

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut der  
Universität München  
Lehrstuhl für Virologie  
Prof. Dr. U. Koszinowski

Therapieversagen unter Einsatz des ersten HIV-Fusionsinhibitors, T-20.  
Analyse von Resistenzmutationen

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Gerrit Heide Thole  
Goslar  
2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Herr Professor Dr. Josef Eberle

Mitberichterstatter: Herr Professor Dr. Gunnar Schotta

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Herr Dr. med. Martin Obermeier

Dekan: Herr Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2008



## **Abkürzungsverzeichnis**

Cop	Copies
Env	Envelope
Gag	Group specific antigen
Gp	Glycoprotein
HA	Hämaggglutinin
HAART	Highly active antiretroviral therapy
HR1	Heptad repeat 1
HR2	Heptad repeat 2
kD	Kilodalton
LTR	Long terminal repeats
Nef	Negative factor
NRTI	Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
NtRTI	Nukleotidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
NNRTI	Nichtnukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
PI	Proteaseinhibitoren
Pol	Polymerase
Rev	Regulator of virion proteins
Res	(Aminosäure-)Residuen
ST	Schmelztemperatur
Tat	Transactivator of transcription
Tev	Tat-env-rev-Protein
Vif	Viral infectivity factor
Vpr	Viral protein rapid
Vpu	Viral protein out
Vpx	Viral protein x

# Inhaltsverzeichnis

Seite

<b>I Einleitung</b> .....	7
<b>I 1. Epidemiologische Daten</b> .....	7
<b>I 2. struktureller Aufbau von HIV-1</b> .....	8
I 2. 1. HIV-1 Viruspartikel .....	8
I 2. 2. Genom von HIV-1 .....	9
I 2. 3. Das HIV-1 Hüllprotein Env .....	11
<b>I 3. Prinzipien der <math>\alpha</math>-Helix</b> .....	14
I 3. 1. Die Helices des Transmembranproteins gp41 .....	16
<b>I 4. Vermehrung des HI-Virus</b> .....	17
I 4. 1. Der HIV-1 Fusionsprozess .....	17
I 4. 2. Die intrazelluläre Virusreplikation .....	19
<b>I 5. Therapiegrundlagen der HIV-Infektion</b> .....	20
I 5. 1. Der Fusionsinhibitor T-20 .....	21
<b>I 6. Ziel der Doktorarbeit</b> .....	21
<b>II Material und Methodik</b> .....	23
<b>II 1. Primerselektion</b> .....	23
<b>II 2. Extraktion</b> .....	24
<b>II 3. Reverse Transkription</b> .....	25
<b>II 4. Polymerasekettenreaktion (PCR)</b> .....	25
<b>II 5. Agarosegelektrophorese</b> .....	27
<b>II 6. Optimierung der PCR-Bedingungen</b> .....	29
II 6. 1. Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ )-Titration .....	29
II 6. 2. Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ )-Verdünnungsreihe .....	31
II 6. 3. Veränderung der Annealing-Temperatur .....	33
II 6. 4. Ergebnis der PCR-Optimierung .....	33
<b>II 7. Sequenzierung</b> .....	34
<b>II 8. Vergleichssequenz</b> .....	35
<b>II 9. Patienten</b> .....	35

<b>II 10. Liste der Computerprogramme.....</b>	36
<b>III Ergebnisse .....</b>	37
<b>III 1. Datenbanksequenzen und Einschlußkriterien einer Mutation .....</b>	37
<b>III 2. Differenzierung der Mutationsorte .....</b>	40
<b>III 3. Mutationsergebnisse .....</b>	41
III 3. 1. Verteilung der Mutationen auf die gp41-Region .....	41
III 3. 2. N-terminal gelegene Mutationen .....	41
III 3. 3. C-terminal gelegene Mutationen .....	41
III 3. 4. Im Verbindungsstück mit Cystein-Loop gelegene Mutationen .....	42
III 3. 5. Kombination von Mutationspositionen .....	44
III 3. 6. Kombination von Mutanten .....	45
III 3. 7. Darstellung der Mutationen im Modell .....	46
III 3. 8. Lage der Mutationen in der $\alpha$ -Helix .....	47
III 3. 9. Viruslast und CD4-Zellzahl .....	51
III 3. 10. Änderung von Mutationen im Therapieverlauf mit T-20 .....	51
<b>IV Diskussion .....</b>	54
<b>V Zusammenfassung .....</b>	62
<b>VI Literaturliste .....</b>	63
<b>VII Danksagung .....</b>	70
<b>VIII Anhang .....</b>	71
<b>VIII 1. Datentabelle .....</b>	71
<b>VIII 2. Curriculum vitae .....</b>	74

# I Einleitung

## I 1. Epidemiologische Daten

Im Jahr 2007 waren weltweit 33,2 Millionen Menschen mit dem Humanen Immunodefizienz Virus (HIV) infiziert. Es gab 2,5 Millionen Neuinfektionen und 2,1 Millionen Menschen starben an den Folgen von AIDS. Während das Epizentrum nach wie vor im südlichen Afrika lag, musste eine Zunahme der Inzidenz in Europa verzeichnet werden. Auch der Anteil HIV infizierter Frauen und Kinder stieg. In Deutschland lebten im letzten Jahr ca. 59000 Menschen mit HIV (UNAIDS-Bericht 2007, Robert Koch Institut Archiv).

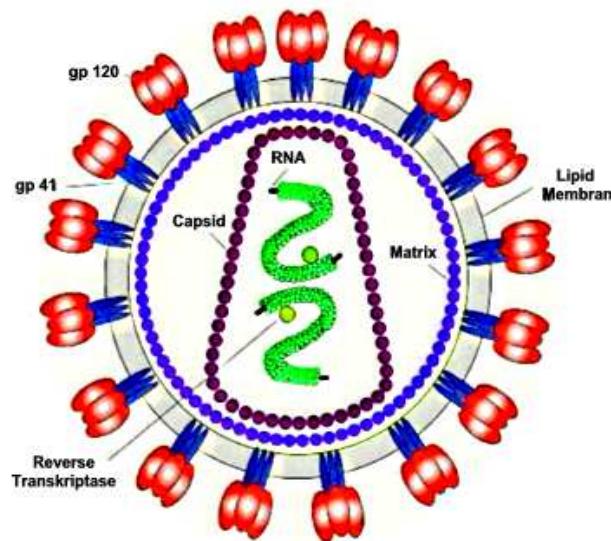
HIV gehört zur Familie der Retroviren, Genus Lentiviren. Aufgrund von Sequenzunterschieden differenziert man zwischen zwei Typen: HIV-1 und HIV-2. HIV-1 wird weiter in die drei Gruppen

M (= major), mit den Subtypen A bis H,  
O (= outlier) und  
N (= new) unterteilt.

HIV-1 M, Genotyp B, ist die in Westeuropa und den USA am weitesten verbreitete Variante. Bei HIV-2, welches erstmals aus einem westafrikanischen Patienten isoliert werden konnte, heute aber weltweit verbreitet ist, unterscheidet man zwischen den Genotypen A-K. Wichtige Vertreter im Tierreich sind die Affenimmundefizienzviren SIV (Modrow et al., 2003).

## I 2. Struktureller Aufbau von HIV-1

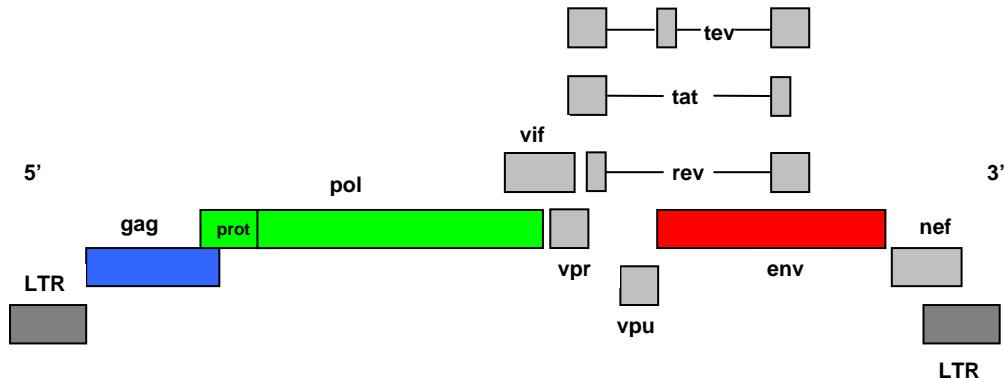
### I 2.1. HIV-1 Viruspartikel



**Abb.1:** Modell von HIV-1 (modifiziert nach Mandell et al., 2004)

Retroviren ähneln sich bezüglich ihres Aufbaus und ihrer Größe. Der Durchmesser eines Viruspartikels beträgt ca. 100 nm. Die äußere Begrenzung von HIV-1 wird von einer Hüllmembran gebildet, welche mit den Glycoproteinen gp120 und gp41 knopfartig durchsetzt ist. Die Innenseite der Hüllmembran ist mit strukturgebenden Matrixproteinen verbunden. Dringt man weiter ins Zentrum vor, so gelangt man zum Viruscapsid, oder Core, welches das Virusgenom, zwei identische Moleküle einzelsträngiger, nicht verbundener RNA enthält. Die RNA ist mit Nucleocapsidproteinen komplexiert. Ebenfalls im Capsid enthalten sind die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease. Über ein Link-Protein (p6) steht das Capsid in Verbindung mit der Hüllmembran (Modrow et al., 2003).

