische Signifikanz ($p\text{-Wert}_{\text{LTNP/HIV-1 Kontrollpatienten}} = 0,137$), wäh-

rend sich die Gruppe der Labor-adaptierten Stämme signifikant von diesen beiden Gruppen unterscheidet ($p\text{-Wert}_{\text{LTNP/Labor-adaptierte Stämme}} = 0,018$ bzw. $p\text{-Wert}_{\text{HIV-1 Kontrollpatienten/Labor-adaptierte Stämme}} = 0,009$).

Die Analyse der Infektiosität in Abhängigkeit der Länge des V1/V2 Bereichs zeigt keine Korrelation der beiden Größen ($p\text{-Wert} = 0,6686$). Die Länge der Variablen Schleifen V1/V2 hat demnach keinen Einfluss auf die Infektiosität der Viren, respektive die Zahl der infektiösen Partikel in den Viruspräparationen ($r^2 = 0,02213$). Verdeutlicht wird dies durch die fast parallel zur Abszisse verlaufende Ausgleichsgerade (rot) der linearen Regression (Abbildung 26).

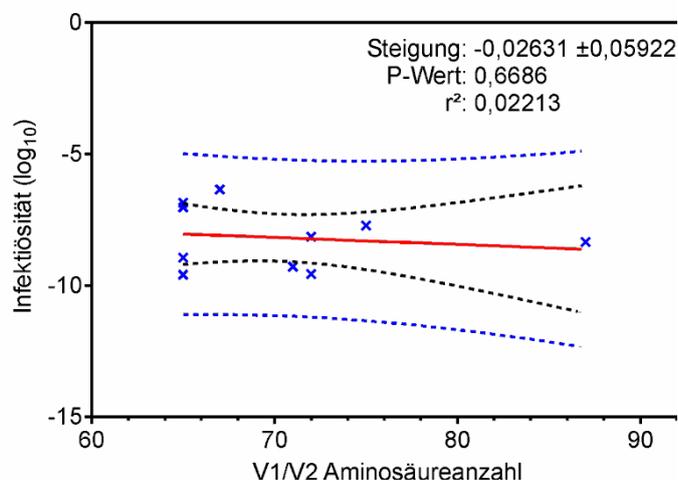


Abbildung 26: Korrelation von Infektiosität und V1/V2 Länge

Die Infektiosität der untersuchten HIV-1 Env-RRV (Ordinate) ist als Funktion der V1/V2 Länge (Abszisse) dargestellt. Die Ausgleichsgerade (rot), das 95%ige Konfidenz- (schwarz), sowie das 95%ige Prädiktionsintervall (blau) einer linearen Regression sind angegeben.

3.2.3. Replikation der HIV-1 Env-RRV

Die Bestimmung der Effizienz der frühen Replikationsschritte erfolgte durch Infektion von U87.CD4.CCR5 Zellen mit den HIV-1 Env-RRV. Hierbei dient die in den Viren codierte *Renilla* Luciferase als Reporter. Die in den infizierten Zellen gebildete Menge an *Renilla* Luciferase wurde photometrisch ermittelt und mit der Menge an *Renilla* Luciferase in den zur Virusproduktion transfizierten 293T Zellen normiert. Dieser Quotient gibt die Replikationskompetenz der HIV-1 Env-RRV in Abhängigkeit des Hüll-

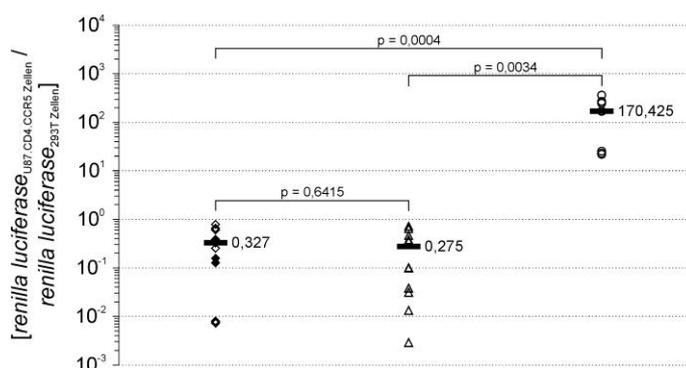


Abbildung 27: Effizienz früher Replikationsschritte HIV-1 Env-RRV

Angegeben ist der Quotient aus *Renilla* Luciferase Aktivität infizierter U87.CD4.CCR5 Zellen und *Renilla* Luciferase Aktivität in transfizierten 293T Zellen. LTNP (◇), HIV-1 Kontrollpatienten (△), Labor-adaptierte Isolate (○). Die Mittelwerte der Gruppen (—), sowie die p-Werte sind ebenfalls dargestellt.

protein-vermittelten Eintritts in die Zellen wieder (Abbildung 27 und Tabelle 10). Innerhalb der beiden Gruppen primärer Viren erstrecken sich die Werte in vergleichbaren Größenordnungen: LTNP Patienten $7,25 \cdot 10^{-3}$ bis $7,86 \cdot 10^{-1}$ bzw. HIV-1 Kontrollpatienten $2,89 \cdot 10^{-3}$ bis $7,19 \cdot 10^{-1}$. Dementsprechend gibt es zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied in der Replikationskompetenz (p-Wert_{LTNP/HIV-1 Kontrollpatienten} = 0,6415). Im Unterschied zu den Gruppen primärer Viren, zeichnen sich die HIV-1 Env-RRV Labor-adaptierter Stämme durch eine signifikant höhere Replikationskompetenz aus ($2,18 \cdot 10^1$ bis $3,61 \cdot 10^2$; p-Wert_{LTNP/Labor-adaptierte Stämme} = 0,0004 bzw. p-Wert_{HIV-1 Kontrollpatienten/Labor-adaptierte Stämme} 0,0034). Als weitere Kontrolle dienten Δenv rekombinante Reporterviren. Diese sind außerstande U87.CD4.CCR5 Zellen zu infizieren, transfizierte 293T Zellen liefern jedoch einen vergleichbaren *Renilla* Luciferase Wert. Der Quotient dieser Kontrolle liegt bei $1,32 \cdot 10^{-4}$, besitzt jedoch keine Aussagekraft, da die *Renilla* Luciferase Werte der U87.CD4.CCR5 Zellen im Bereich des Hintergrunds liegen und so den Quotienten verfälschen.

Die Analyse der Effizienz der frühen Replikation in Abhängigkeit der Länge der Variablen Schleifen V1/V2 zeigt eine schwache, signifikante Korrelation beider Größen ($r^2 = 0,3563$; p-Wert = 0,0486; Abbildung 28). Mit zunehmender Länge der Variablen Schleifen V1/V2 nimmt die Effizienz der frühen Replikationsschritte der untersuchten HIV-1 Env-RRV ab (Steigung = $-0,1434 \pm 0,0617$). Es muss jedoch bedacht werden, dass die hier getätigte Analyse auf einer kleinen Datenmenge beruht und somit leicht durch einzelne Werte verfälscht werden kann.

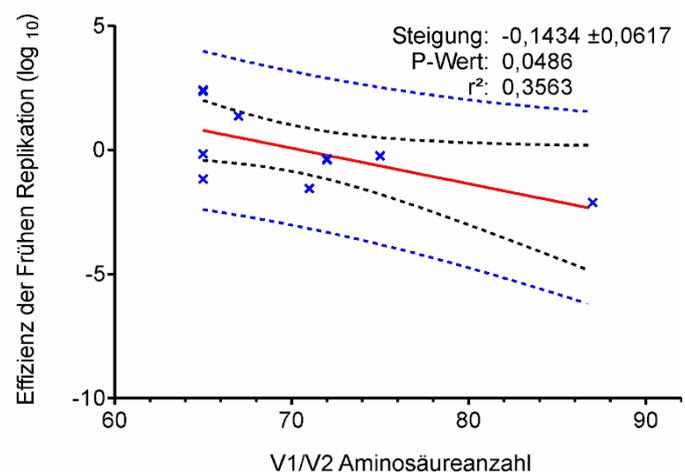


Abbildung 28: Korrelation der Effizienz der frühen Replikationsschritte und der V1/V2 Länge

Die Effizienz der frühen Replikation der untersuchten HIV-1 Env-RRV (Ordinate) ist in Abhängigkeit der V1/V2 Länge (Abszisse) dargestellt. Die Ausgleichsgerade (rot), das 95%ige Konfidenzintervall (schwarz), sowie das 95%ige Prädiktionsintervall (blau) einer linearen Regression sind angegeben.

Tabelle 10: Titer, Infektiosität und frühe Replikationseffizienz der HIV-1 Env-RRV

Virus	Virus-partikel [U/ml]	Titer [IU/ml]	IU/U	Mittelwert StabW	U87.CD4.CCR5 [RLU/ml]	293T [RLU/ml]	U87.CD4.CCR5/293T	Mittelwert StabW
MH01	6,70·10 ¹²	1.402	2,09·10 ⁻¹⁰		1,38·10 ⁷	4,22·10 ⁷	0,327	
	6,81·10 ¹²	2.404	3,53·10 ⁻¹⁰	2,67·10⁻¹⁰	2,83·10 ⁷	4,70·10 ⁷	0,602	0,394
	6,26·10 ¹²	1.502	2,40·10 ⁻¹⁰	7,57·10 ⁻¹¹	1,70·10 ⁷	6,74·10 ⁷	0,252	0,184
MH03	5,19·10 ¹²	9.515	1,83·10 ⁻⁹		2,91·10 ⁷	4,78·10 ⁷	0,609	
	6,06·10 ¹²	4.307	7,11·10 ⁻¹⁰	1,11·10⁻⁹	3,50·10 ⁷	5,32·10 ⁷	0,658	0,684
	5,93·10 ¹²	4.708	7,94·10 ⁻¹⁰	6,26·10 ⁻¹⁰	4,13·10 ⁷	5,25·10 ⁷	0,786	0,091
MH06	2,34·10 ¹¹	1.142	4,88·10 ⁻⁹		4,30·10 ⁵	5,37·10 ⁷	0,008	
	2,80·10 ¹¹	1.342	4,79·10 ⁻⁹	4,42·10⁻⁹	3,74·10 ⁵	5,17·10 ⁷	0,007	0,008
	2,52·10 ¹¹	901	3,58·10 ⁻⁹	7,29·10 ⁻¹⁰	5,49·10 ⁵	7,36·10 ⁷	0,007	0,000
MH08	1,98·10 ¹¹	32.460	1,64·10 ⁻⁷		2,59·10 ⁷	6,69·10 ⁷	0,387	
	1,72·10 ¹¹	25.907	1,51·10 ⁻⁷	1,39·10⁻⁷	2,38·10 ⁷	1,52·10 ⁸	0,157	0,224
	2,31·10 ¹¹	23.589	1,02·10 ⁻⁷	3,25·10 ⁻⁸	2,95·10 ⁷	2,32·10 ⁸	0,127	0,142
LTNP			3,62·10⁻⁸	6,35·10⁻⁸		0,327	0,280	
HOE6	5,11·10 ¹²	50.202	9,82·10 ⁻⁹		6,06·10 ⁷	1,60·10 ⁸	0,378	
	5,85·10 ¹²	38.306	6,55·10 ⁻⁹	7,11·10⁻⁹	4,86·10 ⁷	1,05·10 ⁸	0,462	0,434
	4,89·10 ¹²	24.194	4,95·10 ⁻⁹	2,49·10 ⁻⁹	3,08·10 ⁷	6,65·10 ⁷	0,463	0,049
P5T5	6,42·10 ¹²	1.923	3,00·10 ⁻¹⁰		2,48·10 ⁶	2,46·10 ⁷	0,101	
	6,36·10 ¹²	1.162	1,83·10 ⁻¹⁰	2,52·10⁻¹⁰	1,05·10 ⁵	3,65·10 ⁷	0,003	0,068
	6,47·10 ¹²	1.763	2,72·10 ⁻¹⁰	6,12·10 ⁻¹¹	4,04·10 ⁶	4,08·10 ⁷	0,099	0,056
S3R8	7,44·10 ¹²	111.290	1,50·10 ⁻⁸		3,13·10 ⁷	4,87·10 ⁷	0,643	
	7,14·10 ¹²	93.347	1,31·10 ⁻⁸	1,86·10⁻⁸	6,05·10 ⁷	8,41·10 ⁷	0,719	0,572
	6,73·10 ¹²	185.887	2,76·10 ⁻⁸	7,91·10 ⁻⁹	2,85·10 ⁷	8,03·10 ⁷	0,354	0,192
S19	2,90·10 ¹²	1.563	5,39·10 ⁻¹⁰		2,34·10 ⁶	7,50·10 ⁷	0,031	
	3,46·10 ¹²	2.123	6,14·10 ⁻¹⁰	5,11·10⁻¹⁰	3,92·10 ⁶	1,03·10 ⁸	0,038	0,028
	3,05·10 ¹²	1.162	3,81·10 ⁻¹⁰	1,19·10 ⁻¹⁰	1,29·10 ⁶	9,78·10 ⁷	0,013	0,013
HIV-1 Kontrollpatienten			6,61·10⁻⁹	8,52·10⁻⁹		0,275	0,259	
YU-2	3,13·10 ¹²	163.810	5,23·10 ⁻⁸		2,74·10 ⁹	1,11·10 ⁷	246,78	
	3,33·10 ¹²	289.819	8,70·10 ⁻⁸	9,27·10⁻⁸	2,52·10 ⁹	1,48·10 ⁷	170,36	259,54
	3,16·10 ¹²	438.508	1,39·10 ⁻⁷	4,53·10 ⁻⁸	3,20·10 ⁹	8,84·10 ⁶	361,49	96,20
D117.III	2,11·10 ¹²	673.578	3,19·10 ⁻⁷		1,24·10 ⁹	4,90·10 ⁷	25,25	
	1,92·10 ¹²	668.570	3,48·10 ⁻⁷	4,36·10⁻⁷	1,12·10 ⁹	5,15·10 ⁷	21,82	23,31
	2,10·10 ¹²	1.344.651	6,40·10 ⁻⁷	1,78·10 ⁻⁷	1,52·10 ⁹	6,65·10 ⁷	22,86	1,76
JR-CSF	1,39·10 ¹²	226.815	1,63·10 ⁻⁷		1,37·10 ⁹	8,18·10 ⁶	167,40	
	1,34·10 ¹²	103.327	7,71·10 ⁻⁸	1,36·10⁻⁷	1,58·10 ⁹	5,87·10 ⁶	269,60	228,42
	1,21·10 ¹²	204.133	1,69·10 ⁻⁸	5,14·10 ⁻⁸	1,78·10 ⁹	7,18·10 ⁶	248,27	53,92
Labor-adaptierte Stämme			2,22·10⁻⁷	1,88·10⁻⁷		170,43	130,89	

3.2.4. Neutralisation HIV-1 Env-RRV

Für den Nachweis breit-neutralisierender Antikörper im Serum der Patienten wurden mehrere heterologe und homologe HIV-1 Env RRV in *in vitro* Neutralisationsstudien mit den Patientenseren untersucht (2.8.9 oben). Als maßgebende Punkte zur Beurteilung der Neutralisationskapazität wurden die reziproken Serumverdünnungen zum Erreichen von 50% (IC50) und 90% Inhibition (IC90) bestimmt (Abbildung 29 und Tabelle 17).

In Tabelle 17 sind alle untersuchten Kombinationen detailliert aufgelistet. War auch bei der größten Verdünnungsstufe die Neutralisation zu groß, um einen IC50 zu ermitteln (alle Werte über 50% bezogen auf den Kontrollwert), wurde mit >1.600 bzw. >6.400 gekennzeichnet. War hingegen selbst die geringste Serumverdünnung nicht in der Lage eine Neutralisation von über 50% bzw. 90% zu erreichen, wurden dies mit <10 angegeben. Für Abbildung 29 wurden diese ‚festgelegten‘ Werte in die jeweiligen Höchstwerte der

Verdünnung umgewandelt (z.B. >6.400 zu 6.400) oder aber in 1, falls kein IC50 bzw. IC90 ermittelt werden konnte (<10 zu 1). Abbildung 29 zeigt somit – zusammenfassend – die Ergebnisse aller durchgeführten Neutralisationsstudien. Für die Gruppe der LTNP liegen die Serumverdünnungen für den IC50 im Bereich von 35 bis 6.400 (Mittelwert 1.227 bzw. Median 410), für IC90 bei <10 bis 1.600 (Mittelwert 144 bzw. Median 55). Die Gruppe der HIV-1 Kontrollpatienten erreicht Werte von <10 bis 5.150 (Mittelwert 475 bzw. Median 130) für IC50 bzw. <10 bis 530 (Mittelwert 43 bzw. Median 15) für IC90. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen erreichte sowohl für den IC50, als auch IC90 statistisch signifikantes Niveau (p-Wert_{IC50} = 0,0032 bzw. p-Wert_{IC90} = 0,0050). Ein weiteres Anzeichen für die unterschiedliche Neutralisationskapazität der beiden Gruppen zeigt sich in der Zahl der Kombinationen die keinen IC50 bzw. IC90 erreichten: Während für alle Kombinationen der LTNP ein IC50 ermittelt werden konnte (0/63), waren neun Kombination der HIV-1 Kontrollpatienten Gruppe auch bei der geringsten Serumverdünnung nicht in der Lage einen IC50 zu erzielen (9/63; p-Wert: 0,0021). Hierbei ist zu erwähnen, dass allein das Serum A6N3 siebenmal keinen IC50 erreicht. Vergleichbares gilt für den IC90; lediglich sechs

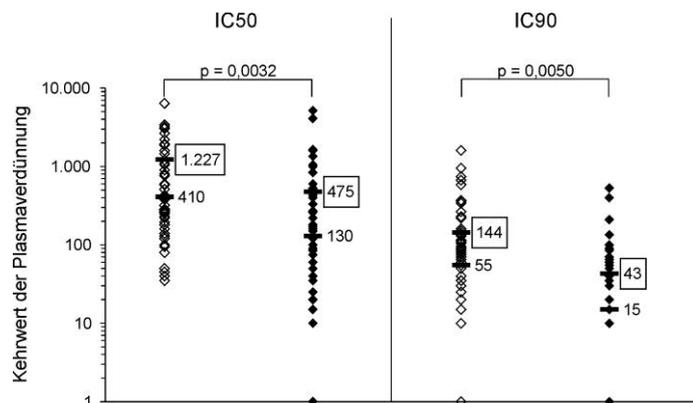


Abbildung 29: Übersicht der Neutralisationskapazität der Patientenseren

Die Ordinate gibt den Kehrwert der Plasmaverdünnung an, die notwendig ist, um den IC50 (links) bzw. IC90 (rechts) zu erreichen. LTNP-Seren (◇) HIV-1 Kontrollseren (◆). Die Mittelwerte (in Box), die Medianwerte, sowie die p-Werte sind im Diagramm angegeben.

Kombinationen der LTNP verfehlen einen IC90 (6/63), jedoch 23 Kombinationen der HIV-1 Kontrollpatienten (23/63; p-Wert = 0,0003). Zusätzlich zu den Seren beider Patientengruppen wurden die HIV-1 Env-RRV mit einem HIV-1 negativen Serum untersucht, um evtl. Serumeffekte aufzuzeigen. Bis auf einen, wohl falsch-positiven, Ansatz kann hierbei keine Inhibition durch das HIV-1 negative Serum festgestellt werden (Tabelle 17).

3.3. Untersuchungen mit Peptidphagen

3.3.1. Kreuzreaktivität der Peptidphagen

Mit Hilfe der LTNP Seren isolierte Michael Humbert aus Peptidphagenbanken HIV-1 spezifische Peptidphagen. Die Peptidinserts dieser Phagen (7 bzw. 12 Aminosäuren) weisen sequentielle oder strukturelle Homologien zu den HIV-1 Hüllproteinen gp120 und gp41 auf und wurden entsprechend ihrer Homologie gruppiert¹⁵¹. Um abschätzen zu können, welche Bedeutung die identifizierten Epitope in der Immunantwort bei einer HIV-1 Infektion besitzen, wurde die Kreuzreaktivität von Seren der LTNP und der HIV-1 Kontrollpatienten mit diesen Peptidphagengruppen analysiert (Tabelle 11 und Abbildung 30).

Tabelle 11: Kreuzreaktivität von Peptidphagen und Patientenseren

Serum	lineare Epitope						konformelle Epitope				neg. Phage	
	gp120			gp41								
	GPGRAF (1)	NNNT (2)	NNALP-NPD (8)	KLIC (3)	KLIC-AVPW (4)	WxxxW (5)	CD4bs (6)	CD4bs (7)	Mix 1 (9)	Mix 2 (10)		
LTNP	MH01	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	MH02	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
	MH03	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	MH04	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	MH05	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
	MH06	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	MH07	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
	Σ [%]	85,7	14,3	14,3	100,0	28,6	14,3	28,6	28,6	71,4	42,9	0
HIV-1 Kontrollpatienten	A6N3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H0E6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P5T5	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	S3R8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P10	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	S6	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	S19	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Σ [%]	28,6	0,0	14,3	57,1	0,0	0,0	14,3	0,0	0,0	0,0	0
p-Wert	0,032	0,356	1,000	0,078	0,172	0,356	0,552	0,172	0,008	0,078		

+: Kreuzreaktivität vorhanden; -: Kreuzreaktivität nicht vorhanden

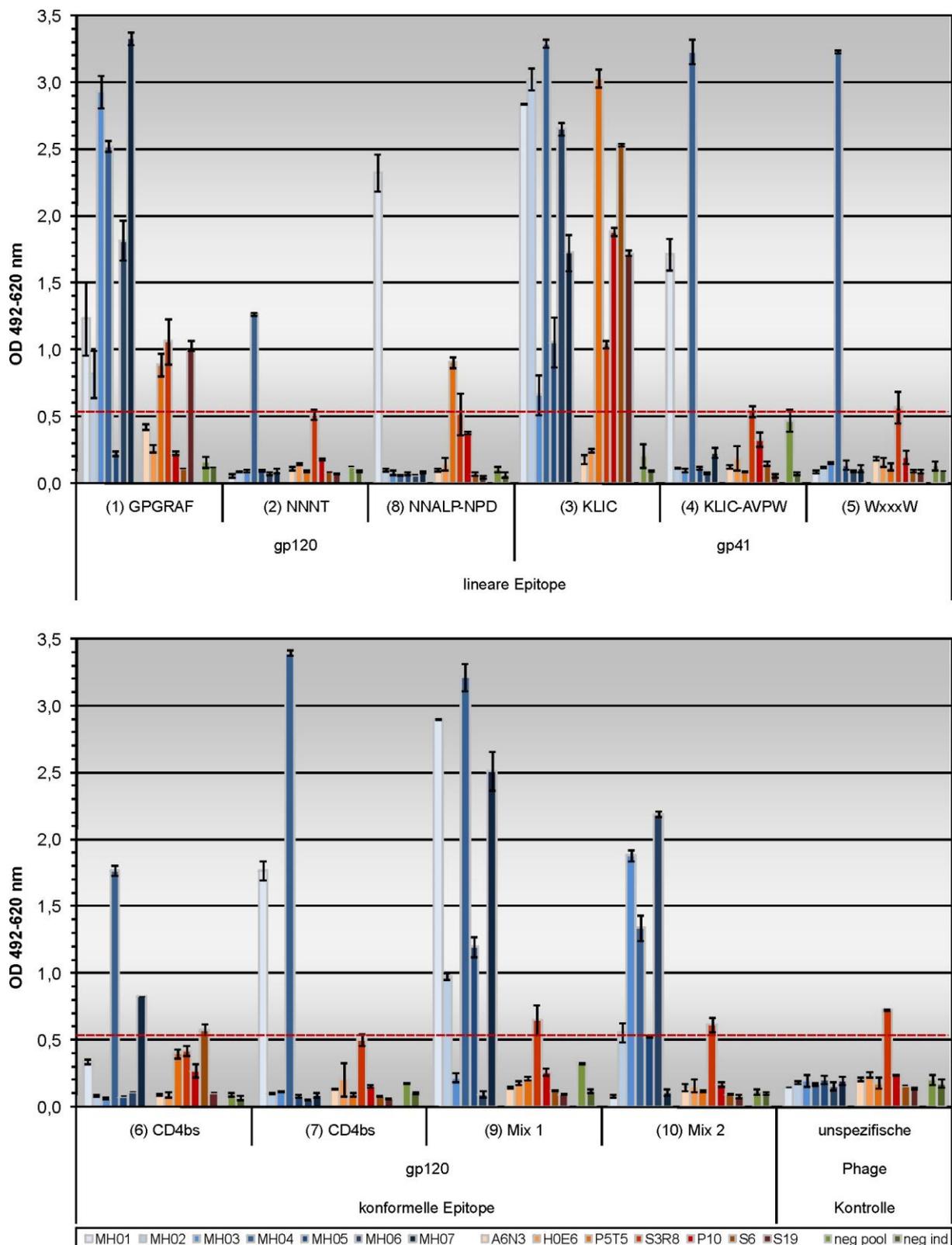


Abbildung 30: Kreuzreaktivität der LTNP-, Kontroll- bzw. HIV-1 negativer Seren mit den Peptidphagen

Der ELISA zeigt die Reaktivität der einzelnen Seren mit den jeweiligen Gruppen der Peptidphagen (1-10), sowie einem unspezifischen Kontrollphagen. LTNP-Seren (Blau), Kontrollseren (Rot), HIV-1 negativ Seren (Grün). Die gestrichelte rote Linie gibt den durchschnittlichen cut-off Wert an.

Neben den Reaktivitäten der Seren mit denen die jeweiligen Biopannings durchgeführt wurden und zur Isolierung der entsprechenden Peptidphagen führten, wurden sowohl mit Seren der LTNP als auch HIV-1 Kontrollpatienten unterschiedlich ausgeprägte Kreuzreaktivitäten detektiert. Einige der positiv zu erwartenden Serum/Peptidphagen-Kombinationen zeigen jedoch, trotz mehrfacher Wiederholung der Analyse, keine Reaktivität. Besonders ausgeprägt ist dieses Phänomen für die Peptidphagengruppe NNNT (2), deren einzelne Peptidphagen mit den Seren MH01-MH05 isoliert wurden. Bei den Peptidphagengruppen WxxxW (5), CD4bs (6) und Mix 2 (10) ist ebenfalls keine Reaktion mit dem Serum von MH01 festzustellen, obwohl dieses, zusammen mit dem Serum von MH04, zur Identifikation dieser Peptidphagen eingesetzt wurde (vergl. Dissertation Michael Humbert). Die Seren der HIV-1 Kontrollpatienten weisen eine starke Kreuzreaktivität mit der Peptidphagengruppen KLIC (3) (57,1%) und vereinzelt schwache Reaktivitäten mit den Gruppen GPGRAF (1) (28,6%), CD4bs (6) und NNALP-NPD (8) (je 14,3%) auf. Bei Patient S3R8 ist ein deutlich erhöhtes Hintergrundsignal zu erkennen, was bei der Beurteilung der Kreuzreaktivität berücksichtigt wurde (Tabelle 11). Einige dieser Peptidphagengruppen spiegeln bekannte (CD4bs) oder immundominante Epitope wider (KLIC, GPGRAF), weshalb einer erhöhte Kreuzreaktivität zu erwarten ist. Die Seren der LTNP zeigen neben einer ausgeprägten Kreuzreaktivität gegenüber den Peptidphagengruppen GPGRAF (1) (85,7%) und KLIC (3) (100%), deutliche Kreuzreaktivitäten mit den Peptidphagengruppen Mix 1 (9) (71,4%) und Mix 2 (10) (42,9%). Obwohl die Reaktivität der Seren MH02 und MH05 mit der Peptidphagengruppe Mix 2 (10) von als negativ eingestuft werden, verfehlen diese den Grenzwert der Analyse nur äußerst knapp oder zeigen eine geringfügig erhöhte Standardabweichung. Bewertet man diese ebenfalls als reaktiv, läge der Wert der Kreuzreaktivität der LTNP Seren mit der Peptidphagengruppe Mix 2 (10) bei 71,4%. Der Unterschied in der Kreuzreaktivität der beiden Patientengruppen wäre in diesem Fall statistisch signifikant (p -Wert = 0,008). Bei den Peptidphagengruppen Mix 1 (9) und Mix 2 (10) handelt es sich um neu identifizierte, konformelle Epitope auf der Oberfläche des HIV-1 Hüllproteins gp120. Eine Auswertung der Kreuzreaktivität mit den Kriterien ‚kreuzreaktiv‘ (+) und ‚nicht-kreuzreaktiv‘ (-), zeigt deutlich die breitere Immunantwort der LTNP-Seren gegenüber den Peptidphagengruppen GPGRAF (1), KLIC (3), Mix 1 (9) und Mix 2 (10). Hierbei erreicht der Unterschied zwischen beiden Patientengruppen für die Gruppen GPGRAF (1) und Mix 1 (9) ein signifikantes Niveau. Bei den Gruppen Mix 2 (10) und KLIC (3) wird das Signifikanzniveau nur knapp verfehlt (p -Wert = 0,078), wobei für die Peptidphagengruppe Mix 2 (10) die zuvor erwähnten Besonderheiten gelten (Tabelle 11).

3.3.2. Wettbewerbsstudien der Peptidphagenbindung an Serumantikörper mit trimeren HIV-1 Env

Um nachzuweisen, dass die identifizierten Peptidphagenepitope auf den Hüllproteinen von HIV-1 vorhanden sind, wurden Wettbewerbsstudien durchgeführt. Hierzu wurde die Bindung der Phagen an immobilisierte Serumantikörper durch Zugabe von trimeren HIV-1 Env bzw. CHO-neg, als unspezifische Kontrolle, kompetiert. Es wurden jene Kombinationen untersucht, die zuvor eine Kreuzreaktivität aufwiesen (Abbildung 30).

Die Interaktion der Serumantikörper mit Peptidphagen linearer Epitope konnte in fast allen Ansätzen spezifisch durch HIV-1 gp140 inhibiert werden. Am deutlichsten ausgeprägt ist dieser Effekt bei den zwei immundominanten Epitopen GPGRAF (1) und KLIC (3). Hier kommt es bei allen sechs bzw. sieben untersuchten Patientenseren zu einer Verringerung der Peptidphagenbindung. Die Verdrängung der Peptidphagen der Gruppen NNNT (2), KLIC-AVPW (4), WxxxW (5) und NNALP-NPD (8) gelingt nur teilweise. Bei den Peptidphagen konformeller Epitope ist in den Gruppen CD4bs (7) und Mix 1 (9) eine Inhibition durch Zugabe von HIV-1 gp140 zu erkennen (Tabelle 12; 6.4 unten). Die Bindung der Peptidphagen der Gruppen CD4bs (6) und Mix 2 (10) konnte für keines der untersuchten Patientenseren spezifisch mit HIV-1 Env beeinflusst werden. Die Untersuchungen mit einem unspezifischen Phagen (11) und dem wildtyp Phagen (12) dient zur Kontrolle der Spezifität. Keiner dieser Phagen wird durch die untersuchten Seren gebunden.

Tabelle 12: Wettbewerb der Peptidphagenbindung an Serumantikörper durch trimeres gp140

Serum	lineare Epitope						konformelle Epitope				Kontrolle	
	gp120			gp41			gp120				unspez. Phage (11)	wt-Phage (12)
	GPGRAF (1)	NNNT (2)	NNALP-NPD (8)	KLIC (3)	KLIC-AVPW (4)	WxxxW (5)	CD4bs (6)	CD4bs (7)	Mix 1 (9)	Mix 2 (10)		
MH01	+		-	+	+			+	+		-	-
MH02	+			+					-		-	-
MH03	+			+						-	-	-
MH04	+	+		+	-	-	-	-	+	-	-	-
MH05				+					+		-	-
MH06	+			+						-	-	-
MH07	+			+			-		-		-	-
Gesamt	6/6	1/1	0/1	7/7	1/2	0/1	0/2	1/2	3/5	0/3	0/7	0/7

+: Wettbewerb; -: keine Wettbewerb

3.4. Expression und Aufreinigung von HIV-1 Env

Die Expression von trimeren HIV-1 gp140 (ADA.C1) oder einer Negativkontrolle (CHO-neg) erfolgte in CHO-Zellen. Zur Expression wurden die Zellen konfluent angezchtet, das Medium gewechselt und die Expression induziert. Fünf bis sechs Tage nach der Induktion wurde der Überstand (ADA.C1 oder CHO-neg) geerntet (2.8.13 oben) und mit Hilfe einer *Galanthus nivalis* Lectinsäule erfolgte eine Anreicherung des hochglykosylierten HIV-1 Env (Abbildung 31). Die erste Spalte zeigt den unaufgereinigten Zellkulturüberstand (ÜS) der jeweiligen Probe. Am unteren Ende der Abbildung ist deutlich die starke Bande für Serumalbumin (BSA) zu erkennen. Nach der Aufreinigung ist das Serumalbumin aus der Probe entfernt und eine Bande für die Monomere von ADA.C1 zu erkennen (140 kDa; ADA.C1 pur.). Für Di- und Trimere ist keine eindeutige Bande zu erkennen. Hier überlagern sich mehrere Banden und auch in der Probe der aufgereinigten Negativkontrolle (CHO-neg pur.) ist hier ein undeutlicher Schmier zu erkennen. Demnach sind in den Eluaten noch weitere Glykoproteine enthalten, die koelulieren.

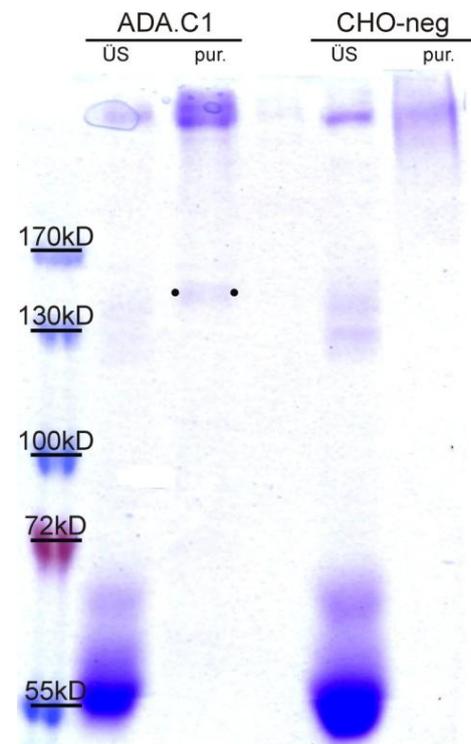


Abbildung 31: Aufreinigung von ADA.C1 und CHO-neg

10µl Zellkulturüberstand (ÜS) oder Elutionsprobe (pur.) wurden mit Probenpuffer ohne DTT versetzt und im SDS-Gel aufgetrennt. Die aufgereinigte gp140 Bande ist mit zwei Punkten markiert.

Die aufgereinigten HIV-1 Env Trimere wurden im Western Blot mit dem monoklonalen HIV-1 Env Trimer-spezifischen Antikörper Md-1 detektiert. Das entsprechende Signal ist deutlich in der aufgereinigten Probe von ADA.C1 zu sehen (ADA.C1 pur.). Im unaufgereinigten Überstand ist aufgrund der geringen Konzentration kein Signal zu erkennen (ADA.C1 ÜS). Ebenfalls negativ sind sowohl die unaufgereinigte (CHO-neg ÜS), als auch die aufgereinigte Probe (CHO-neg pur) von CHO-neg (Abbildung 32 A). Nach der Entwicklung wurde die Membran gestrippt, erneut geblockt und mit dem monoklonalen α -V3 Antikörper 447-52D entwickelt. Dieser detektiert sowohl Mono-, Di- als auch Trimeres HIV-1 Env. Die drei zugehörigen Banden sind sowohl in der unaufgereinigten, als auch in der aufgereinigten ADA.C1 Probe zu erkennen (Abbildung 32 B und C). Wird die Entwicklungszeit verlängert, um auch die Banden in ADA.C1 ÜS sichtbar zu machen, verlaufen die drei einzelnen Signale von ADA.C1 pur. In den Proben von CHO-neg ist erwartungsgemäß wieder kein Signal zu erkennen (Abbildung 32 C).

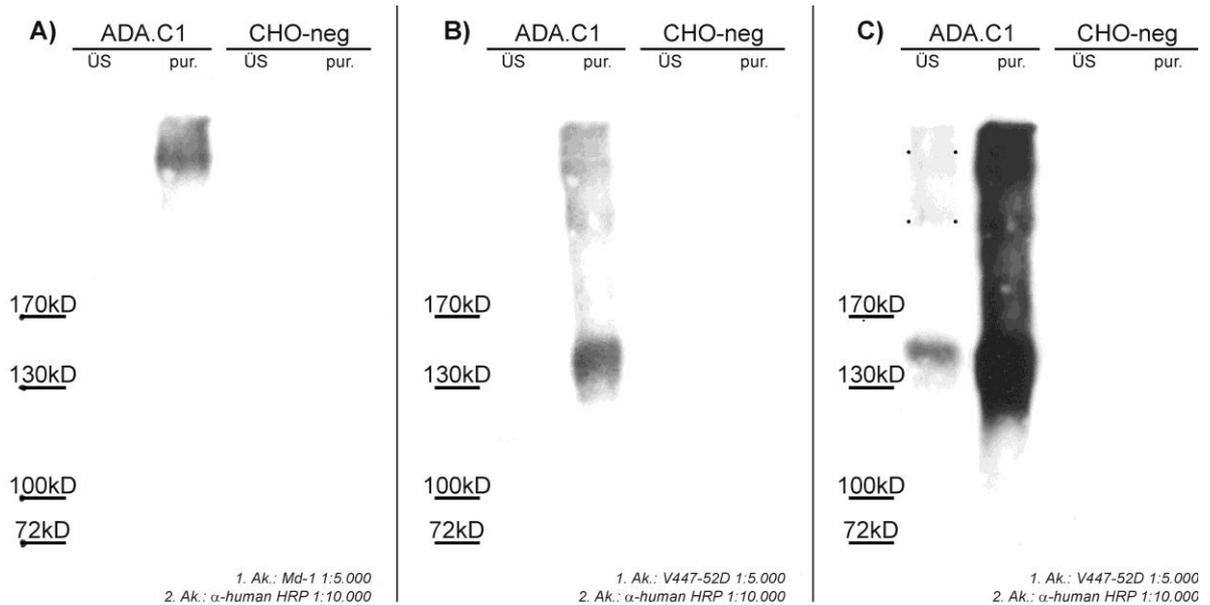


Abbildung 32: Nachweis der HIV-1 Env Trimere im Westernblot

10 µl Probe Zellkulturüberstand (ÜS) bzw. aufgereinigtes Eluat (pur.) wurden mit Probenpuffer ohne DTT denaturiert, im SDS-Gel aufgetrennt und mit den angegebenen Antikörpern detektiert. **A:** Entwicklungszeit 30 sec; **B:** Entwicklungszeit 15 sec; **C:** Entwicklungszeit 3 min

Die so erarbeiteten Proben bzw. die unaufgereinigten Zellkulturüberständen dienen als Zielprotein in HIV-1 Env ELISA Analysen, zur Inhibition der Peptidphagenbindung und zur Selektion HIV-1 spezifischer scF_v Phagen.