## I 2.2. Genom von HIV-1



**Abb. 2:** Genomaufbau von HIV-1. Die Envelope-Region ist in rot dargestellt (modifiziert nach Modrow et al., 2003).

Das Genom von HIV-1 besteht aus einzelsträngiger mRNA, die bis zu 9200 Basen lang ist und für bestimmte virale Proteine codiert. Am 5'-Ende befindet sich eine als Primer-Bindungsstelle bezeichnete Sequenzfolge aus 18 Nucleotiden, an die ein Molekül zellulärer tRNA hybridisiert ist. Hier beginnt die Vervielfältigung der viralen Erbinformation. Bei den Virusproteinen unterscheidet man zwischen gruppenspezifischen Antigenen (gag-Proteine), Enzymen (pol-Genprodukte), Membranproteinen (env-Genprodukte), Transaktivatoren (tat-Proteine), posttranskriptionell wirkenden Transaktivatoren (rev-Protein) und akzessorischen Proteinen (vif-Protein, vpr-Protein, vpu-Protein, nef-Protein) auf die nachfolgend im Einzelnen kurz eingegangen wird:

**LTR-Region:** Die sogenannten „long terminal repeats“ (LTR) bestehen aus den Regionen R, R5 und U3, welche für die reverse Transkription und die Integration der viralen Erbinformation in die zelluläre DNA bedeutsam sind. Als Kontrolleure der retroviralen Genexpression sind sie an beiden Enden des Genoms vertreten. Eine bestimmte Sequenzfolge in U3 z.B. bindet ein zelluläres Transaktivatorprotein, welches nach Stimulierung durch das Immunsystem in aktiver Form vorliegt, und leitet dadurch die virale Genexpression

ein. So kann jede Stimulation des Immunsystems die HIV-Expression induzieren.

**gag-Proteine:** Hierzu zählen die Matrix-, Capsid- und Nucleocapsidproteine, sowie das Link-Protein p6, welches eine Verbindung des Capsids zur Hüllmembran herstellt. Die gag-Proteine werden als Vorläufer produziert und durch eine virale Protease in ihre aktive Form gespalten. Das Matrixprotein p17 fördert intrazellulär den Transport des in doppelsträngige DNA überschriebenen Virusgenoms (Präintegrationskomplex) in den Zellkern und ermöglicht die HIV-Infektion teilungsinaktiver Zellen. Die Nucleocapsidproteine interagieren mit der RNA. Als gruppenspezifische Antigene induzieren die gag-Proteine humorale und zelluläre Immunantworten.

**pol-Genprodukte:** Darunter fallen die virale Protease, die Reverse Transkriptase und die Integrase, die wichtige Angriffspunkte antiretroviraler Therapeutika sind (s.u.).

Die pol-Genprodukte werden ebenfalls als Vorläuferproteine synthetisiert und wie die gag-Proteine durch die aus 99 Aminosäuren bestehende Protease prozessiert. Die Reverse Transkriptase, ein aus zwei Proteineinheiten bestehendes Heterodimer, ist das besondere Charakteristikum der Retroviren, da sie virale RNA in doppelsträngige DNA umschreiben kann. Zusätzlich fungiert sie als RNase H und baut den RNA-Anteil von DNA/RNA-Hybriddoppelsträngen ab. Da die Reverse Transkriptase keine Mechanismen zur Kontrolle der Lesgenauigkeit besitzt, werden mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit ( $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$ ) falsche Basen in die neusynthetisierten Stränge eingebaut, was eine hohe genetische Variabilität der Retroviren zur Folge hat. Die Integrase übernimmt als Endonuclease und Integrase eine Doppelfunktion und katalysiert die Integration der in doppelsträngige DNA übersetzten viralen Erbinformation in das Zellgenom.

**env-Gene:** Die env-Gene codieren für Glycoproteine, welche die Fusion von HIV-1 mit der Zelle veranlassen. Aufgrund ihrer Relevanz im Rahmen dieser Studie werden sie in Abschnitt I 2.3. gesondert abgehandelt.

**tat-Proteine:** tat bedeutet „transactivator of transcription“. **tev-Proteine** verbinden die tat-Proteine mit Abschnitten der env- und rev-Gene (tev = tat, env, rev). Die drei tat-Proteinvarianten fungieren im Zellkern als Transaktivatoren der Transkription und verstärken die vom LTR-Promotor

ausgehende Wirkung um mehr als hundertfach. Ein bestimmter Anteil der tat-Proteine wird nach der Synthese sezerniert, bindet auf der Oberfläche anderer Zellen und wird von diesen aufgenommen. Dadurch kann die Transaktivierung zellulärer Gene und die Synthese von Enzymen, Cytokinen, Wachstumsfaktoren, etc. beeinflusst werden.

**rev-Protein:** Die „regulators of expression of virion proteins“ (rev) sind essentiell für die zeitliche Bahnung der posttranskriptionellen Genexpression. Sie bewirken den Transport bestimmter mRNA-Spezies ins Cytoplasma, wo sie in die entsprechenden Proteine translatiert werden. Mit Ausnahme der Synthese des rev-Proteins selbst, sowie der tat-, tev- und nef-Proteine, ist die Translation aller anderen viralen Polypeptide von der Aktivität dieser Region abhängig.

**vif-Protein:** Das vif-Protein (viral infectivity factor) bildet zusammen mit dem **vpr-Protein** (viral protein rapid), dem **vpu-Protein** (viral protein out), dem **vpx-Gen** (viral protein x) und dem **nef-Protein** (negative factor) die Gruppe der akzessorischen Proteine. Diese regulieren die Infektiosität der Viruspartikel (vif), beschleunigen die Virusreplikation und wirken am Transport von Virusbestandteilen in den Zellkern mit (vpr). Zudem fördern sie die Freisetzung von Nachkommenviren (vpu), verstärken die Replikationsfähigkeit (vpx) und steigern die Infektiosität von HIV-1 (nef) (Modrow et al., 2003).

### I 2. 3. Das HIV-1 Hüllprotein Env

Die Membranproteine von HIV-1 sind für initiale Schritte im Replikationszyklus (Fusion) unerlässlich und können zusätzlich eine Synzytiumformation, d. h. das Verschmelzen infizierter mit benachbarten nicht infizierten Zellen, veranlassen (Cao et al., 1993).

Die Hülle (Env) von HIV-1 wird von mehreren knopfartigen Strukturen durchsetzt. Diese liegen als Trimere vor (s. u.), wobei das Monomer ein Molekulargewicht von 160 kD aufweist. Jedes einzelne dieser Hüllproteine wird als Precursormolekül gp160 synthetisiert und durch eine zelluläre, mit dem endoplasmatischen Reticulum und dem Golgi-Apparat assoziierte,

Protease in zwei Untereinheiten -gp120 und gp41- gespalten (Allan et al., 1985; Veronese et al., 1985).

Gp120 und gp41 bleiben durch nicht-kovalente Bindungen assoziiert und bilden Oligomere auf der Virushülle (Kowalski et al., 1987; Earl et al., 1990; Helseth et al., 1991; Weissenhorn et al., 1996). Man geht davon aus, dass es sich um Trimere handelt, aber auch die Formation von Dimeren und Tetrameren wurde beschrieben, was eine Koexistenz verschiedener gp120-gp41-Oligomere nicht ausschließt (Gelderblom et al., 1987; Pinter et al., 1989; Schwallauer et al., 1989; Earl et al., 1990; Weiss et al., 1990; Weissenhorn et al., 1996; Chan et al., 1997). Für die Oligomerisation des HIV-1 Hüllproteins wurden Sequenzen des gp41-Transmembranproteins verantwortlich gemacht (Pinter et al., 1989; Earl et al., 1990). Aus der Beobachtung, dass die Deletion C-terminaler Teile von gp41 (s. u.) zu monomerer gp160-Konformation führt, wurde eine Beteiligung dieses Bereiches an der Bildung von Trimeren geschlussfolgert (Mische et al., 2005).

Ein gp120-Molekül kann in drei Bereiche unterteilt werden. Der auf der Virusmembran exponierte äußere Bereich bildet den größten Anteil. Er enthält fünf variable Anteile (V1-V5) und ist u. a. für die Anlagerung an die CD4-Zelle und den Korezeptor-Gebrauch verantwortlich. Durch die Oberflächenexposition induzieren die variablen Regionen die Bildung gp120-spezifischer Antikörper, von denen einige das HI-Virus neutralisieren können (Modrow et al., 2003).

Man unterscheidet zwei relevante Korezeptoren für HIV: CXCR4 und CCR5. Alle HIV-1 Stämme können CXCR4, CCR5 oder beide Korezeptoren nutzen (Deng et al., 1996; Clapham et al., 2002; Greenberg und Cammack, 2004). Die Bereiche V3 und V1/V2 determinieren den HIV-1-Tropismus, d. h. die Vorliebe für bestimmte Abwehrzellen wie Makrophagen, Monozyten oder CD4-Zellen. Da Makrophagen den Chemokinrezeptor CCR5, T-Helferzellen hingegen CXCR4 an der Oberfläche tragen, entscheidet die Korezeptor-Spezifität einzelner HIV-1-Isolate über den Infektionsprozess (O'Brian et al., 1990; Chesebro et al., 1991; Hwang et al., 1991; Shioda et al., 1991; Fouchier

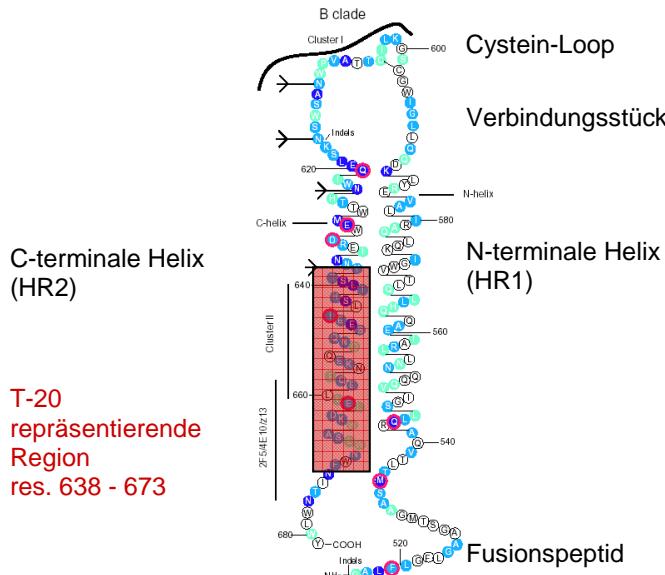
et al., 1992; Trujillo et al., 1996; Koning et al., 2002; Modrow et al., 2003). Durch Mutationen im Bereich der V3-Region konnte die Sensitivität von HIV-1 gegenüber C-Peptiden, die als Fusionsinhibitoren therapeutisch zum Einsatz kommen, (s. u.) beeinflusst werden (Reeves et al., 2002). Ebenfalls in die Bindung des Korezeptors involviert ist eine aus vier  $\beta$ -Faltblättern bestehende Brückenregion, welche die Verbindung zum inneren Teil von gp120 herstellt. Dieser ist aus fünf konservierten Regionen (C1-C5) aufgebaut und interagiert mit gp41.

Gp41 ist ein Transmembranprotein. Während die äußere Hälfte als Ektodomäne exponiert ist, verankert der innere Teil, die so genannte „membrane spanning domain“ (gp41 Residuen 178-199 bzw. HXB2 Residuen 689-710), den Hüllkomplex in der viralen Matrix (Kowalski et al., 1987; Helseth et al., 1991; Cao et al., 1993; Kwong et al., 1998, 2000; Koning et al., 2002).

Die bedeutsame Ektodomäne lässt sich in vier Bereiche unterteilen:

- ein hydrophobes, glycinreiches Fusionspeptid, N-terminal gelegen (gp41 res. 1-16 bzw. HXB2 res. 512-527)
- eine N-terminale stabartige  $\alpha$ -Helix: N-terminal heptad repeat/ Heptad repeat 1 (NHR/ HR1; res. 17-72 bzw. 528-583)
- ein Verbindungsstück (res. 73-112 bzw. 584-623) mit cysteinreichem Loop (res. 87-93 bzw. 598-604), zwischen HR1 und HR2 gelegen
- eine C-terminale stabartige  $\alpha$ -Helix: C-terminal heptad repeat/ Heptad repeat 2 (CHR/ HR2; res. 113-167 bzw. 624-678)

(Gallaher et al., 1987, 1989; Cao et al., 1993).



**Abb. 3:** Modell von gp41 (modifiziert nach Sanders et al., 2002)

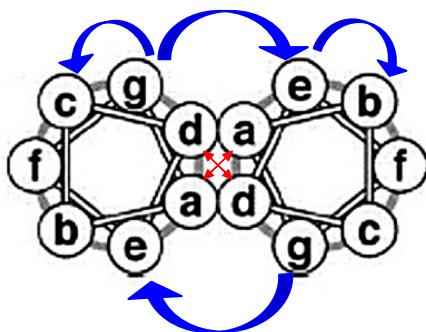
Wie bereits erwähnt bilden gp120 und gp41 Oligomere auf der Virusmembran. Für den Fusionsprozess wichtige Strukturen, wie die  $\alpha$ -Helices der gp41-Ektodomäne, kommen in jeweils dreifacher Anzahl vor und liegen eng benachbart im Laufe der Fusion.

### I 3. Prinzipien der $\alpha$ -Helix

Bereits im Jahr 1953 berechnete Crick, dass eine  $\alpha$ -Helix die Struktur einer rechtsgängig gewendelten Spirale mit genau definierten Abschnitten und Positionen aufweist. Hydrophobe und polare Reste („aminoacid residues“), welche aus der Knüpfung von Peptidbindungen zwischen Aminosäuren, unter Abspaltung von Wasser resultieren, laufen in einem zusammenhängenden, heptanen Schema fort. Dabei stehen sich die CO-Gruppe in einer Windung und die NH-Gruppe der vierten darauf folgenden Aminosäure in der nächsten Windung gegenüber. Durch die fortlaufende Kette der N- und C-Atome entsteht das Gerüst der Kette, welche zudem durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert wird (Crick, 1953; Zeeck et al., 1992).

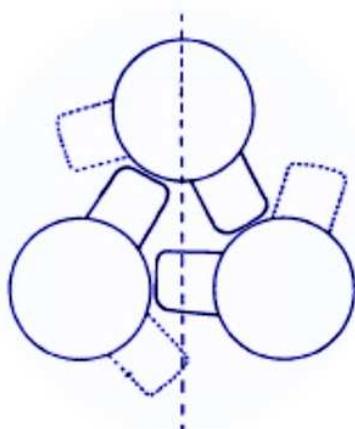
Die Abfolge der hydrophoben und polaren Reste (a-g), sowie deren Wechselwirkungen lässt sich auch im so genannten „helical wheel“ darstellen (Walshaw und Woolfson, 2003, s. Abb. 4). Die hydrophoben Reste nehmen die Positionen a und d ein, d. h. sie finden sich alternierend drei oder vier

Positionen voneinander entfernt. Da eine Helixwindung genau 3,6 Aminosäureresiduen enthält, vereinen sich die a und d gelegenen, d.h. 4,3-hydrophoben Reste zu einem hydrophoben Saum. Nun sind aber selbst zwei komplette Helixwindungen nicht ganz ausreichend für sieben Residuen, und folglich dreht sich der Helixsaum ein Stück, entgegengesetzt zur Helix, d. h. linksherum. Für Interhelixbeziehungen, d. h. die Ausbildung hydrophober Kräfte zwischen a und d Positionen zweier Stränge, ist es dann unerlässlich, dass sich beide Helices umeinanderwinden. (Crick, 1953; Walshaw & Woolfson, 2003 s. Abb.3).



**Abb. 4:** „helical wheel“ einer Doppelhelix (modifiziert nach Walshaw & Woolfson, 2003)  
Blau = Polare Wechselwirkungen  
Rot = Hydrophobe Wechselwirkungen

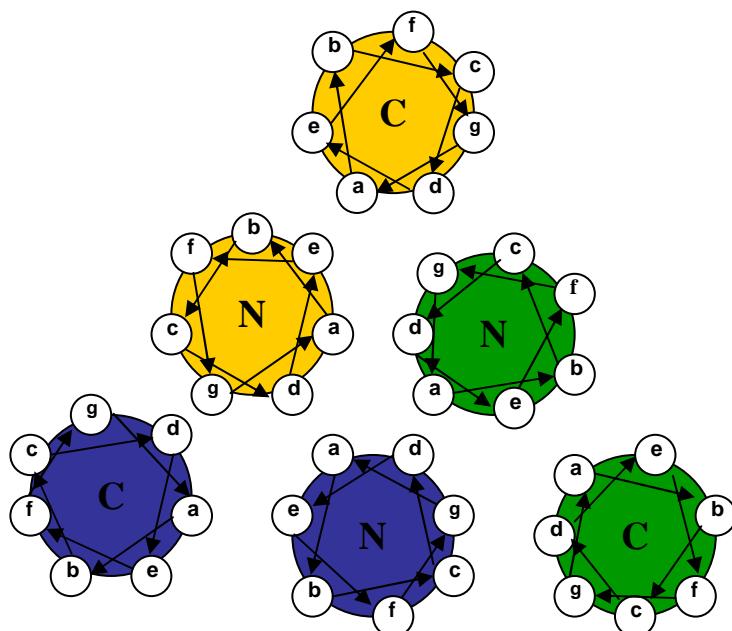
Crick fand heraus, dass sich die Helices in einer „knobs-into-holes-Form“ um eine zentrale Achse legen (1953 s. Abb.4).



**Abb. 5:** Model einer Trippelhelix zur Illustration des knobs-into-holes-Schemas; die Kreise stellen die Hauptpolypeptidketten dar, die „knobs“ die Seitenketten. Gezeigt sind nur die inneren Seitenketten (modifiziert nach Crick, 1953).

### I 3. 1. Die Helices des Transmembranproteins gp41

Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Röntgen-Kristallographie Untersuchungen gaben Hinweise auf die genauere atomare Struktur von gp41. Gp41 kann in drei Formationen unterschiedlicher energetischer Stabilität vorliegen- in einem nativem, in einem funktionsaktiven Zustand und in einem Zwischenstadium (Weissenhorn et al., 1996, 1997; Chan et al., 1997; Chan und Kim, 1998; Mische et al., 2005). Im fusionsaktiven Zustand liegen die gp41 Helices als Bündel aus sechs Helices vor (s. u.). In dieser Konformation können die einzelnen Helixpositionen nach der Theorie von Crick gut dargestellt werden.



**Abb. 6:** Modell des helikalen, fusionsaktiven gp41-Trimmers (Ansicht von oben). Die farblich gleich dargestellten N-und C-terminalen Helices bilden jeweils ein Heterodimer (modifiziert nach Lu et al., 1995).

Die Struktur von gp41 wurde häufig mit Fusionsproteinen anderer Viren, v. a. mit dem Influenza HA2-Protein und dem Moloney Murine Leukemia Virus verglichen, und auch den Fusionsprozess betreffend zog man Parallelen (Chen et al., 1995; Weissenhorn et al., 1996, 1997; Chan et al., 1997; Chan und Kim, 1998; Rimsky et al., 1998).