3.5. Immunisierungsstudien

Mit Hilfe der isolierten Peptidphagen wurde versucht in Immunisierungsstudien, HIV-1 spezifische Antikörper zu induzieren. Hierzu wurden Gruppen von sechs bis acht Wochen alten IMRI Mäusen sechsmal mit je $2 \cdot 10^{12}$ Peptidphagen pro Maus immunisiert und die Reaktivität des Serums untersucht.

3.5.1. Bindungsreaktivität nach Immunisierung

3.5.1.1. Immunisierungsstudie 2006

Das Ziel einer ersten Studie war es, eine Optimierung der Immunantwort zu erreichen, wobei die Mäuse mit Phagen der Gruppen GPGRAF (1), CD4bs (6), Mix 1 (9), Mix 2 (10) oder wt-Phage (12) immunisiert wurden. Ein Teil der Mäuse wurde hierbei alle zwei Wochen subkutan immunisiert (normal), der andere Teil der Tiere dreimal im Abstand von zwei Wochen und anschließend dreimal im Abstand von drei Wochen (lang). Die Qualität der Immunantwort wurde durch die Reaktivität der Mäuseseren mit trimeren HIV-1 gp140 untersucht.

In den einzelnen Gruppen überlebten unterschiedlich viele Mäuse. In Gruppe Mix 1 (9)-lang starb ein Tier, in den Gruppen Mix 2 (10)-normal und lang starben alle bis auf je zwei Tiere. In Abbildung 33 sind die Bindungsreaktivitäten der Mäuseseren nach der Immunisierung aufgezeigt. Es zeigt sich, dass die Mäuse des langen Immunisierungsprotokolls eine bessere Immunantwort als die Mäuse des normalen Immunisierungsprotokolls besitzen. So reagiert nur ein Mausserum der Gruppe GPGRAF (1)-normal (3518) bei der geringsten Verdünnung mit gp140, während alle fünf Mäuseseren der Gruppe GPGRAF (1)-lang (3551-3555) eine Reaktion aufzeigen (Abbildung 33 und Tabelle 13).

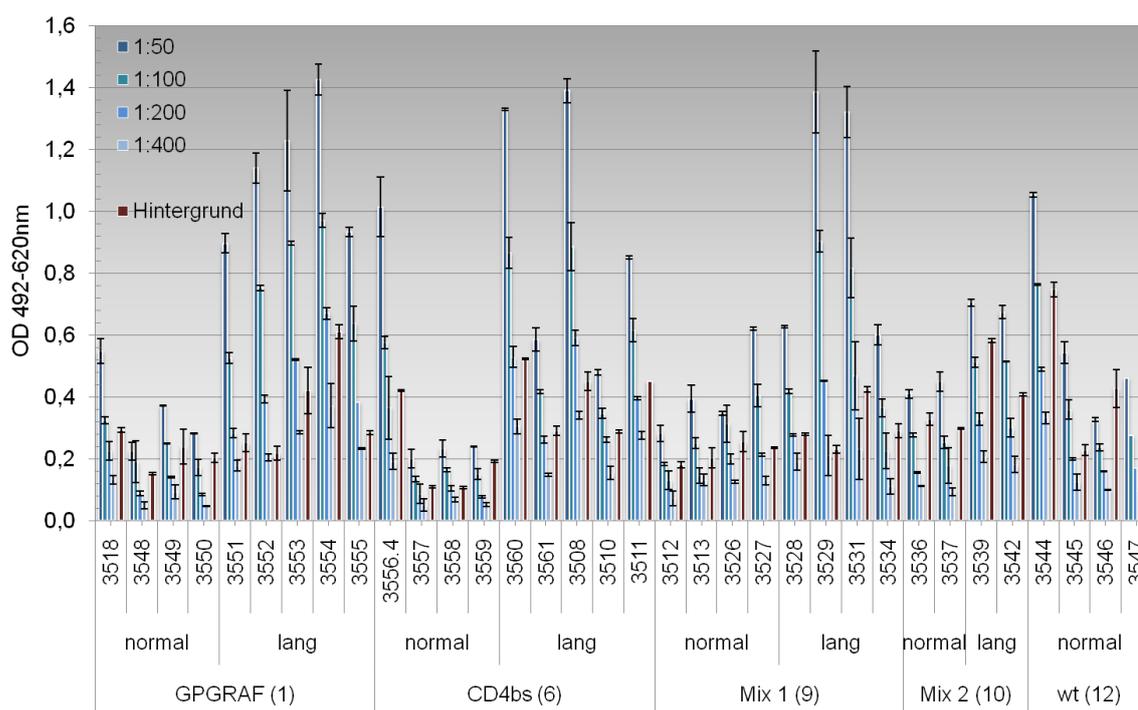


Abbildung 33: Reaktivität der Mäuseseren mit trimeren HIV-1 Env (ADA.C1) – Studie 2006

Die Seren wurden nach der Immunisierung wie angegeben verdünnt und in Duplikaten auf ihre Reaktivität gegenüber trimeren HIV-1 Env (ADA.C1) und einer unspezifischen Kontrolle (Hintergrund; Verdünnung 1:50) getestet. Die mit den unterschiedlichen Phagengruppen immunisierten Mäuse sind auf der Abszisse aufgetragen.

Tabelle 13: Bindungsreaktivitäten an trimeres gp140 der Immunisierungsstudie 2006

	GPGRAF (1)	CD4bs (6)	Mix 1 (9)	Mix 2 (10)	wildtyp (12)
normal	1/4	1/4	2/4	0/2	1/4
lang	5/5	4/5	4/4	1/2	n.d.

Ein ähnliches Bild ergibt sich mit den Gruppen CD4bs (6) und Mix 1 (9). In der Gruppe CD4bs (6) zeigt ein Mausserum des normalen Immunisierungsprotokolls, allerdings vier Seren des langen Immunisierungsprotokolls, eine Immunantwort. Bei den mit Phagen der Gruppe Mix 1 (9) immunisierten Mäuse sind zwei von vier (normal) bzw. vier von vier (lang)

Seren kreuzreaktiv mit HIV-1 Env. Keine Immunantwort kann bei den Tieren der Gruppe Mix 2 (10)-normal festgestellt werden, während eines von zwei Seren der Gruppe Mix 2 (10)-lang eine zumindest schwache Reaktivität aufzeigt. Leider überlebten in diesen Gruppen die wenigsten Tiere, weshalb eine klare Aussage schwierig ist. In der Gruppe der wt-Phagen-immunisierten Mäuse zeigt eines der Seren eine Bindung an trimeres HIV-1 gp140 (3545).

3.5.1.2. Immunisierungsstudie 2007

Eine zweite Immunisierungsstudie zielte auf die Induktion und anschließenden Selektion HIV-1 spezifischer, monoklonaler Antikörper ab. Basierend auf dem Protokoll der Immunisierungsstudie 2006 wurden erneut IMRI-Mäuse mit den Peptidphagen der Gruppen GPGRAF (1), CD4bs (6), Mix 1 (9), Mix 2 (10) oder wt-Phage (12) immunisiert. Die letzten drei Immunisierungen erfolgten im Abstand von drei Wochen (langes Protokoll). Da das primäre Ziel dieser Immunisierung die Isolierung funktioneller B-Zellen war, wurde am Tag nach der sechsten Immunisierung eine weitere Immunisierung der Tiere durchgeführt (Boost) und diese drei Tage nach dem Boost getötet und aufgearbeitet.

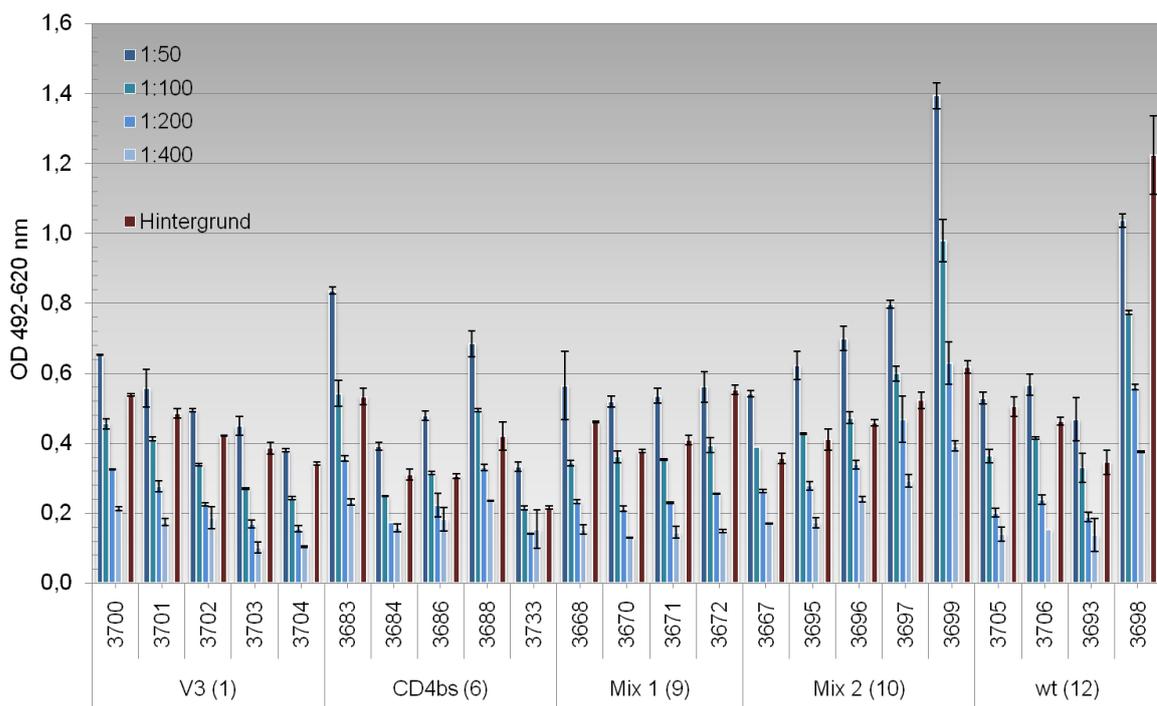


Abbildung 34: Reaktivität der Mäuseseren mit trimeren HIV-1 Env (ADA.C1) – Studie 2007

Die Seren wurden nach der Immunisierung wie angegeben verdünnt und in Duplikaten auf ihre Reaktivität gegenüber trimeren HIV-1 Env (ADA.C1) und einer unspezifischen Kontrolle (Hintergrund; Verdünnung 1:50) getestet. Die mit den unterschiedlichen Phagengruppen immunisierten Mäuse sind auf der Abszisse aufgetragen.

Die Qualität der Immunantwort wurde erneut anhand der Serumreaktivität mit trimeren HIV-1 Env und einer unspezifischen Kontrolle ermittelt. Die Tiere weisen – über alle Gruppen hinweg – einen recht geringen Serومتiter auf, was zumindest teilweise auf die frühere Serumentnahme zurückzuführen ist. Bei den Mäusen der Gruppen GPGRAF (1) und Mix 1 (9) ist die Ausbildung HIV-1 spezifischer Antikörper im Serum nahezu vollständig ausgeblieben (0/5 bzw. 1/5) (Abbildung 34). Eine signifikant stärkere Immunantwort gegenüber trimeren HIV-1 Env (ADA.C1) im Vergleich zur Negativkontrolle (Hintergrund) ist nicht vorhanden. Lediglich ein Tier der Gruppe Mix 1 (9) zeigt eine äußerst schwache Reaktivität (3670; Titer ca. 1:100). Vergleicht man diese jedoch mit der Serumreaktivität der wt-Phagen immunisierten Mäuse (Gruppe wt-Phage (12)) wird deutlich, wie gering diese Immunantwort ist. Die Tiere 3693 und 3706 besitzen eine vergleichbare Immunantwort (Titer ca. 1:100). Bei den Gruppen CD4bs (6) und Mix 2 (10) führt die Immunisierung hingegen zu einer deutlichen Immunantwort bei fast allen Tieren (4/5 bzw. 5/5). Die stärkste Immunantwort zeigen hierbei die Tiere 3699 und 3697 (Mix 2 (10)) mit einem Titer von 1:200 verglichen mit der Negativkontrolle. Die übrigen, reaktiven Seren dieser Gruppe besitzen einen Titer von rund 1:100 (Tabelle 14 und Abbildung 34).

Tabelle 14: Bindungsreaktivitäten an trimeres gp140 der Immunisierungsstudie 2007

	GPGRAF (1)	CD4bs (6)	Mix 1 (9)	Mix 2 (10)	wildtyp (12)
reaktiv	0/5	4/5	0/4	5/5	1/4

3.5.2. Selektion HIV-1 spezifischer Hybridomazellen

Die B-Zellen der Tiere 3683 (CD4bs (6)), 3667 (Mix 1 (9)) und 3699 (Mix 2 (10)) wurden zur Herstellung von Hybridomazellen ausgewählt und mit CRL-1597 Myelomzellen fusioniert. Zwei Wochen nach der Fusion waren in insgesamt 550 Vertiefungen wachsende Heterofusionen zu erkennen (P1-15: 204 Vertiefungen; P16-30: 220 Vertiefungen; P31-45:

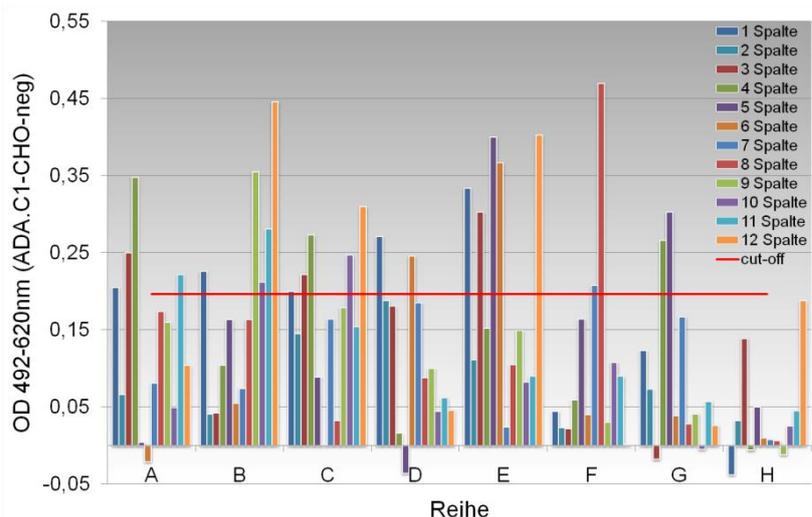


Abbildung 35: Reaktivität der Hybridomaklone

Die Bindung der Überstände einzelner Hybridomaklone an ADA.C1 und CHO-neg beschichtete Platten wurde bestimmt und mit anti-Maus-HRP Antikörper nachgewiesen und Die Differenz der Reaktivität bestimmt. Negativkontrolle (G12); Positivkontrolle (H12). Die fünffache Negativkontrolle wurde als Grenzwert definiert.

126 Vertiefungen). Diese wurden in einem ersten Test auf Reaktivität gegen ADA.C1 getestet (6.5 unten). Insgesamt 94 reaktive Klone (P1-15: 28 Vertiefungen; P16-30: 38 Vertiefungen; P31-45: 29 Vertiefungen) wurden nach wenigen Tagen erneut auf Reaktivität gegenüber ADA.C1 und CHO-neg, als Negativkontrolle, untersucht. Einige der Klone zeigen keine oder eine vergleichbar starke Bindung an ADA.C1 und CHO-neg. Insgesamt 25 Klone weisen eine spezifische Reaktivität gegenüber ADA.C1 auf (CD4bs (6): 10 Klone; Mix 1 (9): 8 Klone; Mix 2 (10): 7 Klone) (Abbildung 35). Diese wurden expandiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gelagert, um zu einem späteren Zeitpunkt subkloniert zu werden.

3.6. Untersuchungen mit scF_v-Phagenbibliotheken

Ausgehend von der mRNA aus Lymphozyten der LTNP Patienten wurden von unserem Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Dübel an der Technischen Universität Braunschweig, scF_v-Phagen Bibliotheken erstellt, die zur Isolierung HIV-1 spezifischer scF_v-Phagen dienen. Bisher wurden von zwei Patienten (MH02 und MH03) κ bzw. λ basierende Phagenbanken des vorhandenen IgG bzw. IgM Repertoires erstellt und verpackt. Diese Arbeiten wurden von Michael Hust und Saskia Helmsing durchgeführt.

3.6.1. Biopanning mit scF_v-Phagen

Zur Identifizierung HIV-1 Env spezifischer scF_v-Phagen aus den synthetisierten Phagen-Bibliotheken werden die Bibliotheken auf unterschiedlichen HIV-1 Env Konstrukten selektiert. Die Biopannings erfolgten abwechselnd auf HIV-1 Env und entsprechenden Kontrollen, wodurch eine Anreicherung HIV-1 Env spezifischer scF_v-Phagen erreicht wird.

3.6.1.1. Biopanning mit HIV-1 gp120

Erste Biopannings der erstellten Phagenbanken (IgG und IgM MH02 bzw. MH03) erfolgten mit unterschiedlichen HIV-1 gp120 Monomeren (SF162, BaL, JR-FL) in Multititerplatten (Biopannings A-C). In einem weiteren Biopanning wurden die Monomere im Gemisch eingesetzt und das Biopanning auf tosylaktivierten Beads durchgeführt (Biopanning F).

Vor Beginn der Untersuchung wurde die Bindung der gp120 Monomere mittels FACS Färbung nachgewiesen. Für das geplante Biopanning wurden die gp120 Monomere als Gemisch im Verhältnis 1:1:1 an die Oberfläche gekoppelt. Hierbei zeigte die Bindung der Monomere bei 4°C und einer Inkubation über Nacht (Abbildung 36 hell-grün) eine höhere Effizienz, als eine Kopplung bei 37°C über eine Dauer von zwei Stunden (dunkel-grün). Darüber hinaus wurden die einzelnen gp120 Monomere einzeln in kleinen Testansätzen auf die Oberfläche der Magnetkügelchen gekoppelt. Die FACS-Färbung dieser Ansätze zeigt, dass die gp120 Monomere JR-FL (orange) und SF162 (gelb) deutlich besser an die Oberfläche der Magnetkügelchen gekoppelt wurden als gp120 BaL (rot).

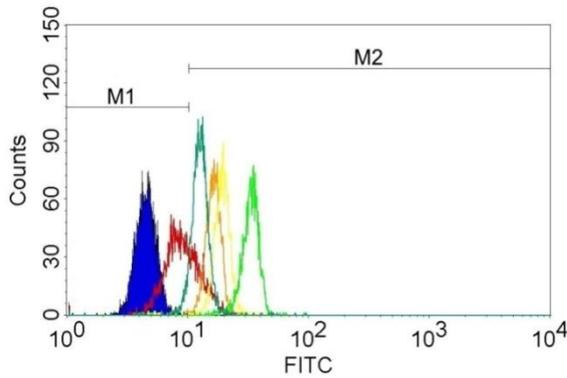


Abbildung 36: FACS Analyse gp120 beschichteter Magnetkügelchen

Die Färbung erfolgte mit HIV-1 positiven Serum und α -Human-FITC Antikörper. BaL (rot), JR-FL (orange), SF162 (gelb), gp120 Mix 4°C (hellgrün), gp120 Mix 37°C (dunkelgrün). Unbeschichtete Beads (blaue Fläche), gp120 beschichtete, α -Human-FITC gefärbte Beads (schwarz). M1: neg. Signale, M2: pos. Signale.

Insgesamt führten die Untersuchungen zur Anreicherung von vier HIV-1 spezifischen scF_v-Phagen aus der IgG abgeleiteten scF_v-Phagen Display Bibliothek von Patient MH03 (Abbildung 38). Die Anreicherung HIV-1 spezifischer scF_v-Phagen aus den übrigen drei Bibliotheken (IgG/IgM MH02 und IgM MH03) schlug fehl. Die Sequenzen der identifizierten Variablen Bereiche (V_H und V_L) dieser Phagen sind in Abbildung 38 dargestellt.

3.6.1.2. Biopanning mit HIV-1 gp140

Da neutralisierende Antikörper oft konformelle Epitope auf der Oberfläche von HIV-1 Env erkennen, wurde ein weiteres Biopanning mit trimeren HIV-1 Env durchgeführt. Hierfür wurde aufgereinigtes HIV-1 Env (ADA.C1 pur.) bzw. eine gleichermaßen prozessierte Negativkontrolle (CHO-neg pur.) an die Oberfläche tosylaktivierter Magnetkügelchen gekoppelt (Biopanning H). Die FACS Analyse der Kopplung zeigt, dass neben den gewünschten Trimeren auch HIV-1 Env Mono- und Dimere auf der Oberfläche gekoppelt wurden. Dies zeigt das schwächere Signal des HIV-1 Env Trimer spezifischen Antikörpers (Abbildung 37; Md-1, grün) im Vergleich zum Signal mit HIV-1 positiven Serum (gelb). Sowohl ungefärbte, als auch α -human FITC gefärbter Magnetkügelchen zeigen nach der

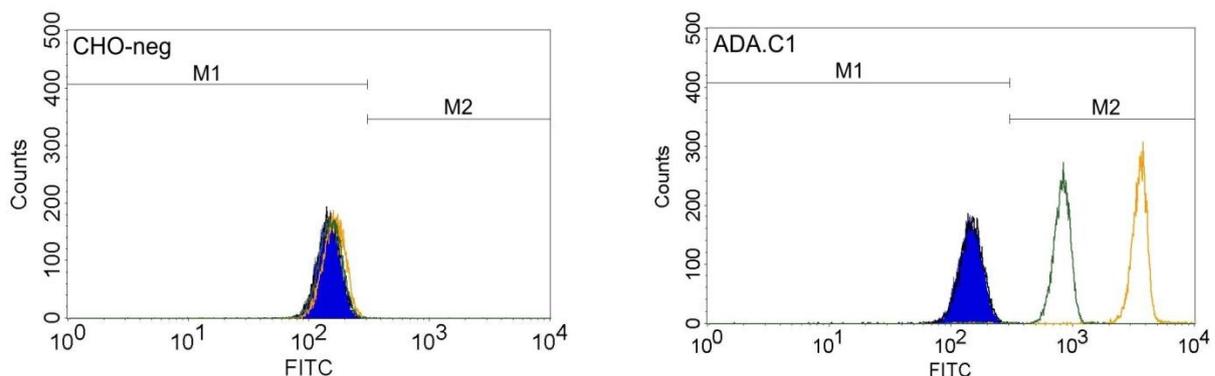


Abbildung 37: FACS Analyse ADA.C1 und CHO-neg beschichteter Magnetkügelchen

Die Färbung erfolgte mit HIV-1 positiven Serum (gelb) bzw. Md-1 (grün) und α -Human-FITC Antikörper. Unbeschichtete Magnetkügelchen (blaue Fläche), nur α -Human-FITC gefärbte Magnetkügelchen (schwarz). M1: neg. Signale, M2: pos. Signale.

3.6.2. Bindungsstudien HIV-1 spezifischer scF_v

3.6.2.1. Bindung von scF_v B8/B10 an verschiedene HIV-1 Env

Mit unterschiedlichen HIV-1 Env gp120 bzw. gp140 Varianten wurde die Bindungskapazität des scF_v B8/B10 untersucht. Alle HIV-1 Env Varianten (gp120 JR-FL, BaL, SF162 und gp140 ADA.C1) werden gebunden. Die deutlich verringerte Reaktivität gegenüber ADA.C1 beruht wohl auf der Heterogenität des Targets. Während die gp120 Proteine (JR-FL, BaL und SF162) hochgradig aufgereinigt sind, liegt ADA.C1 und CHO-neg als Zellkulturüberstand vor. Gegenüber den Kontrollen (CHO-neg; -Target) erfolgt keine Bindung.

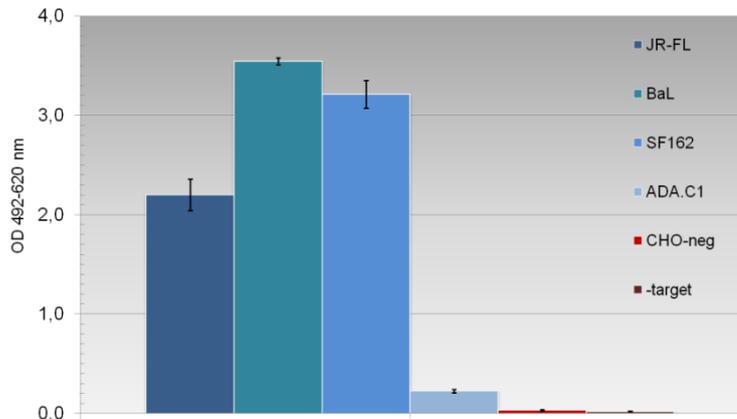


Abbildung 39: Bindung von scF_v B8/B10 an unterschiedliche HIV-1 Env Varianten

ELISA Platten wurden mit HIV-1 gp120 (JR-FL, BaL, SF162) bzw. ADA.C1 beschichtet. Der Nachweis gebundener scF_v Fragmente erfolgte über ihren myc-Tag mit Maus α-myc- und α-Maus-HRP Antikörper (je 1:5.000).

3.6.2.2. Konkurrenz der Bindung von scF_v B8/B10

Um die Spezifität des scF_v B8/B10 zu überprüfen, wurde die Bindung an HIV-1 gp120 durch Serumzugabe inhibiert. Neben dem Serum von LTNP MH03, sind auch die Seren von LTNP MH02 und V43.135 (normaler HIV-1 Patient) in der Lage, die Bindung des scF_v zu inhibieren. Dass es sich hierbei um eine Antikörperbasierte Verdrängung der scF_v Bindung handelt zeigt die Kontrolle mit HIV-1 negativem Serum, dessen Zugabe nicht

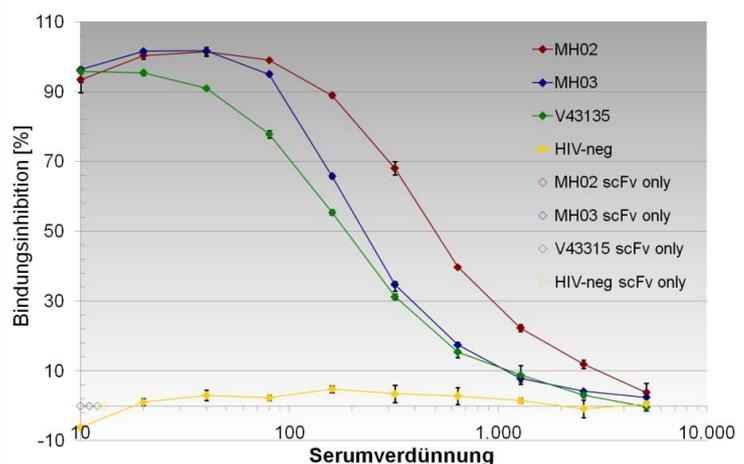


Abbildung 40: Konkurrenz der scF_v B8/B10 Bindung an gp120 durch HIV-1 positives Serum

Die Bindung des scF_v B8/B10 an gp120 (SF162) beschichtete ELISA-Platten wurde durch Serumzugabe inhibiert. Der Nachweis gebundener scF_v erfolgte über ihren myc-Tag mit Maus α-myc- und α-Maus-HRP Antikörper (je 1:5.000).

zu einer Verminderung der scF_v Bindung führt. Die Verringerung der scF_v Bindung erfolgt somit durch Serumantikörper deren Epitope mit dem Epitop des scF_v B8/B10 überlappen oder übereinstimmen (Abbildung 40).

3.6.2.3. Epitopmapping des scF_v B8/B10

Mit Hilfe eines Peptid-ELISAs wurde das Epitop des scF_v B8/B10 näher charakterisiert. Für das Mapping wurden zunächst 15mer Peptide der Variablen Schleife V3 eingesetzt (Tabelle 15). ScF_v B8/B10 reagiert ausschließlich mit Peptid Nr.5 von HIV-1 Consensus B (NNTRKSIHIGPGRAF) (Abbildung 41). Gegenüber den entsprechenden Peptiden von HIV-1 Consensus M (NNNTRKSIRIGPGQA), HIV-1

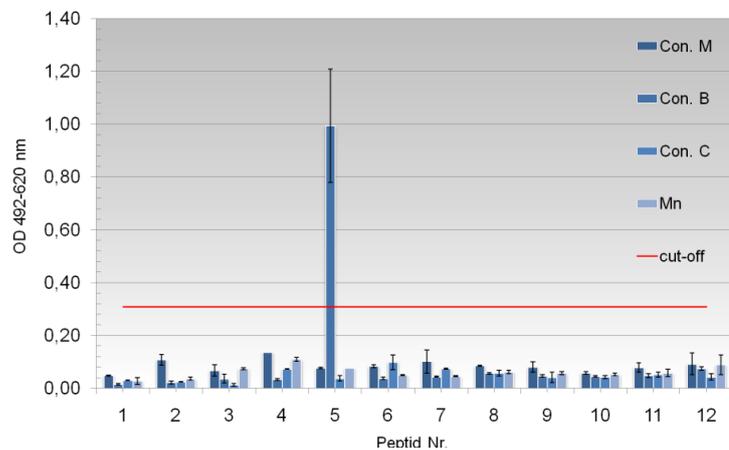


Abbildung 41: Epitopmapping von scF_v B8/B10

ELISA Platten wurden mit 15mer Peptide der Variablen Schleife 3 verschiedener HIV-1 Consensussequenzen (M, B und C) und von HIV-1 Mn beschichtet. Die Peptide überlappen um je vier Aminosäuren (Tabelle 15).

Consensus C (NNNTRKSIRIGPGQT) und HIV-1 Mn (NYNKRKRIHIGPGRA) besitzt der scF_v B8/B10 keine Bindungsaktivität. Diese extrem eingeschränkte Reaktivität weist auf ein äußerst sequenzspezifisches Epitop hin. Peptid Nr. 5 von HIV-1 Consensus B ist verglichen mit den entsprechenden Peptiden der anderen Consensussequenzen (M und C), sowie HIV-1 Mn um eine Aminosäure verschoben. Neben dieser Verschiebung unterscheiden sich die Peptide von Consensus B, M und C nur an zwei bzw. drei Stellen im C-terminalen Bereich (Histidin zu Arginin und Arginin zu Glutamin, bzw. Alanin zu Thymin). Verglichen mit Peptid Nr.5 von HIV-1 Mn unterscheidet sich Peptid Nr.5 von HIV-1 Consensus B an drei Positionen im N-terminalen Bereich (Asparagin zu Tyrosin, Threonin zu Lysin, Serin zu Histidin).

Tabelle 15: Sequenzen der 15mer Peptide zum Epitopmapping von scF_v B8/B10

Nr.	Consensus M	Consensus B	Consensus C	HIV-1 Mn
1	IIVQLNESVEINCTR	IVQLNESVEINCTR ^P	IIVHLNESVEIVCTR	IIVHLNESVQINCTR
2	LNESVEINCTRPN ^{NN}	NESVEINCTRPN ^{NN} T	LNESVEIVCTRPN ^{NN}	LNESVQINCTRPN ^{NY} N
3	VEINCTRPN ^{NN} NTRKS	EINCTRPN ^{NN} NTRKSI	VEIVCTRPN ^{NN} NTRKS	VQINCTRPN ^{NY} NKRKR
4	CTRP ^{NN} NTRKSI ^{RIG}	TRP ^{NN} NTRKSI ^{HIGP}	CTRP ^{NN} NTRKSI ^{RIG}	CTRP ^{NY} NKRKRI ^{HIG}
5	NNNTRKSI ^{RIGPGQA}	NNTRKSI^{HIGP}GRA^F	NNNTRKSI ^{RIGPGQT}	NYNKRKR^{RI}HIGP^{GRA}
6	RKSIRIGPGQAFYAT	KSIHIGPGRAFYTTG	RKSIRIGPGQTFYAT	RKRIHIGPGRAFYTT
7	RIGPGQAFYATGDII	IGPGRAFYTTGEIIG	RIGPGQTFYATGDII	HIGPGRAFYTTKNII
8	GQAFYATGDIIGDIR	RAFYTTGEIIGDIRQ	GQTFYATGDIIGDIR	GRAFYTTKNIIGTIR
9	YATGDIIGDIRQAHC	TTGEIIGDIRQAHC ^N	YATGDIIGDIRQAHC	YTTKNIIGTIRQAHC
10	DIIGDIRQAHC ^{NISG}	IIGDIRQAHC ^{NISRA}	DIIGDIRQAHC ^{NISE}	NIIGTIRQAHC ^{NISR}
11	DIRQAHC ^{NISG} TKWN	IRQAHC ^{NISRA} KWNN	DIRQAHC ^{NISE} EKWN	TIRQAHC ^{NISRA} KWN
12	AHC ^{NISG} TKWN ^{KT} LQ	HC ^{NISRA} KWNN ^{TL} KQ	AHC ^{NISE} EKWN ^{KT} LQ	AHC ^{NISRA} KWNN ^{TL} LR

Aminosäuren der Variablen Schleifen 3 (schwarz), Aminosäuren außerhalb V3 (grün), im Text beschriebene Aminosäuren (rot).

3.6.2.4. Genetische Analyse der isolierten HIV-1 spezifischen scF_v

Ausgehend von den Aminosäuresequenzen der identifizierten scF_v wurde mit Hilfe von VBASE2 eine genetische Analyse durchgeführt. Im Einklang mit der hohen Sequenzhomologie der vier identifizierten scF_v, weist auch die genetische Analyse ein hohes Maß an Gemeinsamkeiten auf. So ergibt sowohl die Analyse mit VBASE2 für alle V-D-J-Gene der vier identifizierten scF_v, mit Ausnahme des J-Gens der leichten Kette von scF_v E2/F3, eine hundertprozentige Übereinstimmung (Tabelle 16). Die in den Sequenzen vorhandenen Mutationen scheinen zum großen Teil die Folge somatischer Hypermutationen zu sein.

Tabelle 16: Genetische Analyse der isolierten HIV-1 spezifischen scF_v Fragmente

Name	VBASE2			IMGT		
	V-Gen	D-Gen	J-Gen	V-Gen	D-Gen	J-Gen
A1/A8	IGLV104		M15642 IGLJ3*01 / M15641 IGLJ2*01	IGLV3-1*01		IGLJ3*01 / IGLJ2*01
	IGHV217	X97051 IGHD4-17*01	X86355 IGHJ3*02 / J00256 IGHJ3*01	IGHJ3*02 / IGHJ3*01	IGHV5-51*01	X97051 IGHD4-17*01
B8/B10	IGLV104		M15642 IGLJ3*01 / M15641 IGLJ2*01	IGLV3-1*01		IGLJ3*01 / IGLJ2*01
	IGHV217	X97051 IGHD4-17*01	X86355 IGHJ3*02 / J00256 IGHJ3*01	IGHJ3*02 / IGHJ3*01	IGHV5-51*01	X97051 IGHD4-17*01
E2/F3	IGLV104		X04457 IGLJ1*01	IGLV3-1*01		IGLJ1*01
	IGHV217	X97051 IGHD4-17*01	X86355 IGHJ3*02 / J00256 IGHJ3*01	IGHJ3*02 / IGHJ3*01	IGHV5-51*01	X97051 IGHD4-17*01
F1/F5	IGLV104		M15642 IGLJ3*01 / M15641 IGLJ2*01	IGLV3-1*01		IGLJ3*01 / IGLJ2*01
	IGHV217	X97051 IGHD4-17*01	X86355 IGHJ3*02 / J00256 IGHJ3*01	IGHJ3*02 / IGHJ3*01	IGHV5-51*01	X97051 IGHD4-17*01

Liefen verschiedene VDJ-Gene die gleiche Trefferquote in der Analyse mit VBASE2, sind beide potenzielle Gene angegeben. Bei der Analyse greift VBASE2 auch auf die Datenbank IMGT zu und gibt die Ergebnisse dieser Analyse an.