## I 4. Vermehrung des HI-Virus

Der Replikationszyklus des Humanen Immundefizienz Virus umfasst zehn Schritte:

- |                          |                             |
|--------------------------|-----------------------------|
| 1. Adsorption            | 6. Transkription            |
| 2. Fusion                | 7. Translation              |
| 3. Uncoating             | 8. Zusammenlagerung         |
| 4. Reverse Transkription | 9. Knospung und Freisetzung |
| 5. Integration           | 10. Reifung                 |

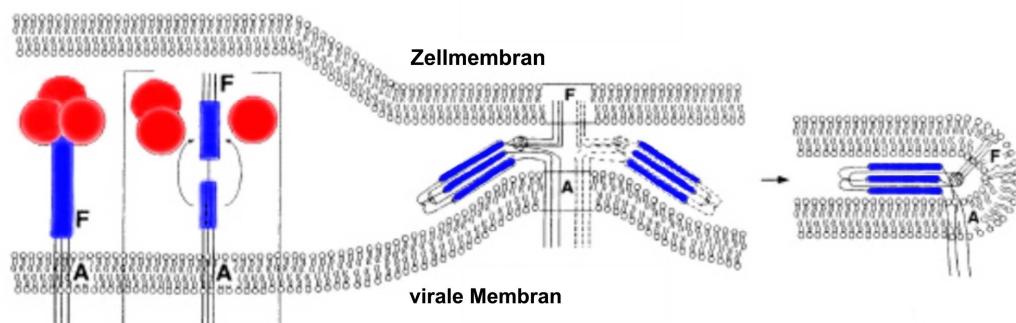
Die ersten beiden Punkte werden im folgenden Abschnitt gemeinsam abgehandelt.

### I 4. 1. Der HIV-1 Fusionsprozess

Erste Hinweise bezüglich der genaueren Abläufe des HIV-1 Fusionsprozesses erhielt man durch die Beobachtung, dass synthetische, der C-terminalen Helix nachempfundene Peptide (C-Peptide wie z.B. DP-178, C-34, T-20), die HIV-Infektion und Synzytiumformation verhindern können (Jiang et al., 1993; Wild et al., 1992,1994; Chan et al., 1997; Chan und Kim, 1998). Durch Anbindung an das gp41-Trimer stellen sie kompetitive Hemmer des Fusionsprozesses dar. Gleichzeitig ging man davon aus, dass der Hüllkomplex, ähnlich dem HA2-Protein von Influenza, in verschiedenen Konformationen vorliegen kann, welche im Laufe des Fusionsprozesses zur Ausprägung kommen (s. o.).

Der Fusion voran geht die Anlagerung der hoch konservierten Domäne C3 von gp120 an aminotermrale, an der Oberfläche gelegene Abschnitte eines CD4-Moleküls (CDR2 und CDR3; Adsorption). Dies führt zu einer Konformationsänderung des Hüllkomplexes mit folgender Exposition der Korezeptorbindungsstelle und der V3-Region von gp120 (Koning et al., 2002). Die Interaktion von V3 und der V1/V2-Domäne mit dem Korezeptor (CXCR4, CCR5) verursacht weitere Konformationsänderungen im gp120-gp41-Komplex. Diese liefern die notwendige Energie für die Dissoziation von

gp120 und bewirken dadurch die Exposition des N-terminal, nahe zur viralen Hülle, gelegenen Fusionspeptides von gp41 und sein Eindringen in die zelluläre Membran (Weissenhorn et al., 1997; Chan und Kim, 1998). In diesem zweiten oder Zwischenstadium (s. o.) wurde gp41 als „prehairpin intermediate“ bezeichnet und man nimmt an, dass hier das Zeitfenster für die Anlagerung fusionsinhibierender C-Peptide liegt (Chan und Kim, 1998). Die entstandene Distanz von gp120 und gp41 führt zu einer erhöhten Beweglichkeit der HR1-Regionen, welche sich zu einem trimerischen Bündel („coiled coil“) formieren und nebeneinander anordnen. Die HR2-Regionen werden durch ein Zuklappen an die N-terminale Helices herangezogen, wodurch gp41 einer Haarnadelstruktur gleicht und insgesamt ein Bündel aus sechs Helices („six-helix bundle“) entsteht. Die Oberfläche wird von konservierten, hydrophoben Aminosäureresiduen durchzogen (Chan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1996, 1997). Innerhalb der haarnadelartigen Strukturen bilden sich Disulfidbrücken aus- gp41 ist in seinen stabilen fusionsaktiven Zustand übergegangen. Die Bündelformation bringt die virale und zelluläre Membran in große Nähe (Weissenhorn et al., 1997; Chan und Kim, 1998; Melikyan et al., 2000; Greenberg und Cammack, 2004; Greenberg et al., 2004). Nun kann sich zwischen beiden eine Fusionsspore ausbilden, durch die die virale Erbinformation in die Wirtszelle geschleust wird (Chen et al., 1995; Kliger et al., 2001).



**Abb. 7:** Modell des HIV-Fusionsprozesses (modifiziert nach Weissenhorn et al., 1997)

## I 4. 2. Die intrazelluläre Virusreplikation

Die Struktur des Capsids bleibt nach Aufnahme in die Wirtszelle erhalten, allerdings ändert sich die Konformation und es entsteht ein reverser Transkriptionskomplex, der für Nukleotide durchlässig ist. Durch die Reverse Transkriptase wird das RNA-Genom in doppelsträngige DNA umgeschrieben. An das 5'-Ende der in 5→3'-Richtung vorliegenden RNA ist ein Molekül tRNA (3'→5') gebunden (Primerbindungsstelle). Ausgehend vom 3'-Ende des tRNA-Moleküls synthetisiert die Reverse Transkriptase in 5'→3'-Richtung einen komplementären DNA-Strang. Zusätzlich übernimmt das Enzym als RNase-H den Abbau des RNA-Anteils im Hybridstrang. Der so synthetisierte Primer wird an das 3'-Ende der RNA transferiert. Von dort erfolgt die Elongation des Erststranges in 5'→3'-Richtung und der anschließende Abbau der RNA-Matrize. Ein kleiner Teil der Matrize bleibt allerdings stehen, hybridisiert mit der Primerbindungsstelle des Erstranges und initiiert die Zweitstrang-DNA-Synthese. So entsteht aus der einzelsträngigen Virusgenom-RNA eine doppelsträngige DNA, welche als Präintegrationskomplex, mit Hilfe von p17 und Vpr (s. o.), in den Wirtszellkern transportiert wird. Die virale Integrase katalysiert den Einbau der Viruserbinformation in das Genom der Wirtszelle. Sie schneidet sowohl die Virus- als auch die zelluläre DNA, was zur Entstehung überhängender Enden führt. An diesen werden beide Genome miteinander verbunden. Ungepaarte Basen werden entfernt und durch zelluläre Reparatursysteme ersetzt. Im Rahmen der nun folgenden Transkription, mit Hilfe der RNA-Polymerase II, entstehen gespleißte mRNA-Moleküle, die ins Cytoplasma transportiert und an freien Ribosomen translatiert, oder als RNA-Genom in entstehende Partikel verpackt werden. Die Hüllproteine von HIV-1 (Env) werden als einzige am Endoplasmatischen Reticulum synthetisiert. Die Proteinbereiche werden an Asparaginresten glycosyliert und interagieren zu Oligomeren (Trimeren). Nur das glycosyierte gp120 kann später mit dem CD4-Molekül interagieren. Die viralen Vpu-Proteine verhindern eine frühzeitige Wechselwirkung mit den CD4-Rezeptoren, während die Glycoproteine (gp160) mit Hilfe des Golgi-Apparates zur Zelloberfläche transportiert werden. Auf dem Weg erfolgt bereits ihre Spaltung in die beiden Anteile gp120 und gp41. Alle anderen Virusproteine werden zur Zellmembran

gebracht, an die sie sich anlagern. Der Kontakt führt zur Ausstülpung der entsprechenden Membrananteile an der Zelloberfläche und zu ihrer Abschnürung. In den Vesikeln findet die Reifung von Virusbestandteilen statt, welche die Entstehung der infektiösen Nachkommenviren vervollständigt (Modrow et al., 2003).

## I 5. Therapiegrundlagen der HIV-Infektion

Für die Therapie der HIV-Infektion stehen verschiedene antiretrovirale Stoffklassen zur Verfügung. Man unterscheidet:

- Reverse Transkriptase Inhibitoren
  - Nukleosidanaloge (NRTI)
  - Nukleotidanaloge (NtRTI)
  - Nichtnukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTI)
- Proteaseinhibitoren (PI)
- Integraseinhibitoren
- Fusions-/ Entry Inhibitoren

Die Therapieempfehlungen sind in Leitlinien festgelegt, welche auf randomisierten klinischen Studien basieren (z.B. „Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion“). Die Kombination verschiedener Substanzklassen wird als „highly active antiretroviral therapy“ (= HAART) bezeichnet und ist für einen Therapieerfolg unerlässlich.

Die Verlaufskontrolle erfolgt durch quantitative Bestimmung der CD4+-Lymphozyten und der HIV-RNA und sollte in 2- bis 3-monatigen Abständen erfolgen. Ein Therapieerfolg kann in der Regel erst nach vier Wochen, z.T. nach drei oder sechs Monaten verzeichnet werden, da meist erst in dieser Zeit ein Abfall der HIV-RNA auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze (< 50 cop/ml) stattfindet. Bei erneutem Anstieg der Viruslast kann eine Resistenztestung erforderlich werden, die dem Nachweis von unter Medikamenteneinnahme entstandenen Mutationen im Genom von HIV, mittels Polymerasekettenreaktion und Sequenzierung dient. Durch gezielte

Umstellung der Therapie kann das asymptomatische Latenzstadium von HIV über Jahre hinausgezögert werden.