4. Diskussion

Der klinische Verlauf einer HIV-1 Infektion ist von Person zu Person unterschiedlich und ergibt sich aus einem konzertierten Zusammenspiel genetischer, virologischer und immunologischer Faktoren. Dieses bestimmt das Ausmaß der viralen Replikation und so den Verfall des Immunsystems sowie das Auftreten opportunistischer Infektionen. Hierbei dient die Viruslast nach der ersten Immunantwort auf die Primärinfektion als prognostischer Marker, weil sie umgekehrt proportional zur Länge der Asymptomatischen Phase ist²¹⁴. Im Gegensatz zu normal-progredierenden HIV-1 Infizierten, zeichnen sich einige Patienten durch eine relativ konstant geringe Viruslast und hohe CD4⁺-Zellzahl über einen ungewöhnlich langen Zeitraum aus. In Folge dieser besonderen Charakteristika bleibt eine Progression der Infektion und somit evtl. opportunistische Infektionen aus. Bemerkenswert hierbei ist die Tatsache, dass diese Patienten keinerlei antivirale Therapie erhalten. In den letzten Jahren wurden mehrere genetische, virologische und immunologische Aspekte, die mit einer solchen nicht-progredierenden Infektion korrelieren, identifiziert und teilweise eingehender untersucht. Hierzu zählen genetische Prädispositionen wie die 32bp Deletion in *ccr5* (*ccr5Δ32*), einige HLA-B Genotypen und die damit verbundene zytotoxische T-Zellimmunantwort, die humorale Immunantwort, virusgenetische Polymorphismen sowie das Fehlen pathogener HIV-1 Viren im Verlauf der Infektion^{45,252,259,289,303,370}. Aufgrund des komplexen Wechselspiels dieser Faktoren ist die Bedeutung der einzelnen Aspekte für die Immunantwort und den ungewöhnlichen Infektionsverlauf weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen. Anhand eines kleinen, aber gut charakterisierten LTNP-Kollektivs soll im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung dieser Aspekte analysiert werden.

4.1. Genetische Untersuchungen

4.1.1. Klinische Daten der untersuchten Patienten

Grundlage dieser Studie ist eine Gruppe von acht LNTP sowie eine Gruppe von HIV-1 Kontrollpatienten. Sieben der LNTP (MH01-MH07) sowie alle HIV-1 Kontrollpatienten sind mit einem HIV-1 Virus vom Subtyp B infiziert. Bei LNTP MH08 erfolgte die Infektion mit einem Subtyp C Isolat. Die Infektion der LNTP Patienten erfolgte vor mindestens 17 Jahren. Sieben der LNTP (MH01-MH07) weisen über den gesamten Infektionsverlauf eine normale CD4⁺-Zellzahl und eine geringe virale Last auf, was sie als LNTP charakterisiert. Die untersuchte Blutprobe von MH08 besitzt eine leicht verringerte CD4⁺-Zellzahl sowie eine geringfügig erhöhte Viruslast (19.000 Kopien/ml). Gegen Ende 2006 verschlechterten sich die klinischen Marker dieses Patienten weiter, so dass eine antivirale Therapie initiiert wurde. Streng genommen gehört MH08 somit zur Gruppe der Langsam-Progredierenden (SP), der

Übergang zwischen den einzelnen Untergruppen verläuft jedoch fließend (Tabelle 3; 6.1 unten). Die Gruppe der HIV-1 Kontrollpatienten wurde gezielt aufgrund ihrer klinischen Daten ausgewählt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sowohl die Zahl der CD4⁺-Zellen (p-Wert = 0,5705) als auch die Viruslast (p-Wert = 0,3717) mit den Werten der LTNP-Gruppe vergleichbar ist. Diese Auswahl ermöglicht einen aussagekräftigen Vergleich der Beteiligung immunologischer Faktoren beider Patientengruppen an der Kontrolle der Virämie. Die gezielte Auswahl der HIV-1 Kontrollpatienten stellt einen wichtigen Unterschied zu einer Vielzahl veröffentlichter Studien mit LTNP dar, in denen die Patienten der Kontrollgruppen über einen vergleichbaren Zeitraum infiziert sind, jedoch völlig unterschiedliche klinische Marker aufweisen, was eine aussagekräftigen Vergleich immunologischer Faktoren beeinflusst^{8,40,259,359}. Bei den Serumproben der Patienten S6 und S19 handelt es sich um Proben während, bei Patient P10 um eine Probe unmittelbar vor einer antiviralen Therapie. Die Serumproben der Patienten A6N3, H0E6, P5T5 und S3R8 wurden in den frühen Jahren der Infektion während der normalen, symptomfreien Phase gewonnen. Bei diesen Patienten ist der weitere Infektionsverlauf nicht bekannt, mit einer Wahrscheinlichkeit von 81,5% (bei der Annahme, dass 5% aller HIV-1 Infizierten zur Gruppe der LTNP gehören) handelt es sich jedoch bei all diesen Patienten nicht um LTNP (Tabelle 3).

4.1.2. Analyse der HIV-1 Gene *env*, *nef*, *ref*, *tat*, *vpr*

Innerhalb der letzten Jahre wurden in mehreren HIV-1 Genen Mutationen identifiziert, die mehr oder minder mit einer verlangsamten oder nicht-progredierenden Infektion zu korrelieren scheinen^{202,225,331,340,343,359}. Aufgrund ihrer zentralen Stellung im Verlauf der Infektion sind hierbei die viralen Hüllproteine gp41 und gp120 von herausragendem Interesse. Aus diesem Grund stellt Env den Schwerpunkt dieser Untersuchungen dar. Neben den Hüllproteinen, wurden auch die Hilfs- und akzessorischen Proteine (Nef, Rev, Tat, Vpr und Vif) auf LTNP-assoziierte Polymorphismen oder Defekte hin untersucht. Hierbei stammt die am besten untersuchte LTNP Kohorte mit Deletionen in diesen Proteinen aus Australien. Die Patienten dieser Kohorte wurden über ein kontaminiertes Blutprodukt mit dem gleichen Nef-deletierten Isolat infiziert und eingehend untersucht^{59,60,74,186}.

Die Sequenzanalyse von Env zeigt für jeden der analysierten Patienten einen funktionellen Leserahmen auf. Bis auf eine Mutation in der sekundären Proteaseschnittstelle in Env von MH08 ((K/R)500D) sind alle funktionell wichtigen Elemente vollständig konserviert (Tabelle 5; 6.2 unten). Da für die Spaltung des Vorläuferproteins gp160 eine funktionelle, primäre Schnittstelle ausreicht und die Gruppe um Valerie Bosch zeigen konnte, dass eine einzelne Mutation in der sekundären Schnittstelle keinen Effekt auf die Prozessierung besitzt, kann diese Mutation vernachlässigt werden²⁹. Die an der

CD4-Rezeptor- bzw. Corezeptorbindung beteiligten Aminosäuren sind ebenfalls weitestgehend konserviert oder weisen in beiden Patientengruppen identische Mutationen auf.

Die Variationen der einzelnen Sequenzen konzentrieren sich erwartungsgemäß auf die Bereiche V1 bis V5, die, neben Punktmutationen, zahlreiche Längenpolymorphismen aufweisen (6.2 unten). Eine Längenanalyse der Variablen Schleifen im Vergleich mit einer Gruppe Labor-adaptierter HIV-1 Isolate zeigt, dass eine bis drei der Variablen Schleifen in den Sequenzen der LTNP MH01, 02, 04, 06 und 08 verlängert sind. Die Sequenzen der HIV-1 Kontrollpatienten zeigen hingegen, bis auf eine verlängerte V1 Schleife in Patient S3R8, keine Längenpolymorphismen (Tabelle 5). Der Schwerpunkt der Längenpolymorphismen liegt in beiden Patientengruppen im zusammenhängenden Bereich V1/V2 (Mittelwert_{LTNP}: 78,0; Mittelwert_{HIV-1 Kontrollpatienten}: 71,2; Mittelwert_{Labor-adaptierte Stämme}: 66,4). Während sich die Gruppe der HIV-1 Kontrollpatienten in der V1/V2-Länge signifikant von der Gruppe der Labor-adaptierten Isolate unterscheidet (p-Wert: 0,044), verfehlt die Gruppe der LTNP das Signifikanzniveau nur knapp (p-Wert: 0,057). Ursache hierfür dürfte die hohe Varianz in der LTNP-Gruppe sein, die sich aufgrund der geringen Probenzahl stark auf die Signifikanzanalyse auswirkt (Abbildung 19). Dennoch wird ein klarer Trend in der Länge des V1/V2 Bereichs zwischen den Gruppen ersichtlich: LTNP > HIV-1 Kontrollpatienten > Labor-adaptierte Isolate. Bereits in früheren Studien wurden Insertionen in V1/V2 mit einer verlangsamten Progression korreliert^{210,310,344}. Als Ursache wird der Selektionsdruck der humoralen Immunantwort aufgeführt. Beim Versuch diesem zu entrinnen, kommt es, neben Punktmutationen und Mutationen im Glykosylierungsmuster, zu den beschriebenen Längenpolymorphismen im Bereich von V1/V2^{260,288}. Aufgrund ihrer Positionierung in der Nähe der Corezeptorbindungsstelle handelt es sich bei den Variablen Schleifen V1/V2 um einen wichtigen Immunregulator, wodurch sich Variationen in ihrer Sequenz, Länge oder Glykosylierung auf die Neutralisationssensitivität, den Tropismus und den Infektionsverlauf auswirken^{57,167,203,245,288}. Interessant sind hierbei die Ergebnisse von Masciotra *et al.*, die einen Zusammenhang zwischen Insertionen in V1/V2 und dem viralen Tropismus aufzeigen. Der Studie nach führen die Insertionen zur Selektion von R5-tropen Viren und verhindern somit die Entstehung X4 bzw. R5X4-troper Isolate und die damit verbundene Progression²¹⁰.

Einen weiteren Schutzmechanismus, dessen sich das Virus bedient, stellt das gut untersuchte und umfassend beschriebene Zuckerschild von HIV-1 Env dar. Durch die Akkumulation von N-Glykosylierungen auf der Oberfläche der Hüllproteine wird die Antikörperbindung an die maskierten Bereiche der Oberflächenproteine verhindert^{54,70,166,203,272}. Bei den von uns untersuchten Env konnten nur geringe Änderungen in der Zahl potenzieller N-Glykosylierungsstellen nachgewiesen werden (Mittelwert_{LTNP}: 30,4; Mittelwert_{HIV-1 Kontrollpatienten}: 29,8; Mittelwert_{Labor-adaptierte Stämme}: 29,2). Wenngleich die durchschnittliche Anzahl an

N-Glykosylierungsstellen der einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufweisen, können bereits einzelne N-Glykosylierungsstellen den viralen Phänotyp variieren^{167,203,213,245,264}. Eine Studie von Connor *et al.* mit sechs LTNP identifizierte funktionelle *env* Gene in allen untersuchten LTNP. In Experimenten mit HIV-1 Env-rekombinanten Reporterviren dieser LTNP zeigen jedoch teilweise gravierende, funktionelle Defekte, die für ein Nicht-Progressieren dieser Patienten verantwortlich sein könnten⁶⁵. Welchen Einfluss die hier identifizierten N-Glykosylierungsmuster auf den Phänotyp der einzelnen Viren haben, wird in den Analysen der HIV-1 Env-rekombinanten Reporterviren beschrieben (4.2 unten).

Die Analyse der Nef Proteinsequenzen weist auf ein funktionelles Nef in den Viren der LTNP hin. Funktionell wichtige Motive sind vollständig konserviert (Myristoylierungsstelle, Poly-Prolin-Helix, CD4 Bindungsstelle, PAK Bindungsstelle und Phosphorylierungsstelle) oder weisen nur minimale Mutationen auf (Arginin Cluster, Saurer Cluster, β -COP-Bindungsstelle und V1H Bindungsdomäne). Die für die Dimerisierung von Nef essentielle Aminosäure D123 ist ebenfalls in allen Sequenzen vorhanden (Abbildung 21)^{187,196}. Dies deutet auf eine produktive Expression und vollständige Funktionalität von Nef hin, was sich mit mehreren Studien, die ebenso keine funktionellen Unterschiede bzw. LTNP-korrelierte Polymorphismen in Nef aufzeigen konnten, deckt^{53,146,147,216,340}. Andere Studien hingegen postulieren LTNP-korrelierte Mutationen in Nef und damit verbundene Effekte auf den Infektionsverlauf^{47,68,164,205,266,331}. Der Vergleich der LTNP Nef Sequenzen mit einem HIV-1 Subtyp B Referenz-Set führte zur Identifikation mehrerer Sequenzmuster. In Folge der geringen Probenzahl ist die Aussagekraft der Daten jedoch limitiert. So stimmen viele als LTNP-spezifisch identifizierten Mutationen mit der aktuellen oder ehem. Konsensussequenz von HIV-1 Subtyp B überein und lediglich zwei der identifizierten Sequenzmuster (V11D und G12R) entsprechen nicht dem Konsensus von HIV-1 Subtyp B. Diese liegen jedoch in einem variablen Bereich von Nef und wurden bisher nicht in der Literatur beschrieben (Tabelle 6). In einer vergleichbaren Studie korrelieren Kirchhoff *et al.* mehrere potentielle Sequenzmuster mit einem progredierenden bzw. nicht-progredierenden Krankheitsverlauf¹⁶⁴. Einige dieser Muster wurden auch von uns detektiert, entsprechen jedoch der Konsensussequenz und decken sich teilweise nicht in ihrer vermeintlichen Bedeutung mit unseren Ergebnissen. So korrelieren Kirchhoff *et al.* die Mutation A15 mit einer Progression und T15 mit dem LTNP-Status, während unsere Analyse die umgekehrte Zuordnung ergibt. Dies lässt erkennen, wie schwer eine detaillierte Aussage über die Bedeutung einzelner Sequenzmuster auf den Phänotyp von Nef ist. Ohne funktionelle Analyse der Mutationen scheint eine fundierte Aussage über die Bedeutung der identifizierten Sequenzmuster nahezu unmöglich. Am eindrucksvollsten wird die potenzielle Bedeutung von Nef für die Pathogenität der Viren durch eine Studie mit Nef verschiedener SIV bzw. HIV-1 Isolate

aufgezeigt. Während Nef nicht-pathogener SIV-Isolate in der Lage ist, die Immunantwort des infizierten Wirts unter Kontrolle zu halten und so hilft eine persistente, nicht-progredierende Infektion zu gewährleisten, ist HIV-1 Nef und seine phylogenetisch nächsten Verwandten dazu außerstande. Vielmehr kommt es hier durch die unkontrollierte virale Replikation zu einer chronischen, pathogenen Infektion und letztendlich zum Zusammenbruch des Immunsystems²⁹⁹. Wenngleich der Großteil der HIV-1 Nef diese Charakteristika aufweisen, konnten jedoch einige Isolate mit einer verminderten Nef-vermittelten Pathogenität identifiziert werden^{236,267}. Der genaue Beitrag von Nef zur verminderten Pathogenität und dem Ausbleiben einer Progression, ist jedoch weiterhin ungeklärt und Gegenstand mehrerer Studien^{68,146}. Dies zeigt die Komplexität des Wechselspiels zwischen Nef und dem Immunsystem sowie die Schwierigkeiten einer detaillierten Analyse dieser Interaktion (siehe 4.1.3).

Die Analyse der Rev Proteinsequenzen zeigt, neben einem offenen Leserahmen in allen Sequenzen, dass sowohl funktionell wichtige Domänen (Hoch-affine Bindungsstelle bzw. Leucin-reiche Effektor-domäne) als auch essentielle Aminosäuren (L12, V16, L60) vollständig konserviert sind (Abbildung 22). Bei den identifizierten Sequenzmustern handelt es sich, bis auf eine Ausnahme, um die aktuelle bzw. ehemalige Konsensussequenz von HIV-1 Subtyp B (Tabelle 7). Das verbleibende Sequenzmuster (I55L) ist zum einen schwach ausgeprägt, zum anderen handelt es sich um eine konservative Mutation. Eine nicht-progredierende Infektion als Folge dieser Polymorphismen erscheint somit unwahrscheinlich. Die in der Literatur beschriebene LTNP-assoziierte Mutation (L78I) liegt nur in LTNP MH08 vor, wobei es sich hier um die Konsensussequenz von HIV-1 Subtyp C handelt¹⁵⁴. Mehrere Untersuchungen viraler Gene weisen ebenfalls darauf hin, dass eine nicht-progredierende Infektion nicht durch Mutationen in Rev erklärt werden kann^{3,359}.

Die Sequenzen von Tat zeigten ebenfalls keine Besonderheiten, die ein Ausbleiben der Progression in einem der LTNP eindeutig begründen würden. Wenngleich einige der Sequenzen ein vorzeitiges Stopcodon besitzen, so sind die zur Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke notwendigen Cysteine, sowie die Kernlokalisierungssequenz (NLS) vollständig konserviert. Weil für die Funktionalität von Tat lediglich das erste Exon notwendig ist, sind die detektierten N-terminalen Verkürzungen ohne Bedeutung. Dies zeigt sich auch daran, dass HxB2R ebenfalls ein vorzeitiges Stopcodon aufweist (Abbildung 23). Im Sequenzvergleich wurden neun Sequenzmuster identifiziert, wovon sechs Polymorphismen der Konsensussequenz von HIV-1 Subtyp B entsprechen oder im zweiten Exon liegen. In einer Studie von Jennings *et al.* über Tat Proteine unterschiedlicher HIV-1 Isolate, wurden mehrere Mutationen mit einer verringerten Tat Aktivität korreliert, die auch von uns als Sequenzmuster identifiziert wurden¹⁵⁷. Drei dieser Polymorphismen entsprechen allerdings der aktuellen bzw. ehemaligen Konsensussequenz von HIV-1 Sub-

typ B. Eine weiterer Polymorphismus (A58T) stimmt wiederum mit der Konsensussequenz zahlreicher anderer HIV-1 Subtypen überein (Tabelle 8). Ebenfalls von Jennings *et al.* beschrieben wird der Polymorphismus N24T. Einen Einfluss auf die Funktion von Tat schließt diese Studie jedoch aus.

Funktionelle Leserahmen und vollständig konservierte funktionelle Domänen (Oligomerisierungsbereich, amphipatische α -Helix, NLS und H(S/F)RIG-Motive) sind auch in den Vpr Sequenzen zu finden (Abbildung 24). Der Vergleich beider Sequenzgruppen führte zur Identifikation von vier Sequenzmuster, wobei der Polymorphismen (R77Q) bereits beschriebenen und mit einer nicht-progredierenden Infektion in Verbindung gebracht wurde^{202,225}. Fünf der LTNP Patienten sowie ein HIV-1 Kontrollpatient weisen diese Mutation auf. Gegen eine Bedeutung dieser Mutation für den Infektionsverlauf sprechen die Tatsache, dass Q77 der Konsensussequenz von HIV-1 Subtyp B entspricht und in 65% der Vpr Sequenzen der Los Alamos HIV-1 Sequenzdatenbank vorliegt, sowie die Ergebnisse mehrerer Studien (Tabelle 9)^{58,93}. Die übrigen drei Polymorphismen entsprechen entweder der HIV-1 Subtyp B Konsensussequenz oder sind mehrfach in der Los Alamos HIV-1 Sequenzdatenbank vertreten¹⁸⁷. Eine evtl. Bedeutung dieser Mutation kann allerdings erst durch funktionelle Untersuchungen entsprechender Vpr-Mutanten ermittelt werden. Eine bereits beschriebene Q3R Mutation, die eine verringerte Zytopathogenität zur Folge hat, ist in zwei der hier untersuchten LTNP Patienten vorhanden³¹⁸. Diese soll mit einer höheren CD4⁺-Zellzahl im Blut der Patienten einhergehen und so ein Nicht-Progredieren begünstigen.

In der Summe deuten sowohl unsere eigenen, als auch die Untersuchungen anderer Gruppen darauf hin, dass Mutationen viraler Gene bestenfalls einen limitierten Einfluss auf den Infektionsverlauf der hier untersuchten LTNP besitzen^{3,359}. Dieser Effekt ist umso größer, je höher der durch die Mutation hervorgerufene Fitnessverlust ist. Am deutlichsten wird dieser Zusammenhang am Beispiel nicht-progredierender HIV-1 Infizierter, die mit einem attenuierten Virus infiziert sind. Hierbei handelt es sich jedoch in der Regel um größere Mutationen (Deletionen oder Insertionen), die nicht durch eine einfache Reversion behoben werden können^{3,74,168}. Die von uns untersuchten viralen Proteine weisen hingegen meist nur einfache Punktmutationen auf. Da es bei hoher viraler Last in einem Patienten täglich zur Ausbildung jedes erdenklichen Polymorphismus im viralen Genom kommt, erscheint es unwahrscheinlich das die hier identifizierten ‚LTNP-spezifischen‘ Sequenzmuster *per se* die Ursache einer nicht-progredierenden Infektion sind⁷. Wären die von uns identifizierten Mutationen mit einem entsprechenden Fitnessverlust korreliert, würde es innerhalb kürzester Zeit zur Entstehung von Reversionsmutanten kommen⁵. Vielmehr ist davon auszugehen, dass es sich bei den identifizierten ‚LTNP-spezifischen‘ Polymorphismen um Fluchtmutanten in Folge des humoralen oder zellulären Selektionsdrucks zu

handeln. Ihre Existenz deutet darauf hin, dass verschiedene Mutationen mit einem unterschiedlich großen Verlust an Infektiosität, Replikationseffizienz oder Pathogenität korrelieren. Bei ‚LTNP-spezifischen‘ Mutationen scheint dieser ungewöhnlich groß zu sein und nur schwer oder teilweise gar nicht durch Folgemutationen ausgeglichen werden zu können. Das Virus steht somit vor der Wahl durch das Immunsystem detektiert und eliminiert zu werden, oder einen gravierenden Teil seiner Funktionalität einzubüßen. Die Fluchtmutante stellt somit einen Kompromiss aus Resistenzgewinn und Fitnessverlust dar^{3,91,198,301,316}. Gelingt es dem Virus der Immunantwort zu enttrinnen, ohne dabei einen gravierenden Fitnessverlust zu erleiden oder diesen durch zusätzliche Mutationen zu kompensieren, kann dies zur Progression der Infektion führen^{12,28,122}. Ist die Immunantwort umgekehrt gegen mehrere Epitope, deren Mutation einen deutlichen Fitnessverlust zur Folge hätte, gerichtet, kann die Progression trotz Mutationen in einigen dieser Epitope unterdrückt oder zumindest verlangsamt werden^{9,76}. Die Identifikation und Untersuchung ‚LTNP-spezifischer‘ Mutationen kann somit helfen das Wechselspiel zwischen Virus und Immunsystem zu verstehen und aufzuzeigen, welche Epitope in Folge einer Vakzinierung detektiert werden sollten, um einen möglichst umfassenden Schutz zu erzielen^{13,188,189,198,301,326}.

4.1.3. *ccr5* Genotyp und HLA-B Typisierung

Zwei der bedeutendsten wirtsgenetischen Modulatoren der Progression sind der *ccr5*-Genotyp sowie die HLA-B Genotypen. Hierbei ist die 32bp Deletion in *ccr5* (*ccr5*Δ32) der am besten beschriebene LTNP-korrelierte wirtsgenetische Faktor. Bereits der heterozygote Genotyp führt zu einer partiellen Resistenz gegenüber HIV-1 und wurde mit einer nicht-progredierenden Infektion in Verbindung gebracht^{75,124,204,322}. Die Ergebnisse neuerer Studien legen nahe, dass der *ccr5*Δ32bp Genotyp für sich alleine nicht für das Ausbleiben einer Progression verantwortlich ist, sondern weitere Determinanten notwendig sind^{212,233}. Die Analyse der *ccr5* Gene der hier untersuchten LTNP Patienten ergab, dass alle homozygot für den Wildtyp von *ccr5* sind (Tabelle 4). Eine nicht-progredierende Infektion in Folge dieses Genotyps kann somit vollständig ausgeschlossen werden. Zwei weitere, oftmals im Zusammenhang mit *ccr5*Δ32 diskutierten genetischen Marker (*ccr2*-64I und SDF1-3'A) wurden aus diesem Grund nicht von uns untersucht, weil sie nur bei Patienten mit einem *ccr5*Δ32/*ccr5* Genotyp einen Einfluss auf den Infektionsverlauf nehmen und somit für die von uns untersuchten Patienten ohne Bedeutung sind^{132,212,217}.

Einen entscheidenden Einfluss auf die Progression einer HIV-1 Infektion besitzen auch die HLA-Allele. Diese sind durch die Ausbildung der MHC-Komplexe für die Präsentation körpereigener und körperfremder Peptide auf der Zelloberfläche und somit für die zelluläre Immunantwort von zentraler Bedeutung. Mehrere Untersuchungen zeigen, dass die

genetische Prädisposition der HLA-Typen mit einem unterschiedlichen Verlauf der HIV-1 Infektion korreliert. Hierbei gibt es sowohl Genotypen die eine Progression begünstigen, als auch solche die den Infektionsverlauf verlangsamen^{27,110,131,204,220}. Die Typisierung der HLA-B Genotypen identifizierte die HLA-Typen B*5701 und B*27 je einmal in LNTP MH03 bzw. MH06, sowie B*14 in MH04 und MH07 (Tabelle 4). Diese HLA-Typen wurden in mehreren Studien mit einem verlangsamteten Infektionsverlauf in Verbindung gebracht, wobei die Bedeutung des HLA-Typs B*14 nicht eindeutig geklärt zu sein scheint. Ebenso stellt eine neuere Untersuchung die Bedeutung des HLA-Typs B*27 in Frage^{77,131,204,220,342}. So zeigte die Analyse der zellulären Immunantwort der LNTP, trotz der identifizierten HLA-Typen, eine vergleichbare Reaktivität wie die von HIV-1 Progressoren²⁸¹. Lässt dies einen entscheidenden Beitrag der zellulären Immunantwort zum LNTP-Status unserer Patienten auch unwahrscheinlich aussehen, gilt es jedoch zu bedenken, dass neueren Studien zufolge nicht die Stärke der zellulären Immunantwort sondern deren Qualität von entscheidender Bedeutung ist¹⁷. Diese wurde in der Analyse der zellulären Immunantwort unserer LNTP allerdings nicht untersucht, da diese zu einem früheren Zeitpunkt erfolgte. Der genaue Einfluss der identifizierten HLA-Typen auf den Infektionsverlauf bleibt somit unbeantwortet und müsste durch weitere Analysen eingehender untersucht werden.

Anhand der hier gewonnenen Erkenntnisse und der Resultate zahlreicher Studien zeigt sich der mögliche Einfluss verschiedener Wirts-genetischer Prädispositionen auf den Infektionsverlauf. Das Vorliegen einzelner genetischer Prädispositionen stellt jedoch keine Garantie für eine Nicht-Progression dar. Beispiele hierfür sind HIV-1 Infizierte die trotz *ccr5Δ32* Genotyp oder protektiver HLA-Allele einen normalen Infektionsverlauf aufweisen. Erst das Zusammenspiel mehrerer genetischer Marker wirkt sich entsprechend auf den Infektionsverlauf aus^{204,233}. Das Potenzial sowie die Grenzen dieses genetischen Einflusses zeigen Studien HIV-1 infizierter Zwillinge oder Kohorten mit gleichem Infektionsursprung. Dabei zeigen Untersuchungen HIV-1 infizierter, monozygoter Zwillinge von Draenert *et al.*, dass die Viren der Zwillinge einen ähnlichen Infektionsverlauf verursachen und auf den gleichen genetischen und humoralen Druck mit vergleichbaren Fluchtmutanten reagieren. Hutto *et al.* konnten wiederum zeigen, dass Unterschiede im Infektionsverlauf von Zwillingen unter anderem auf die An- bzw. Abwesenheit von neutralisierenden Antikörpern und ADCC zurückgeführt werden könnte^{81,121,153}.

Welchen Beitrag die zelluläre bzw. humorale Immunantwort für die nicht-progredierende Infektion der einzelnen LNTP besitzen bleibt unbeantwortet. Beide Teile des Immunsystems können jedoch zu einer nicht-progredierenden Infektion beitragen. So wird eine breit-reaktive Neutralisationsaktivität im Serum ebenso mit einem nicht-progredierenden Infektionsverlauf in Verbindung gebracht, wie eine starke zelluläre Immunantwort^{11,45,48,89,122,370}. Eine erfolgreiche Kontrolle der Infektion muss jedoch nicht aus-

schließlich auf dem einen oder dem anderen Arm des Immunsystems beruhen, sondern kann von beiden getragen werden. Dies zeigen mehrere Studien, bei denen der Verlust der humoralen oder zellulären Immunantwort der Patienten nicht zur Progression führt^{9,155,258}. Wenngleich für eine erfolgreiche zelluläre Immunantwort bereits die Detektion weniger Epitope ausreichen kann, so bleibt das zelluläre Immunsystem dennoch aufgrund seiner HLA-Genotypen in seiner Anpassungsfähigkeit limitiert. Kumulieren im Verlauf der Infektion mehrere Mutationen, kann dies zu einem Kontrollverlust und zur Progression führen^{111,158,159,222}. Im Gegensatz zur zellulären Immunantwort, besitzt die humorale Immunantwort hingegen die Fähigkeit ein Antikörperparatop gegen scheinbar jedes beliebige Antigen zu entwickeln. Diese nahezu unbegrenzte Anpassungsfähigkeit, sowie die Fähigkeit der humoralen Immunantwort ein Pathogen durch direkte Neutralisation oder einer Vielzahl von Effektormechanismen (Antikörper-vermittelte Zellzytotoxizität, Antikörper-vermittelte Komplementaktivierung, Phagozytose) zu bekämpfen, prädestiniert die humorale Immunantwort für den Kampf gegen ein hochvariables Antigen wie HIV-1^{37,153}.

4.2. Infektiosität und Effizienz der frühen Replikationsschritte HIV-1 Env-RRV

Aufgrund der sehr geringen viralen Last gelang es nicht die Viren der LTNP *in vitro* zu kultivieren, um umfassende Studien durchzuführen. Da die Env vermittelte Bindung und Fusion mit der Zelle allerdings zwei der wichtigsten Schritte des viralen Replikationszyklus darstellen, können HIV-1 Env-rekombinanten Reporterviren für aussagekräftige Untersuchungen viraler Eigenschaften genutzt werden^{207,275}. Die Gewinnung der HIV-1 Env-rekombinanten Reporterviren erfolgte mit dem Plasmid pTN7- Δenv von PD Dr. M. Dittmar. Dieses System ermöglicht die Herstellung von HIV-1 Env-rekombinanten Reporterviren, denen das Gen *Renilla* Luciferase als Reporter gen dient²⁴¹. Es gelang uns HIV-1 Env-rekombinante Reporterviren von vier LTNP (MH01, MH03, MH06, MH08), vier HIV-1 Kontrollpatienten (H0E6, P5T5, S3R8, S19) und drei HIV-1 Labor-adaptierten Stämmen (D117III, 89.6, YU2) herzustellen. Dies ermöglichte es die Funktionalität und Neutralisationssensitivität der patienteneigenen Env-Proteine in einem einheitlichen Kontext zu überprüfen.

Zunächst wurde die Infektiosität der generierten HIV-1 Env-rekombinanten Reporterviren bestimmt. Diese ist sowohl in der Gruppe der LTNP (Mittelwert: $3,62 \cdot 10^{-8}$ IU/U), als auch der HIV-1 Kontrollpatienten (Mittelwert: $6,61 \cdot 10^{-9}$ IU/U) deutlich geringer als in der Gruppe der Labor-adaptierten Stämme (Mittelwert: $2,22 \cdot 10^{-4}$ IU/U). Während sich die Infektiosität der HIV-1 Env-RRV beider Patientengruppen nicht signifikant unterscheidet (p-Werte: 0,137), ist die Infektiosität der Labor-adaptierten HIV-1 Env-RRV signifikant besser (p-Wert_{LTNP/Labor-adaptierte Stämme}: 0,018 bzw. p-Wert_{HIV-1 Kontrollpatienten/Labor-adaptierte Stämme}: 0,009)

(Tabelle 10; Abbildung 25). In einer weiteren Analyse wurde die Effizienz der frühen Replikationsschritte der HIV-1 Env-rekombinanten Reporterviren überprüft. Auch hier zeigt die Gruppe der Labor-adaptierten Stämme (Mittelwert: 170,425) deutlich höhere Werte als die Gruppen der LTNP (Mittelwert: 0,327) bzw. der HIV-1 Kontrollpatienten (Mittelwert: 0,0275). Erneut besteht zwischen der Gruppe der LTNP und der HIV-1 Kontrollpatienten kein signifikanter Unterschied (p -Wert_{LTNP/HIV-1 Kontrollpatienten}: 0,6415), jedoch zwischen der Gruppe der Labor-adaptierten Stämme und den beiden Gruppen primärer HIV-1 Env-RRV (p -Wert_{LTNP/Labor-adaptierte Stämme}: 0,0004 bzw. p -Wert_{HIV-1 Kontrollpatienten/Labor-adaptierte Stämme}: 0,0034) (Tabelle 10 und Abbildung 27). Diese Beobachtungen stimmen mit den Resultaten früherer Untersuchungen überein, die ebenfalls eine größere Infektiosität bei Labor-adaptierten Stämmen im Vergleich mit primären Viren aufzeigen. Als Grund hierfür werden oft Veränderungen in der Env-Sequenz ins Feld geführt^{167,268}. Auch die hier untersuchten primären Env unterscheiden sich – zum Teil signifikant – in der Länge der Variablen Schleifen (vor allem V1/V2) von den Env Proteinen Labor-adaptierter Stämme (3.1.3.1 oben). Das Fehlen eines Selektionsdrucks bei der *in vitro* Kultivierung Labor-adaptierter Stämme führt, durch entsprechende Veränderungen der Hüllproteine, zur Ausbildung hoch-infektöser HIV-1 Stämme^{208,268}. Primäre Isolate sind hingegen *in vivo* dazu gezwungen der Immunantwort zu entrinnen. Hierzu bedienen sie sich einer Vielzahl von Schutzmechanismen zu denen, neben einfachen Sequenzmutationen, das Zuckerschild sowie die Längenvariation der Variablen Schleifen gehören. In Folge dieser Mutationen entstehen neutralisationsresistente aber weniger replikationskompetente Viren, die die Infektion tragen^{70,102}. Untersuchungen mit *in vivo* passagierten Labor-adaptierten SHIV-Isolaten in Affenmodellen zeigen diese Zusammenhänge eindrucksvoll auf. Bereits eine geringe Zahl von rund 15 Mutationen in der Env Proteinsequenz kann zur Ausbildung pathogener, neutralisationsresistenter Isolate führen, die jedoch eine verminderte Replikationsfähigkeit besitzen. Der Großteil der identifizierten Mutationen liegt hierbei in den Variablen Schleifen V1/V2 bzw. V3 und in der an der CD4-Rezeptorbindung beteiligten C4-Region^{86,87,361}.

Ein Hinweis auf diese Mechanismen liefert die Analyse der Effizienz der frühen Replikationsschritte in Abhängigkeit der Länge von V1/V2. Hier ist eine schwach ausgeprägte, inverse Korrelation zu erkennen (Abbildung 28). Die Aussagekraft dieser Analyse ist jedoch limitiert, da weder die Zahl der N-Glykosylierungsstellen noch deren Position berücksichtigt wurden, die allerdings einen beachtlichen Einfluss auf die Infektiosität haben können^{167,203,245,288,350}. Eine Studie mit V1/V2 Mutanten unterschiedlicher Länge, N-Glykosylierungen und Ladung zeigt, dass für die Funktionalität von Env eine minimale Länge von 40 Aminosäuren in V2 notwendig ist und ferner welche Konsequenzen die Veränderung der untersuchten Parameter haben⁹⁷. Mehrere Studien zeigen zudem,

dass Insertionen in V1/V2 überwiegend in Patienten mit verlangsamten oder nicht-progredierenden Infektionen nachgewiesen werden können, und sehe Polymorphismen als Reaktion des Virus auf eine funktionelle Immunantwort^{97,310}. Wird bedacht, dass der V1/V2 Bereich im Env-Trimer zur Maskierung der CD4-Bindungsstelle beiträgt und selbst Teil der Corezeptorbindungsstelle ist, wird klar warum Mutationen in diesem Bereich einen ausgeprägten Effekt auf Replikation, Infektiosität, Pathogenität und die Neutralisationseigenschaft der Viren haben können^{43,97,167,203,245,310,355,361}. Die tendenziell verlängerten Variablen Schleifen in den Env Proteinen der LTNP-Patienten führen jedoch zu keinem signifikanten Verlust der Infektiosität bzw. Effizienz der frühen Replikationsschritte der untersuchten HIV-1 Env-RRV. Hierbei decken sich unsere Ergebnisse mit den Resultaten einer Studie von Candotti *et al.* die ebenfalls zeigt, dass von LTNP abgeleitete Viren keinen signifikanten Unterschied in der Replikation aufweisen⁴⁰. Zwei weitere Studien mit Isolaten von Elite Suppressoren bzw. LTNP zeigen ebenfalls keine Unterschiede in der *in vitro* Replikation der analysierten Viren^{25,210}. Andere Studien hingegen zeigen eine Korrelation der Replikationskapazität viraler Isolate und der Viruslast im Blut der Infizierten. Weil die Viruslast im Blut von LTNP Patienten deutlich geringer ist, als in normal-progredierenden HIV-1 Infizierten, sollten demnach die Isolate von LTNP eine verringerte Replikationskapazität aufweisen^{23,39,273,337}.

Zusammen mit der Analyse der Env-Sequenzen, sprechen die vergleichbare Infektiosität bzw. Effizienz der frühen Replikationsschritte gegen eine nicht-progredierende Infektion in Folge defekter Hüllproteine oder Viren (Abbildung 25, Abbildung 27, Abbildung 43). Die von uns untersuchten HIV-1 Env lassen, außer dem mehrfach beschriebenen Trend zu verlängerten Variablen Schleifen in den Hüllproteinen von LTNP, keine Besonderheiten erkennen (Tabelle 5). Es gilt zu bedenken, dass HIV-1 Env-RRV nur dazu in der Lage sind den Env bedingten Einfluss auf Infektiosität bzw. Replikation zu bestimmen. Den Einfluss anderer viraler Gene kann mit diesen Viren nicht bestimmt werden. Aufgrund der zentralen Bedeutung der Hüllproteine für den Tropismus, die Replikation und die Sensitivität des Virus gegenüber der humoralen Immunantwort sind die Ergebnisse der Untersuchungen mit HIV-1 Env-RRV größtenteils repräsentativ für die korrespondierenden Isolate^{201,207,275,288}.

4.3. Neutralisation von HIV-1 Env-RRV

Um die Bedeutung der humoralen Immunantwort für die Kontrolle der Infektion bewerten zu können, wurden umfassende Neutralisationsstudien mit den Seren der LTNP und HIV-1 Kontrollpatienten durchgeführt (Tabelle 17). Die Seren der LTNP-Patienten zeigen im Vergleich zu den HIV-1 Kontrollpatienten sowohl eine signifikant höhere IC50 (Mittelwert_{LTNP}: 1.227; Mittelwert_{HIV-1 Kontrollpatienten}: 475; p-Wert: 0,0032) als auch IC90 (Mittelwert_{LTNP}: 144; Mittelwert_{HIV-1 Kontrollpatienten}: 43; p-Wert: 0,0050) (Abbildung 29). Bewegen

sich die Unterschiede zwischen beiden Gruppen auch innerhalb einer Größenordnung so wird klar ersichtlich, dass die humorale Immunantwort der LTNP-Patienten denen der HIV-1 Kontrollpatienten überlegen ist. Erkennbar wird dies anhand der signifikanten Unterschiede beider Gruppen. Einen weiteren Hinweis auf die überlegene humorale Immunantwort der LTNP Patienten liefert die Zahl der Virus/Serumkombinationen die nicht zu einer 50%igen bzw. 90%igen Neutralisation führen. Während bei den LTNP-Seren keine Virus/Serumkombination eine 50%ige Neutralisation verfehlt (0/63), erreichen neun Virus/Serumkombinationen der HIV-1 Kontrollpatienten keine 50%ige Neutralisation (9/63; p-Wert: 0,0021). Noch deutlicher ist der Unterschied zwischen beiden Patientengruppen bei der Zahl der Virus/Serumkombinationen die keine 90%ige Neutralisation erreichen (LTNP: 6/63; HIV-1 Kontrollpatienten: 23/63; p-Wert: 0,0003). In einer Vielzahl weiterer Studien wurde ebenfalls eine bessere und breitere humorale Immunantwort bei LTNP Patienten aufgezeigt und mit einer nicht-progredienten Infektion in Zusammenhang gebracht^{44,45,48,226,259,370}. Allerdings vergleichen die meisten dieser Studien die Immunantwort der LTNP mit weit fortgeschrittenen Patienten, zum Teil auch Patienten mit AIDS. Aufgrund des stark beeinflussten Immunsystems der Kontrollgruppen ist eine bessere Immunantwort der LTNP in diesen Studien wenig aussagekräftig. Im Gegensatz dazu werden hier zwei Gruppen HIV-1 Infizierter mit vergleichbaren klinischen Markern untersucht (Tabelle 3). Der beobachtete Unterschied in der Neutralisationskapazität stellt somit die bessere humorale Immunantwort der LTNP Patienten gegenüber einer Kontrollgruppe mit vergleichbarem Immunstatus dar.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die verlängerten Variablen Schleifen in den Env-Sequenzen der LTNP sowie das Vorhandensein ‚LTNP-spezifischer‘ Sequenzmuster in den untersuchten viralen Genen (4.1.2 oben). Hierbei handelt es sich um Anzeichen einer viralen Adaption an die Immunantwort, was die Ergebnisse unserer Neutralisationsstudien untermauern. Um der Immunantwort zu entkommen, bedient sich das Virus in seiner Entwicklung zahlreicher Verteidigungsmechanismen. Neben den bereits beschriebenen Veränderungen der Variablen Schleifen sind dies vor allem Sequenzmutationen und eine ständige Adaption des Zuckerschilds auf der Oberfläche der Hüllproteine^{70,203,210,213,260,264,288}. Dacheux *et al.* zeigen die Zusammenhänge zwischen der Adaption dieses Zuckerschilds und der Modulation potentieller Epitope auf. Sie konnten zeigen, dass das Epitop für den nAK 2G12 mehrere Jahre nach der Infektion, aber nicht in den Primärviren, die die Infektion tragen, vorhanden ist⁷⁰. Die Ausbildung eines neuen Antikörperepitops erscheint zunächst unvorteilhaft für das Virus. Wird jedoch bedacht wie selten die Ausreifung von 2G12-ähnlichen Antikörpern ist und wie dies mit der Maskierung zahlreicher Epitope auf der Oberfläche der Hüllproteine durch das Zuckerschild auf, wird der Nutzen für das Virus ersichtlich^{296,336,346,354,374}. Zusätzlich kann das Zuckerschild eine

Interaktion zwischen dem Virus und dem Lectin DC-SIGN, auf der Oberfläche Dendritischer Zellen in der Peripherie des Körpers, vermitteln. Diese Interaktion führt zur Endozytose der Viren. Hierbei kommt es zwar nicht zur Infektion der Dendritischen Zellen, jedoch bleiben einige der internalisierten Viren teilweise infektiös und die Dendritischen Zellen beginnen in die Lymphatische Organe zu migrieren. Dort angekommen werden die identifizierten Pathogene (die HI-Viren) von den Dendritischen Zellen CD4⁺-T-Zellen präsentiert, was zur Initialisierung der adaptiven Immunantwort führt. Durch die verbliebenen infektiösen Viren kommt es hierbei aber auch zur Infektion der CD4⁺-T-Zellen. Dieser Vorgang wird als Infektion *in trans* bezeichnet. Neben der protektiven Wirkung unterstützt das Zuckerschild somit die Replikation des Virus, in dem es die Dendritischen Zellen als ‚Trojanisches Pferd‘ nutzt, um sich von diesen in die CD4⁺-T-Zell-reichen Lymphatischen Organe einschleusen zu lassen^{69,85,112,176,290}.

Es wird ersichtlich, wie komplex die Zusammenhänge im Wechselspiel viraler Mutation und Immunantwort sind. Wenngleich das Virus in seiner Entwicklung durch die humorale Immunantwort ‚geformt‘ wird, gelingt es dem Virus dennoch, der Immunantwort meist einen Schritt voraus zu sein und ihr zu enttrinnen^{37,102,254,277}. So zeigen Verlaufsstudien mit Seren HIV-1 Infizierter, dass diese zwar in der Lage sind ‚historische‘, autologe Isolate zu neutralisieren, eine Neutralisation kontemporärer Isolate jedoch stark vermindert ist^{76,227,277}. Verglichen mit normal-progredierenden Patienten scheint die humorale Immunantwort von LTNP allerdings eine andere Güte zu besitzen, die sie – evtl. neben möglicher, anderer Gründe – dazu in die Lage versetzt, eine Progression zu unterbinden. So zeichnen sich LTNP unter anderem durch eine breite, persistente humorale Immunantwort sowohl gegenüber ‚historischen‘, als auch kontemporären Isolaten aus, der das Virus nicht enttrinnen kann^{34,44,48,76,250,259,370}. In der Regel entzieht sich das Virus mit Hilfe seiner immensen Mutationsfähigkeit der Immunantwort. Durch einen Fitnessverlust in Folge der Mutation zahlt das Virus hierfür einen gewissen Preis. Ist dieser außergewöhnlich hoch, kommt es rasch zur Reversion. Um optimal zu replizieren, passt sich das Virus der jeweiligen Situation ständig an, wobei es fortwährend einen Kompromiss zwischen Replikationskapazität und Neutralisationsresistenz eingeht^{7,258}. Richtet sich die Immunantwort gegen hochkonservierte, funktionelle Epitope, kann das Virus dieser nur schwer enttrinnen. So zeigen passive Immunisierungsstudien breit-neutralisierender, monoklonaler Antikörpern, dass es für das Virus umso schwerer ist, unter dem Druck der Immunantwort zu replizieren, wenn sich die Immunantwort gegen mehrere konservierte Epitope richtet^{79,223,239}. Die Ausreifung breit-neutralisierender Antikörper benötigt jedoch längere Zeit. Die Tatsache, dass die Ausreifung dieser Antikörper primär in LTNPs zu beobachten ist, unterstreicht das große Potenzial dieser Antikörper^{34,76,259}. Gelingt es dem Immunsystem, das Virus in seinem ‚Mutationsraum‘ hinreichend einzudämmen, scheint es möglich das Fortschreiten

der Infektion zu verlangsamen oder gar zu verhindern. Der Nutzen breit-neutralisierender Antikörper als passive Vakzine wurde mehrfach in Studien mit Affen, sowie im Menschen durch die Unterdrückung einer Mutter-Kind-Übertragung oder der Verlangsamung der Virusreplikation nach Absetzen einer HAART-Therapie aufgezeigt^{92,137,191,211,335,358}.

In der Summe lassen die Ergebnisse der Neutralisationsstudien einen Einfluss der humoralen Immunantwort auf das Nicht-Progressieren der HIV-1 Infektion, der hier untersuchten LTNP, erkennen. Durch die im Serum vorhandenen Antikörper ist das Virus zu Mutationen in den Hüllproteinen gezwungen, die ein Fortschreiten der Infektion erschweren oder gar verhindern können (4.1.2 oben und 4.2 oben). Die detaillierte Analyse der humoralen Immunantwort der LTNP-Patienten, ihrer Epitope und Wirkmechanismen kann somit helfen die Entwicklung einer aktiven oder passiven Vakzine voranzutreiben.

4.4. Untersuchungen mit Peptidphagen

In der Dissertation von Michael Humbert wird die Identifikation HIV-1 spezifischer Peptidphagen als Liganden für Serumantikörper der hier untersuchten LTNP Patienten beschrieben. Zusammenfassend gelang die Identifikation mehrerer HIV-1 spezifischer Peptidphagen, die lineare bzw. konformelle Epitope der Hüllproteine gp120 bzw. gp41 widerspiegeln. Während die Identifikation linearer Epitope mit einem einfachen Sequenzvergleich möglich war, bedurfte die Identifikation konformeller Epitope die Entwicklung einer neuen Software, die die isolierten Peptidsequenzen auf der Oberfläche der Hüllproteine zuordnete. Aufgrund der großen Anzahl an HIV-1 spezifischen Peptidphagen wurden diese, basierend auf ihrer Sequenzhomologie, in zehn Gruppen unterteilt^{151,302}. In diesem Teil meiner Dissertation werden diese Gruppen eingehender untersucht und auf ihre Bedeutung für die humorale Immunantwort hin analysiert.

4.4.1. Kreuzreaktivität der Peptidphagen

Hinsichtlich einer Vakzineentwicklung wäre es ideal, wenn einzelne HIV-1 Peptidphagen eine möglichst breite Reaktivität aufwiesen. Weil die untersuchten HIV-1 spezifischen Peptidphagen nur mit einem Teil oder gar einzelnen Seren identifiziert wurden, wurde zunächst die Kreuzreaktivität der übrigen LTNP Seren gegen die einzelnen Phagengruppen überprüft. Um abschätzen zu können, ob es sich bei den einzelnen Epitopen um ‚LTNP-spezifische‘ Epitope handelt, wurde gleichzeitig die Reaktivität mit den Seren der HIV-1 Kontrollpatienten untersucht (Tabelle 11 und Abbildung 30). Die Peptidphagengruppen NNNT (2) und WxxxW (5) reagieren ausschließlich mit dem Serum, mit dem sie identifiziert wurden (vgl. Dissertation Michael Humbert). Die übrigen Gruppen besitzen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Kreuzreaktivität. Sowohl bei den LTNP Patienten (85,7% bzw. 100%), als auch bei den HIV-1 Kontrollpatienten (28,6% bzw. 57,1%) zeigen die Gruppen

GPGRAF (1) bzw. KLIC (3) die stärkste Kreuzreaktivität. Dies entspricht unseren Erwartungen, da beiden Gruppen immundominante Epitope darstellen¹⁸⁷. Überraschend ist jedoch, dass zwischen den Kreuzreaktivitäten beider Patientengruppen ein ausgeprägter, teils signifikanter Unterschied besteht (p-Wert_{GPGRAF}: 0,032 bzw. p-Wert_{KLIC}: 0,078). Auffällig ist hierbei, dass die Seren der Patienten A6N3 (infiziert 2001; Serumprobe Feb. 2003), H0E6 (infiziert 2002; Serumprobe Aug. 2002) und S3R8 (infiziert 2003; Serumprobe Feb. 2004) mit keiner der Peptidphagengruppen reagieren. Wenngleich sich diese Patienten in der frühen Phase der Infektion befinden, dürfte ein generelles Fehlen der humoralen Immunantwort nicht die Ursache für eine nicht vorhandene Kreuzreaktivität sein. Für die Patienten H0E6 und S3R8 wird dies durch die Neutralisationsuntersuchungen untermauert, die für die Seren eine zum Teil recht hohe Neutralisationskapazität aufzeigen (Tabelle 17). Die Immunantwort scheint vielmehr gegen andere Epitope gerichtet, denn die Epitope GPGRAF und KLIC sind, bis auf eine Punktmutation in GPGRAF (R315K) von S3R8, in den Env-Sequenzen der Patienten vorhanden. Patient A6N3, der ebenfalls mit keiner der untersuchten Peptidphagengruppen reagiert, zeigt auch nahezu keine Neutralisationskapazität. Ob dies ein charakteristisches Merkmal der untersuchten Serumprobe oder des Patienten ist, könnte durch die Überprüfung weiterer Serumprobe aufgezeigt werden. Die Seren der übrigen HIV-1 Kontrollpatienten reagieren mit der Peptidphagengruppe GPGRAF (1) (P5T5, S19) und/oder KLIC (3) (P5T5, P10, S6, S19). Interessant ist vor allem die humorale Immunantwort von P5T5, denn dessen Serum reagiert zum einen mit den beiden zuvor erwähnten Gruppen, sowie mit der Gruppe NNALP-NPD (8) und zeichnet sich darüberhinaus mit der größten Neutralisationskapazität der untersuchten HIV-1 Kontrollpatienten aus (Tabelle 17). Hier ist der weitere Infektionsverlauf von großem Interesse, bleibt doch abzuwarten, ob es dem Immunsystem des Patienten gelingt die in Ansätzen scheinbar gut ausgebildete Immunantwort evtl. weiter zu verbreitern und zu etablieren.

Aufgrund des signifikanten Unterschieds in der Kreuzreaktivität der beiden Patientengruppen mit der Peptidphagengruppe GPGRAF (1), scheint eine funktionelle Antikörperantwort gegen dieses Epitop für eine bessere Kontrolle der Infektion durchaus von Bedeutung zu sein. Handelt es sich hierbei auch um ein Epitop in der Variablen Schleife 3, so zeigen neuere Studien mit V3, dass diese aufgrund der Beteiligung an der Corezeptorbindung eher semi-konserviert als hoch-variabel ist¹⁴². Dies lässt vermuten, dass eine gute Immunantwort gegen diese semikonservierteren Epitope zur Neutralisation führen kann^{84,117,118,135,360}. Das Potenzial einer solchen Immunantwort wird eindrucksvoll vom breit-neutralisierenden, monoklonalen Antikörper 447-52D unter Beweis gestellt. Dieser bindet ein Epitop, welches Teile der Spitze und der Basis von V3 umfasst^{177,321,375}. Entgegen der meisten anderen bekannten α -V3-Antikörper wird die Bindung von 447-52D durch Mutationen der V3-Sequenz nur minimal beeinflusst. Die Ursache hierfür liegt in der ungewöhnlichen

Bindungseigenschaft von 447-52D. Ein Großteil der Wechselwirkungen mit der Variablen Schleife erfolgt mit Hauptkettenatomen und ist somit unabhängig von der Aminosäuresequenz, was dem Antikörper eine ungewöhnlich breite Reaktivität verleiht³²¹.

Vergleichbare Unterschiede in der Kreuzreaktivität ergaben sich für die zwei Peptidphagengruppen der konformellen Epitope Mix 1 (9) und Mix 2 (10) ($p\text{-Wert}_{\text{Mix1}}$: 0,008 bzw. $p\text{-Wert}_{\text{Mix2}}$: 0,078). Beide Peptidphagengruppen wurden ausschließlich von Seren der LTNP detektiert (71,4% bzw. 42,9%), von den Seren der HIV-1 Kontrollpatienten hingegen nicht. Demnach könnte es sich um zwei ‚LTNP-spezifische‘ Epitope handeln. Das beide zur Gruppe der konformellen Epitope zählen, deckt sich mit Ergebnissen früherer Studien, die aufzeigen, dass breit-neutralisierende Antikörper oftmals konformelle Epitope erkennen und sich die humorale Immunantwort von LTNP in diesem Punkt nachweislich von der normal-progredierender HIV-1 Infizierter unterscheidet³⁴. Die humorale Immunantwort der LTNP-Seren gegen diese Epitope könnte einen entscheidenden Beitrag zur Kontrolle der Infektion *in vivo* leisten.

Die Kreuzreaktivität gegenüber den Peptidphagengruppen NNNT (2), KLIC-AVPW (4), WxxxW (5), CD4bs (6), CD4bs (7) und NNALP-NPD (8) sind entweder nur äußerst schwach ausgeprägt oder nicht vorhanden und zeigen keine signifikanten Unterschiede (p -Werte zwischen 0,172 und 1). Mit den vier erstgenannten Peptidphagengruppen reagieren nur die Seren von MH01 und/oder MH04, mit denen diese Peptidphagen identifiziert wurden. Gegenüber der Peptidphagengruppe NNALP-NPD (8) besitzen die Seren von MH01 und P5T5 eine Aktivität. Im Fall der Peptidphagengruppe Cd4bs (6), die mit den Seren der Patienten MH04, MH07 und S6 reagiert, zeigen, mit den Patienten MH07 und S6, zwei Seren eine Kreuzreaktivität. Die schwache Kreuzreaktivität mit den Gruppen CD4bs (6) und CD4bs (7) überrascht, da es sich bei der CD4-Rezeptorbindungsstelle um eines der am besten konservierten Epitope handelt. Demnach wäre eine deutlich größere Kreuzreaktivität zu erwarten gewesen. Eine mögliche Ursache für das Fehlen einer Kreuzreaktivität könnte in der Natur der CD4-Rezeptorbindungsstelle liegen. Diese baut sich, wie in Kapitel 1.1.5.2 und 1.1.5.3 beschrieben, durch mehrere, räumlich angeordnete Aminosäurecluster auf, was ein Nachbilden der korrekten Struktur ungemein erschwert.

4.4.2. Kompetitionsstudien der Peptidphagenbindung an Serumantikörper mit trimeren HIV-1 Env

Um nachzuprüfen, in wiefern die von 3DEX identifizierten, konformellen Epitope tatsächlich auf den Hüllproteinen von HIV-1 vorhanden und zugänglich sind, wurde die Bindung der HIV-1 spezifischen Peptidphagen an die Serumantikörper der untersuchten LTNP mit löslichen HIV-1 Env Trimeren inhibiert. Als Kontrolle dienten hierbei die Gruppen linearer

Epitope, deren Bindung bei fast jeder untersuchten Serum/Peptidphagen-Kombination durch trimeres HIV-1 gp140 inhibiert werden konnte. Lediglich die Bindung von MH04 bzw. MH01 an die Peptidphagen der Gruppen KLIC-AVPW (4) bzw. NNALP-NPD (8) wurde nicht inhibiert. Unter Umständen ist die Bindung der Peptidphagen an die Serumantikörper der Patienten so stark, dass für eine Inhibition der Bindung eine höhere Konzentration von HIV-1 gp140 nötig gewesen wäre. Bei den untersuchten konformellen Epitopen wurde eine Inhibition der Bindung für die Peptidphagengruppen CD4bs (7) und Mix 1 (9) nachgewiesen. Bei den Peptidphagengruppen CD4bs (6) und Mix 2 (10) führte die Zugabe von HIV-1 gp140 nicht zu einer Verminderung der Peptidphagenbindung (Tabelle 12 und Abbildung 44). Hier könnte der untersuchte Konzentrationsbereich des Inhibitors ebenfalls nicht ausreichend gewesen sein. Da es sich bei diesem um ein Gemisch von gp140 Mono-, Di- und Trimeren handelt, ist die Konzentration konformeller Epitope, die nur auf den Trimeren richtig nachgebildet werden, gegenüber linearen Epitopen verringert. Dies könnte erklären warum die Serumbindung an lineare Peptidphagengruppen deutlich erfolgreicher inhibiert wird, als die Bindung an konformelle Peptidphagengruppen. Die erfolgreiche Bindungsinhibition der Gruppe Mix 1 (9) in drei von fünf Ansätzen belegt jedoch, dass dieses durch das Computerprogramm 3DEX identifizierte Epitop tatsächlich auf der Oberfläche von HIV-1 Env vorhanden ist. Um aufzuzeigen, dass es sich bei der Inhibition nicht um einen unspezifischen Verdrängungseffekt oder eine Peptid-unabhängige Phagenbindung handelt, wurden entsprechende Kontrollen durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse dieser Kontrollen kann ein solches, unspezifisches Szenario ausgeschlossen werden (Abbildung 44).

In der Summe lässt die unterschiedlich stark ausgeprägte Kreuzreaktivität der LTNP bzw. HIV-1 Kontrollpatienten gegenüber den immundominanten Epitopen GPGRAF (1) und KLIC (3), sowie den zwei neu identifizierten, konformellen Epitopen Mix 1 (9) und Mix 2 (10) erkennen, dass die humorale Immunantwort der LTNP deutlich unterschiedliche Charakteristika als die humorale Immunantwort der HIV-1 Kontrollpatienten besitzt. In Verbindung mit den Resultaten der Neutralisationsstudien könnte dies ein Hinweis darauf sein, welche Antikörper für die bessere (bzw. breitere) Neutralisationskapazität der LTNP-Seren verantwortlich sind. Die Bedeutung von Antikörpern gegen konformelle Epitope wurde bereits in früheren Studien herausgearbeitet⁹⁶. Da es immer noch HIV-1 Isolate gibt, die von Seren HIV-1 Infizierter, aber nicht von den bis heute identifizierten breit-neutralisierenden Antikörpern, neutralisiert werden, stellt die Isolierung und Identifikation neuer breit-neutralisierender Antikörper und deren Epitope eine interessante und notwendige Aufgabe für die Entwicklung einer aktiven oder passiven Vakzine dar^{135,255}. Obwohl die Kombination der bisher bekannten breit-neutralisierenden Antikörper die Übertragung von SHIV im Tiermodell verhindern kann, treten bei therapeutischer Anwendung in

HIV-1 Infizierten Fluchtmutanten auf. Diese sollten durch den Einsatz zusätzlicher monoklonaler Antikörper minimiert werden können^{92,211,253,335}. In Folge ihrer dreidimensionalen Struktur ist die Identifikation sowie die detailgetreue Nachbildung konformeller Epitope allerdings äußerst komplex. Der in der Dissertation von Michael Humbert beschriebene Ansatz zur Identifikation dieser Epitope mit Hilfe von Peptidphagen, könnte bei der Detektion dieser Epitope wie auch bei der Induktion einer entsprechenden Immunantwort helfen. Vielversprechend erscheint dieser Ansatz vor allem, wenn die Selektion mit LTNP-Seren erfolgt, um sich den Vorteil der jahrelangen nativen Selektion und Antikörperreifung von Nutzen zu machen^{52,151,302}.

4.4.3. Bindungsreaktivität nach Immunisierung

Aufgrund ihrer signifikant unterschiedlichen Kreuzreaktivität und der teils erfolgreichen Kompetitionsstudien wurden die Peptidphagengruppen GPGRAF (1), Mix 1 (9) und Mix 2 (10) in Immunisierungsstudien zur Induktion HIV-1 spezifischer Antikörper genutzt. Die Peptidphagengruppe CD4bs (6) wurde in die Studien mit eingebunden, da es sich um ein bekanntes konformes Epitop mit großer Bedeutung für die Infektion handelt.

4.4.3.1. Immunisierungsstudie 2006

Das Ziel dieser ersten Studie war die Optimierung eines vorhandenen Impfprotokolls. In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Immunantwort gegen das Peptid-tragende Fusionsprotein pIII erst nach fünf bis sechs Immunisierungen detektierbar ist (vgl. Dissertation Michael Humbert). Aus diesem Grund ist auch die zu erwartende Kreuzreaktivität mit HIV-1 Env sehr gering. Um diese zu verbessern, wurden je zwei Gruppen von Mäusen in unterschiedlichen Abständen mit den Phagen der verschiedenen Gruppen immunisiert (2.8.12 oben). Durch die unterschiedliche Zeit zwischen den einzelnen Immunisierungen, sollte die Ausreifung der gewünschten Immunantwort optimiert werden. Es zeigt sich, dass die Verlängerung des Impfprotokolls zur gewünschten Verbesserung der Immunantwort führte. Während durch das ‚normale‘ Impfprotokoll lediglich vereinzelte HIV-1 kreuzreaktive Immunantworten induziert werden konnten, zeigt der Großteil, der mit dem verlängerten Impfprotokoll (‚lang‘) immunisierten Tiere, die gewünschte Kreuzreaktivität (Tabelle 13 und Abbildung 33). Zusätzlich zur Zahl der kreuzreaktiven Tiere erhöhte sich auch der Titer gegen HIV-1 Env, wobei dieser immer noch sehr gering war. Demnach ist eine weitere Optimierung des Immunogens notwendig, um nach einer erfolgreichen Immunisierung umfassende Studien mit den Seren der Tiere durchführen zu können.

4.4.3.2. Immunisierungsstudie 2007

Die zweite Immunisierungsstudie war darauf ausgelegt, HIV-1 spezifische B-Zellen aus der Milz der immunisierten Tiere zu isolieren, um aus diesen HIV-1 spezifische Hybridoma-

zellen zu gewinnen. Um diesem Ziel gerecht zu werden, wurde das Impfprotokoll der Studie modifiziert. Die Tiere der Immunisierungsstudie 2006 wurden zehn Tage nach der sechsten Immunisierung ausgeblutet und auf Serumreaktivität getestet, erfolgte nun am Tag nach der sechsten Immunisierung ein finaler Boost und drei Tage danach die Isolierung der B-Zellen und des Serums. Hierdurch wird ein Ausreifen der B-Zellen verhindert, was zu einer deutlich verringerten Fusionsrate führen würde. Die Antikörperantwort ist zu diesem Zeitpunkt jedoch deutlich vermindert, was sich auch bei der Analyse der gewonnenen Serumproben zeigt. Verglichen mit der Immunisierungsstudie 2006 sind die Reaktivitäten mit HIV-1 Env bei fast allen Tieren deutlich geringer (Abbildung 33 und Abbildung 34). Nur die Tiere der Gruppen CD4bs (6) bzw. Mix 2 (10) zeigen eine klare Reaktivität, während in den Gruppen GPGRAF (1) und Mix 1 (9) keine klare Bindung der Seren an HIV-1 Env zu erkennen ist. Ob dies allein auf eine Verringerung der Reaktivität in Folge der früheren Serumentnahme zurückzuführen ist oder ob die Immunisierung der Tiere fehlschlug bleibt offen. Da in der vorherigen Studie jedoch alle Tiere dieser Gruppe eine Immunantwort zeigen und die Immunisierung mit demselben Immunogen erfolgte, scheint ein generelles Ausbleiben der Immunantwort unwahrscheinlich.

Weil die Wahrscheinlichkeit eine antigenspezifische Hybridomazelle zu erhalten mit der Stärke der Immunantwort korreliert, bleibt die weitere Optimierung des Impfprotokolls eine der wichtigsten Aufgaben für die Fortführung dieses Projekts. Mögliche Ansätze hierfür sind die Präsentation der Peptide in einem alternativen Trägersystem oder die Immunisierung mit pIII-Fusionsproteinen, um eine Immunantwort gegen den Phagen, vor allem pVIII, zu unterbinden. Die Wahl eines neuen Trägersystems birgt jedoch die Gefahr, dass sich die Konformation der Peptide verändert, wodurch es insbesondere bei den konformellen Peptidphagen zu einem Verlust der Kreuzreaktivität mit HIV-1 Env kommen könnte. Eine mögliche Alternative stellt das AP-Fusionsprotein-System dar¹²⁷.

4.4.4. Selektion HIV-1 spezifischer Hybridomazellen

Trotz der geringen Immunantwort der immunisierten Mäuse wurden die B-Zellen dreier Tiere zur Synthese HIV-1 spezifischer Hybridomazellen herangezogen. Die Fusion der B-Zellen mit Myelomzellen führte in rund 12% der Vertiefungen zur Ausbildung von Heterofusionen, die in einem ersten Test auf ihre Bindung an HIV-1 Env untersucht wurden. Hierbei wurden 94 Klone identifiziert, die mit HIV-1 gp140 reagierten und expandiert wurden. In einem zweiten Test dieser Klone mit HIV-1 Env und einer entsprechenden Kontrolle (CHO-neg) verblieben 24 positive Klone (Abbildung 35). Die übrigen Klone zeigten entweder keine beständige Reaktivität oder eine unspezifische Bindung an die Kontrolle. Eine abschließende Subklonierung sowie die Untersuchung der reaktiven Klone verlief in einem ersten Ansatz ohne Erfolg. Daher wäre ein mögliches Ziel nachfolgender Arbeiten,

dies mit den noch vorhandenen tiefgefrorenen Zellen zu wiederholen, um aus den identifizierten Klonen eine stabile, monoklonale HIV-1 spezifische Hybridomazelllinie zu gewinnen.

4.5. Untersuchungen mit scF_v-Phagen Display Bibliotheken

Zur Identifikation HIV-1 spezifischer Antikörper und deren Charakterisierung, werden aus dem Antikörperrepertoire der LTNP scF_v-Phagen Display Bibliotheken erstellt. Bisher konnten von zwei der untersuchten LTNP (MH02 und MH03) IgG bzw. IgM basierende scF_v-Phagen Display Bibliotheken erstellt werden (IgG-MH02, IgM-MH02, IgG-MH03, IgM-MH03). Zur Herstellung weiterer Bibliotheken sind frische B-Zellproben der Patienten nötig, weil diese keine Krankheitssymptome aufzeigen und nur unregelmäßig in der Klinik erscheinen, ist die Gewinnung neuer Proben leider schlecht planbar.

4.5.1. Biopanning mit scF_v-Phagen

Um eine erste Etablierung der Methodik zu erlangen, erfolgten erste Biopannings mit hochaufgereinigten gp120 Monomeren auf der Oberfläche von Multititerplatten (Biopanning A-C). Die eingesetzten gp120 Monomere stellen dabei die einfachste Variante von HIV-1 Env dar. Aufgrund der fehlenden Trimerisierung sowie gp41, ist von einer Anreicherung von scF_v-Phagen gegen lineare Epitope auszugehen. Die Biopannings führten lediglich zur Isolierung einer Konsensussequenz aus der scF_v-Phagen Display Bibliothek IgG-MH03. Die Anreicherung HIV-1 spezifischer scF_v-Phagen aus den übrigen drei scF_v-Phagen Display Bibliotheken misslang. Daher wurden die gp120 Monomere in einem weiteren Biopanning auf tosylaktivierten Magnetkügelchen immobilisiert, um so eine größere Selektionsfläche zu erhalten (Biopanning F) und durch trimeres gp140 (ADA.C1) ersetzt (Biopanning H). Nach drei repetitiven Runden konnten bei Biopanning F vier Konsensussequenzen aus der scF_v-Phagen Display Bibliothek IgG-MH03 isoliert werden, wobei Konsensus B8/B10 identisch mit dem Konsensus der Biopannings A-C ist. Biopanning H ergab eine Konsensussequenz, die wiederum dem Konsensus B8/B10 entspricht (Abbildung 38). Die Untersuchung der übrigen drei Bibliotheken führte wiederum in beiden Biopannings zu keiner Anreicherung HIV-1 spezifischer scF_v-Phagen. Dies und die geringe Anzahl identifizierter Konsensussequenzen aus der scF_v-Phagen Bibliothek IgG-MH03 lassen auf ungelöste technische Probleme schließen. Da beide Patientenserien in der Analyse der Kreuzreaktivität mit der Peptidphagengruppe GPGRF (1) reagierten (3.3.1 oben), sollten sich zumindest aus beiden IgG abgeleiteten Bibliotheken entsprechende scF_v-Phagen isolieren lassen.

Ein möglicher Lösungsansatz, um die Anzahl HIV-1 spezifischer scF_v-Phagen zu erhöhen, könnte die Verpackung der scF_v-Phagen mit einem anderen Helferphagen (z.B. Hyperphage) sein. Im Gegensatz zu M13KO7 besitzt dieser kein Gen für pIII, wodurch bei einer

Verpackung von scF_v-Phagemiden mit Hyperphage ausschließlich scF_v-pIII-Fusionsproteine in die scF_v-Phagen eingebaut werden. Bei Verpackungen mit M13KO7 liegt neben dem scF_v-pIII-Fusionsprotein noch wildtyp pIII vor, weshalb es zum Aufbau pIII-chimärer scF_v-Phagen kommt. Diese besitzen in der Regel nur ein bis zwei scF_v-pIII-Fusionsproteine pro scF_v-Phage³¹⁷. Die Erhöhung der Anzahl von scF_v auf der Phagenoberfläche könnte über die gesteigerte Avidität zur Anreicherung neuer antigenspezifischer scF_v-Phagen führen. In Folge der gestiegenen Avidität käme es hierbei wohl aber auch zur Anreicherung gering-affiner scF_v-Phagen. Eine weitere Optimierung der Präsentation des Zielproteins und des Zielproteins selbst stellen weiter zentrale Ansatzpunkte dar. Eine möglichst native Präsentation hochaufgereinigter HIV-1 Env Trimere sollte die Anreicherung HIV-1 spezifischer scF_v-Phagen weiter begünstigen. Alternativ kann versucht werden, die Selektion auf HIV-1 Env exprimierenden Zellen durchzuführen. Hierdurch wird das Hüllprotein in seiner nativen Umgebung präsentiert, was sowohl Vorteile als auch Nachteile mit sich bringt. Zwei große Vorteile stellen die Membranständigkeit sowie die vollständige Glykosylierung der Hüllproteine dar. Die Bedeutung dieser Aspekte wird anhand zahlreicher Studien deutlich. So wurde gezeigt, dass die Epitope der Antikörper 2F5 und 4E10 in membranständigen MPER-Peptiden besser erkannt werden, als in löslichen MPER-Peptiden. Es wird vermutet, dass die extrem langen CDRH3 Schleifen dieser Antikörper mit ihrer Basis an die Epitope in gp41 binden und sich die Spitze dieser HCDR3 Schleifen dabei auf die Zellmembran anlegt, was zur Stabilisierung der Antikörperbindung führt^{37,125,244}. Die vollständige Glykosylierung von Env wiederum ist Voraussetzung für die Selektion von 2G12-ähnlichen scF_v-Phagen^{37,290,296,336}. Ein weiterer Vorteil einer Präsentation von Env auf der Zelloberfläche kann die vollständige Prozessierung des Vorläuferproteins gp160 sein. So ist in dem hier eingesetztem gp140 die Proteaseschnittstelle zwischen gp120 und gp41 mutiert, wodurch es zwangsläufig zu konformellen Änderung im Trimer kommt, die eine Anreicherung gesuchter scF_v-Phagen beeinflussen kann^{133,320}. In Folge der Prozessierung kann es allerdings zu einem Ablösen der gp120-Trimere von den gp41-Trimeren kommen, was wiederum zur Anreicherung von scF_v-Phagen gegenüber diesen, eigentlich verdeckten Epitopen, führen kann^{232,354}. Nachteilig für die Anreicherung HIV-1 spezifischer scF_v-Phagen könnte sich ebenfalls die große Anzahl ungewünschter Zielstrukturen auswirken, wodurch es ebenfalls zu einer Anreicherung HIV-1 Env unspezifischer scF_v-Phagen kommen könnte. Die generelle Möglichkeit zur Selektion HIV-1 spezifischer scF_v- oder F_{ab}-Phagen aus entsprechenden Bibliotheken wird jedoch durch mehrere erfolgreiche Studien belegt. Verglichen mit der Hybridoma-technologie besitzt die Phagen Display Technik jedoch mehrere Vorteile. So erfolgt die Selektion von bis zu 10⁹ verschiedenen scF_v- oder F_{ab}-Phagen mit einem minimalen Material- und Arbeitsaufwand und es ist keine Humanisierung der isolierten scF_v- oder F_{ab}-

Fragmente nötig. Ferner ermöglicht die immanente Verbindung von Genotyp und Phänotyp eine einfache Modifikation der isolierten scF_v- oder F_{ab}-Fragmente^{36,333,368,369,377}.