### **I 5. 1. Der Fusionsinhibitor T-20**

T-20, auch bekannt unter dem Namen Enfuvirtide oder Fuzeon®, ist ein Vertreter der therapeutischen Klasse der Fusionsinhibitoren und wurde Ende 2003 auf dem deutschen Markt zugelassen. Es ist ein Peptid, welches in seinem Aufbau einem Teil des Hüllproteins von HIV-1 entspricht. T-20 ist ein Inhibitor der räumlichen Umstrukturierung des Proteins gp41 und agiert durch spezifische extrazelluläre Bindung an das Virusprotein, wodurch die Fusion zwischen der viralen Zellmembran und der Zielzelle blockiert und dadurch das Eindringen der viralen RNA in die Zielzelle verhindert wird. T-20 sollte in Kombination mit anderen antiretroviralnen Therapeutika eingesetzt werden, sofern ein Therapieversagen unter HAART aufgetreten ist, bzw. eine Unverträglichkeit gegenüber diesen Substanzklassen besteht. Es wirkt spezifisch gegen HIV-1 und hat keine signifikante Aktivität gegen HIV-2 oder SIV. T-20 kann nur durch subkutane Injektion verabreicht werden und wird zweimal täglich appliziert. Die Dosierung liegt ab einem Gewicht  $\geq 42,6$  kg bei 90 mg/ Dosis (Roche Fachinformation, 2005).

### **I 6. Ziel der Doktorarbeit**

Das synthetische Peptid T-20 ist einer linearen, 36 Aminosäuren umfassenden Sequenz in HR2 nachgebildet (Rimsky et al., 1998). Peptide, die der C-terminalen Helix von gp41 entsprechen, werden kurz als “C-Peptide” bezeichnet. Vertreter verbergen sich hinter den Namen C34, DP178, T649, 5-helix und T-20 (Enfuvirtide, Handelsname Fuzeon®). Fusionsinhibitoren wie T-20 lagern sich im Zwischenstadium an die N-terminalen Helices und blockieren dadurch den Übergang in den fusionsaktiven Zustand von HIV-1, für den die Interaktion zwischen NHR und nativer CHR unerlässlich ist. Die Fusion von Virus und Wirtszelle wird unterbunden (Lu et al., 1995; Chan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1997).

Bereits bevor Enfuvirtide zum therapeutischen Einsatz bei HIV zugelassen wurde, erkannte man, dass C-Peptide die Entstehung resistenter HIV-1 Mutanten selektieren.

Die T-20-Resistenz wurde Mutationen im GIV-Motiv (Pos.36-38) des N-terminalen gp41-Bereiches zugeschrieben. Bei T649 liegen die Mutationen C-terminal dieses Gebietes (Rimsky et al., 1998).

Da der C- und N-terminale Bereich im Laufe der Fusion durch die Formation eines Sechs-Helix-Bündels eng benachbart liegen und interagieren, muss von kompensatorischen C-terminalen Mutationen als Antwort auf die N-terminal stattgefundene Resistenzentwicklung ausgegangen werden (Weissenhorn et al., 1997; Chan et al., 1997).

Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung genauerer Erkenntnisse über T-20 induzierte Resistenzmutationen im HIV-1-Transmembranprotein gp41, die Darstellung der Ergebnisse in einem Proteinmodell und dessen Weiterentwicklung.

## **II Material und Methodik**

## II 1. Primerselektion

Die Primerselektion erfolgte mit Hilfe des Los Alamos „Alignment of HIV-1/HIV-2/ SIV Complete Genomes“ ([www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov)), welches sich der HXB2-Referenzsequenz bedient.

Zunächst wurden die konstanten Regionen im Transmembranprotein gp41 der Virushülle gesichtet. Nach Stabilitätskriterien wurden vier, in allen im Alignment aufgeführten Genomen konstante, guanin-cytosinreiche Areale ausgewählt, die sowohl den HR1-, als auch den HR2-Bereich umfassten. Mit dem Los Alamos „PrimAlign“-Programm wurde jeder selektierte Primer anhand 545 historischer Datenbanksequenzen auf Konstanz überprüft.

**FU1:7737-7759** - 5' **GIGGIGC AGACGAAAA AAAGACCAGTG GGAATAGGAG CTTTGTCTCT TGGGTCTCTTG**  
V V Q P E K R A V C I G A L F E I G E I

GGA**CCAGCAG** G**AAGC**TAT GGGCGAGCC TCAATGACGC TGACGGTACA GGCCAGACAA  
G A A G S T M G A A S M T L T V Q A R Q

TTATTCCTTG GTATAGTGCA GCAGCAGAAC AATTGCTGA GGGCTATTGA GGCGCAACAG  
L L S G I V O O N N L L R A I E A O O

CACTGTTGC AACTCACAGT CTGGGGCATC AAGCTAGCTCC AGGCAAGAAT CCTGGCTGTG  
H L L Q L T V W G I K Q L Q A R I L A V

GAAAGATACC TAAAGGATCA ACAGCTCCIG GGGATTTGGG GTTCTCTCTGG AAAACTCATT  
E R Y L K D Q Q L L G I W G C S G K L I

TGCAACATCTG CTGAGCTTG GAAATGCTAGT TGGAGTAATA AATCCTCTGG ACAGATTTGG  
C T T A V P W N A S W S N K S L E Q I 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 L

D K W A S L W N W F N I T N W L W Y I K

TTATTCATAA TGATAGTAGG AGGCTTGGTA GGTTAAAGAAT AGTTTTGCT GTACCTTCT

L F I M I V G G L V G L R I V F A V L S

### 3) **ПОДАЧА АЛЮМИНИЕВОЙ ПЛАСТИКИ**

**Laz 8345-0000** 5' - **TCTC AATGGGTC TATGGAGG** - 3'  
 ATAGGAAAT**AGAG** TTAGGCAGGG ATATTCACC - 3'  
 I V N R V R Q G Y S P

U3: 7797-7817

511 bp

La4: 8287-8308

**Abb. 8:** Ausgewählte Primer (dargestellt in rot: FU1, La2, FU3, La4) an ihrer HXB2-Position. Am rechten und linken Rand ist die Länge der jeweiligen PCR-Produkte angegeben (links 1.PCR, rechts 2.PCR).

Abschließend wurden die Primer bezüglich ihrer Schmelztemperatur (ST) und des prozentualen Guanin-Cytosin-Anteils (GC) mit dem ABI Prism Primer Express Computerprogramm (Applied Biosystems) untersucht:

Primer **FU 1:** ST 58,5 °C %GC 47,8

Primer **La 2:** ST 61,1 °C %GC 52,2

Primer **FU3:** ST 62,9 °C %GC 61,9

Primer **La 4:** ST 59,8 °C %GC 40,9

Aufgrund der Fähigkeit drei lineare Wasserstoffbrücken ausbilden zu können, ist das GC-Basenpaar besonders stabil, mit dem GC-Gehalt steigt die Schmelztemperatur des Primers.

Alle Primer wurden synthetisiert und geliefert von der Firma Sigma-Genosys, Steinheim.

Die Primer erbrachten bei Viruslasten zwischen 2227 und 501187 cop/ml gute Ergebnisse, die mittlere Viruslast betrug 93040 cop/ml. Die niedrigste Viruslast in einer Probe, mit der ein PCR- und ein Sequenzergebnis erzielt werden konnte, betrug 755 cop/ml, die höchste Viruslast in einer Probe, die nicht erfolgreich sequenziert werden konnte, lag bei 11500 cop/ ml.

Der Selektion schloss sich die Verdünnung der Stammprimer auf eine Konzentration von 10 pmol an, um diese für den Einsatz in die Polymerasekettenreaktion gemäß Herstellerempfehlung vorzubereiten.

## II 2. Extraktion

Für die Extraktion aus Patientenmaterial wurde das „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ (Firma Roche, Bestellnummer: 1 858 874) verwendet. Die HIV-RNA wurde fast immer aus Plasma gewonnen, nur in wenigen Fällen aus Serum oder Vollblut. 1ml des Patientenmaterials musste zunächst bei 1000 min<sup>-1</sup> 1 Minute lang zentrifugiert werden. 800 µl des Überstandes wurden verworfen, die Restmenge von 200 µl gut resuspendiert in die Extraktion eingesetzt, und gemäß Herstelleranleitung wurde weiter gearbeitet.

Bei HIV-Plasmaproben musste in die ersten beiden Arbeitsschritte der Extraktion (1. Lyse durch Inkubation mit Proteinase K und Bindepuffer-

Arbeitslösung, 2. Zusatz von Isopropanol) jeweils die doppelte Menge (1. 100 µl Proteinase K, 400 µl zentrifugiertes Material, 400 µl Arbeitslösung, 2. 200 µl Isopropanol) eingesetzt werden. Durch doppelte Konzentration des Extraktionsproduktes und 1:2-Verdünnung der RNA im RT-Schritt, konnte für die sich anschließende PCR wieder eine einheitliche Konzentration von Virus-RNA und Kontroll-DNA erreicht werden. Die Zentrifugation erfolgte mit der Zentrifuge 5417C (Eppendorf).