4.5.2. Bindungsstudien HIV-1 spezifischer scF_v

In mehreren Experimenten wurde die Bindungscharakteristik des scF_v B8/B10 analysiert. Zunächst wurde die Bindung an die vorhandenen gp120/gp140 Varianten überprüft, wobei eine Bindung aller untersuchter HIV-1 Env (JR-FL, BaL, SF162, ADA.C1) erfolgte (Abbildung 39). Weil es während der Klonierung der scF_v-Phagen Display Bibliotheken zu einer freien Rekombination der schweren und leichten Variablen Ketten kommen kann, wurde mit Hilfe eines Kompletions-ELISAs überprüft inwieweit die Bindung des scF_v B8/B10 an HIV-1 Env durch Serumzugabe inhibiert werden kann. Während HIV-1 positives Serum die Bindung des scF_v B8/B10 an HIV-1 Env inhibiert, hat HIV-1 negatives Serum keinen Effekt (Abbildung 40). Dies beweist, dass es sich um einen HIV-1 spezifischen scF_v handelt, der durch das Immunsystem gebildet wurde und dass es in den untersuchten Seren Antikörper gegen das gleiche oder zumindest überlappende Epitope gibt. Da das Serum von MH03 lediglich mit den Peptidphagengruppen GPGRAF (1) und Mix 2 (10) kreuzreagiert und die Selektion von Peptidphagen mit dem Patientenserum überwiegend V3-spezifische Peptidphagen selektierte (vgl. Dissertation M. Humbert), erfolgte ein erstes Epitopmapping mit vier verschiedenen V3-Peptidbibliotheken. Hierbei ergab sich lediglich mit Peptid Nr. 5 der Subtyp B V3-Peptidbibliothek eine eindeutig Reaktion, während andere Peptide dieser Bibliothek, sowie die Peptide der übrigen Bibliotheken nicht detektiert werden (Abbildung 41 und Tabelle 15). Obwohl sich die entsprechenden Peptide der jeweiligen Bibliotheken nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden, führen diese Polymorphismen zu einem vollständigen Verlust der scF_v Bindung. Daher liegt nahe zu vermuten, dass diese Aminosäuren für die Bindung des scF_v essentiell sind. Dabei gilt es auch die V3-Sequenzen der untersuchten HIV-1 Env Varianten zu berücksichtigen, die ja alle von dem scF_v detektiert wurden. Die Variabilität dieser Isolate im entsprechendem Bereich von V3 (NNTRKSI[N/H/T]IGPGRA[L/F]) führt nicht zu einem Verlust der Reaktivität¹⁸⁷. Die beobachteten Polymorphismen sind entweder nicht an der Bindung von scF_v B8/B10 beteiligt, oder werden toleriert. Eine vollständige Identifizierung des scF_v-Epitops könnte mit einem Alaninscan über die gesamte Variable Schleife 3 hinweg erfolgen. Ein interessanter Aspekt der Bindung von scF_v B8/B10, ist das Ausbleiben einer – zumindest – verringerten Reaktion mit den Peptiden Nr.4 bzw. 6 der V3-Peptidbibliothek von Subtyp B. Wichtige Teile des Epitops von scF_v B8/B10 scheinen sich über die gesamte Länge von Peptid Nr. 5 zu verteilen, weshalb der Versatz um nur vier Aminosäuren zu einem vollständigen Verlust der Bindung führt (Tabelle 15).

Ob und im welchen Maß der scF_v B8/B10 in der Lage ist eine HIV-1 Infektion zu

neutralisieren, muss in weiteren Studien untersucht werden. Erste Versuche, den scF_v in ausreichenden Mengen über seinen His-Tag zu präparieren, waren erfolglos. In Abhängigkeit ihrer Sequenz und Struktur, besitzen scF_v teilweise eine äußerst eingeschränkte Stabilität. Hierdurch kommt es zur Entfaltung der Immunglobulinstruktur, zur Ausbildung von Multimeren und zur Präzipitation³⁰⁰. Um dies zu unterbinden können die variablen Ketten (V_L bzw. V_H) in ein alternatives Antikörperformat eingebracht werden. Hierzu gehören sowohl die eigentliche IgG Struktur, als auch die Fusion des scF_v an einzelne F_c-Fragmente. Diese sogenannten scF_v-F_c werden in eukaryotischen Expressionssystemen als lösliches, Disulfid-verknüpftes, glykosyliertes Homodimer exprimiert und können aus dem Kulturüberstand gewonnen aufgereinigt werden. Neben einer erhöhten Stabilität und verlängerter Halbwertszeit kann es durch die gewonnene Avidität (n = 2) zu einer Verbesserung der Neutralisationseigenschaft des scF_vs kommen²⁶⁵. Im Gegensatz zur nativen IgG Struktur werden die scF_v-F_c als ein einziges zusammenhängendes Protein exprimiert, wodurch sich eine Zusammenlagerung von Leichter und Schwerer Kette erübrigt. So kommt es auch zu keiner Veränderung der scF_v-Struktur, was die Affinität der selektierten scF_v erhält³⁰. Ferner können scF_v-F_cs verglichen mit scF_vs über ihren F_c-Teil vielfältige Effektorfunktionen (Antikörper-vermittelte Zellzytotoxizität, Antikörper-vermittelte Komplementaktivierung oder Phagozytose) ausüben, deren Einfluss auf den Verlauf einer HIV-1 Infektion in mehreren Studien aufgezeigt wurde^{2,15,31,138,149,199,216,246}. Besonders eindrucksvoll ist eine Studie von Hessel *et al.*, in der rekombinante Varianten des breit-neutralisierenden Antikörpers b12 zur passiven Immunisierung von Makaken eingesetzt werden. Führen die Mutationen im F_c-Teil des Antikörpers zu einem Verlust der F_c-Rezeptorbindung, wodurch eine Bindung von Effektorzellen ausbleibt, verliert der eigentlich breit-neutralisierende Antikörper deutlich an Aktivität¹³⁴. Die Bedeutung der Antikörper-vermittelten Effektorfunktionen deutet sich auch in den Studien von Asquith *et al.* an, die darauf hinweisen, dass nur rund 20% der HIV-1 infizierten Zellen durch die zelluläre Immunantwort zerstört werden, die restlichen 80% fallen anderen Immuneffektoren zum Opfer⁵. Neben den natürlichen Effektormechanismen können auch völlig neue Funktionen in rekombinante Antikörper eingebracht oder scF_v-Derivate mit mehreren, unterschiedlichen Affinitäten hergestellt werden, wodurch sich völlig neue Problemlösungsansätze ergeben^{139,140,240,308,351}.

Aufgrund der nachgewiesenen zentralen Bedeutung der humoralen Immunantwort für das Nicht-Progressieren der hier untersuchten LTNP stellen diese einen vielversprechenden Ausgangspunkt zur Herstellung von scF_v-Phagen Display Bibliotheken dar. Im Gegensatz zu anderen Kohorten ist die Bedeutung genetischer, viraler und immunologischer Faktoren für die nicht-progressierende Infektion detailliert untersucht. Hierbei konnten zahlreiche genetische und virale Faktoren als Ursache für das Nicht-Progressieren ausgeschlossen werden.

Zusätzlich zu den Ergebnissen der Neutralisationsstudie, zeigen Untersuchungen mit HIV-1 spezifischen Peptidphagen, dass einige der hier untersuchten Patientenserum eine außergewöhnliche Reaktivität gegenüber einzelner, ausgewählter HIV-1 Env Epitope besitzen. Zusammen mit der jahrzehntelangen *in vivo* Reifung der Antikörper, lassen diese Ergebnisse weitere Biopanningstudien zur Isolierung HIV-1 spezifischer scF_v-Phagen vielversprechend erscheinen. Neben der Isolierung neuer, möglichst breit-neutralisierender HIV-1 spezifischer scF_v-Phagen, bieten auch die Ergebnisse der durchgeführten Immunisierungsstudien Anlass mit der Herstellung und Isolierung von HIV-1 spezifischen Hybridomazellen fortzufahren. Hierbei sollte neben der Subklonierung der bereits identifizierten HIV-1 spezifischen Klone, vor allem die weitere Optimierung des Immunisierungsprotokolls weiter vorangetrieben werden. Da sich beide Ansätze – direkt oder indirekt – die *in vivo* Reifung der humoralen Immunantwort zu Nutze machen, besitzen beide das Potenzial zur Isolierung neuer, evtl. breit-neutralisierender HIV-1 spezifischer Antikörper und können so bei der Entwicklung einer aktiven oder passiven Vakzine von äußerstem Nutzen sein.

5. Verzeichnisse

5.1. Referenzen

1. Aasa-Chapman, M.M., Hayman, A., Newton, P., Cornforth, D., Williams, I., Borrow, P., Balfe, P. & McKnight, A. Development of the antibody response in acute HIV-1 infection. *Aids* **18**, 371-381 (2004).
2. Ahmad, R., Sindhu, S.T., Toma, E., Morisset, R., Vincelette, J., Menezes, J. & Ahmad, A. Evidence for a correlation between antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated anti-HIV-1 antibodies and prognostic predictors of HIV infection. *Journal of clinical immunology* **21**, 227-233 (2001).
3. Alexander, L., Weiskopf, E., Greenough, T.C., Gaddis, N.C., Auerbach, M.R., Malim, M.H., O'Brien, S.J., Walker, B.D., Sullivan, J.L. & Desrosiers, R.C. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* **74**, 4361-4376 (2000).
4. Arhel, N., Genovesio, A., Kim, K.A., Miko, S., Perret, E., Olivo-Marin, J.C., Shorte, S. & Charneau, P. Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Methods* **3**, 817-824 (2006).
5. Asquith, B., Edwards, C.T., Lipsitch, M. & McLean, A.R. Inefficient cytotoxic T lymphocyte-mediated killing of HIV-1-infected cells in vivo. *PLoS biology* **4**, e90 (2006).
6. Baba, T.W., Liska, V., Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Xu, W., Ayehunie, S., Cavacini, L.A., Posner, M.R., Katinger, H., Stiegler, G., Bernacky, B.J., Rizvi, T.A., Schmidt, R., Hill, L.R., Keeling, M.E., Lu, Y., Wright, J.E., Chou, T.C. & Ruprecht, R.M. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* **6**, 200-206 (2000).
7. Bailey, J., Blankson, J.N., Wind-Rotolo, M. & Siliciano, R.F. Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Current opinion in immunology* **16**, 470-476 (2004).
8. Bailey, J.R., Lassen, K.G., Yang, H.C., Quinn, T.C., Ray, S.C., Blankson, J.N. & Siliciano, R.F. Neutralizing antibodies do not mediate suppression of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors or selection of plasma virus variants in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* **80**, 4758-4770 (2006).
9. Bailey, J.R., Williams, T.M., Siliciano, R.F. & Blankson, J.N. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J Exp Med* **203**, 1357-1369 (2006).
10. Barbas, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K. & Silverman, G.J. *Phage Display: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004).
11. Barker, E., Mackewicz, C.E., Reyes-Teran, G., Sato, A., Stranford, S.A., Fujimura, S.H., Christopherson, C., Chang, S.Y. & Levy, J.A. Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **92**, 3105-3114 (1998).
12. Barouch, D.H., Kunstman, J., Glowczwskie, J., Kunstman, K.J., Egan, M.A., Peyerl, F.W., Santra, S., Kuroda, M.J., Schmitz, J.E., Beaudry, K., Krivulka, G.R., Lifton, M.A., Gorgone, D.A., Wolinsky, S.M. & Letvin, N.L. Viral escape from dominant simian immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in DNA-vaccinated rhesus monkeys. *J Virol* **77**, 7367-7375 (2003).
13. Barouch, D.H., Kunstman, J., Kuroda, M.J., Schmitz, J.E., Santra, S., Peyerl, F.W., Krivulka, G.R., Beaudry, K., Lifton, M.A., Gorgone, D.A., Montefiori, D.C., Lewis, M.G., Wolinsky, S.M. & Letvin, N.L. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **415**, 335-339 (2002).
14. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautuet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired

- immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
15. Baum, L.L., Cassutt, K.J., Knigge, K., Khattri, R., Margolick, J., Rinaldo, C., Kleiberger, C.A., Nishanian, P., Henrard, D.R. & Phair, J. HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression. *J Immunol* **157**, 2168-2173 (1996).
 16. Berger, E.A., Murphy, P.M. & Farber, J.M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**, 657-700 (1999).
 17. Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., De Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., Roederer, M. & Koup, R.A. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* **107**, 4781-4789 (2006).
 18. Binley, J.M., Ditzel, H.J., Barbas, C.F., 3rd, Sullivan, N., Sodroski, J., Parren, P.W. & Burton, D.R. Human antibody responses to HIV type 1 glycoprotein 41 cloned in phage display libraries suggest three major epitopes are recognized and give evidence for conserved antibody motifs in antigen binding. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**, 911-924 (1996).
 19. Binley, J.M., Wrin, T., Korber, B., Zwick, M.B., Wang, M., Chappey, C., Stiegler, G., Kunert, R., Zolla-Pazner, S., Katinger, H., Petropoulos, C.J. & Burton, D.R. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* **78**, 13232-13252 (2004).
 20. Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. & Whitlow, M. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-426 (1988).
 21. Biti, R., Ffrench, R., Young, J., Bennetts, B., Stewart, G. & Liang, T. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med* **3**, 252-253 (1997).
 22. Bjorndal, A., Deng, H., Jansson, M., Fiore, J.R., Colognesi, C., Karlsson, A., Albert, J., Scarlatti, G., Littman, D.R. & Fenyo, E.M. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* **71**, 7478-7487 (1997).
 23. Blaak, H., Brouwer, M., Ran, L.J., de Wolf, F. & Schuitemaker, H. In vitro replication kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in relation to virus load in long-term survivors of HIV-1 infection. *J Infect Dis* **177**, 600-610 (1998).
 24. Blanco, J., Barretina, J., Cabrera, C., Gutierrez, A., Clotet, B. & Este, J.A. CD4(+) and CD8(+) T cell death during human immunodeficiency virus infection in vitro. *Virology* **285**, 356-365 (2001).
 25. Blankson, J.N., Bailey, J.R., Thayil, S., Yang, H.C., Lassen, K., Lai, J., Gandhi, S.K., Siliciano, J.D., Williams, T.M. & Siliciano, R.F. Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *J Virol* **81**, 2508-2518 (2007).
 26. Blankson, J.N., Persaud, D. & Siliciano, R.F. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* **53**, 557-593 (2002).
 27. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M. & Oldstone, M.B. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **68**, 6103-6110 (1994).
 28. Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M.S., Pfeffer, N., Meyers, H., Nelson, J.A., Gairin, J.E., Hahn, B.H., Oldstone, M.B. & Shaw, G.M. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* **3**, 205-211 (1997).
 29. Bosch, V. & Pawlita, M. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 env gene product proteolytic cleavage site. *J Virol* **64**, 2337-2344 (1990).
 30. Bose, B., Khanna, N., Acharya, S.K. & Sinha, S. Generation and characterization of a single-gene mouse-human chimeric antibody against hepatitis B surface antigen. *Journal of gastroenterology and hepatology* **21**, 1439-1447 (2006).
 31. Bottiger, B., Ljunggren, K., Karlsson, A., Krohn, K., Fenyo, E.M., Jondal, M. & Biberfeld, G. Neutralizing antibodies in relation to antibody-dependent cellular cytotoxicity-

- inducing antibodies against human immunodeficiency virus type 1. *Clin Exp Immunol* **73**, 339-342 (1988).
32. Bour, S., Geleziunas, R. & Wainberg, M.A. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiological reviews* **59**, 63-93 (1995).
 33. Bower, J.F., Yang, X., Sodroski, J. & Ross, T.M. Elicitation of neutralizing antibodies with DNA vaccines expressing soluble stabilized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers conjugated to C3d. *J Virol* **78**, 4710-4719 (2004).
 34. Braibant, M., Brunet, S., Costagliola, D., Rouzioux, C., Agut, H., Katinger, H., Autran, B. & Barin, F. Antibodies to conserved epitopes of the HIV-1 envelope in sera from long-term non-progressors: prevalence and association with neutralizing activity. *Aids* **20**, 1923-1930 (2006).
 35. Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. & Stevenson, M. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**, 666-669 (1993).
 36. Burton, D.R., Barbas, C.F., 3rd, Persson, M.A., Koenig, S., Chanock, R.M. & Lerner, R.A. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10134-10137 (1991).
 37. Burton, D.R., Stanfield, R.L. & Wilson, I.A. Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14943-14948 (2005).
 38. Calarese, D.A., Scanlan, C.N., Zwick, M.B., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert, R., Zhu, P., Wormald, M.R., Stanfield, R.L., Roux, K.H., Kelly, J.W., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Katinger, H., Burton, D.R. & Wilson, I.A. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* **300**, 2065-2071 (2003).
 39. Campbell, T.B., Schneider, K., Wrin, T., Petropoulos, C.J. & Connick, E. Relationship between in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication rate and virus load in plasma. *J Virol* **77**, 12105-12112 (2003).
 40. Candotti, D., Costagliola, D., Joberty, C., Bonduelle, O., Rouzioux, C., Autran, B. & Agut, H. Status of long-term asymptomatic HIV-1 infection correlates with viral load but not with virus replication properties and cell tropism. French ALT Study Group. *J Med Virol* **58**, 256-263 (1999).
 41. Cantin, R., Fortin, J.F., Lamontagne, G. & Tremblay, M. The acquisition of host-derived major histocompatibility complex class II glycoproteins by human immunodeficiency virus type 1 accelerates the process of virus entry and infection in human T-lymphoid cells. *Blood* **90**, 1091-1100 (1997).
 42. Cantin, R., Fortin, J.F., Lamontagne, G. & Tremblay, M. The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *J Virol* **71**, 1922-1930 (1997).
 43. Cao, J., Sullivan, N., Desjardin, E., Parolin, C., Robinson, J., Wyatt, R. & Sodroski, J. Replication and neutralization of human immunodeficiency virus type 1 lacking the V1 and V2 variable loops of the gp120 envelope glycoprotein. *J Virol* **71**, 9808-9812 (1997).
 44. Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J. & Ho, D.D. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine* **332**, 201-208 (1995).
 45. Carotenuto, P., Looij, D., Keldermans, L., de Wolf, F. & Goudsmit, J. Neutralizing antibodies are positively associated with CD4+ T-cell counts and T-cell function in long-term AIDS-free infection. *Aids* **12**, 1591-1600 (1998).
 46. Carter, P., Kelley, R.F., Rodrigues, M.L., Snedecor, B., Covarrubias, M., Velligan, M.D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C.E., Carver, M.E. & et al. High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **10**, 163-167 (1992).
 47. Casartelli, N., Di Matteo, G., Argentini, C., Cancrini, C., Bernardi, S., Castelli, G.,

- Scarlatti, G., Plebani, A., Rossi, P. & Doria, M. Structural defects and variations in the HIV-1 nef gene from rapid, slow and non-progressor children. *Aids* **17**, 1291-1301 (2003).
48. Cecilia, D., Kleeberger, C., Munoz, A., Giorgi, J.V. & Zolla-Pazner, S. A longitudinal study of neutralizing antibodies and disease progression in HIV-1-infected subjects. *J Infect Dis* **179**, 1365-1374 (1999).
49. Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. & Kim, P.S. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273 (1997).
50. Chen, B., Vogan, E.M., Gong, H., Skehel, J.J., Wiley, D.C. & Harrison, S.C. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* **433**, 834-841 (2005).
51. Chen, H., Wei, S.Q. & Engelman, A. Multiple integrase functions are required to form the native structure of the human immunodeficiency virus type I intasome. *J Biol Chem* **274**, 17358-17364 (1999).
52. Chen, X., Scala, G., Quinto, I., Liu, W., Chun, T.W., Justement, J.S., Cohen, O.J., vanCott, T.C., Iwanicki, M., Lewis, M.G., Greenhouse, J., Barry, T., Venzon, D. & Fauci, A.S. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes. *Nat Med* **7**, 1225-1231 (2001).
53. Chen, Y., Caruso, L., Shen, C., Wu, H., Zhou, Y. & Gupta, P. Lack of Differences in HIV-1 Nef Functional Domains in Infected Chinese Blood Donors at Different Stages of Disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**, 1150-1154 (2007).
54. Cheng-Mayer, C., Brown, A., Harouse, J., Luciw, P.A. & Mayer, A.J. Selection for neutralization resistance of the simian/human immunodeficiency virus SHIVSF33A variant in vivo by virtue of sequence changes in the extracellular envelope glycoprotein that modify N-linked glycosylation. *J Virol* **73**, 5294-5300 (1999).
55. Chertova, E., Bess Jr, J.W., Jr., Crise, B.J., Sowder, I.R., Schaden, T.M., Hilburn, J.M., Hoxie, J.A., Benveniste, R.E., Lifson, J.D., Henderson, L.E. & Arthur, L.O. Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* **76**, 5315-5325 (2002).
56. Chinen, J. & Shearer, W.T. Molecular virology and immunology of HIV infection. *J Allergy Clin Immunol* **110**, 189-198 (2002).
57. Chohan, B., Lang, D., Sagar, M., Korber, B., Lavreys, L., Richardson, B. & Overbaugh, J. Selection for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J Virol* **79**, 6528-6531 (2005).
58. Chui, C., Cheung, P.K., Brumme, C.J., Mo, T., Brumme, Z.L., Montaner, J.S., Badley, A.D. & Harrigan, P.R. HIV VprR77Q mutation does not influence clinical response of individuals initiating highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**, 615-618 (2006).
59. Churchill, M.J., Chiavaroli, L., Wesselingh, S.L. & Gorry, P.R. Persistence of attenuated HIV-1 rev alleles in an epidemiologically linked cohort of long-term survivors infected with nef-deleted virus. *Retrovirology* **4**, 43 (2007).
60. Churchill, M.J., Rhodes, D.I., Learmont, J.C., Sullivan, J.S., Wesselingh, S.L., Cooke, I.R., Deacon, N.J. & Gorry, P.R. Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef/long terminal repeat sequences in a cohort of long-term survivors infected from a single source. *J Virol* **80**, 1047-1052 (2006).
61. Clavel, F., Guyader, M., Guetard, D., Salle, M., Montagnier, L. & Alizon, M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**, 691-695 (1986).
62. Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. & et al. Human immunodeficiency viruses. *Science* **232**, 697 (1986).
63. Collins, K.L., Chen, B.K., Kalams, S.A., Walker, B.D. & Baltimore, D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*

- 391**, 397-401 (1998).
64. Collis, A.V., Brouwer, A.P. & Martin, A.C. Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J Mol Biol* **325**, 337-354 (2003).
 65. Connor, R.I., Sheridan, K.E., Lai, C., Zhang, L. & Ho, D.D. Characterization of the functional properties of env genes from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **70**, 5306-5311 (1996).
 66. Cordonnier, A., Montagnier, L. & Emerman, M. Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. *Nature* **340**, 571-574 (1989).
 67. Cordonnier, A., Riviere, Y., Montagnier, L. & Emerman, M. Effects of mutations in hyperconserved regions of the extracellular glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 on receptor binding. *J Virol* **63**, 4464-4468 (1989).
 68. Crotti, A., Neri, F., Corti, D., Ghezzi, S., Heltai, S., Baur, A., Poli, G., Santagostino, E. & Vicenzi, E. Nef alleles from human immunodeficiency virus type 1-infected long-term-nonprogressor hemophiliacs with or without late disease progression are defective in enhancing virus replication and CD4 down-regulation. *J Virol* **80**, 10663-10674 (2006).
 69. Cunningham, A.L., Harman, A.N. & Donaghy, H. DC-SIGN 'AIDS' HIV immune evasion and infection. *Nat Immunol* **8**, 556-558 (2007).
 70. Dacheux, L., Moreau, A., Ataman-Onal, Y., Biron, F., Verrier, B. & Barin, F. Evolutionary dynamics of the glycan shield of the human immunodeficiency virus envelope during natural infection and implications for exposure of the 2G12 epitope. *J Virol* **78**, 12625-12637 (2004).
 71. Dayton, A.I., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Goh, W.C. & Haseltine, W.A. The transactivator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**, 941-947 (1986).
 72. de Haard, J.J., Kazemier, B., Oudshoorn, P., Boender, P., van Gemen, B., Koolen, M.J., van der Groen, G., Hoogenboom, H.R. & Arends, J.W. Selection of human anti-human immunodeficiency virus type 1 envelope single-chain antibodies from a peripheral blood cell-based phage repertoire. *J Gen Virol* **79 (Pt 12)**, 2883-2894 (1998).
 73. de Quiros, J.C., Shupert, W.L., McNeil, A.C., Gea-Banacloche, J.C., Flanigan, M., Savage, A., Martino, L., Weiskopf, E.E., Imamichi, H., Zhang, Y.M., Adelsburger, J., Stevens, R., Murphy, P.M., Zimmerman, P.A., Hallahan, C.W., Davey, R.T., Jr. & Connors, M. Resistance to replication of human immunodeficiency virus challenge in SCID-Hu mice engrafted with peripheral blood mononuclear cells of nonprogressors is mediated by CD8(+) T cells and associated with a proliferative response to p24 antigen. *J Virol* **74**, 2023-2028 (2000).
 74. Deacon, N.J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D.J., McPhee, D.A., Greenway, A.L., Ellett, A., Chatfield, C., Lawson, V.A., Crowe, S., Maerz, A., Sonza, S., Learmont, J., Sullivan, J.S., Cunningham, A., Dwyer, D., Dutton, D. & Mills, J. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**, 988-991 (1995).
 75. Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Smith, M.W., Allikmets, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., Donfield, S., Vlahov, D., Kaslow, R., Saah, A., Rinaldo, C., Detels, R. & O'Brien, S.J. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* **273**, 1856-1862 (1996).
 76. Deeks, S.G., Schweighardt, B., Wrin, T., Galovich, J., Hoh, R., Sinclair, E., Hunt, P., McCune, J.M., Martin, J.N., Petropoulos, C.J. & Hecht, F.M. Neutralizing antibody responses against autologous and heterologous viruses in acute versus chronic human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence for a constraint on the ability of HIV to completely evade neutralizing antibody responses. *J Virol* **80**, 6155-6164 (2006).
 77. den Uyl, D., van der Horst-Bruinsma, I.E. & van Agtmael, M. Progression of HIV to

- AIDS: a protective role for HLA-B27? *AIDS Rev* **6**, 89-96 (2004).
78. Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R. & Landau, N.R. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666 (1996).
79. Devico, A., Fouts, T., Lewis, G.K., Gallo, R.C., Godfrey, K., Charurat, M., Harris, I., Galmin, L. & Pal, R. Antibodies to CD4-induced sites in HIV gp120 correlate with the control of SHIV challenge in macaques vaccinated with subunit immunogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17477-17482 (2007).
80. Dietrich, U., Adamski, M., Kreutz, R., Seipp, A., Kuhnel, H. & Rubsamen-Waigmann, H. A highly divergent HIV-2-related isolate. *Nature* **342**, 948-950 (1989).
81. Draenert, R., Allen, T.M., Liu, Y., Wrin, T., Chappey, C., Verrill, C.L., Sirera, G., Eldridge, R.L., Lahaie, M.P., Ruiz, L., Clotet, B., Petropoulos, C.J., Walker, B.D. & Martinez-Picado, J. Constraints on HIV-1 evolution and immunodominance revealed in monozygotic adult twins infected with the same virus. *J Exp Med* **203**, 529-539 (2006).
82. Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P. & Paxton, W.A. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673 (1996).
83. Earl, P.L. & Moss, B. Mutational analysis of the assembly domain of the HIV-1 envelope glycoprotein. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 589-594 (1993).
84. Emini, E.A., Schleif, W.A., Nunberg, J.H., Conley, A.J., Eda, Y., Tokiyoshi, S., Putney, S.D., Matsushita, S., Cobb, K.E., Jett, C.M. & et al. Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature* **355**, 728-730 (1992).
85. Engering, A., Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Wijers, M., van Liempt, E., Demarex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C.G., Piguet, V. & van Kooyk, Y. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* **168**, 2118-2126 (2002).
86. Etemad-Moghadam, B., Sun, Y., Nicholson, E.K., Fernandes, M., Liou, K., Gomila, R., Lee, J. & Sodroski, J. Envelope glycoprotein determinants of increased fusogenicity in a pathogenic simian-human immunodeficiency virus (SHIV-KB9) passaged in vivo. *J Virol* **74**, 4433-4440 (2000).
87. Etemad-Moghadam, B., Sun, Y., Nicholson, E.K., Karlsson, G.B., Schenten, D. & Sodroski, J. Determinants of neutralization resistance in the envelope glycoproteins of a simian-human immunodeficiency virus passaged in vivo. *J Virol* **73**, 8873-8879 (1999).
88. Fassati, A. & Goff, S.P. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**, 3626-3635 (2001).
89. Feeney, M.E., Tang, Y., Roosevelt, K.A., Leslie, A.J., McIntosh, K., Karthas, N., Walker, B.D. & Goulder, P.J. Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term-nonprogressing child. *J Virol* **78**, 8927-8930 (2004).
90. Feldhaus, M.J., Siegel, R.W., Opresko, L.K., Coleman, J.R., Feldhaus, J.M., Yeung, Y.A., Cochran, J.R., Heinzelman, P., Colby, D., Swers, J., Graff, C., Wiley, H.S. & Wittrup, K.D. Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat Biotechnol* **21**, 163-170 (2003).
91. Fernandez, C.S., Stratov, I., De Rose, R., Walsh, K., Dale, C.J., Smith, M.Z., Agy, M.B., Hu, S.L., Krebs, K., Watkins, D.I., O'Connor D, H., Davenport, M.P. & Kent, S.J. Rapid viral escape at an immunodominant simian-human immunodeficiency virus cytotoxic T-lymphocyte epitope exacts a dramatic fitness cost. *J Virol* **79**, 5721-5731 (2005).
92. Ferrantelli, F., Rasmussen, R.A., Buckley, K.A., Li, P.L., Wang, T., Montefiori, D.C., Katinger, H., Stiegler, G., Anderson, D.C., McClure, H.M. & Ruprecht, R.M. Complete protection of neonatal rhesus macaques against oral exposure to pathogenic simian-

- human immunodeficiency virus by human anti-HIV monoclonal antibodies. *J Infect Dis* **189**, 2167-2173 (2004).
93. Fischer, A., Lejczak, C., Lambert, C., Roman, F., Servais, J., Karita, E., Allen, S., Schmit, J.C. & Arendt, V. Is the Vpr R77Q mutation associated with long-term non-progression of HIV infection? *Aids* **18**, 1346-1347 (2004).
 94. Fisher, A.G., Feinberg, M.B., Josephs, S.F., Harper, M.E., Marselle, L.M., Reyes, G., Gonda, M.A., Aldovini, A., Debouk, C., Gallo, R.C. & et al. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**, 367-371 (1986).
 95. Fortin, J.F., Cantin, R. & Tremblay, M.J. T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. *J Virol* **72**, 2105-2112 (1998).
 96. Fouts, T.R., Binley, J.M., Trkola, A., Robinson, J.E. & Moore, J.P. Neutralization of the human immunodeficiency virus type 1 primary isolate JR-FL by human monoclonal antibodies correlates with antibody binding to the oligomeric form of the envelope glycoprotein complex. *J Virol* **71**, 2779-2785 (1997).
 97. Fox, D.G., Balfe, P., Palmer, C.P., May, J.C., Arnold, C. & McKeating, J.A. Length polymorphism within the second variable region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein affects accessibility of the receptor binding site. *J Virol* **71**, 759-765 (1997).
 98. Francisco, J.A., Campbell, R., Iverson, B.L. & Georgiou, G. Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10444-10448 (1993).
 99. Freed, E.O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**, 1-15 (1998).
 100. Freed, E.O. HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics* **26**, 13-33 (2001).
 101. Freed, E.O. & Martin, M.A. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem* **270**, 23883-23886 (1995).
 102. Frost, S.D., Wrin, T., Smith, D.M., Kosakovsky Pond, S.L., Liu, Y., Paxinos, E., Chappay, C., Galovich, J., Beauchaine, J., Petropoulos, C.J., Little, S.J. & Richman, D.D. Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18514-18519 (2005).
 103. Fuchs, P., Weichel, W., Dubel, S., Breitling, F. & Little, M. Separation of E. coli expressing functional cell-wall bound antibody fragments by FACS. *Immunotechnology* **2**, 97-102 (1996).
 104. Gallay, P., Hope, T., Chin, D. & Trono, D. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9825-9830 (1997).
 105. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B. & et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503 (1984).
 106. Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J. & Popovic, M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865-867 (1983).
 107. Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M. & Hahn, B.H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* **397**, 436-441 (1999).
 108. Gao, F., Weaver, E.A., Lu, Z., Li, Y., Liao, H.X., Ma, B., Alam, S.M., Scarce, R.M., Sutherland, L.L., Yu, J.S., Decker, J.M., Shaw, G.M., Montefiori, D.C., Korber, B.T., Hahn, B.H. & Haynes, B.F. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein. *J Virol* **79**, 1154-1163 (2005).
 109. Gao, F., Yue, L., White, A.T., Pappas, P.G., Barchue, J., Hanson, A.P., Greene, B.M.,

- Sharp, P.M., Shaw, G.M. & Hahn, B.H. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**, 495-499 (1992).
110. Gao, X., Bashirova, A., Iversen, A.K., Phair, J., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Altfield, M., O'Brien, S.J. & Carrington, M. AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* **11**, 1290-1292 (2005).
111. Geels, M.J., Cornelissen, M., Schuitemaker, H., Anderson, K., Kwa, D., Maas, J., Dekker, J.T., Baan, E., Zorgdrager, F., van den Burg, R., van Beelen, M., Lukashov, V.V., Fu, T.M., Paxton, W.A., van der Hoek, L., Dubey, S.A., Shiver, J.W. & Goudsmit, J. Identification of sequential viral escape mutants associated with altered T-cell responses in a human immunodeficiency virus type 1-infected individual. *J Virol* **77**, 12430-12440 (2003).
112. Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G. & van Kooyk, Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587-597 (2000).
113. Gillespie, G.M., Stewart-Jones, G., Rengasamy, J., Beattie, T., Bwayo, J.J., Plummer, F.A., Kaul, R., McMichael, A.J., Easterbrook, P., Dong, T., Jones, E.Y. & Rowland-Jones, S.L. Strong TCR conservation and altered T cell cross-reactivity characterize a B*57-restricted immune response in HIV-1 infection. *J Immunol* **177**, 3893-3902 (2006).
114. Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I. & Pluckthun, A. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* **29**, 1362-1367 (1990).
115. Goff, S.P. Intracellular trafficking of retroviral genomes during the early phase of infection: viral exploitation of cellular pathways. *The journal of gene medicine* **3**, 517-528 (2001).
116. Gorny, M.K., Conley, A.J., Karwowska, S., Buchbinder, A., Xu, J.Y., Emini, E.A., Koenig, S. & Zolla-Pazner, S. Neutralization of diverse human immunodeficiency virus type 1 variants by an anti-V3 human monoclonal antibody. *J Virol* **66**, 7538-7542 (1992).
117. Gorny, M.K., Revesz, K., Williams, C., Volsky, B., Louder, M.K., Anyangwe, C.A., Krachmarov, C., Kayman, S.C., Pinter, A., Nadas, A., Nyambi, P.N., Mascola, J.R. & Zolla-Pazner, S. The v3 loop is accessible on the surface of most human immunodeficiency virus type 1 primary isolates and serves as a neutralization epitope. *J Virol* **78**, 2394-2404 (2004).
118. Gorny, M.K., VanCott, T.C., Hioe, C., Israel, Z.R., Michael, N.L., Conley, A.J., Williams, C., Kessler, J.A., 2nd, Chigurupati, P., Burda, S. & Zolla-Pazner, S. Human monoclonal antibodies to the V3 loop of HIV-1 with intra- and interclade cross-reactivity. *J Immunol* **159**, 5114-5122 (1997).
119. Gorny, M.K., Williams, C., Volsky, B., Revesz, K., Cohen, S., Polonis, V.R., Honnen, W.J., Kayman, S.C., Krachmarov, C., Pinter, A. & Zolla-Pazner, S. Human monoclonal antibodies specific for conformation-sensitive epitopes of V3 neutralize human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from various clades. *J Virol* **76**, 9035-9045 (2002).
120. Gorny, M.K., Xu, J.Y., Karwowska, S., Buchbinder, A. & Zolla-Pazner, S. Repertoire of neutralizing human monoclonal antibodies specific for the V3 domain of HIV-1 gp120. *J Immunol* **150**, 635-643 (1993).
121. Gorry, P.R., McPhee, D.A., Verity, E., Dyer, W.B., Wesselingh, S.L., Learmont, J., Sullivan, J.S., Roche, M., Zaunders, J.J., Gabuzda, D., Crowe, S.M., Mills, J., Lewin, S.R., Brew, B.J., Cunningham, A.L. & Churchill, M.J. Pathogenicity and immunogenicity of attenuated, nef-deleted HIV-1 strains in vivo. *Retrovirology* **4**, 66 (2007).
122. Goulder, P.J., Phillips, R.E., Colbert, R.A., McAdam, S., Ogg, G., Nowak, M.A., Gianfranco, P., Luzzi, G., Morgan, B., Edwards, A., McMichael, A.J. & Rowland-Jones, S. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* **3**, 212-217 (1997).
123. Greene, W.C. & Peterlin, B.M. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* **8**, 673-680 (2002).

124. Grovit-Ferbas, K., Ferbas, J., Gudeman, V., Sadeghi, S., Goetz, M.B., Giorgi, J.V., Chen, I.S. & O'Brien, W.A. Potential contributions of viral envelope and host genetic factors in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor. *J Virol* **72**, 8650-8658 (1998).
125. Grundner, C., Mirzabekov, T., Sodroski, J. & Wyatt, R. Solid-phase proteoliposomes containing human immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J Virol* **76**, 3511-3521 (2002).
126. Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D. & Garten, W. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**, 358-361 (1992).
127. Han, Z., Karatan, E., Scholle, M.D., McCafferty, J. & Kay, B.K. Accelerated screening of phage-display output with alkaline phosphatase fusions. *Comb Chem High Throughput Screen* **7**, 55-62 (2004).
128. Hanes, J. & Pluckthun, A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4937-4942 (1997).
129. Heeney, J.L., Dalgleish, A.G. & Weiss, R.A. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* **313**, 462-466 (2006).
130. Heinzinger, N.K., Bukinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Stevenson, M. & Emerman, M. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7311-7315 (1994).
131. Hendel, H., Caillat-Zucman, S., Lebuanec, H., Carrington, M., O'Brien, S., Andrieu, J.M., Schachter, F., Zagury, D., Rappaport, J., Winkler, C., Nelson, G.W. & Zagury, J.F. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol* **162**, 6942-6946 (1999).
132. Hendel, H., Henon, N., Lebuanec, H., Lachgar, A., Poncelet, H., Caillat-Zucman, S., Winkler, C.A., Smith, M.W., Kenefic, L., O'Brien, S., Lu, W., Andrieu, J.M., Zagury, D., Schachter, F., Rappaport, J. & Zagury, J.F. Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **19**, 381-386 (1998).
133. Herrera, C., Klasse, P.J., Michael, E., Kake, S., Barnes, K., Kibler, C.W., Campbell-Gardener, L., Si, Z., Sodroski, J., Moore, J.P. & Beddows, S. The impact of envelope glycoprotein cleavage on the antigenicity, infectivity, and neutralization sensitivity of Env-pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 particles. *Virology* **338**, 154-172 (2005).
134. Hessell, A.J., Hangartner, L., Hunter, M., Havenith, C.E., Beurskens, F.J., Bakker, J.M., Lanigan, C.M., Landucci, G., Forthal, D.N., Parren, P.W., Marx, P.A. & Burton, D.R. Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* **449**, 101-104 (2007).
135. Hioe, C.E., Xu, S., Chigurupati, P., Burda, S., Williams, C., Gorny, M.K. & Zolla-Pazner, S. Neutralization of HIV-1 primary isolates by polyclonal and monoclonal human antibodies. *Int Immunol* **9**, 1281-1290 (1997).
136. Hoffman, T.L., LaBranche, C.C., Zhang, W., Canziani, G., Robinson, J., Chaiken, I., Hoxie, J.A. & Doms, R.W. Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6359-6364 (1999).
137. Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Rasmussen, R.A., Smith, B.A., Baba, T.W., Liska, V., Ferrantelli, F., Montefiori, D.C., McClure, H.M., Anderson, D.C., Bernacky, B.J., Rizvi, T.A., Schmidt, R., Hill, L.R., Keeling, M.E., Katinger, H., Stiegler, G., Cavacini, L.A., Posner, M.R., Chou, T.C., Andersen, J. & Ruprecht, R.M. Postnatal passive immunization of neonatal macaques with a triple combination of human monoclonal antibodies against oral simian-human immunodeficiency virus challenge. *J Virol* **75**, 7470-7480 (2001).
138. Holl, V., Peressin, M., Decoville, T., Schmidt, S., Zolla-Pazner, S., Aubertin, A.M. & Moog, C. Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency vi-

- rus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. *J Virol* **80**, 6177-6181 (2006).
139. Holliger, P. & Hudson, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **23**, 1126-1136 (2005).
140. Holliger, P., Wing, M., Pound, J.D., Bohlen, H. & Winter, G. Retargeting serum immunoglobulin with bispecific diabodies. *Nat Biotechnol* **15**, 632-636 (1997).
141. Hoxie, J.A., LaBranche, C.C., Endres, M.J., Turner, J.D., Berson, J.F., Doms, R.W. & Matthews, T.J. CD4-independent utilization of the CXCR4 chemokine receptor by HIV-1 and HIV-2. *Journal of reproductive immunology* **41**, 197-211 (1998).
142. Huang, C.C., Tang, M., Zhang, M.Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R.L., Dimitrov, D.S., Korber, B., Sodroski, J., Wilson, I.A., Wyatt, R. & Kwong, P.D. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **310**, 1025-1028 (2005).
143. Huang, C.C., Venturi, M., Majeed, S., Moore, M.J., Phogat, S., Zhang, M.Y., Dimitrov, D.S., Hendrickson, W.A., Robinson, J., Sodroski, J., Wyatt, R., Choe, H., Farzan, M. & Kwong, P.D. Structural basis of tyrosine sulfation and VH-gene usage in antibodies that recognize the HIV type 1 coreceptor-binding site on gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2706-2711 (2004).
144. Huang, M., Orenstein, J.M., Martin, M.A. & Freed, E.O. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* **69**, 6810-6818 (1995).
145. Huang, Y., Paxton, W.A., Wolinsky, S.M., Neumann, A.U., Zhang, L., He, T., Kang, S., Ceradini, D., Jin, Z., Yazdanbakhsh, K., Kunstman, K., Erickson, D., Dragon, E., Landau, N.R., Phair, J., Ho, D.D. & Koup, R.A. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* **2**, 1240-1243 (1996).
146. Huang, Y., Zhang, L. & Ho, D.D. Biological characterization of nef in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **69**, 8142-8146 (1995).
147. Huang, Y., Zhang, L. & Ho, D.D. Characterization of nef sequences in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **69**, 93-100 (1995).
148. Huang, Y., Zhang, L. & Ho, D.D. Characterization of gag and pol sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* **240**, 36-49 (1998).
149. Huber, M. & Trkola, A. Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *Journal of internal medicine* **262**, 5-25 (2007).
150. Hudson, P.J. & Kortt, A.A. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *J Immunol Methods* **231**, 177-189 (1999).
151. Humbert, M., Antoni, S., Brill, B., Landersz, M., Rodes, B., Soriano, V., Wintergerst, U., Knechten, H., Staszewski, S., von Laer, D., Dittmar, M.T. & Dietrich, U. Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. *Eur J Immunol* **37**, 501-515 (2007).
152. Hust, M. & Dubel, S. Mating antibody phage display with proteomics. *Trends in biotechnology* **22**, 8-14 (2004).
153. Hutto, C., Zhou, Y., He, J., Geffin, R., Hill, M., Scott, W. & Wood, C. Longitudinal studies of viral sequence, viral phenotype, and immunologic parameters of human immunodeficiency virus type 1 infection in perinatally infected twins with discordant disease courses. *J Virol* **70**, 3589-3598 (1996).
154. Iversen, A.K., Shpaer, E.G., Rodrigo, A.G., Hirsch, M.S., Walker, B.D., Sheppard, H.W., Merigan, T.C. & Mullins, J.I. Persistence of attenuated rev genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected asymptomatic individual. *J Virol* **69**, 5743-5753 (1995).
155. Iversen, A.K., Stewart-Jones, G., Learn, G.H., Christie, N., Sylvester-Hviid, C., Armitage, A.E., Kaul, R., Beattie, T., Lee, J.K., Li, Y., Chotiyarnwong, P., Dong, T., Xu, X., Luscher, M.A., MacDonald, K., Ullum, H., Klarlund-Pedersen, B., Skinhoj, P., Fugger, L., Buus, S., Mullins, J.I., Jones, E.Y., van der Merwe, P.A. & McMichael, A.J. Conflicting selective forces affect T cell receptor contacts in an immunodominant human immunodeficiency virus epitope. *Nat Immunol* **7**, 179-189 (2006).
156. Jakobovits, A. Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Current opi-*

- nion in biotechnology* **6**, 561-566 (1995).
157. Jeeninga, R.E., Jan, B., van den Berg, H. & Berkhout, B. Construction of doxycycline-dependent mini-HIV-1 variants for the development of a virotherapy against leukemias. *Retrovirology* **3**, 64 (2006).
 158. Jones, N.A., Wei, X., Flower, D.R., Wong, M., Michor, F., Saag, M.S., Hahn, B.H., Nowak, M.A., Shaw, G.M. & Borrow, P. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8+ cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* **200**, 1243-1256 (2004).
 159. Karlsson, A.C., Iversen, A.K., Chapman, J.M., de Oliveira, T., Spotts, G., McMichael, A.J., Davenport, M.P., Hecht, F.M. & Nixon, D.F. Sequential broadening of CTL responses in early HIV-1 infection is associated with viral escape. *PLoS ONE* **2**, e225 (2007).
 160. Kaslow, R.A., Carrington, M., Apple, R., Park, L., Munoz, A., Saah, A.J., Goedert, J.J., Winkler, C., O'Brien, S.J., Rinaldo, C., Detels, R., Blattner, W., Phair, J., Erlich, H. & Mann, D.L. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* **2**, 405-411 (1996).
 161. Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E.M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J.F., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Peeters, M. & Hahn, B.H. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* **313**, 523-526 (2006).
 162. Kestler, H.W., 3rd, Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D. & Desrosiers, R.C. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**, 651-662 (1991).
 163. Kim, M., Qiao, Z.S., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Reinherz, E.L. & Liao, H.X. Comparison of HIV Type 1 ADA gp120 monomers versus gp140 trimers as immunogens for the induction of neutralizing antibodies. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 58-67 (2005).
 164. Kirchhoff, F., Easterbrook, P.J., Douglas, N., Troop, M., Greenough, T.C., Weber, J., Carl, S., Sullivan, J.L. & Daniels, R.S. Sequence variations in human immunodeficiency virus type 1 Nef are associated with different stages of disease. *J Virol* **73**, 5497-5508 (1999).
 165. Kirsch, M., Zaman, M., Meier, D., Dubel, S. & Hust, M. Parameters affecting the display of antibodies on phage. *J Immunol Methods* **301**, 173-185 (2005).
 166. Koch, M., Pancera, M., Kwong, P.D., Kolchinsky, P., Grundner, C., Wang, L., Hendrickson, W.A., Sodroski, J. & Wyatt, R. Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology* **313**, 387-400 (2003).
 167. Kolchinsky, P., Kiprilov, E., Bartley, P., Rubinstein, R. & Sodroski, J. Loss of a single N-linked glycan allows CD4-independent human immunodeficiency virus type 1 infection by altering the position of the gp120 V1/V2 variable loops. *J Virol* **75**, 3435-3443 (2001).
 168. Kondo, M., Shima, T., Nishizawa, M., Sudo, K., Iwamuro, S., Okabe, T., Takebe, Y. & Imai, M. Identification of attenuated variants of HIV-1 circulating recombinant form 01_AE that are associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the nef/long terminal repeat sequences. *J Infect Dis* **192**, 56-61 (2005).
 169. Kontermann, R.E., Wing, M.G. & Winter, G. Complement recruitment using bispecific diabodies. *Nat Biotechnol* **15**, 629-631 (1997).
 170. Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C. & Detours, V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* **58**, 19-42 (2001).
 171. Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B.H., Wolinsky, S. & Bhattacharya, T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**, 1789-1796 (2000).
 172. Korber, B. & Myers, G. Signature pattern analysis: a method for assessing viral sequence relatedness. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**, 1549-1560 (1992).

173. Korber, B., Theiler, J. & Wolinsky, S. Limitations of a molecular clock applied to considerations of the origin of HIV-1. *Science* **280**, 1868-1871 (1998).
174. Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C. & Ho, D.D. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* **68**, 4650-4655 (1994).
175. Kuhnel, H., von Briesen, H., Dietrich, U., Adamski, M., Mix, D., Biesert, L., Kreutz, R., Immelmann, A., Henco, K., Meichsner, C. & et al. Molecular cloning of two west African human immunodeficiency virus type 2 isolates that replicate well in macrophages: a Gambian isolate, from a patient with neurologic acquired immunodeficiency syndrome, and a highly divergent Ghanian isolate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2383-2387 (1989).
176. Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A. & Littman, D.R. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* **16**, 135-144 (2002).
177. Kwong, P.D. The 447-52D antibody: hitting HIV-1 where its armor is thickest. *Structure* **12**, 173-174 (2004).
178. Kwong, P.D., Doyle, M.L., Casper, D.J., Cicala, C., Leavitt, S.A., Majeed, S., Steenbeke, T.D., Venturi, M., Chaiken, I., Fung, M., Katinger, H., Parren, P.W., Robinson, J., Van Ryk, D., Wang, L., Burton, D.R., Freire, E., Wyatt, R., Sodroski, J., Hendrickson, W.A. & Arthos, J. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**, 678-682 (2002).
179. Kwong, P.D., Wyatt, R., Majeed, S., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J. & Hendrickson, W.A. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure Fold Des* **8**, 1329-1339 (2000).
180. Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J. & Hendrickson, W.A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648-659 (1998).
181. Kwong, P.D., Wyatt, R., Sattentau, Q.J., Sodroski, J. & Hendrickson, W.A. Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol* **74**, 1961-1972 (2000).
182. Labrijn, A.F., Poignard, P., Raja, A., Zwick, M.B., Delgado, K., Franti, M., Binley, J., Vivona, V., Grundner, C., Huang, C.C., Venturi, M., Petropoulos, C.J., Wrin, T., Dimitrov, D.S., Robinson, J., Kwong, P.D., Wyatt, R.T., Sodroski, J. & Burton, D.R. Access of antibody molecules to the conserved coreceptor binding site on glycoprotein gp120 is sterically restricted on primary human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **77**, 10557-10565 (2003).
183. Lasky, L.A., Nakamura, G., Smith, D.H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T. & Capon, D.J. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50**, 975-985 (1987).
184. Lavreys, L., Baeten, J.M., Chohan, V., McClelland, R.S., Hassan, W.M., Richardson, B.A., Mandaliya, K., Ndinya-Achola, J.O. & Overbaugh, J. Higher set point plasma viral load and more-severe acute HIV type 1 (HIV-1) illness predict mortality among high-risk HIV-1-infected African women. *Clin Infect Dis* **42**, 1333-1339 (2006).
185. Layne, S.P., Merges, M.J., Dembo, M., Spouge, J.L., Conley, S.R., Moore, J.P., Raina, J.L., Renz, H., Gelderblom, H.R. & Nara, P.L. Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology* **189**, 695-714 (1992).
186. Learmont, J.C., Geczy, A.F., Mills, J., Ashton, L.J., Raynes-Greenow, C.H., Garsia, R.J., Dyer, W.B., McIntyre, L., Oelrichs, R.B., Rhodes, D.I., Deacon, N.J. & Sullivan, J.S. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *The New England journal of medicine* **340**, 1715-1722 (1999).
187. Leitner, T., Foley, B., Hahn, B.H., Marx, P.A., McCutchan, F.E., Mellors, J.W., Wolinsky, S. & Korber, B. *HIV Sequence Compendium 2006/2007*, (Theoretical Biology

- and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, NM, LA-UR 07-4826, 2007).
188. Leslie, A., Kavanagh, D., Honeyborne, I., Pfafferott, K., Edwards, C., Pillay, T., Hilton, L., Thobakgale, C., Ramduth, D., Draenert, R., Le Gall, S., Luzzi, G., Edwards, A., Brander, C., Sewell, A.K., Moore, S., Mullins, J., Moore, C., Mallal, S., Bhardwaj, N., Yusim, K., Phillips, R., Klenerman, P., Korber, B., Kiepiela, P., Walker, B. & Goulder, P. Transmission and accumulation of CTL escape variants drive negative associations between HIV polymorphisms and HLA. *J Exp Med* **201**, 891-902 (2005).
 189. Letvin, N.L. Progress toward an HIV vaccine. *Annu Rev Med* **56**, 213-223 (2005).
 190. Letvin, N.L., Barouch, D.H. & Montefiori, D.C. Prospects for vaccine protection against HIV-1 infection and AIDS. *Annu Rev Immunol* **20**, 73-99 (2002).
 191. Lewis, A.D., Chen, R., Montefiori, D.C., Johnson, P.R. & Clark, K.R. Generation of neutralizing activity against human immunodeficiency virus type 1 in serum by antibody gene transfer. *J Virol* **76**, 8769-8775 (2002).
 192. Li, Y., Svehla, K., Mathy, N.L., Voss, G., Mascola, J.R. & Wyatt, R. Characterization of antibody responses elicited by human immunodeficiency virus type 1 primary isolate trimeric and monomeric envelope glycoproteins in selected adjuvants. *J Virol* **80**, 1414-1426 (2006).
 193. Liao, Z., Cimasky, L.M., Hampton, R., Nguyen, D.H. & Hildreth, J.E. Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 1009-1019 (2001).
 194. Liao, Z., Graham, D.R. & Hildreth, J.E. Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**, 675-687 (2003).
 195. Lindwasser, O.W. & Resh, M.D. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol* **75**, 7913-7924 (2001).
 196. Liu, L.X., Heveker, N., Fackler, O.T., Arold, S., Le Gall, S., Janvier, K., Peterlin, B.M., Dumas, C., Schwartz, O., Benichou, S. & Benarous, R. Mutation of a conserved residue (D123) required for oligomerization of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein abolishes interaction with human thioesterase and results in impairment of Nef biological functions. *J Virol* **74**, 5310-5319 (2000).
 197. Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A. & Landau, N.R. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367-377 (1996).
 198. Liu, Y., McNevin, J., Zhao, H., Tebit, D.M., McSweyn, M., Ghosh, A.K., Shriner, D., Arts, E.J., McElrath, M.J. & Mullins, J.I. Evolution of HIV-1 CTL epitopes: Fitness-Balanced Escape. *J Virol* (2007).
 199. Ljunggren, K., Moschese, V., Broliden, P.A., Giaquinto, C., Quinti, I., Fenyo, E.M., Wahren, B., Rossi, P. & Jondal, M. Antibodies mediating cellular cytotoxicity and neutralization correlate with a better clinical stage in children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *J Infect Dis* **161**, 198-202 (1990).
 200. Lonberg, N. & Huszar, D. Human antibodies from transgenic mice. *International reviews of immunology* **13**, 65-93 (1995).
 201. Louder, M.K., Sambor, A., Chertova, E., Hunte, T., Barrett, S., Ojong, F., Sanders-Buell, E., Zolla-Pazner, S., McCutchan, F.E., Roser, J.D., Gabuzda, D., Lifson, J.D. & Mascola, J.R. HIV-1 envelope pseudotyped viral vectors and infectious molecular clones expressing the same envelope glycoprotein have a similar neutralization phenotype, but culture in peripheral blood mononuclear cells is associated with decreased neutralization sensitivity. *Virology* **339**, 226-238 (2005).
 202. Lum, J.J., Cohen, O.J., Nie, Z., Weaver, J.G., Gomez, T.S., Yao, X.J., Lynch, D., Pilon, A.A., Hawley, N., Kim, J.E., Chen, Z., Montpetit, M., Sanchez-Dardon, J., Cohen, E.A. & Badley, A.D. Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J Clin Invest* **111**, 1547-1554 (2003).
 203. Ly, A. & Stamatatos, L. V2 loop glycosylation of the human immunodeficiency virus type 1 SF162 envelope facilitates interaction of this protein with CD4 and CCR5 re-

- ceptors and protects the virus from neutralization by anti-V3 loop and anti-CD4 binding site antibodies. *J Virol* **74**, 6769-6776 (2000).
204. Magierowska, M., Theodorou, I., Debre, P., Sanson, F., Autran, B., Riviere, Y., Charon, D. & Costagliola, D. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood* **93**, 936-941 (1999).
205. Mariani, R., Kirchhoff, F., Greenough, T.C., Sullivan, J.L., Desrosiers, R.C. & Skowronski, J. High frequency of defective nef alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **70**, 7752-7764 (1996).
206. Marmor, M., Sheppard, H.W., Donnell, D., Bozeman, S., Celum, C., Buchbinder, S., Koblin, B. & Seage, G.R., 3rd. Homozygous and heterozygous CCR5-Delta32 genotypes are associated with resistance to HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **27**, 472-481 (2001).
207. Marozsan, A.J., Moore, D.M., Lobritz, M.A., Fraundorf, E., Abraha, A., Reeves, J.D. & Arts, E.J. Differences in the fitness of two diverse wild-type human immunodeficiency virus type 1 isolates are related to the efficiency of cell binding and entry. *J Virol* **79**, 7121-7134 (2005).
208. Martin, J., LaBranche, C.C. & Gonzalez-Scarano, F. Differential CD4/CCR5 utilization, gp120 conformation, and neutralization sensitivity between envelopes from a microglia-adapted human immunodeficiency virus type 1 and its parental isolate. *J Virol* **75**, 3568-3580 (2001).
209. Martinson, J.J., Chapman, N.H., Rees, D.C., Liu, Y.T. & Clegg, J.B. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* **16**, 100-103 (1997).
210. Masciotra, S., Owen, S.M., Rudolph, D., Yang, C., Wang, B., Saksena, N., Spira, T., Dhawan, S. & Lal, R.B. Temporal relationship between V1V2 variation, macrophage replication, and coreceptor adaptation during HIV-1 disease progression. *Aids* **16**, 1887-1898 (2002).
211. Mascola, J.R., Stiegler, G., VanCott, T.C., Katinger, H., Carpenter, C.B., Hanson, C.E., Beary, H., Hayes, D., Frankel, S.S., Birx, D.L. & Lewis, M.G. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* **6**, 207-210 (2000).
212. Mazzucchelli, R., Corvasce, S., Violin, M., Riva, C., Bianchi, R., Deho, L., Velleca, R., Cibella, J., Bada, M., Moroni, M., Galli, M. & Balotta, C. Role of CCR5, CCR2 and SDF-1 gene polymorphisms in a population of HIV-1 infected individuals. *J Biol Regul Homeost Agents* **15**, 265-271 (2001).
213. McCaffrey, R.A., Saunders, C., Hensel, M. & Stamatatos, L. N-linked glycosylation of the V3 loop and the immunologically silent face of gp120 protects human immunodeficiency virus type 1 SF162 from neutralization by anti-gp120 and anti-gp41 antibodies. *J Virol* **78**, 3279-3295 (2004).
214. Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Jr., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A. & Kingsley, L.A. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**, 1167-1170 (1996).
215. Mersmann, M., Schmidt, A., Tesar, M., Schoneberg, A., Welschof, M., Kipriyanov, S., Terness, P., Little, M., Pfizenmaier, K. & Moosmayer, D. Monitoring of scFv selected by phage display using detection of scFv-pIII fusion proteins in a microtiter scale assay. *J Immunol Methods* **220**, 51-58 (1998).
216. Michael, N.L., Chang, G., d'Arcy, L.A., Ehrenberg, P.K., Mariani, R., Busch, M.P., Birx, D.L. & Schwartz, D.H. Defective accessory genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected long-term survivor lacking recoverable virus. *J Virol* **69**, 4228-4236 (1995).
217. Michael, N.L., Louie, L.G., Rohrbaugh, A.L., Schultz, K.A., Dayhoff, D.E., Wang, C.E. & Sheppard, H.W. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* **3**, 1160-1162 (1997).
218. Migueles, S.A., Laborico, A.C., Imamichi, H., Shupert, W.L., Royce, C., McLaughlin, M., Ehler, L., Metcalf, J., Liu, S., Hallahan, C.W. & Connors, M. The differential ability

- of HLA B*5701+ long-term nonprogressors and progressors to restrict human immunodeficiency virus replication is not caused by loss of recognition of autologous viral gag sequences. *J Virol* **77**, 6889-6898 (2003).
219. Migueles, S.A., Laborico, A.C., Shupert, W.L., Sabbaghian, M.S., Rabin, R., Hallahan, C.W., Van Baarle, D., Kostense, S., Miedema, F., McLaughlin, M., Ehler, L., Metcalf, J., Liu, S. & Connors, M. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* **3**, 1061-1068 (2002).
220. Migueles, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., Hallahan, C.W., Selig, S.M., Schwartz, D., Sullivan, J. & Connors, M. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2709-2714 (2000).
221. Mikhail, M., Wang, B. & Saksena, N.K. Mechanisms involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev* **5**, 230-244 (2003).
222. Milicic, A., Edwards, C.T., Hue, S., Fox, J., Brown, H., Pillay, T., Drijfhout, J.W., Weber, J.N., Holmes, E.C., Fidler, S.J., Zhang, H.T. & Phillips, R.E. Sexual transmission of single human immunodeficiency virus type 1 virions encoding highly polymorphic multisite cytotoxic T-lymphocyte escape variants. *J Virol* **79**, 13953-13962 (2005).
223. Mo, H., Stamatatos, L., Ip, J.E., Barbas, C.F., Parren, P.W., Burton, D.R., Moore, J.P. & Ho, D.D. Human immunodeficiency virus type 1 mutants that escape neutralization by human monoclonal antibody IgG1b12. *J Virol* **71**, 6869-6874 (1997).
224. Modrow, S., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Gallo, R.C., Wong-Staal, F. & Wolf, H. 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).
225. Mologni, D., Citterio, P., Menzagli, B., Zanone Poma, B., Riva, C., Broggin, V., Sinicco, A., Milazzo, L., Adorni, F., Rusconi, S., Galli, M. & Riva, A. Vpr and HIV-1 disease progression: R77Q mutation is associated with long-term control of HIV-1 infection in different groups of patients. *Aids* **20**, 567-574 (2006).
226. Montefiori, D.C., Pantaleo, G., Fink, L.M., Zhou, J.T., Zhou, J.Y., Biliska, M., Miralles, G.D. & Fauci, A.S. Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors. *J Infect Dis* **173**, 60-67 (1996).
227. Moog, C., Fleury, H.J., Pellegrin, I., Kirn, A. & Aubertin, A.M. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **71**, 3734-3741 (1997).
228. Moore, J.P., Cao, Y., Ho, D.D. & Koup, R.A. Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**, 5142-5155 (1994).
229. Moore, J.P., Kitchen, S.G., Pugach, P. & Zack, J.A. The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 111-126 (2004).
230. Moore, J.P., Sattentau, Q.J., Wyatt, R. & Sodroski, J. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J Virol* **68**, 469-484 (1994).
231. Moore, J.P., Willey, R.L., Lewis, G.K., Robinson, J. & Sodroski, J. Immunological evidence for interactions between the first, second, and fifth conserved domains of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**, 6836-6847 (1994).
232. Moore, P.L., Crooks, E.T., Porter, L., Zhu, P., Cayan, C.S., Grise, H., Corcoran, P., Zwick, M.B., Franti, M., Morris, L., Roux, K.H., Burton, D.R. & Binley, J.M. Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **80**, 2515-2528 (2006).
233. Morawetz, R.A., Rizzardi, G.P., Glauser, D., Rutschmann, O., Hirschel, B., Perrin, L., Opravil, M., Flepp, M., von Overbeck, J., Glauser, M.P., Ghezzi, S., Vicenzi, E., Poli, G., Lazzarin, A. & Pantaleo, G. Genetic polymorphism of CCR5 gene and HIV dis-

- ease: the heterozygous (CCR5/delta ccr5) genotype is neither essential nor sufficient for protection against disease progression. Swiss HIV Cohort. *Eur J Immunol* **27**, 3223-3227 (1997).
234. Moulard, M., Phogat, S.K., Shu, Y., Labrijn, A.F., Xiao, X., Binley, J.M., Zhang, M.Y., Sidorov, I.A., Broder, C.C., Robinson, J., Parren, P.W., Burton, D.R. & Dimitrov, D.S. Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6913-6918 (2002).
235. Mullen, L.M., Nair, S.P., Ward, J.M., Rycroft, A.N. & Henderson, B. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends in microbiology* **14**, 141-147 (2006).
236. Munch, J., Rajan, D., Schindler, M., Specht, A., Rucker, E., Novembre, F.J., Nerrienet, E., Muller-Trutwin, M.C., Peeters, M., Hahn, B.H. & Kirchhoff, F. Nef-mediated Enhancement of Virion Infectivity and Stimulation of Viral Replication are Fundamental Properties of Primate Lentiviruses. *J Virol* (2007).
237. Muster, T., Guinea, R., Trkola, A., Purtscher, M., Klima, A., Steindl, F., Palese, P. & Katinger, H. Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. *J Virol* **68**, 4031-4034 (1994).
238. Muster, T., Steindl, F., Purtscher, M., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., Rucker, F. & Katinger, H. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **67**, 6642-6647 (1993).
239. Nakowitsch, S., Quendler, H., Fekete, H., Kunert, R., Katinger, H. & Stiegler, G. HIV-1 mutants escaping neutralization by the human antibodies 2F5, 2G12, and 4E10: in vitro experiments versus clinical studies. *Aids* **19**, 1957-1966 (2005).
240. Natsume, A., Wakitani, M., Yamane-Ohnuki, N., Shoji-Hosaka, E., Niwa, R., Uchida, K., Satoh, M. & Shitara, K. Fucose removal from complex-type oligosaccharide enhances the antibody-dependent cellular cytotoxicity of single-gene-encoded bispecific antibody comprising of two single-chain antibodies linked to the antibody constant region. *Journal of biochemistry* **140**, 359-368 (2006).
241. Neumann, T., Hagmann, I., Lohrengel, S., Heil, M.L., Derdeyn, C.A., Krausslich, H.G. & Dittmar, M.T. T20-insensitive HIV-1 from naive patients exhibits high viral fitness in a novel dual-color competition assay on primary cells. *Virology* **333**, 251-262 (2005).
242. Nguyen, D.H. & Hildreth, J.E. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74**, 3264-3272 (2000).
243. Nyambi, P.N., Mbah, H.A., Burda, S., Williams, C., Gorny, M.K., Nadas, A. & Zolla-Pazner, S. Conserved and exposed epitopes on intact, native, primary human immunodeficiency virus type 1 virions of group M. *J Virol* **74**, 7096-7107 (2000).
244. Ofek, G., Tang, M., Sambor, A., Katinger, H., Mascola, J.R., Wyatt, R. & Kwong, P.D. Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J Virol* **78**, 10724-10737 (2004).
245. Ogert, R.A., Lee, M.K., Ross, W., Buckler-White, A., Martin, M.A. & Cho, M.W. N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dual-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J Virol* **75**, 5998-6006 (2001).
246. Ojo-Amaize, E.A., Nishanian, P., Keith, D.E., Jr., Houghton, R.L., Heitjan, D.F., Fahy, J.L. & Giorgi, J.V. Antibodies to human immunodeficiency virus in human sera induce cell-mediated lysis of human immunodeficiency virus-infected cells. *J Immunol* **139**, 2458-2463 (1987).
247. Olshevsky, U., Helseth, E., Furman, C., Li, J., Haseltine, W. & Sodroski, J. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J Virol* **64**, 5701-5707 (1990).
248. Ono, A. & Freed, E.O. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13925-13930 (2001).
249. Pan, Y., Ma, B. & Nussinov, R. CD4 binding partially locks the bridging sheet in gp120 but leaves the beta2/3 strands flexible. *J Mol Biol* **350**, 514-527 (2005).
250. Pantaleo, G., Menzo, S., Vaccarezza, M., Graziosi, C., Cohen, O.J., Demarest, J.F.,

- Montefiori, D., Orenstein, J.M., Fox, C., Schragger, L.K. & et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *The New England journal of medicine* **332**, 209-216 (1995).
251. Pantophlet, R. & Burton, D.R. GP120: Target for Neutralizing HIV-1 Antibodies. *Annu Rev Immunol* (2006).
252. Paroli, M., Propato, A., Accapezzato, D., Francavilla, V., Schiaffella, E. & Barnaba, V. The immunology of HIV-infected long-term non-progressors--a current view. *Immunol Lett* **79**, 127-129 (2001).
253. Parren, P.W., Marx, P.A., Hessel, A.J., Luckay, A., Harouse, J., Cheng-Mayer, C., Moore, J.P. & Burton, D.R. Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro. *J Virol* **75**, 8340-8347 (2001).
254. Parren, P.W., Moore, J.P., Burton, D.R. & Sattentau, Q.J. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *Aids* **13 Suppl A**, S137-162 (1999).
255. Parren, P.W., Wang, M., Trkola, A., Binley, J.M., Purtscher, M., Katinger, H., Moore, J.P. & Burton, D.R. Antibody neutralization-resistant primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 10270-10274 (1998).
256. Paxton, W.A., Martin, S.R., Tse, D., O'Brien, T.R., Skurnick, J., VanDevanter, N.L., Padian, N., Braun, J.F., Kotler, D.P., Wolinsky, S.M. & Koup, R.A. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat Med* **2**, 412-417 (1996).
257. Peterlin, B.M. & Trono, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* **3**, 97-107 (2003).
258. Peut, V. & Kent, S.J. Fitness constraints on immune escape from HIV: Implications of envelope as a target for both HIV-specific T cells and antibody. *Current HIV research* **4**, 191-197 (2006).
259. Pilgrim, A.K., Pantaleo, G., Cohen, O.J., Fink, L.M., Zhou, J.Y., Zhou, J.T., Bolognesi, D.P., Fauci, A.S. & Montefiori, D.C. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* **176**, 924-932 (1997).
260. Pinter, A., Honnen, W.J., He, Y., Gorny, M.K., Zolla-Pazner, S. & Kayman, S.C. The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J Virol* **78**, 5205-5215 (2004).
261. Pitt, J., Henrard, D., FitzGerald, G., Mofenson, L., Lew, J., Hillyer, G., Mendez, H., Cooper, E., Hanson, C. & Rich, K.C. Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 antibodies in perinatal HIV-1 infection: association with human HIV-1 transmission, infection, and disease progression. For the Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* **182**, 1243-1246 (2000).
262. Platt, E.J., Wehrly, K., Kuhmann, S.E., Chesebro, B. & Kabat, D. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 2855-2864 (1998).
263. Pollard, V.W. & Malim, M.H. The HIV-1 Rev protein. *Annual review of microbiology* **52**, 491-532 (1998).
264. Polzer, S., Dittmar, M.T., Schmitz, H. & Schreiber, M. The N-linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology* **304**, 70-80 (2002).
265. Powers, D.B., Amersdorfer, P., Poul, M., Nielsen, U.B., Shalaby, M.R., Adams, G.P., Weiner, L.M. & Marks, J.D. Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *J Immunol Methods* **251**, 123-135 (2001).
266. Premkumar, D.R., Ma, X.Z., Maitra, R.K., Chakrabarti, B.K., Salkowitz, J., Yen-Lieberman, B., Hirsch, M.S. & Kestler, H.W. The nef gene from a long-term HIV type 1 nonprogressor. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**, 337-345 (1996).
267. Priceputu, E., Hanna, Z., Hu, C., Simard, M.C., Vincent, P., Wildum, S., Schindler, M., Kirchhoff, F. & Jolicoeur, P. Primary human immunodeficiency virus type 1 nef alleles

- show major differences in pathogenicity in transgenic mice. *J Virol* **81**, 4677-4693 (2007).
268. Pugach, P., Kuhmann, S.E., Taylor, J., Marozsan, A.J., Snyder, A., Ketas, T., Wolinsky, S.M., Korber, B.T. & Moore, J.P. The prolonged culture of human immunodeficiency virus type 1 in primary lymphocytes increases its sensitivity to neutralization by soluble CD4. *Virology* **321**, 8-22 (2004).
269. Purcell, D.F. & Martin, M.A. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol* **67**, 6365-6378 (1993).
270. Purtscher, M., Trkola, A., Gruber, G., Buchacher, A., Predl, R., Steindl, F., Tauer, C., Berger, R., Barrett, N., Jungbauer, A. & et al. A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 1651-1658 (1994).
271. Pustowka, A., Dietz, J., Ferner, J., Baumann, M., Landersz, M., Konigs, C., Schwalbe, H. & Dietrich, U. Identification of peptide ligands for target RNA structures derived from the HIV-1 packaging signal psi by screening phage-displayed peptide libraries. *Chembiochem* **4**, 1093-1097 (2003).
272. Quinones-Kochs, M.I., Buonocore, L. & Rose, J.K. Role of N-linked glycans in a human immunodeficiency virus envelope glycoprotein: effects on protein function and the neutralizing antibody response. *J Virol* **76**, 4199-4211 (2002).
273. Quinones-Mateu, M.E., Ball, S.C., Marozsan, A.J., Torre, V.S., Albright, J.L., Vanham, G., van Der Groen, G., Colebunders, R.L. & Arts, E.J. A dual infection/competition assay shows a correlation between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression. *J Virol* **74**, 9222-9233 (2000).
274. Quinones-Mateu, M.E., Mas, A., Lain de Lera, T., Soriano, V., Alcamí, J., Lederman, M.M. & Domingo, E. LTR and tat variability of HIV-1 isolates from patients with divergent rates of disease progression. *Virus Res* **57**, 11-20 (1998).
275. Rangel, H.R., Weber, J., Chakraborty, B., Gutierrez, A., Marotta, M.L., Mirza, M., Kiser, P., Martinez, M.A., Este, J.A. & Quinones-Mateu, M.E. Role of the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene in viral fitness. *J Virol* **77**, 9069-9073 (2003).
276. Retter, I., Althaus, H.H., Munch, R. & Muller, W. VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Res* **33**, D671-674 (2005).
277. Richman, D.D., Wrin, T., Little, S.J. & Petropoulos, C.J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4144-4149 (2003).
278. Rizzuto, C. & Sodroski, J. 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).
279. Rizzuto, C.D. & Sodroski, J.G. Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. *J Virol* **71**, 4847-4851 (1997).
280. Rizzuto, C.D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P.D., Hendrickson, W.A. & Sodroski, J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**, 1949-1953 (1998).
281. Rodes, B., Toro, C., Paxinos, E., Poveda, E., Martinez-Padial, M., Benito, J.M., Jimenez, V., Wrin, T., Bassani, S. & Soriano, V. Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *Aids* **18**, 1109-1116 (2004).
282. Rohrbach, P., Broders, O., Toleikis, L. & Dubel, S. Therapeutic antibodies and antibody fusion proteins. *Biotechnology & genetic engineering reviews* **20**, 137-163 (2003).
283. Roman, F., Karita, E., Monnet, A., Lambert, C., Fontaine, E., Allen, S., Schneider, F., Hemmer, R., Schmit, J.C. & Arendt, V. Rare and new V3 loop variants in HIV-1-positive long-term non-progressors from Rwanda. *Aids* **16**, 1827-1829 (2002).
284. Rosenberg, E.S., Billingsley, J.M., Caliendo, A.M., Boswell, S.L., Sax, P.E., Kalams, S.A. & Walker, B.D. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**, 1447-1450 (1997).