### **II 3. Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription wurde mit dem „Super Script™ II RNase H- Reverse Transcriptase-Set (Invitrogen life technologies, Cat. No. 18064-014) durchgeführt und wie folgt angesetzt:

4 µl	5x Puffer
2 µl	DTT
2 µl	5mM dNTP
2 µl	3' Primer
0,2 µl	Superscript
10 µl + 10 µl RNA	

Zur Umschreibung (RNA ⇒ cDNA) diente der Primer La 2. Inkubation der Proben bei 45°C über 1 Stunde.

### **II 4. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Zur Amplifikation der Virus-RNA wurden zwei geschachtelte PCRs (nested PCR) verwendet. Ein Vorteil der nested PCR liegt in der hohen Sensitivität, d.h. auch geringe Mengen Materials können amplifiziert werden (Albert und Fenyö, 1990).

Da das Verfahren sehr sensitiv auf Verunreinigungen reagiert, wurden die Empfehlungen von Kwok und Higuchi (1989) berücksichtigt:

- Die PCR wurde in einem separaten Raum mit eigenen PCR-Pipetten angesetzt
- Pipettenspitzen, Eppendorf- und PCR-Tubes wurden vor der Benutzung autoklaviert
- Die verwendeten Reagenzien wurden vor ihrem ersten Einsatz aliquotiert
- Die Handschuhe wurden häufig gewechselt, Spritzer wurden vermieden durch vorsichtiges Öffnen der Tubes
- Aus allen PCR-Reagenzien wurde zunächst ein Mix erstellt, der dann in die PCR-Tubes aufgeteilt wurde, erst danach wurde die cDNA vorsichtig hinzupipettiert.
- In jede PCR wurden Kontrollen eingesetzt
- Fragliche PCR-Resultate wurden in einem neuen PCR-Lauf evaluiert

Die PCR wurde zunächst mit dem „Taq DNA Polymerase“-Kit (amersham pharmacia biotech, Produkt Nummer: 27-0799-64) versucht (Taq DNA Polymerase in 50mM Tris-HCl, pH 7,5; 10xPCR-Puffer: 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl pH 9):

**Material:**

1. 899 DNA (Kontrolle)
2. H 9 (negative Kontrolle)
- 3.-7. Patienten-cDNA
8. 899 cDNA (Kontrolle)

Bei 899 DNA handelt es sich um DNA aus HUT78-Zellen, die mit dem HIV-Isolat MVP-899 infiziert sind. MVP-899 ist ein HIV-1/M/B-Virus.

H 9 ist DNA aus HUT78-Zellen, die nicht HIV-infiziert sind.

<b>1. PCR: FU 1- La 2</b>	<b>2. PCR: FU3 – La 4</b>	
22 µl	26 µl	Aqua dest
8 µl	8 µl	dNTP 5mM
5 µl	5 µl	10x Puffer
5 µl	5 µl	Primer 5'
5 µl	5 µl	Primer 3'
0,4 µl	0,4 µl	TaqDNA Polymerase
45 µl + 5 µl Material	49 µl + 1 µl Amplifikat	

Die in drei Schritten ablaufende PCR wurde in einem Gene Amp PCR System 9600 (Applied Biosystems) gecycelt.

- |                                  |      |        |
|----------------------------------|------|--------|
| 1. initiale Denaturierung:       | 92°C | 5 min  |
| 2. Amplifikation: Denaturierung: | 92°C | 30 sec |
| Annealing:                       | 55°C | 1 min  |
| Extension:                       | 72°C | 1 min  |
| 3. finale Elongation:            | 72°C | 4 min  |

Der Amplifikations- Schritt durchlief dabei 30 Zyklen.

## **II 5.Agarosegelektrophorese**

Die Agarosegelektrophorese erforderte die vorbereitende Verarbeitung und den Ansatz mehrerer benötigter Reagenzien. Zur besseren Übersicht sind diese mit Herstellerangaben im Folgenden aufgelistet:

### **Reagenzien:**

10x TBE Puffer (pH 7,5-7,8)

Herstellung ⇒ 540g Tris (Merck, Bestellnr.:1.08382)

275g Borsäure (Merck, Bestellnr.:1.00165)

37,2g EDTA 0,5M, pH 8,0

(Merck, Bestellnr.:1.12029.1000)

Auf 5000ml mit Aqua dest auffüllen.

### Bromphenolblaupuffer

Herstellung  $\Rightarrow$  27,5 ml Glycerin 87% (Merck,  
Bestellnr.:4094.1000)  
5 ml 10x TBE- Puffer  
1 Spatelspitze Bromphenolblau (Merck,  
Bestellnr.:11746.005)  
1 Spatelspitze Xylencyanol (Flucka Chemie  
AG, Bestellnr.:95600 FF)  
50 ml steriles Wasser  
in 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotieren.

Ethidiumbromid 1% (Merck, Bestellnr.:1.11608.0030)

Agarose (Bioenzym, Bestellnr.:840.004)

### DNA- Marker:

DNA- Marker V (Roche, Bestellnr.:821705, Fragmente 8-587 bp, 0,25 $\mu$ g/ml)  
DNA- Marker VIII (Roche, Bestellnr.:1336045, Fragmente 19-1114 bp,  
0,25 $\mu$ g/ml)

Ansatz  $\geq$  10  $\mu$ l, d.h.für eine Gelkammer: 1  $\mu$ l Marker

2  $\mu$ l Bromphenolblaupuffer  
7  $\mu$ l Aqua dest

### **Gelherstellung**

In einem Erlenmeyerkolben wurden pro Gel 1g Agarose in 50 ml 1xTBE Puffer gelöst und erhitzt.

Das heiße Gel wurde mit vorsichtigen Schwenkbewegungen unter kaltem Wasser auf ca. 60° C abgekühlt, anschließend wurden in das noch flüssige Gel 2 $\mu$ l Ethidiumbromid pipettiert und durch erneutes Schwenken untergemischt. Die Lösung wurde in eine mit Spacer und Kamm ausgerüstete Gelkammer gegossen, sobald das Gel erkaltet war, wurden Spacer und Kamm entfernt und 1xTBE- Puffer darüber gegeben.

### **Gelbestückung**

Auf einer 96well-Platte wurden je 8 $\mu$ l Amplifikat mit 2 $\mu$ l Bromphenolblaupuffer gemischt und in eine Geltasche pipettiert.

In die erste und/ oder letzte Geltasche kamen je 10 $\mu$ l des DNA-Marker-Ansatzes. In jedes Gel wurde mindestens ein Marker eingesetzt.

### **Elektrophorese**

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 80 V und 250 mA, mit dem 5-Microcomputer 4-Channel Power Supply Phero-Stab 324 von Biotec-Fischer. Der 1xTBE- Puffer fungierte auch als Laufpuffer.

### **Fotografie**

Die Gele wurden unter UV-Licht fotografiert.

Da die durchgeführten ersten PCR-Läufe kein zufrieden stellendes Ergebnis lieferten, wurden die PCR-Bedingungen optimiert.

## **II 6.Optimierung der PCR-Bedingungen**

### **II 6.1. Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ )-Titration**

In einer  $MgCl_2$ -Verdünnungsreihe wurde versucht die optimale  $MgCl_2$ -Konzentration für oben genannte Primer zu ermitteln. Dazu wurde das Ampli Taq Gold-Set (Applied Biosystems, Bestellnr.: 4311806) verwendet. Dieses enthielt neben Ampli Taq Gold 5U/ $\mu$ l und GeneAmp PCR-Puffer, 25mM  $MgCl_2$ -Lösung.

Die dNTP-Konzentration (5mM) sowie die Primer-Konzentration (10pM) wurden beibehalten.

### **Material:**

1. 899 DNA
2. H 9
3. } HIV-cDNA
4. }
5. 899 cDNA

### 1.PCR: FU 1 – La 2

1,5mM MgCl <sub>2</sub>	2,5mM MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM MgCl <sub>2</sub>	4,5 mM MgCl <sub>2</sub>	
4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	10 x Puffer
2,4 µl	4 µl	5,6 µl	7,2 µl	MgCl <sub>2</sub> 25 mM
2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	dNTP 5 mM
2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	Primer FU1 10 pM
2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	Primer La 2 10 pM
22,35 µl	20,75 µl	19,15 µl	17,55 µl	Aqua dest
0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	Taq Gold
35 µl	35 µl	35 µl	35 µl	

+ 5 µl cDNA

### 2. PCR: FU 3- La 4

1,5mM MgCl <sub>2</sub>	2,5mM MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM MgCl <sub>2</sub>	4,5 mM MgCl <sub>2</sub>	
4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	10 x Puffer
2,4 µl	4 µl	5,6 µl	7,2 µl	MgCl <sub>2</sub> 25 mM
2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	dNTP 5 mM
2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	Primer FU 3 10 pM
2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	Primer La 4 10 pM
25,35 µl	23,75 µl	22,15 µl	20,55 µl	Aqua dest
0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	Taq Gold
38 µl	38 µl	38 µl	38 µl	

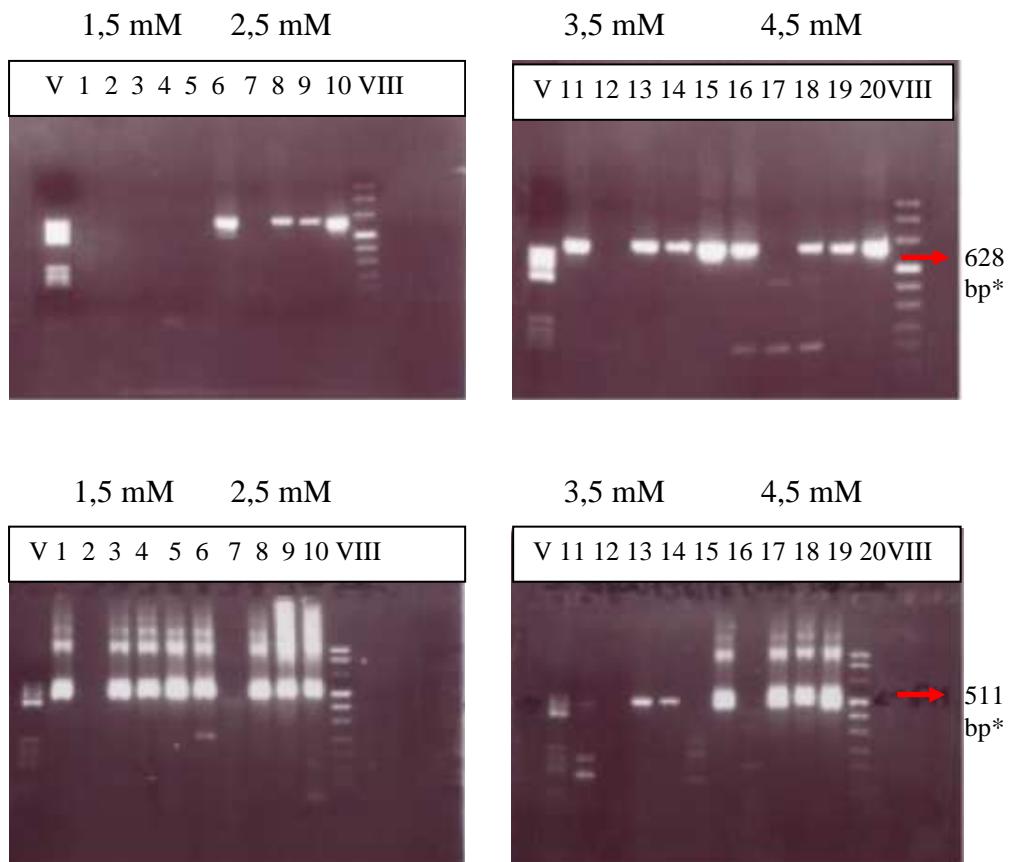
+ 2 µl Amplifikat

### Geräte:

Cycler UNO II von Biometra. Gemäß den Produktempfehlungen wurde die cDNA bei 95°C denaturiert, die Hybridisierung erfolgte in 40 Zyklen bei einer Anealing Temperatur von 55°C. Zusätzlich wurde die Zeit der finalen Elongation von vier auf sieben Minuten verlängert.

1. initiale Denaturierung: 95°C 1 min  
 2. Amplifikation: Denaturierung: 95°C 30 sec  
                             Annealing: 55°C 45 sec      } x 40  
                             Extension: 72°C 1 min  
 3. finale Elongation: 72°C 7 min

### Ergebnis:



**Abb. 9:** PCR-Ergebnisse (1.PCR oben, 2.PCR unten) der Magnesiumchlorid-Titration.  
 \*628 Basenpaare = Länge des zu erwartenden Produktes der 1. PCR, 511 Basenpaare = Länge des zu erwartenden Produktes der 2. PCR

## II 6. 2. Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ )-Verdünnungsreihe

Im nächsten Schritt wurde pro  $MgCl_2$ -Konzentration eine Verdünnungsreihe angefertigt, um den zuvor bestimmten optimalen  $MgCl_2$ -Gehalt für die Primer zu verifizieren.

## **Material:**

1. 899 DNA
  2. H 9

Das Material wurde in Zehnerpotenzen bis zu einer Konzentration von  $10^{-7}$  verdünnt und in den Verdünnungen  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  in die PCR eingesetzt. Grenzen der PCR stellten sich bei Verdünnungen ab  $10^{-7}$ /  $10^{-8}$  ein.

In drei Durchgängen wurde der  $\text{MgCl}_2$ -Gehalt wie in der Titration jeweils um 1 mmol erhöht, ausgehend von einer Konzentration von 2,5 mmol  $\text{MgCl}_2$ .

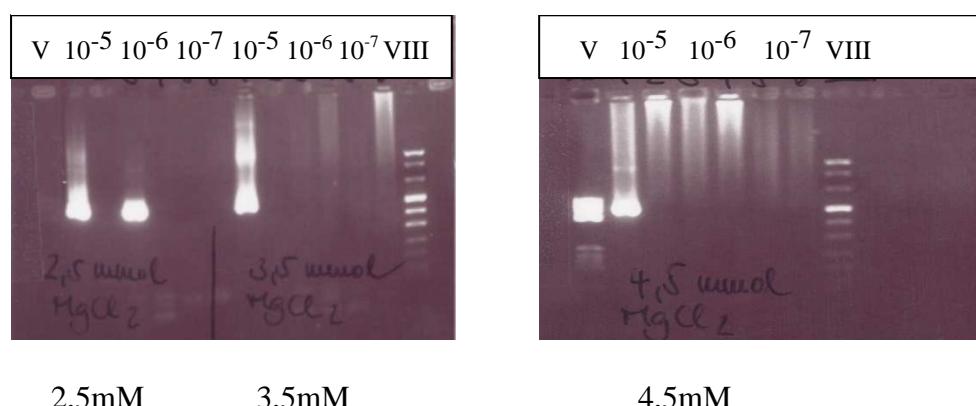
Der 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>-Gehalt wurde nicht weiter berücksichtigt, da sich die Ergebnisse der Titration in dieser Konzentration als unbefriedigend herausstellten (s. Abb. 9).

#### Cycler UNO II Biometra

- |                                  |      |        |
|----------------------------------|------|--------|
| 1. initiale Denaturierung:       | 95°C | 1 min  |
| 2. Amplifikation: Denaturierung: | 95°C | 30 sec |
| Annealing:                       | 55°C | 45 sec |
| Extension:                       | 72°C | 1 min  |
| 3. finale Elongation:            | 72°C | 7 min  |

## Ergebnis:

Eine MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 2,5mM führte als einzige zu einem PCR-Ergebnis bei einer Verdünnung von 10<sup>-6</sup>.



**Abb. 10:** Ergebnis der MgCl<sub>2</sub>-Titration

## **II 6. 3. Veränderung der Annealing-Temperatur**

In einem weiteren Versuchsschritt wurde die Annealing-Temperatur von 55°C auf 50°C herabgesetzt.

Erneut wurde das verdünnte Material (s. II 5.2.) in den Konzentrationen 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> in die PCR eingesetzt.

Cycler UNO II Biometra

1. initiale Denaturierung:	95°C	1 min
2. Amplifikation: Denaturierung:	95°C	30 sec
Annealing:	50°C	45 sec
Extension:	72°C	1 min
3. finale Elongation:	72°C	7 min

Die um 5°C auf 50°C herabgesetzte Annealing-Temperatur lieferte bei einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 2,5mM lediglich Ergebnisse bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-5</sup> und konnte somit als eine Verschlechterung der PCR-Bedingungen interpretiert werden.

## **II 6. 4. Ergebnis der PCR-Optimierung**

Aufgrund der guten PCR-Ergebnisse nach Variation der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, Testung der Verdünnungsgrenzen und Herabsetzung der Annealing-Temperatur wurde auf weitere Optimierungsschritte, wie Veränderung der dNTP- und der Primer-Konzentration verzichtet.

Resultierend aus den oben beschriebenen Optimierungsschritten, wurden alle nachfolgenden PCRs wie folgt angesetzt:

<b>1. PCR: FU 1- La 2</b>	<b>2. PCR: FU3 – La 4</b>	
4 µl	4 µl	10 x Puffer
4 µl	4 µl	MgCl <sub>2</sub> 25 mM
2 µl	2 µl	dNTP 5 mM
2 µl	2 µl	Primer 10 pM
2 µl	2 µl	Primer 10 pM
20,75 µl	23,75 µl	Aqua dest
0,25 µl	0,25 µl	Taq Gold
35 µl + 5 µl Material	38 µl + 2 µl	
	Amplifikat	

Cycler UNO II Biometra

1. initiale Denaturierung: 95°C 1 min  
 2. Amplifikation: Denaturierung: 95°C 30 sec  
     Annealing: 55°C 45 sec      Extension: 72°C 1 min      } x 40  
 3. finale Elongation: 72°C 7 min

## II 7. Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI PRISM 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems) nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al, 1977). Nach Hybridisierung der DNA-Einzelstränge mit dem jeweiligen Primer (FU 3, La 4) führten Big Dye-Terminatoren zum Abbruch der Zweitstrang-Synthese und ermöglichen eine gelelektrophoretische Abfolgebestimmung der Basen. Bezuglich der Sequenz-PCR wurde sich an den Herstellerempfehlungen orientiert:

Cycler UNO II Biometra

Amplifikation: Denaturierung: 95°C 10 sec      }  
     Annealing: 50°C 5 sec      Extension: 60°C 4 min      } x 25

Ab Januar 2005 wurden die Proben aufgrund laborinterner Umstellung mit dem CEQ 8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) weiter-

verarbeitet. Die Fällung nach Beckman wurde mit wesentlich geringeren DNA-Mengen durchgeführt, und auch in der Sequenz-PCR fanden sich leichte Abweichungen:

#### Cycler UNO II Biometra

Amplifikation:	Denaturierung:	96°C	20 sec	} x 30
	Annealing:	50°C	20 sec	
	Extension:	60°C	4 min	

## II 8. Vergleichssequenz

Durch den Vergleich von 20 HIV-1 B-Sequenzen aus verschiedenen Ländern (Los Alamos, [www.hiv-lanl.gov](http://www.hiv-lanl.gov)) konnte eine Konsensussequenz erstellt werden, die nach dem IUB-Code verschlüsselt wurde. Anhand dieser wurden die Patientensequenzen, unter Auswertung der Elektropherogramme, mit dem Sequence Navigator (Applied Biosystems) editiert. Ab Januar 2005 erfolgte die Editierung mit der pregap und gap4-Software (vnc-viewer, [www.bioinformatix.org](http://www.bioinformatix.org)).