-
285. Roux, K.H. & Taylor, K.A. AIDS virus envelope spike structure. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 244-252 (2007).
286. Rubsamen-Waigmann, H., Briesen, H.V., Maniar, J.K., Rao, P.K., Scholz, C. & Pflutzer, A. Spread of HIV-2 in India. *Lancet* **337**, 550-551 (1991).
287. Ryu, S.E., Truneh, A., Sweet, R.W. & Hendrickson, W.A. Structures of an HIV and MHC binding fragment from human CD4 as refined in two crystal lattices. *Structure* **2**, 59-74 (1994).
288. Sagar, M., Wu, X., Lee, S. & Overbaugh, J. Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J Virol* **80**, 9586-9598 (2006).
289. Saksena, N.K. Biological and Molecular Mechanisms in Progression and non-Progression of HIV Disease. *AIDS Rev* **3**, 133-144 (2001).
290. Sanders, R.W., Venturi, M., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Katinger, H., Lloyd, K.O., Kwong, P.D. & Moore, J.P. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol* **76**, 7293-7305 (2002).
291. Santiago, M.L., Range, F., Keele, B.F., Li, Y., Bailes, E., Bibollet-Ruche, F., Fruteau, C., Noe, R., Peeters, M., Brookfield, J.F., Shaw, G.M., Sharp, P.M. & Hahn, B.H. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* **79**, 12515-12527 (2005).
292. Saphire, E.O., Parren, P.W., Pantophlet, R., Zwick, M.B., Morris, G.M., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Stanfield, R.L., Burton, D.R. & Wilson, I.A. Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* **293**, 1155-1159 (2001).
293. Sattentau, Q.J. HIV gp120: double lock strategy foils host defences. *Structure* **6**, 945-949 (1998).
294. Sattentau, Q.J., Zolla-Pazner, S. & Poignard, P. Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. *Virology* **206**, 713-717 (1995).
295. Scanlan, C.N., Offer, J., Zitzmann, N. & Dwek, R.A. Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature* **446**, 1038-1045 (2007).
296. Scanlan, C.N., Pantophlet, R., Wormald, M.R., Ollmann Saphire, E., Stanfield, R., Wilson, I.A., Katinger, H., Dwek, R.A., Rudd, P.M. & Burton, D.R. The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol* **76**, 7306-7321 (2002).
297. Scarlatti, G., Albert, J., Rossi, P., Hodara, V., Biraghi, P., Muggiasca, L. & Fenyo, E.M. Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: correlation with neutralizing antibodies against primary isolates. *J Infect Dis* **168**, 207-210 (1993).
298. Schiavoni, I., Trapp, S., Santarcangelo, A.C., Piacentini, V., Pugliese, K., Baur, A. & Federico, M. HIV-1 Nef enhances both membrane expression and virion incorporation of Env products. A model for the Nef-dependent increase of HIV-1 infectivity. *J Biol Chem* **279**, 22996-23006 (2004).
299. Schindler, M., Munch, J., Kutsch, O., Li, H., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Muller-Trutwin, M.C., Novembre, F.J., Peeters, M., Courgnaud, V., Bailes, E., Roques, P., Sodora, D.L., Silvestri, G., Sharp, P.M., Hahn, B.H. & Kirchhoff, F. Nef-Mediated Suppression of T Cell Activation Was Lost in a Lentiviral Lineage that Gave Rise to HIV-1. *Cell* **125**, 1055-1067 (2006).
300. Schmiedl, A. & Dubel, S. Rekombinante Antikörper & Phagen-Display. in *Molekulare Biotechnologie*, Vol. 1 (ed. Wink, M.) 511-542 (Willey-VCH, 2004).
301. Schneidewind, A., Brockman, M.A., Yang, R., Adam, R.I., Li, B., Le Gall, S., Rinaldo, C.R., Craggs, S.L., Allgaier, R.L., Power, K.A., Kuntzen, T., Tung, C.S., Labute, M.X., Mueller, S.M., Harrer, T., McMichael, A.J., Goulder, P.J., Aiken, C., Brander, C., Kelleher, A.D. & Allen, T.M. Escape from the Dominant HLA-B27 Restricted CTL Res-
-

- ponse in Gag is Associated with a Dramatic Reduction in HIV-1 Replication. *J Virol* (2007).
302. Schreiber, A., Humbert, M., Benz, A. & Dietrich, U. 3D-Epitope-Explorer (3DEX): localization of conformational epitopes within three-dimensional structures of proteins. *J Comput Chem* **26**, 879-887 (2005).
303. Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, N.A., Dercksen, M.W., de Goede, R.E., van Steenwijk, R.P., Lange, J.M., Schattenkerk, J.K., Miedema, F. & Tersmette, M. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* **66**, 1354-1360 (1992).
304. Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. & Heard, J.M. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* **2**, 338-342 (1996).
305. Schweighardt, B., Shieh, J.T. & Atwood, W.J. CD4/CXCR4-independent infection of human astrocytes by a T-tropic strain of HIV-1. *Journal of neurovirology* **7**, 155-162 (2001).
306. Scott, J.K. Discovering peptide ligands using epitope libraries. *Trends in biochemical sciences* **17**, 241-245 (1992).
307. Sharp, P.M., Shaw, G.M. & Hahn, B.H. Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees. *J Virol* **79**, 3891-3902 (2005).
308. Shi, M., Zhang, L., Gu, H.T., Jiang, F.Q., Qian, L., Yu, M., Chen, G.J., Luo, Q., Shen, B.F. & Guo, N. Efficient growth inhibition of ErbB2-overexpressing tumor cells by anti-ErbB2 ScFv-Fc-IL-2 fusion protein in vitro and in vivo. *Acta pharmacologica Sinica* **28**, 1611-1620 (2007).
309. Shioda, T., Levy, J.A. & Cheng-Mayer, C. Small amino acid changes in the V3 hyper-variable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9434-9438 (1992).
310. Shioda, T., Oka, S., Xin, X., Liu, H., Harukuni, R., Kurotani, A., Fukushima, M., Hasan, M.K., Shiino, T., Takebe, Y., Iwamoto, A. & Nagai, Y. In vivo sequence variability of human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120: association of V2 extension with slow disease progression. *J Virol* **71**, 4871-4881 (1997).
311. Sidhu, S.S., Fairbrother, W.J. & Deshayes, K. Exploring protein-protein interactions with phage display. *Chembiochem* **4**, 14-25 (2003).
312. Sirven, A., Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., Dubart-Kupperschmitt, A. & Charneau, P. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* **96**, 4103-4110 (2000).
313. Skerra, A. & Pluckthun, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041 (1988).
314. Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317 (1985).
315. Smith, G.P. & Petrenko, V.A. Phage Display. *Chem Rev* **97**, 391-410 (1997).
316. Smith, S.M. HIV CTL escape: at what cost? *Retrovirology* **1**, 8 (2004).
317. Soltes, G., Hust, M., Ng, K.K., Bansal, A., Field, J., Stewart, D.I., Dubel, S., Cha, S. & Wiersma, E.J. On the influence of vector design on antibody phage display. *Journal of biotechnology* **127**, 626-637 (2007).
318. Somasundaran, M., Sharkey, M., Brichacek, B., Luzuriaga, K., Emerman, M., Sullivan, J.L. & Stevenson, M. Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9503-9508 (2002).
319. Srivastava, I.K., Ulmer, J.B. & Barnett, S.W. Role of neutralizing antibodies in protective immunity against HIV. *Hum Vaccin* **1**, 45-60 (2005).
320. Stamatatos, L., Lim, M. & Cheng-Mayer, C. Generation and structural analysis of soluble oligomeric gp140 envelope proteins derived from neutralization-resistant and neutralization-susceptible primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 981-994 (2000).
321. Stanfield, R.L., Gorny, M.K., Williams, C., Zolla-Pazner, S. & Wilson, I.A. Structural

- rationale for the broad neutralization of HIV-1 by human monoclonal antibody 447-52D. *Structure* **12**, 193-204 (2004).
322. Stewart, G.J., Ashton, L.J., Biti, R.A., Ffrench, R.A., Bennetts, B.H., Newcombe, N.R., Benson, E.M., Carr, A., Cooper, D.A. & Kaldor, J.M. Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *Aids* **11**, 1833-1838 (1997).
323. Sticht, J., Humbert, M., Findlow, S., Bodem, J., Muller, B., Dietrich, U., Werner, J. & Krausslich, H.G. A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro. *Nature structural & molecular biology* **12**, 671-677 (2005).
324. Stiegler, G., Kunert, R., Purtscher, M., Wolbank, S., Voglauer, R., Steindl, F. & Katinger, H. A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 1757-1765 (2001).
325. Stoiber, H., Kacani, L., Speth, C., Wurzner, R. & Dierich, M.P. The supportive role of complement in HIV pathogenesis. *Immunological reviews* **180**, 168-176 (2001).
326. Sullivan, N., Sun, Y., Li, J., Hofmann, W. & Sodroski, J. Replicative function and neutralization sensitivity of envelope glycoproteins from primary and T-cell line-passaged human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* **69**, 4413-4422 (1995).
327. Sullivan, N., Sun, Y., Sattentau, Q., Thali, M., Wu, D., Denisova, G., Gershoni, J., Robinson, J., Moore, J. & Sodroski, J. CD4-Induced conformational changes in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization. *J Virol* **72**, 4694-4703 (1998).
328. Sullivan, N., Thali, M., Furman, C., Ho, D.D. & Sodroski, J. Effect of amino acid changes in the V1/V2 region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein on subunit association, syncytium formation, and recognition by a neutralizing antibody. *J Virol* **67**, 3674-3679 (1993).
329. Suzuki, Y. & Craigie, R. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**, 187-196 (2007).
330. Todorovska, A., Roovers, R.C., Dolezal, O., Kortt, A.A., Hoogenboom, H.R. & Hudson, P.J. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods* **248**, 47-66 (2001).
331. Tolstrup, M., Laursen, A.L., Gerstoft, J., Pedersen, F.S., Ostergaard, L. & Duch, M. Cysteine 138 mutation in HIV-1 Nef from patients with delayed disease progression. *Sex Health* **3**, 281-286 (2006).
332. Tomlinson, I. & Holliger, P. Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments. *Methods in enzymology* **326**, 461-479 (2000).
333. Toran, J.L., Kremer, L., Sanchez-Pulido, L., de Alboran, I.M., del Real, G., Llorente, M., Valencia, A., de Mon, M.A. & Martinez, A.C. Molecular analysis of HIV-1 gp120 antibody response using isotype IgM and IgG phage display libraries from a long-term non-progressor HIV-1-infected individual. *Eur J Immunol* **29**, 2666-2675 (1999).
334. Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Allaway, G.P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P.J. & Moore, J.P. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **384**, 184-187 (1996).
335. Trkola, A., Kuster, H., Rusert, P., Joos, B., Fischer, M., Leemann, C., Manrique, A., Huber, M., Rehr, M., Oxenius, A., Weber, R., Stiegler, G., Vcelar, B., Katinger, H., Aceto, L. & Gunthard, H.F. Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat Med* **11**, 615-622 (2005).
336. Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J.P. & Katinger, H. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**, 1100-1108 (1996).
337. Troyer, R.M., Collins, K.R., Abraha, A., Fraundorf, E., Moore, D.M., Krizan, R.W., Toossi, Z., Colebunders, R.L., Jensen, M.A., Mullins, J.I., Vanham, G. & Arts, E.J. Changes in human immunodeficiency virus type 1 fitness and genetic diversity during

- disease progression. *J Virol* **79**, 9006-9018 (2005).
338. Turner, B.G. & Summers, M.F. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**, 1-32 (1999).
339. Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B.F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Delaporte, E., Hahn, B.H. & Peeters, M. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* **444**, 164 (2006).
340. Visco-Comandini, U., Yun, Z., Paganelli, R., Orlandi, P., Salotti, A., Johansson, B., Vahlne, A. & Sonnerborg, A. HIV-1 nef mutations and clinical long-term nonprogression. A molecular epidemiology study. *J Hum Virol* **1**, 320-327 (1998).
341. Vogel, T.U., Reynolds, M.R., Fuller, D.H., Vielhuber, K., Shipley, T., Fuller, J.T., Kunstman, K.J., Sutter, G., Marthas, M.L., Erfle, V., Wolinsky, S.M., Wang, C., Allison, D.B., Rud, E.W., Wilson, N., Montefiori, D., Altman, J.D. & Watkins, D.I. Multispecific vaccine-induced mucosal cytotoxic T lymphocytes reduce acute-phase viral replication but fail in long-term control of simian immunodeficiency virus SIVmac239. *J Virol* **77**, 13348-13360 (2003).
342. Wagner, R., Leschonsky, B., Harrer, E., Paulus, C., Weber, C., Walker, B.D., Buchbinder, S., Wolf, H., Kalden, J.R. & Harrer, T. Molecular and functional analysis of a conserved CTL epitope in HIV-1 p24 recognized from a long-term nonprogressor: constraints on immune escape associated with targeting a sequence essential for viral replication. *J Immunol* **162**, 3727-3734 (1999).
343. Wang, B., Ge, Y.C., Palasanthiran, P., Xiang, S.H., Ziegler, J., Dwyer, D.E., Randle, C., Downton, D., Cunningham, A. & Saksena, N.K. Gene defects clustered at the C-terminus of the vpr gene of HIV-1 in long-term nonprogressing mother and child pair: in vivo evolution of vpr quasispecies in blood and plasma. *Virology* **223**, 224-232 (1996).
344. Wang, B., Spira, T.J., Owen, S., Lal, R.B. & Saksena, N.K. HIV-1 strains from a cohort of American subjects reveal the presence of a V2 region extension unique to slow progressors and non-progressors. *Aids* **14**, 213-223 (2000).
345. Wei, S.Q., Mizuuchi, K. & Craigie, R. A large nucleoprotein assembly at the ends of the viral DNA mediates retroviral DNA integration. *The EMBO journal* **16**, 7511-7520 (1997).
346. Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., Komarova, N.L., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Kwong, P.D. & Shaw, G.M. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**, 307-312 (2003).
347. Weinberg, J.B., Matthews, T.J., Cullen, B.R. & Malim, M.H. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med* **174**, 1477-1482 (1991).
348. Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J. & Wiley, D.C. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-430 (1997).
349. Willey, R.L., Rutledge, R.A., Dias, S., Folks, T., Theodore, T., Buckler, C.E. & Martin, M.A. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5038-5042 (1986).
350. Wolk, T. & Schreiber, M. N-Glycans in the gp120 V1/V2 domain of the HIV-1 strain NL4-3 are indispensable for viral infectivity and resistance against antibody neutralization. *Medical microbiology and immunology* **195**, 165-172 (2006).
351. Wu, A.M. & Senter, P.D. Arming antibodies: prospects and challenges for immunconjugates. *Nat Biotechnol* **23**, 1137-1146 (2005).
352. Wu, T.T., Johnson, G. & Kabat, E.A. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* **16**, 1-7 (1993).
353. Wyatt, R., Desjardin, E., Olshevsky, U., Nixon, C., Binley, J., Olshevsky, V. & Sodroski, J. Analysis of the interaction of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* **71**, 9722-9731 (1997).
354. Wyatt, R., Kwong, P.D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson,

- W.A. & Sodroski, J.G. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705-711 (1998).
355. Wyatt, R., Moore, J., Accola, M., Desjardin, E., Robinson, J. & Sodroski, J. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J Virol* **69**, 5723-5733 (1995).
356. Wyatt, R. & Sodroski, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-1888 (1998).
357. Xu, L., Aha, P., Gu, K., Kuimelis, R.G., Kurz, M., Lam, T., Lim, A.C., Liu, H., Lohse, P.A., Sun, L., Weng, S., Wagner, R.W. & Lipovsek, D. Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chemistry & biology* **9**, 933-942 (2002).
358. Xu, W., Hofmann-Lehmann, R., McClure, H.M. & Ruprecht, R.M. Passive immunization with human neutralizing monoclonal antibodies: correlates of protective immunity against HIV. *Vaccine* **20**, 1956-1960 (2002).
359. Yamada, T. & Iwamoto, A. Comparison of proviral accessory genes between long-term nonprogressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Virol* **145**, 1021-1027 (2000).
360. Yang, Z.Y., Chakrabarti, B.K., Xu, L., Welcher, B., Kong, W.P., Leung, K., Panet, A., Mascola, J.R. & Nabel, G.J. Selective modification of variable loops alters tropism and enhances immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 envelope. *J Virol* **78**, 4029-4036 (2004).
361. Ye, Y., Si, Z.H., Moore, J.P. & Sodroski, J. Association of structural changes in the V2 and V3 loops of the gp120 envelope glycoprotein with acquisition of neutralization resistance in a simian-human immunodeficiency virus passaged in vivo. *J Virol* **74**, 11955-11962 (2000).
362. Zanetti, G., Briggs, J.A., Grunewald, K., Sattentau, Q.J. & Fuller, S.D. Cryo-electron tomographic structure of an immunodeficiency virus envelope complex in situ. *PLoS pathogens* **2**, e83 (2006).
363. Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L. & Charneau, P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**, 173-185 (2000).
364. Zhang, C.W., Chishti, Y., Hussey, R.E. & Reinherz, E.L. Expression, purification, and characterization of recombinant HIV gp140. The gp41 ectodomain of HIV or simian immunodeficiency virus is sufficient to maintain the retroviral envelope glycoprotein as a trimer. *J Biol Chem* **276**, 39577-39585 (2001).
365. Zhang, H., Hoffmann, F., He, J., He, X., Kankasa, C., West, J.T., Mitchell, C.D., Ruprecht, R.M., Orti, G. & Wood, C. Characterization of HIV-1 subtype C envelope glycoproteins from perinatally infected children with different courses of disease. *Retrovirology* **3**, 73 (2006).
366. Zhang, L., Huang, Y., Yuan, H., Chen, B.K., Ip, J. & Ho, D.D. Genotypic and phenotypic characterization of long terminal repeat sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **71**, 5608-5613 (1997).
367. Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C. & Korber, B. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* **14**, 1229-1246 (2004).
368. Zhang, M.Y., Shu, Y., Phogat, S., Xiao, X., Cham, F., Bouma, P., Choudhary, A., Feng, Y.R., Sanz, I., Rybak, S., Broder, C.C., Quinnan, G.V., Evans, T. & Dimitrov, D.S. Broadly cross-reactive HIV neutralizing human monoclonal antibody Fab selected by sequential antigen panning of a phage display library. *J Immunol Methods* **283**, 17-25 (2003).
369. Zhang, M.Y., Xiao, X., Sidorov, I.A., Choudhry, V., Cham, F., Zhang, P.F., Bouma, P., Zwick, M., Choudhary, A., Montefiori, D.C., Broder, C.C., Burton, D.R., Quinnan, G.V., Jr. & Dimitrov, D.S. Identification and characterization of a new cross-reactive human immunodeficiency virus type 1-neutralizing human monoclonal antibody. *J Virol* **78**, 9233-9242 (2004).

-
370. Zhang, Y.J., Fracasso, C., Fiore, J.R., Bjorndal, A., Angarano, G., Gringeri, A. & Fenyo, E.M. Augmented serum neutralizing activity against primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in two groups of HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Infect Dis* **176**, 1180-1187 (1997).
371. Zhou, T., Xu, L., Dey, B., Hessel, A.J., Van Ryk, D., Xiang, S.H., Yang, X., Zhang, M.Y., Zwick, M.B., Arthos, J., Burton, D.R., Dimitrov, D.S., Sodroski, J., Wyatt, R., Nabel, G.J. & Kwong, P.D. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* **445**, 732-737 (2007).
372. Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr., Chertova, E., Lifson, J.D., Grise, H., Ofek, G.A., Taylor, K.A. & Roux, K.H. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**, 847-852 (2006).
373. Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M. & Ho, D.D. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594-597 (1998).
374. Zolla-Pazner, S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol* **4**, 199-210 (2004).
375. Zolla-Pazner, S., Zhong, P., Revesz, K., Volsky, B., Williams, C., Nyambi, P. & Gorny, M.K. The cross-clade neutralizing activity of a human monoclonal antibody is determined by the GPGR V3 motif of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 1254-1258 (2004).
376. Zwick, M.B., Kelleher, R., Jensen, R., Labrijn, A.F., Wang, M., Quinnan, G.V., Jr., Parren, P.W. & Burton, D.R. A novel human antibody against human immunodeficiency virus type 1 gp120 is V1, V2, and V3 loop dependent and helps delimit the epitope of the broadly neutralizing antibody immunoglobulin G1 b12. *J Virol* **77**, 6965-6978 (2003).
377. Zwick, M.B., Labrijn, A.F., Wang, M., Spencehauer, C., Saphire, E.O., Binley, J.M., Moore, J.P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D.R. & Parren, P.W. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* **75**, 10892-10905 (2001).
378. Zwick, M.B., Wang, M., Poignard, P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D.R. & Parren, P.W. Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies. *J Virol* **75**, 12198-12208 (2001).

5.2. Eigene Veröffentlichungen

5.2.1. Publikationen

Antoni, S., Walz, N., Landersz, M., Humbert, M., Seidl, C., Dittmar, M.T. & Dietrich, U. Genetic and Biological Characterization of Recombinant HIV Type 1 with Env Derived from Long-Term Nonprogressor (LTNP) Viruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* **23**, 1377-1386 (2007).

Djordjevic, A., Veljkovic, M., Antoni, S., Sakarellos-Daitsiotis, M., Krikorian, D., Zevgiti, S., Dietrich, U., Veljkovic, N. & Branch, D.R. The presence of antibodies recognizing a peptide derived from the second conserved region of HIV-1 gp120 correlates with non-progressive HIV infection. *Current HIV research* **5**, 443-448 (2007).

Humbert, M., Antoni, S., Brill, B., Landersz, M., Rodes, B., Soriano, V., Wintergerst, U., Knechten, H., Staszewski, S., von Laer, D., Dittmar, M.T. & Dietrich, U. Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. *Eur J Immunol* **37**, 501-515 (2007).

5.2.2. Posterpräsentationen

XV International AIDS Conference 2004, Bangkok, Thailand

Michael Humbert, Sascha Antoni, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Uwe Wintergerst, Ursula Dietrich

Biopanning of LTNP sera to detect HIV specific conserved mimotopes for vaccine development

Annual Meeting of the Society of Virology GfV/SIV 2004, Tübingen, Germany

Michael Humbert, Sascha Antoni, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Uwe Wintergerst, Ursula Dietrich

Biopanning of LTNP sera to detect HIV specific conserved mimotopes for vaccine development

CHI's 6th Annual Phage Display Technologies 2004, Cambridge, U.S.A.

Michael Humbert, Sascha Antoni, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Uwe Wintergerst, Ursula Dietrich

Identification of protective epitopes from HIV-1 long-term non-progressor sera

Annual Meeting of the Society of Virology GfV 2005, Hannover, Germany

Michael Humbert, Sascha Antoni, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes,

Vicente Soriano, Uwe Wintergerst, Ursula Dietrich

Biopanning of LTNP sera to detect HIV specific conserved mimotopes for vaccine development

PEGS: The Protein Engineering Summit 2005, Cambridge, U.S.A.

Michael Humbert, Sascha Antoni, Margot Landersz, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Uwe Wintergerst, Ursula Dietrich

Biopanning of LTNP sera to detect HIV specific conserved mimotopes for vaccine development

International Meeting of The Institute of Human Virology 2005, Baltimore, U.S.A.

Michael Humbert, Sascha Antoni, Andreas Schreiber, Berta Rodes, Vicente Soriano, Matthias T. Dittmar and Ursula Dietrich

Phage Display Selection of HIV Specific Conserved Mimotopes With IgG from Long-term Non-progressors

Annual Meeting of the Society of Virology GfV 2006, München, Germany

Sascha Antoni, Michael Humbert, Margot Landersz, Nicole Walz, Berta Rodes, Vicente Soriano, Heribert Knechten, Schlomo Staszewski, Dorothee von Laer, Matthias T. Dittmar, Ursula Dietrich

Enhanced humoral neutralization capacity of long-term non-progressor plasma

XVI International AIDS Conference 2006, Toronto, Canada

Sascha Antoni, Michael Humbert, Boris Brill, Berta Rodes, Vicente Soriano, Ursula Dietrich

Mimotopes selected with broadly neutralizing IgG from long-term non-progressors induce HIV-1 neutralizing antibodies upon immunization of mice

Deutsch Österreichischer AIDS-Kongress 2007, Frankfurt am Main, Germany

Sascha Antoni, Michael Hust, Stefan Dübel, Christian Seidl, Ursula Dietrich

Selection of anti HIV-1 specific phage displayed scFv from LTNP with broadly neutralizing antibodies

Annual Meeting of the Society of Virology GfV 2007, Nürnberg, Germany

Sascha Antoni, Michael Hust, Maria Hertje, Stefan Dübel, Christian Seidl, Ursula Dietrich

Selection of anti HIV-1 specific phage displayed scFv from LTNP with broadly neutralizing antibodies

5.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: HIV-1 Genom, Transkripte & Proteine	3
Abbildung 2: Schematischer Querschnitt von HIV-1	4
Abbildung 3: Replikationszyklus von HIV-1	5
Abbildung 4: Domänen von gp160	7
Abbildung 5: Kryoelektronenmikroskopische Modelle von SIV Env-Spikes	8
Abbildung 6: Strukturmodell von HXBc2 und YU2 gp120 Proteinkernen	9
Abbildung 7: Struktur von CD4-ungebundenem SIV gp120 (links) und CD4-gebundenem HIV-1 gp120 (rechts)	10
Abbildung 8: Strukturmodell eines CD4-Rezeptor gebundenen gp120 Trimers mit V3	11
Abbildung 9: Verlauf klinischer Marker während einer HIV-1 Infektion	12
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Aufbaus eines IgG-Antikörpers und einiger daraus abgeleiteter Antikörperfragmente	19
Abbildung 11: Beispiel der Immunglobulin Faltung eines scF _v -Fragments	20
Abbildung 12: Aufbau der M13-Phage	23
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Projektübersicht	25
Abbildung 14: PCR-Schema der <i>env</i> -Amplifikation	41
Abbildung 15: Plasmidkarte von pTN7- Δenv	43
Abbildung 16: Biolumineszenzreaktion von <i>Renilla</i> Luciferase	48
Abbildung 17: Darstellung des Neutralisationsassays	49
Abbildung 18: Prinzip des scF _v -Phagen Biopannings auf Magnetkügelchen	57
Abbildung 19: Aminosäureanzahl in V1/V2 von Env	65
Abbildung 20: Anzahl der potenziellen N-Glykosylierungstellen in Env	65
Abbildung 21: Alignment der Nef Sequenzen der LTNP mit HXB2R	66
Abbildung 22: Alignment der Rev Patientensequenzen mit HXB2R	68
Abbildung 23: Alignment der Tat Patientensequenzen mit HXB2R	70
Abbildung 24: Vpr Alignment der Patientensequenzen mit HXB2R	71
Abbildung 25: Infektiosität der untersuchten HIV-1 Env-RRV	73
Abbildung 26: Korrelation von Infektiosität und V1/V2 Länge	74
Abbildung 27: Effizienz früher Replikationsschritte HIV-1 Env-RRV	74
Abbildung 28: Korrelation der Effizienz der frühen Replikationsschritte und der V1/V2 Länge	75
Abbildung 29: Übersicht der Neutralisationskapazität der Patientenseren	77
Abbildung 30: Kreuzreaktivität der LTNP-, Kontroll- bzw. HIV-1 negativer Seren mit den Peptidphagen	79
Abbildung 31: Aufreinigung von ADA.C1 und CHO-neg	82
Abbildung 32: Nachweis der HIV-1 Env Trimere im Westernblot	83

Abbildung 33: Reaktivität der Mäuseseren mit trimeren HIV-1 Env (ADA.C1) – Studie 2006	84
Abbildung 34: Reaktivität der Mäuseseren mit trimeren HIV-1 Env (ADA.C1) – Studie 2007	85
Abbildung 35: Reaktivität der Hybridomaklone	86
Abbildung 36: FACS Analyse gp120 beschichteter Magnetkügelchen	88
Abbildung 37: FACS Analyse ADA.C1 und CHO-neg beschichteter Magnetkügelchen	88
Abbildung 38: Aminosäuresequenzen der isolierten HIV-1 spezifischen scF _v Fragmente	89
Abbildung 39: Bindung von scF _v B8/B10 an unterschiedliche HIV-1 Env Varianten	90
Abbildung 40: Konkurrenz der scF _v B8/B10 Bindung an gp120 durch HIV-1 positives Serum	90
Abbildung 41: Epitopmapping von scF _v B8/B10	91
Abbildung 42: Verlauf der klinischen Marker der untersuchten Patienten	151
Abbildung 43: Env Alignment der LTNP- und HIV-1 Kontrollpatienten mit HXB2R	159
Abbildung 44: Inhibition der Peptid-phagenbindung durch trimere HIV-1 Env	161
Abbildung 45: Hybridoma ELISA HIV-1 gp140 Bindungsreaktivität	162

5.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Monoklonale neutralisierende Antikörper gegen HIV-1	17
Tabelle 2: Kombinationsmöglichkeiten der humanen Antikörper Multigenfamilien	21
Tabelle 3: Klinische Daten der untersuchten Patienten	61
Tabelle 4: Genetische Merkmale der Patienten und Viren	63
Tabelle 5: Eigenschaften der HIV-1 Env Proteine	64
Tabelle 6: VESPA identifizierte Sequenzmuster in Nef	67
Tabelle 7: VESPA identifizierte Sequenzmuster in Rev	69
Tabelle 8: VESPA identifizierte Sequenzmuster in Tat	70
Tabelle 9: VESPA identifizierte Sequenzmuster in Vpr	72
Tabelle 10: Titer, Infektiosität und frühe Replikationseffizienz der HIV-1 Env-RRV	76
Tabelle 11: Kreuzreaktivität von Peptidphagen und Patientenseren	78
Tabelle 12: Konkurrenz der Peptidphagenbindung an Serumantikörper durch trimere gp140	81
Tabelle 13: Bindungsreaktivitäten an trimere gp140 der Immunisierungsstudie 2006	84
Tabelle 14: Bindungsreaktivitäten an trimere gp140 der Immunisierungsstudie 2007	86
Tabelle 15: Sequenzen der 15mer Peptide zum Epitopmapping von scF _v B8/B10	92
Tabelle 16: Genetische Analyse der isolierten HIV-1 spezifischen scF _v Fragmente	92
Tabelle 17: Neutralisation der HIV-1 Env-rekombinanter Reporterviren	160

5.5. Abkürzungsverzeichnis

5.5.1. Allgemeine Abkürzungen

Abkürzung	Beschreibung
(d)dH ₂ O	(doppelt)-destilliertes Wasser
°C	Grad Celsius
α	Präfix: anti-
A	Adenin Ampere
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität(engl.: antibody dependent cellular cytotoxicity)
AIDS	Erworbene Immunschwäche (engl.: acquired immunodeficiency syndrome)
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
Å	Angström
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Konservierter Bereich (engl.: conserved region)
CA	Kapsid (engl. capsid); p24
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	Cluster zu Differenzierung 4 (engl.: cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CDR	Komplementarität bestimmende Region (engl.: complementary determining region)
CHO	Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster (engl.: chinese hamster ovary)
CIP	Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (engl.: calf intestine phosphatase)
CO ₂	Kohlendioxid
CRbs	Corezeptorbindungsstelle
CRF	Zirkulierende Rekombinante Form (engl.: circulating recombinant form)
CT	Cytoplasmatisches Ende (engl.: cytoplasmic tail)
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (engl.: cytotoxic T-lymphocyte)
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5´-Triphosphat
DMEM	Dolbecco´s Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotid-5´-Triphosphat
dsF _v	Disulfid stabilisiertes variables Antikörperfragment (engl.: disulfid stabilized fragment variable)
dTMP	Desoxythymidin-5´-Monophosphat

dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECTO	Extrazelluläre Domäne (engl.: extra cellular domain)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunosorbent-Assay (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay)
Env	Hüllprotein (engl.: Envelope)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	Elitesuppressor (engl.: elite suppressor)
F _{ab}	Antigenbindendes Fragment (engl.: fragment antigen binding)
F _c	kristallisierbares Antikörperfragment (engl.: fragment crystallizable)
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FR	Framework Region
g	Gram Zentrifugalkraft
gp120	Glycoprotein 120
gp41	Glycoprotein 41
h	Stunde(n)
HAART	Hoch-aktive antivirale Therapie (engl.: highly active anti-retroviral therapie)
HAMA	Humane α -Maus Antikörper (engl.: human α -mouse antibody)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus (engl.: human immunodeficiency virus)
HLA	Humane Leukozyten Antigene (engl.: human leukocyte antigen)
HR	Heptadrepeat
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: horse raddish peroxidase)
IC	Inhibitionskonzentration (engl.: inhibition of concentration)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IN	Integrase; p32
IPTG	Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid
IU	Infektiöse Einheit (engl.: infectious unit)
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LIC	Ligase-unabhängige Klonierung (engl.: ligase independent cloning)
LP	Spät-progredierender HIV-1 Patient (engl.: late progressor)
LTNP	Langzeit Nicht-Progredierender (engl.: longt-term non-progressor)
LTR	longt-terminal repeat
m	Meter
M	Molar

MA	Matrix (engl.: matrix); p17
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
min	Minute(n)
mol	Molzahl
MPBST	Michpulver-Tween-PBS-Lösung
MPER	Membranproximale Extrazelluläre Region
MSD	Transmembrandomäne (engl.: membrane spanning domain)
MW	Molekulargewicht (engl.: molecular weight)
MWCO	Ausschluss-Molekulargewicht (engl.: molecular weight cut-off)
N	Normal
nAK	neutralisierender Antikörper
Nc	Nukleokapsid (engl.: nucleocapsid); p7
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren (engl.: non essential aminoacids)
Nef	Negativer Effektor (engl.: negative effector); p27
NP	Nicht-progredierender HIV-1 Patient (engl.: non progressor)
OD	Optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid
p	Plasmid Protein
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen (engl.: peripheral blood mononuclear cell)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
PIC	Pre-Integrations Komplex (engl.: pre-integration complex)
PR	Protease; p11
R5	CCR5-trope HIV-1 Isolate
R5/X4	dual-trope HIV-1 Isolate
Rev	Regulator der Virusgen Expression (engl.: regulator of virion gene expression); p19
rLU	relative Lichteinheit (engl.: relative light unit)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RP	Schnell-progredierender HIV-1 Patient (engl.: rapid progressor)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RRE	Rev Response Element
RRV	HIV-1 Env Rekombinanter Reportervirus
RT	Reverse Transkriptase; p66 mit RNaseH bzw. p51 ohne RNaseH
RTC	Reverse Transkriptions Komplex (engl.: reverse transcription complex)
s.c.	subkutan (engl. subcutaneous)
scF _v	Einzelketten variables Antikörperfragment (engl.: single chain fragment variable)
sec	Sekunde(n)
SIV	Simian Immundefizienz Virus (engl.: simian immunodeficiency virus)

SP	Signalpeptid
SP	Langsam-progredierender HIV-1 Patient (engl.: slow progressor)
ssDNA	Einzelstrang DNA (engl.: single stranded DNA)
ssRNA	Einzelstrang RNA (engl.: single stranded RNA)
StabW	Standardabweichung
SU	Oberflächeneinheit (engl.: surface unit); entspr.: gp41
TAR	Transaktivator Response Element
Tat	Transkriptions Transaktivator (engl.: transcriptional transactivator); p14
TM	Transmembraneinheit (engl.: transmembran unit); entspr.: gp120
tRNA	transfer-RNA
U	Einheit / Viruspartikel (engl.: unit / viralparticle)
UV	Ultraviolett
VH	variable Region der schweren Kette (engl.: variable heavy)
Vif	Viraler Infektiositätsfaktor (engl.: viral infectivity factor); p23
VL	variable Region der leichten Kette (engl.: variable light)
Vpr	Virusprotein R (engl.: viral protein R); p15
Vpu	Virusprotein U (engl.: viral protein U); p16
vRNA	virale RNA
wt	wildtyp
X4	CXCR4-trope HIV-1 Isolate
Xgal	5-Brom-4-Chlor-Indolyl-b-D-Galaktosid

5.5.2. Präfixe für Größeneinheiten

Symbol	Name	Wert		
k	Kilo	$(10^3)^1 = 10^3$	1 000	Tausend
h	Hekto	10^2	100	Hundert
da	Deka	10^1	10	Zehn
d	Dezi	10^{-1}	0,1	Zehntel
c	Zenti	10^{-2}	0,01	Hundertstel
m	Milli	$(10^{-3})^1 = 10^{-3}$	0,001	Tausendstel
μ	Mikro	$(10^{-3})^2 = 10^{-6}$	0,000 001	Millionstel
n	Nano	$(10^{-3})^3 = 10^{-9}$	0,000 000 001	Milliardstel
p	Piko	$(10^{-3})^4 = 10^{-12}$	0,000 000 000 001	Billionstel

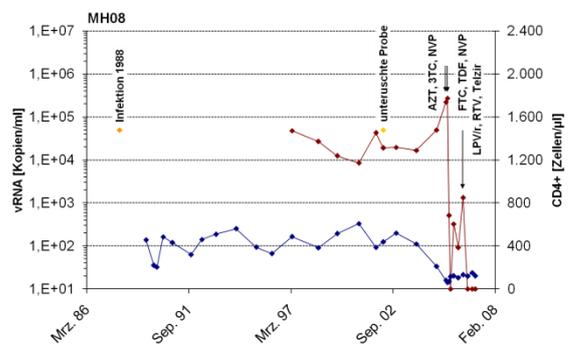
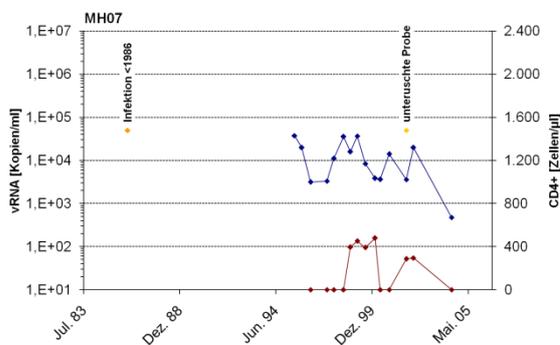
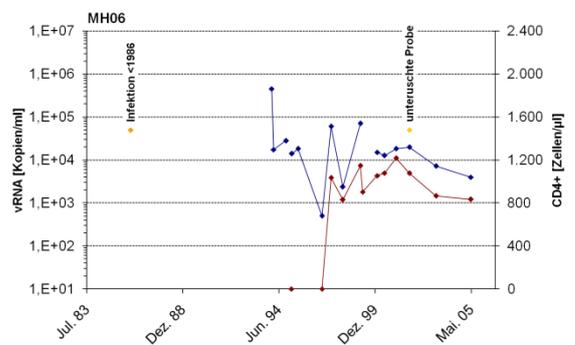
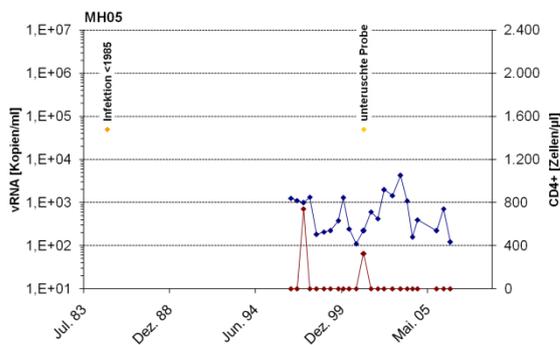
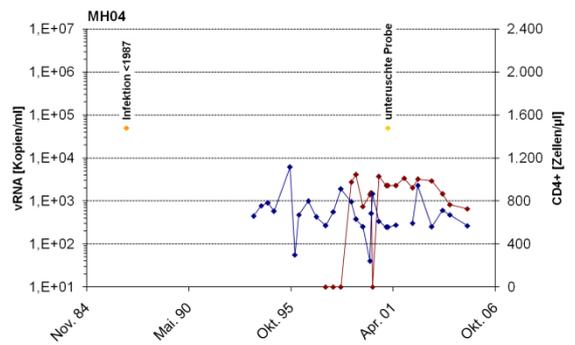
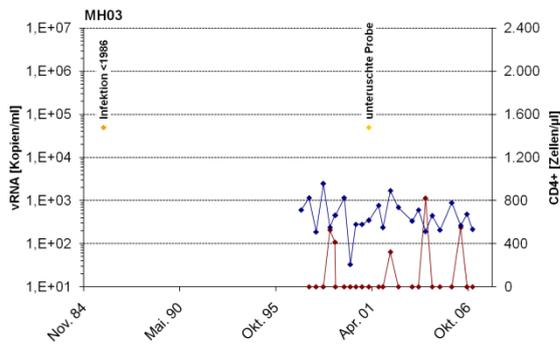
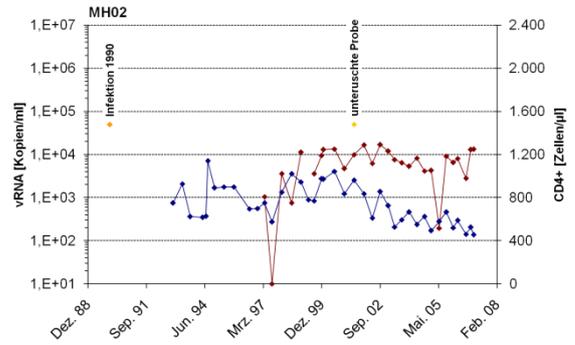
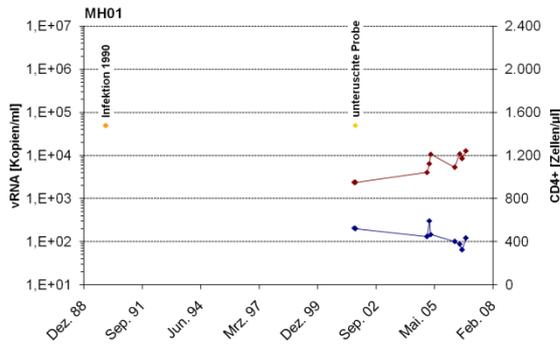
5.5.3. Abkürzungen für Aminosäuren

Code	Abkürzung	Name	Seitenkette	Klasse*	Polarität	Hydrophobizität	Acidität oder Basizität
A	Ala	Alanin	-CH ₃	–	unpolar	1,8	neutral
C	Cys	Cystein	-CH ₂ SH	–	polar	2,5	neutral
D	Asp	Asparaginsäure	-CH ₂ COOH	–	polar	-3,5	sauer
E	Glu	Glutaminsäure	-CH ₂ CH ₂ CONH ₂	–	polar	-3,5	neutral
F	Phe	Phenylalanin	-CH ₂ (C ₆ H ₅)	1	unpolar	2,8	neutral
G	Gly	Glycin	-H	–	unpolar	-0,4	neutral
H	His	Histidin	-CH ₂ (C ₃ H ₃ N ₂)	1	polar	-3,2	basisch
I	Ile	Isoleucin	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	2	unpolar	4,5	neutral
K	Lys	Lysin	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	–	polar	-3,9	basisch
L	Leu	Leucin	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	2	unpolar	3,8	neutral
M	Met	Methionin	-CH ₂ CH ₂ SCH ₃	–	unpolar	1,9	neutral
N	Asn	Asparagin	-CH ₂ CONH ₂	–	polar	-3,5	neutral
P	Pro	Prolin	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	–	unpolar	-1,6	neutral
Q	Gln	Glutamin	-CH ₂ CH ₂ COOH	–	polar	-3,5	sauer
R	Arg	Arginin	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH-C(NH)NH ₂	–	polar	-4,5	basisch
S	Ser	Serin	-CH ₂ OH	–	polar	-0,8	neutral
T	Thr	Threonin	-CH(OH)CH ₃	–	polar	-0,7	neutral
V	Val	Valin	-CH(CH ₃) ₂	2	unpolar	4,2	neutral
W	Trp	Tryptophan	-CH ₂ (C ₈ H ₆ N)	1	polar	-0,9	neutral
Y	Tyr	Tyrosin	-CH ₂ (C ₆ H ₄)OH	1	polar	-1,3	neutral

*) 1: aromatisch; 2: aliphatisch

6. Anhang

6.1. Verlauf der klinischen Daten



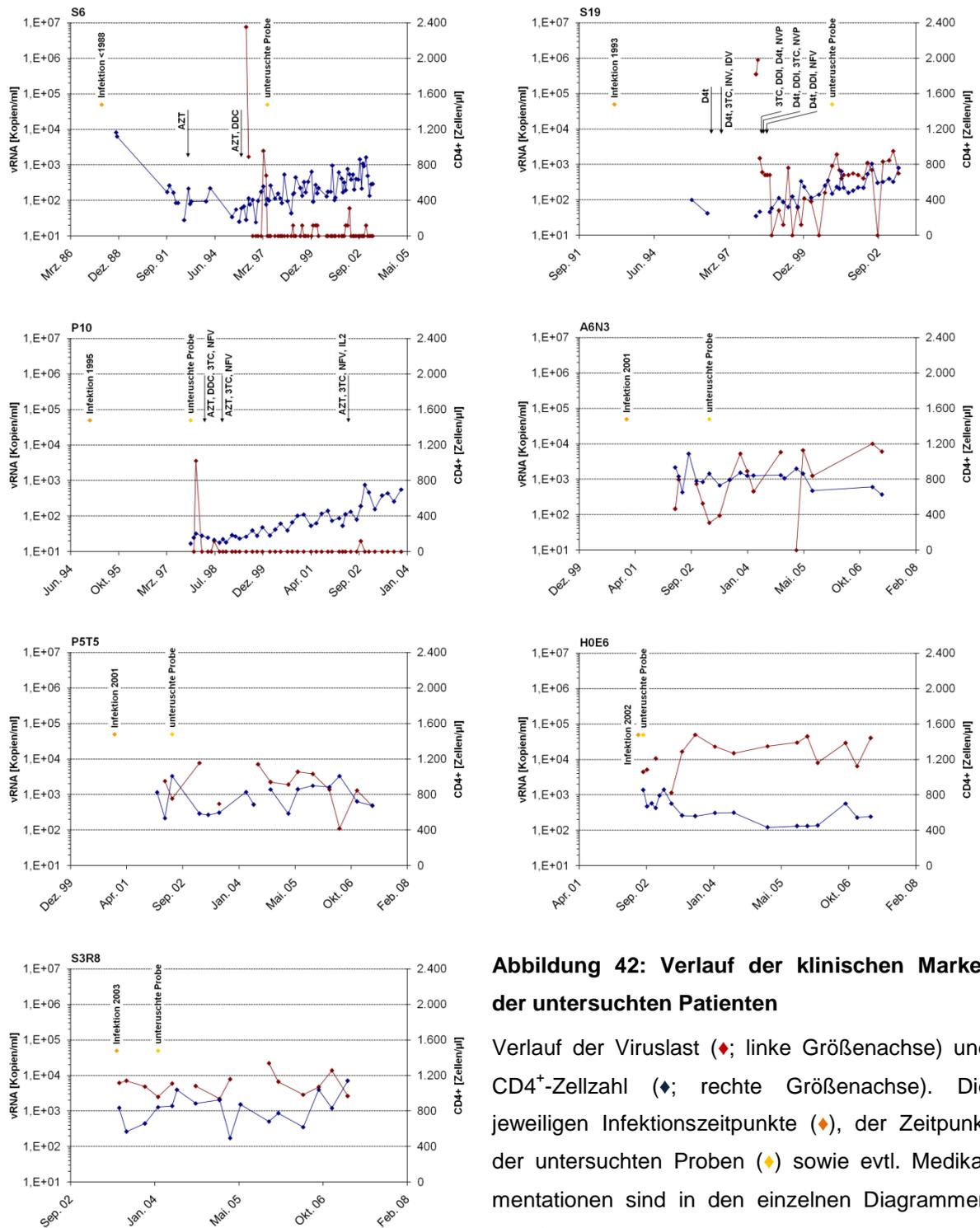


Abbildung 42: Verlauf der klinischen Marker der untersuchten Patienten

Verlauf der Viruslast (♦; linke Größenachse) und CD4⁺-Zellzahl (◆; rechte Größenachse). Die jeweiligen Infektionszeitpunkte (◇), der Zeitpunkt der untersuchten Proben (◇) sowie evtl. Medikamentationen sind in den einzelnen Diagrammen gegeben.

6.2. Alignment der untersuchten HIV-1 Env Proteine

		Signalpeptid				
		10	20	*	30	
HXB2R	1	MRVKEKYQHL	WRWGWWRWGT	LLGMLMICS	ATEKLWVTVY	39
MH001	1	...GIRKN-	YHHL.K	...WF.I	...AN	37
MH002	1	...MGIRKN-	YQHL.E	...N	VAGN	38
MH003	1	4
MH004	1	...GIRKN-	YQHL	F.WL	...Q	38
MH006	1	4
MH008	1	...TGTRKN-	CQQW.I	ILGFW	...YN	37
S19	1	4
P10	1MHARA	AASVMD	...R	23
H0E6	1	4
P5T5	1	4
S3R8	1	4
89.6	1	...IRKN-	QHLR.G	IL	...A	38
D117III	1	...GIRKN-	CQRL	...SIL	...A	38
JR-CSF	1	...GIRKN-	YQHL.KG	IL	...T	38
YU-2	1	...AT.IRKN-	YQHL.KG	IL	...A.Q	38

		40	50	*	60	70	*	
HXB2R	40	YGV PVWKEAT	TTLFCASDAK	AYDTEVHN	VW	ATHACVPTDP		79
MH001	38	77
MH002	39K	78
MH003	5	44
MH004	39R	78
MH006	5A	44
MH008	38	...R.NK	77
S19	5A	44
P10	24QNE.K	63
H0E6	5AY	44
P5T5	5A	44
S3R8	5ST	44
89.6	39	...R	78
D117III	39	78
JR-CSF	39	...T	78
YU-2	39	78

		80	90	100	110	
HXB2R	80	NPQEVVL-VN	VTENFNMWKN	DMVEQMHEDI	ISLWDQSL	118
MH001	78	...IE.-K	...E...D	N	116
MH002	79	S...-A	...DV.N	117
MH003	45	H...-E	N	83
MH004	79	...GA	N	...Q	118
MH006	45	...LD	...E	N	...V	83
MH008	78	K...QW.-K	...D	N	116
S19	45	...ML.-K	...E	N	83
P10	64	...E.-K	...E	N	...D	102
H0E6	45	S...-G	...D	N	83
P5T5	45	...-E	...P	N	83
S3R8	45	...-E	N	83
89.6	79	...-G	N	...D	117
D117III	79	...P.-I	...D	N	117
JR-CSF	79	...-E	...D	N	...Q.V	117
YU-2	79	...K.-E	N	117

		Variable Schleife 1															
		*	*	*	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^											
		120		130			140										
HXB2R	119	CV	K	L	T	P	L	CVS	LK	CTDLKNDT	N	-----	T	NSSSGR	----	146	
MH001	117								N	AN	TN	T	-----	NNA	IVNETK	----	146
MH002	118								N	NVTTN	T	-----	NSP	TTT	STSSLT	151	
MH003	84	E							N	NWR	T	G	-----	A	GK	----	110
MH004	119								H	S	VNTTD	V	-----	NT	DVNTT	THTN	152
MH006	84								N	DLENK	T	STAGNGTS		TPP	TTTPTN	123	
MH008	117								N	NATS	IV	---	MTDVASN	R	R	NDTSVE	154
S19	84	E							I	D			-----	LN	INTNTTNTTR	111	
P10	103								N	W	TN		-----		TT	TNTTDL	134
HOE6	84								N				-----	VMV	DTTTNNSTE	111	
P5T5	84								N				-----	YSK	TT	KNTTVN	111
S3R8	84								N	NA	TNS	SR	-----	T	ATT	NTTNT	117
89.6	118								N	N	NIT	K	-----	NT	PT	SSWGMM	150
D117III	118								N				-----	NA	TT	SNGETM	148
JR-CSF	118								N	K	V		-----	NA	TT	SSEGMM	146
YU-2	118								N	R			-----	NA	TT	SSWETM	147

		Variable Schleife 1					^ ^ ^	^ ^ ^	Variable Schleife 2																									
		150					160					170																						
HXB2R	146	---	M	I	M	E	K	G	E	---	I	K	N	C	S	F	N	I	S	T	S	I	R	G	K	V	Q	K	E	Y	A	F	175	
MH001	146									---	G	E																					170	
MH002	152	A	S	T	A	P	T	T	S	S	I	---	K	D	E																			186
MH003	110	---	G	T																														139
MH004	153	A	S	H	T	N	T	T	N	N	S	G	E	R	M	E	M	G	E															192
MH006	124	S	S	W	E	K																												155
MH008	155	N	V	N	G	T	S	V	E	N	M	T	I	V	N	S	T	D	E															194
S19	112	N	S	W	G	T																												143
P10	135	G	L	M	D	K	G																											163
HOE6	112	K	Q	N	D	T	R	V		G	---	M																						144
P5T5	112	N	T	N																														139
S3R8	118	N	S	N	S	N	E																											149
89.6	151	E	---																															176
D117III	149	K	---																															173
JR-CSF	147	E	---																															172
YU-2	148	E	---																															173

		Variable Schleife 2																																
		180	^	^ ^	^ ^	*	^ ^ ^	*																										
		180		190			200																											
HXB2R	176	F	Y	K	L	D	I	I	P	I	D	N	---	D	T	S	Y	K	L	T	S	C	N	T	S	V	I	T	Q	A	C	P	206	
MH001	171																																	210
MH002	187																																	217
MH003	140																																	170
MH004	193																																	228
MH006	156																																	192
MH008	195	S																																227
S19	144																																	176
P10	164																																	197
HOE6	145																																	177
P5T5	140	N																																170
S3R8	150	N	R																															180
89.6	177	N	R																															208
D117III	174	N																																206
JR-CSF	173																																	204
YU-2	174	N																																202

		210	*	220	*	^ ^ ^ ^	^ ^ ^ ^	*	^ ^ ^ ^																																				
HXB2R	207	K	V	S	F	E	P	I	P	I	H	Y	C	A	P	A	G	F	A	I	L	K	C	N	N	K	T	F	N	G	T	G	P	C	T	N	V	S	T	V	Q	246			
MH001	211	250
MH002	218	257	
MH003	171	210		
MH004	229	268		
MH006	193	232		
MH008	228	267		
S19	177	216		
P10	198	237		
HOE6	178	217		
P5T5	171	210		
S3R8	181	220		
89.6	209	248		
D117III	207	246		
JR-CSF	205	244		
YU-2	203	242		

		*	250	^ ^ ^ ^	260	270	^ ^ ^ ^	280																																				
HXB2R	247	285
MH001	251	290	
MH002	258	296	
MH003	211	249	
MH004	269	307	
MH006	233	272		
MH008	268	306		
S19	217	255		
P10	238	276		
HOE6	218	256		
P5T5	211	249		
S3R8	221	259		
89.6	249	287		
D117III	247	285		
JR-CSF	245	283		
YU-2	243	281		

		^ ^ ^ ^	^	^ ^	^ ^ ^ ^	Variable Schleife 3																																					
HXB2R	286	324
MH001	291	327
MH002	297	333	
MH003	250	287	
MH004	308	345	
MH006	273	310	
MH008	307	344		
S19	256	293		
P10	277	314		
HOE6	257	294		
P5T5	250	287		
S3R8	260	297		
89.6	288	325		
D117III	286	323		
JR-CSF	284	321		
YU-2	282	319		

		N-terminaler Heptadrepeat																																								
		550					560					570					580																									
HXB2R	543	Q	L	L	S	G	I	V	Q	Q	Q	N	N	L	L	R	A	I	E	A	Q	Q	H	L	L	Q	L	T	V	W	G	I	K	Q	L	Q	A	R	I	L	A	582
MH001	545	584	
MH002	560	H	599	
MH003	504	L	543	
MH004	566	605	
MH006	526	565	
MH008	565	604	
S19	513	552	
P10	531	570	
H0E6	511	550	
P5T5	503	542	
S3R8	513	L	552	
89.6	540	L	579	
D117III	542	581	
JR-CSF	535	574	
YU-2	530	569	

		Immundominante Region																																								
		590					600					610					620																									
HXB2R	583	V	E	R	Y	L	K	D	Q	Q	L	L	G	I	W	G	C	S	G	K	L	I	C	T	T	A	V	P	W	N	A	S	W	S	N	K	S	L	E	Q	I	622
MH001	585	624
MH002	600	639	
MH003	544	583	
MH004	606	.	S	.	.	.	R	645	
MH006	566	605	
MH008	605	L	Q	.	.	.	I	R	644	
S19	553	R	592	
P10	571	Q	.	.	.	R	610	
H0E6	551	.	S	590	
P5T5	543	R	582	
S3R8	553	592	
89.6	580	L	R	.	.	.	M	619	
D117III	582	R	621	
JR-CSF	575	M	614	
YU-2	570	R	609	

		C-terminaler Heptadrepeat																																								
		630					640					650					660																									
HXB2R	623	W	N	H	T	T	W	M	E	W	D	R	E	I	N	N	Y	T	S	L	I	H	S	L	I	E	E	S	Q	N	Q	Q	E	K	N	E	Q	E	L	L	E	662
MH001	625	664	
MH002	640	679	
MH003	584	623	
MH004	646	685	
MH006	606	645	
MH008	645	684	
S19	593	632	
P10	611	650	
H0E6	591	630	
P5T5	583	622	
S3R8	593	632	
89.6	620	659	
D117III	622	661	
JR-CSF	615	654	
YU-2	610	649	

		MPER			Transmembrandomäne				
		670	680	690	700				
HXB2R	663	LDKWASLWNW	FNITNWLWYI	KLFIMIVGGL	VGLRIVFAVL				702
MH001	665	W.	D.K.			T.			704
MH002	680	T.	D.SK.						719
MH003	624		D.K.						663
MH004	686		D.K.			T.			725
MH006	646	N.T.	D.S.	R		T.			685
MH008	685	S.KN.							724
S19	633	N.	D.S.			T.			672
P10	651	D.				T.			690
H0E6	631		D.Q.			S.	I		670
P5T5	623		D.S.						662
S3R8	633	T.S.	D.				I	I	672
89.6	660		D.	R					699
D117III	662		D.	R			F		701
JR-CSF	655		G.K.			S.			694
YU-2	650		D.K.			V.			689

		710	720	730	740				
HXB2R	703	SIVNRVRQGY	SPLSFQTHLP	TPRGPDRPEG	IEEEGGERDR				742
MH001	705		R.	A.					744
MH002	720	R.	RH.	G.	T.	N			759
MH003	664			A.E.A.					703
MH004	726		R.	A.		QG.			765
MH006	686	A.	R.	A.	G.	S.			725
MH008	725	H.	LI.	NQ.E.	GR	GQ.			764
S19	673		H.	A.	G.				712
P10	691		RF.	A.	G.				730
H0E6	671			A.	G.				710
P5T5	663	V.		V.	TG.				702
S3R8	673	V.Y.	L.L.	AA.		G.			712
89.6	700		L.	AS.	T.				739
D117III	702		L.R.	G.					741
JR-CSF	695		L.	AT.					734
YU-2	690			AQ.	D.				729

		750	760	*	770	780				
HXB2R	743	DRSIRLVNGS	LALIWDDLRS	LCLFSYHRLR	DLLLIVTRIV				782	
MH001	745	G.G.F.	F.W.	WI.					784	
MH002	760	GP.D.F.	I.V.						799	
MH003	704	G.G.F.	F.	G.	L.				743	
MH004	766	GL.G.F.	F.F.	L.	IA.				805	
MH006	726	T.G.G.L.							765	
MH008	765	S.F.	A.G.		CIS.AA.AG				804	
S19	713	G.GT.D.F.	I.V.						752	
P10	731	T.TP.F.	I.N	L.					770	
H0E6	711	RP.T.F.	I.V.		A.T.				750	
P5T5	703		D.F.		A.				742	
S3R8	713	GP.D.F.	S.	RH.	AA.				752	
89.6	740	GP.F.	F.V.N	L.L.	N.				779	
D117III	742	SP.D.F.	L.V.		L.				781	
JR-CSF	735	GQ.F.	V.	F.	T.				774	
YU-2	730	GP.D.F.	I.V.						769	

			790		800		810		
HXB2R	783	ELLGR	- - - - -	- -	RGWEALKY	WWNLLQYWSQ	ELKNSAVSLL		815
MH001	785	.	.	.	I	.	.	F	817
MH002	800	S	.	F	832
MH003	744	.	.	.	V	.	.		776
MH004	806		838
MH006	766	.	.	.	L	I	.		798
MH008	805	.	SSLKG	LQ	T	LGS	V GL	K I	844
S19	753	.	.	.	I	.	.	F	785
P10	771	.	H	- - - - -	K I	.	I	F	803
HOE6	751	C	.	F	783
P5T5	743	C	.	D F	775
S3R8	753	.	R	- - - - -	.	S	.	Q I	785
89.6	780		812
D117III	782	.	.	.	R I	.	R	F	814
JR-CSF	775	.	.	.	I	.	.		807
YU-2	770	.	.	.	GV	.	I		802

		^ ^ ^			*				
			820		830		840		850
HXB2R	816	NATA	I A V A E G	TDRV	I E V V Q G	ACRA	I R H I P R	R I R Q G L E R I L	855
MH001	818	.	I	.	G L R	.	Y L	.	857
MH002	833	.	.	I	A L R	.	Y L	.	872
MH003	777	.	.	.	L R	.	Y L	.	816
MH004	839	.	I	.	I R	.	LN	.	878
MH006	799	.	I	.	A S R	.	F L	.	838
MH008	845	DT	I	.	I F I R	I	C N	.	884
S19	786	.	I	.	I L R	.	G V L T	.	825
P10	804	.	.	.	A R	.	F F L	.	843
HOE6	784	.	I	.	I F R	.	V V L	.	823
P5T5	776	T	I	.	.	R	.	F L	815
S3R8	786	.	T	.	L R	.	F V I	.	825
89.6	813	.	.	.	K I R	.	N T	A	852
D117III	815	.	I	.	L R	.	G L T	L	854
JR-CSF	808	.	.	.	I R	.	V Y L T	A	847
YU-2	803	.	.	.	I L R	.	F V L V	A	842

Abbildung 43: Env Alignment der LTNP- und HIV-1 Kontrollpatienten mit HXB2R

HXB2R	856	L	856	Identische Aminosäuren sind im Alignment durch einen Punkt
MH001	858	.	858	wiedergegeben (.), freie Positionen durch einen Strich (-),
MH002	873	.	873	Stopcodons mit einem Stern (*). Die Farbbalken markieren die
MH003	817	.	817	Bereiche des Signalpeptids (rot), gp120 (blau) und gp41 (grün).
MH004	879	.	879	Die Bereiche des Signalpeptids, der Variablen Schleifen sowie
MH006	839	.	839	funktioneller Domänen in gp41 sind gelb hinterlegt dargestellt und
MH008	885	.	885	beschriftet. Konservierte Cysteine (*) und N-Glykosylierungs-
S19	826	.	826	stellen in HXB2R (^^^) sind über dem Alignment aufgezeigt. Für
P10	844	.	844	die Interaktion mit dem CD-Rezeptor (rot) bzw. Corezeptor (grün)
HOE6	824	.	824	wichtige Aminosäuren sind in der Sequenz von HXB2R farblich
P5T5	816	.	816	unterlegt.
S3R8	826	.	826	
89.6	853	.	853	
D117III	855	.	855	
JR-CSF	848	.	848	
YU-2	843	.	843	

6.3. Neutralisation HIV-1 Env-rekombinanter Reporterviren

Patient	D117III (R5)		89.6 (dual)		89.6 (dual)		JR-CSF (R5)		YU2 (R5)		NL4-3 (X4)		MH03 (R5)		MH06 (R5)		MH08* (R5)		Mittelwert			
	IC 50	IC 90	IC 50	IC 90	IC 50	IC 90	IC 50	IC 90	IC 50	IC 90	IC 50	IC 90	IC 50	IC 90	IC 50	IC 90	IC 50	IC 90	IC 50	IC 90		
MH01	3.400	115	510	95	420	80	230	50	250	60	>6400	1.600	1.100	360	>1600	135	285	15	1577*	279*		
MH02	>6400	585	1.875	130	1.200	220	280	70	410	85	>6400	670	600	140	>1600	50	140	40	2.101	221		
MH03	270	65	195	<10	80	10	80	<10	35	<10	2.200	230	100	40	>1600	25	40	<10	511	41		
MH04	2.650	265	900	75	250	35	140	20	130	20	>6400	950	260	80	>1600	110	280	15	1.401	174		
MH05	580	55	230	20	95	15	50	<10	45	<10	760	160	95	25	>1600	40	180	15	404	37		
MH06	1.450	150	1.050	50	390	60	220	35	160	40	3.050	370	430	95	>1600	35	100	30	939	96		
MH07	3.200	340	1.950	90	380	50	120	15	140	20	>6400	740	320	105	>1600	75	800	20	1.657	162		
Mittelwert	2.564	225	959	66	402	67	160	27	167	32	4.516	674	415	121	1.600	67	261	19	1.227	144		
A6N3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	<10	<10	<10	25	<10	<10	<10	21	<10		
P5T5	530	90	430	60	160	15	150	<10	20	<10	5.150	530	130	20	>1600	15	35	<10	912	81		
H0E6	180	20	10	<10	50	10	<10	<10	25	<10	1.650	100	<10	<10	>1600	15	15	<10	392	16		
S3R8	1.050	100	400	90	170	20	60	<10	90	15	4.100	400	260	55	>1600	30	15	<10	861	79		
S6	85	20	180	50	220	35	600	70	100	55	840	85	130	40	510	50	85	15	306	47		
S19	330	30	180	50	120	<10	125	20	50	15	1.000	135	120	20	>1600	20	15	<10	393	32		
P10	400	65	160	50	85	10	75	<10	40	15	1.350	210	270	70	>1600	20	20	<10	444	49		
Mittelwert	368	46	194	43	115	13	144	13	46	14	2.036	209	130	29	1.219	21	26	2	475	43		
HIV neg	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	2	0		
P Wert																					0,003	0,005

Tabelle 17: Neutralisation der HIV-1 Env-rekombinanter Reporterviren

HIV-1 Subtyp C Isolat

* Reziproke Verdünnung, um 50% bzw. 90% Neutralisation zu erzielen.

c Die Berechnung der p-Werte erfolgt unter der Annahme $\alpha = 0,05$.

HIV neg. ist eine Kontrolle mit HIV-1 negativen Plasma. Das Isolat 89.6 wurde sowohl auf U87.CD4.CCR5 Zellen getestet (linke Spalte), als auch auf U87.CD4.CXCR4 Zellen (rechte Spalte).

6.5. Hybridoma-ELISA Untersuchung

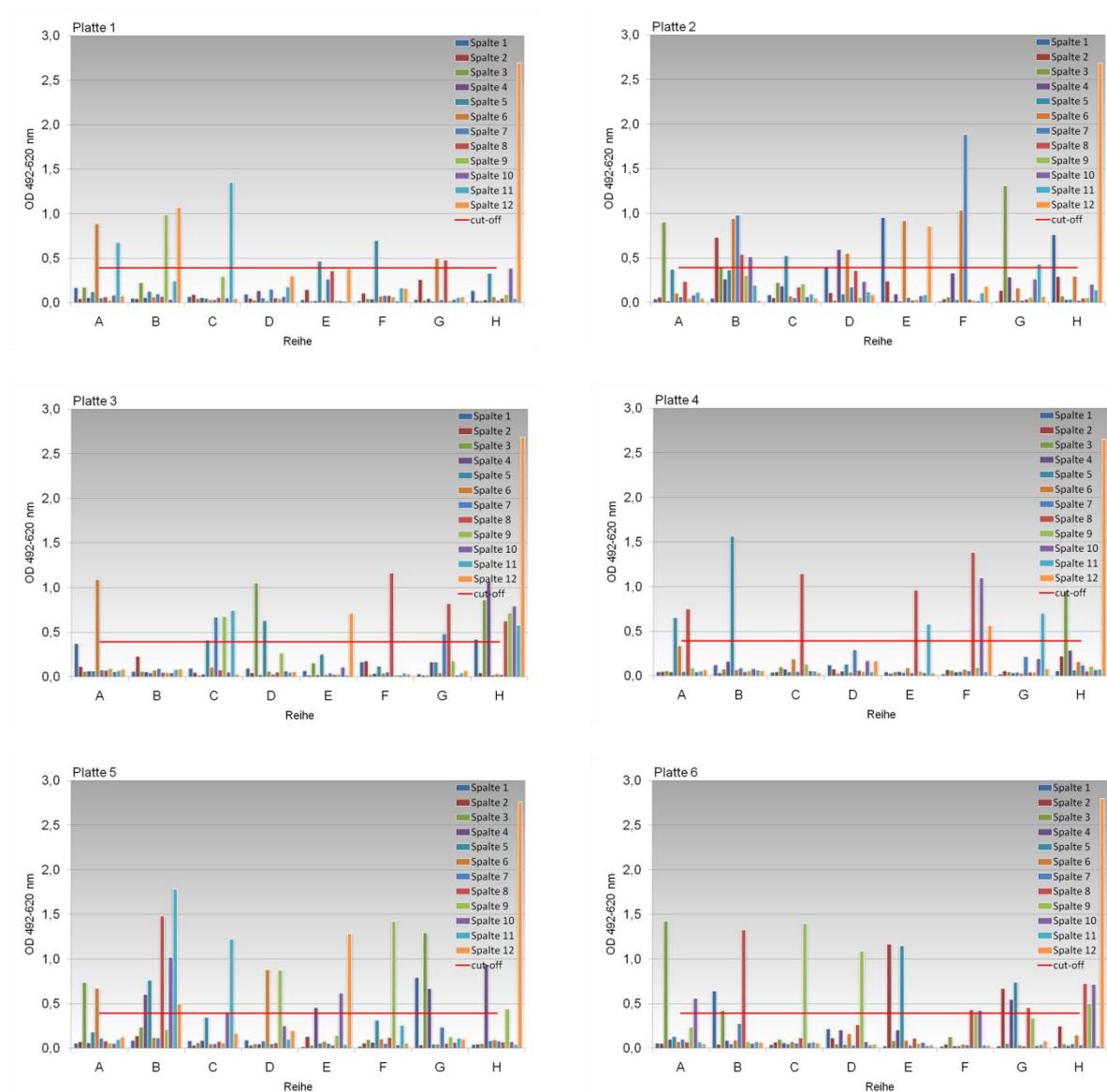


Abbildung 45: Hybridoma ELISA HIV-1 gp140 Bindungsreaktivität

HIV-1 gp140 beschichtete Platten wurden mit 100 µl Hybridomaüberstand inkubiert. Der Nachweis gebundener Mausantikörper erfolgte mit einem α -Maus-HRP Antikörper (1:5.000). Negativkontrolle (G12): Zellkulturmedium; Positivkontrolle (H12): HIV-1 positives Serum (1:1.000) und α -Human-HRP Antikörper (1:5.000).

DANKSAGUNG

Die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in einem ‚greifbaren‘ und aktuellen Forschungsfeld wie das der HIV-1 Forschung anfertigen zu können, brachte mich nach Jahren des Studierens und Laborierens zurück an den Anfang: Forschen für das Leben. Dieser Praxisbezug war es, der mich während meines Studiums öfters davor bewahrte die Flinte ins Korn zu werfen und etwas völlig Neues anzupacken. Der intensive Kontakt mit der Immunologie, allen voran den Antikörper, sowie der Umgang mit neuen, interessanten Methoden führten zu einer interessanten und lehrreichen Laborzeit.

Für die Bereitstellung des Projekts und die umfassende fachliche Betreuung möchte ich Frau Dr. Ursula Dietrich danken. Herrn Prof. Dr. Bernd Groner danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Georg-Speyer-Haus anfertigen zu können und Herrn Prof. Dr. Volker Dötsch für die Betreuung seitens des Fachbereichs Biochemie der Universität Frankfurt am Main. Bei Frau Prof. Dr. Dorothee von Laer und Herrn Prof. Dr. Winfried Wels möchte ich mich für zahlreiche, lehrreiche Diskussionen und Anregungen bedanken.

Dr. Boris Brill, Julia Dietz, Dr. Michael Humbert und Dr. Michael Hust möchte ich für ihre Betreuung und Unterstützung im Labor, den zahllosen Diskussion der gemeinsamen und eigenen Arbeit, sowie ihrer Hilfe im Umgang mit ‚Lust und Frust am Forschen‘ und den Stunden außerhalb des Labors danken. Den Mitarbeitern am GSH, allen voran den Mitgliedern der AG Dietrich und der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Dübel an der Technischen Universität Braunschweig danke ich für die kreative und produktive Atmosphäre, die vielen gemeinsamen Stunden an den Instituten, sowie den zahllosen Tipps und Tricks. Besonders erwähnen möchte ich Frau Margot Landersz, die zu jeder Zeit mindestens ein offenes Ohr und eine helfende Hand parat hält, um bei Problemen, Engpässen oder Schwierigkeiten zur Stelle zu sein; nebenbei wird dann noch ‚ein wenig‘ sequenziert! Danke, Margot.

Für ihre tatkräftig Unterstützung im Labor und der gemeinsamen Arbeit am Projekt danke ich Nicole Walz und Maria Hertje, die ich während ihrer Diplomarbeiten am Georg-Speyer-Haus betreuen durfte.

Die Grundlage all dieses ‚Guten Schaffens‘ wurde jedoch schon vor Jahren von zwei besonderen Menschen gelegt. Da mit der nun vollendeten Doktorarbeit die ‚versprochene‘ Ausbildung endet: Danke, Mum und Dad. Für die umfassende Unterstützung in all ihren Formen, den Rückhalt, das Fundament und die Basis die ihr vor Jahren gelegt habt. Von ganzem Herzen Danken möchte ich auch meinen Geschwistern sowie meiner Freundin Monika, die mich über all die Jahre hinweg begleiteten und es immer verstanden, mir auch in tiefster Finsternis, Hoffnung und Zuversicht zu schenken.

LEBENS LAUF

Name: Antoni
Vorname: Sascha Martin
Adresse: Kantor-Jörg-Straße 3
63579 Freigericht
Deutschland
e-Mail: Sascha.Antoni@gmx.net
Geburtsdatum: 29. April 1978
Geburtsort: Hanau

Ausbildung

1984-1988	Grundschule Bernbach	Freigericht
1988-1997	Kopernikusschule Freigericht	Freigericht
1997-2003	Johann Wolfgang Goethe-Universität	Frankfurt
Diplomarbeit:	Optimierung der <i>in vitro</i> Synthese von Proteinen und <i>in vitro</i> Expression membranständiger Proteine	
Abschluss:	Diplom Biochemiker mit der Note 1,2	
2003-2007	Georg-Speyer-Haus	Frankfurt
Doktorarbeit:	Charakterisierung genetischer, viraler und immunologischer Eigenschaften von HIV-1 Langzeit Nicht-Progressierenden Patienten	

Stipendien

2000-2007	e-fellows.net (Netzwerk Community für Studenten, Alumni und Firmen)	München
-----------	--	---------

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 25. August 2008

Sascha Antoni

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Charakterisierung genetischer, viraler und immunologischer Eigenschaften von HIV-1 Langzeit Nicht-Progressierenden Patienten“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 25. August 2008

Sascha Antoni

Lache, wenn's nicht zum Weinen reicht

Herbert Grönemeyer, Mensch