## II 9. Patienten (s. Anhang, Tabelle)

Insgesamt wurden 95 Proben von 30 HIV infizierten Patienten (Typ HIV-1, Gruppe M, Subtyp B) in die Untersuchungen eingeschlossen. 79 Proben von 23 Patienten lieferten ein Sequenzergebnis. 16 dieser Patienten waren männlich, sieben weiblich. Das mittlere Lebensalter betrug 43 Jahre, mit einem Range von 13 bis 61 Jahren. Alle Patienten wurden mit einem antiretroviralen Medikamentenbackground behandelt und befanden sich meist in einem fortgeschrittenen Therapiestadium, ersichtlich an einem Viruslast-Mittelwert von 108394,7 cop/ml und einem CD4-Zahl-Mittelwert von 124,1/ $\mu$ l (Referenzbereich beim Gesunden: 435 bis 1600). Bei 13 von 23 Patienten stammte die erste untersuchte Probe von einem Zeitpunkt 22 Tage bis 27 Monate nach Therapiebeginn mit T-20, bei sechs Patienten konnte je eine baseline Probe 28 Tage bis 9 Monate vor T-20-Therapie sequenziert und ausgewertet werden (4, 5, 6, 7, 8, 9). Pro Patient wurde eine bis 15 Proben untersucht, die aus einem Zeitraum von fünf bis 23 Monaten stammten, je

nach Therapiebeginn und -dauer. Drei Patienten (4, 9, 15) verstarben im Verlauf der Studie.

## **II 10. Liste der Computerprogramme**

Sequence Navigator (Applied Biosystems)

Pregap-/ Gap 4-Software (vnc-viewer, [www.bioinformatics.org](http://www.bioinformatics.org))

PrimAlign (Los Alamos, [www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov))

Position Calculator (Dr. M. Obermeier)

Bioedit Sequence Alignment Editor für Windows

RCSB Protein Datenbank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org))

DeepView ([www.expasy.org/spdbv](http://www.expasy.org/spdbv))

### **III Ergebnisse**

Insgesamt wurden 95 Proben von 30 Patienten untersucht. Für 79 Proben von 23 Patienten konnte ein entsprechendes Amplifikat gewonnen, sequenziert und ausgewertet werden. Dabei wurden der N-terminale Teil (HR1), der C-terminale Teil (HR2), und das Verbindungsstück mit dem cysteinreichen Loop zwischen HR1 und HR2 des Transmembranproteins gp41 beobachtet. Im C-terminalen Teil befindet sich der Abschnitt, dem der Fusionsinhibitor T-20 nachempfunden ist (gp41 Residuen 127-167, HXB2 Residuen 638-678). Bei 16 Proben mit Viruslasten zwischen 75 und 11.500 cop/ml (Mittelwert 1484,5 cop/ml) gelang die Amplifikation nicht. Die 50%-Erfolgsrate lag bei etwa 2300 cop/ml, die 90%-Erfolgsrate bei ca. 10.000 cop/ml. Diese Proben trugen im Wesentlichen zur Erkennung der Sensitivitätsgrenzen der PCR bei und werden deshalb an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

#### **III 1. Datenbanksequenzen und Bewertungskriterien für die Mutation**

659 HIV-1 B Datenbanksequenzen wurden aligned (Bio Edit Sequence Alignment). Mit Hilfe eines zweiten Datenwerkzeuges wurde für jede gp41 Position der prozentuale Anteil der dort vertretenen Aminosäure(n) berechnet (Position Calculator, Dr. Martin Obermeier). So konnten Aussagen über den Konservierungsgrad der Residuen gemacht und Mutationen detektiert werden.

**Tab. 1:** Polymorphismen der HIV-1 gp41-Region.

Anzahl der Sequenzen: n=659

Position: Aminosäure (Anzahl der Sequenzen: Prozentwert)

**35:** S(642:97.4%) A(5:0.7%) T(5:0.7%) P(4:0.6%) F(1:0.1%)  
 Y(1:0.1%) G(1:0.1%)  
**36:** G(652:98.9%) D(6:0.9%) I(1:0.1%)  
**38:** V(655:99.3%) A(2:0.3%) Q(1:0.1%) L(1:0.1%)  
**40:** Q(659:100%)  
**42:** N(561:85.1%) S(75:11.3%) R(18:2.7%) D(4:0.6%) I(1:0.1%)  
 T(0:0%)  
**43:** N(654:99.2%) S(1:0.1%) D(1:0.1%) I(1:0.1%)  
 L(1:0.1%)  
**44:** L(656:99.5%) M(2:0.3%)  
**45:** L(658:99.8%) R(1:0.1%)  
**46:** R(607:92.1%) K(42:6.3%) M(5:0.7%) Q(2:0.3%) A(1:0.1%)  
 W(1:0.1%) T(1:0.1%)  
**49:** E(635:96.3%) D(16:2.4%) K(3:0.4%) G(3:0.4%) A(1:0.1%)  
 Q(1:0.1%)  
**71:** A(651:98.7%) S(4:0.6%) F(2:0.3%) T(1:0.1%) V(1:0.1%)  
**74:** R(646:98%) S(6:0.9%) K(4:0.6%) A(1:0.1%) T(1:0.1%)  
 Y(1:0.1%)  
**75:** Y(653:99%) F(3:0.4%) H(1:0.1%) C(1:0.1%) L(1:0.1%)  
**77:** K(362:54.9%) R(214:32.4%) Q(48:7.2%) G(25:3.7%) A(2:0.3%)  
 S(2:0.3%) E(2:0.3%) T(1:0.1%) V(1:0.1%) H(1:0.1%)  
 D(1:0.1%)  
**84:** I(587:89%) L(54:8.1%) M(12:1.8%) F(4:0.6%) W(1:0.1%)  
**91:** L(636:96.5%) I(10:1.5%) F(6:0.9%) P(3:0.4%) T(1:0.1%)  
 H(1:0.1%) R(1:0.1%)  
**96:** A(338:51.2%) T(217:32.9%) N(70:10.6%) S(20:3%) D(13:1.9%)  
 V(1:0.1%)  
**101:** A(338:51.2%) T(201:30.5%) S(68:10.3%) D(20:3%) V(15:2.2%)  
 N(10:1.5%) I(4:0.6%) K(1:0.1%) E(1:0.1%)  
**102:** S(640:97.1%) T(18:2.7%) W(1:0.1%)  
**105:** N(647:98.1%) S(6:0.9%) T(2:0.3%) K(2:0.3%) D(2:0.3%)  
**107:** S(579:87.8%) T(43:6.5%) N(32:4.8%) P(3:0.4%) A(1:0.1%)  
 L(1:0.1%)  
**108:** L(495:75.1%) Q(68:10.3%) M(24:3.6%) Y(23:3.4%) F(14:2.1%)  
 V(12:1.8%) H(10:1.5%) R(4:0.6%) E(3:0.4%) W(2:0.3%)  
 S(1:0.1%) N(1:0.1%) I(1:0.1%)  
**109:** D(254:38.5%) N(147:22.3%) E(113:17.1%) S(65:9.8%)  
 T(39:5.9%) G(16:2.4%) K(12:1.8%) H(4:0.6%) Q(4:0.6%)  
 A(3:0.4%) L(1:0.1%)  
**110:** E(178:27%) Q(150:22.7%) D(87:13.2%) K(80:12.1%) Y(53:8%)  
 M(39:5.9%) T(29:4.4%) S(10:1.5%) A(10:1.5%) N(7:1%)  
 H(7:1%) R(4:0.6%) F(2:0.3%) V(1:0.1%) W(1:0.1%) I(1:0.1%)  
**113:** N(268:40.6%) D(258:39.1%) E(55:8.3%) G(32:4.8%)  
 H(19:2.8%) K(11:1.6%) Q(9:1.3%) S(3:0.4%) T(1:0.1%)  
 V(1:0.1%) R(1:0.1%)

**114:** N(625:94.8%) H(12:1.8%) K(10:1.5%) R(3:0.4%) S(2:0.3%)  
 T(1:0.1%) E(1:0.1%) Y(1:0.1%) M(1:0.1%)  
 D(1:0.1%)  
**115:** M(631:95.7%) T(20:3%) L(7:1%) I(1:0.1%)  
**118:** M(613:93%) I(27:4%) L(7:1%) R(5:0.7%) Q(4:0.6%) T(1:0.1%)  
 E(1:0.1%) V(1:0.1%)  
**125:** D(319:48.4%) N(174:26.4%) S(109:16.5%) E(25:3.7%)  
 G(16:2.4%) T(7:1%) H(5:0.7%) A(2:0.3%) Y(1:0.1%)  
 R(1:0.1%)  
**126:** N(638:96.8%) S(9:1.3%) K(4:0.6%) T(3:0.4%) D(3:0.4%)  
 Y(1:0.1%) I(1:0.1%)  
**127:** Y(650:98.6%) H(7:1%) F(1:0.1%) T(1:0.1%)  
**133:** T(320:48.5%) N(140:21.2%) S(109:16.5%) R(42:6.3%)  
 D(11:1.6%) K(7:1%) Q(7:1%) E(6:0.9%) H(5:0.7%) I(3:0.4%)  
 Y(2:0.3%) L(2:0.3%) A(2:0.3%) M(1:0.1%) P(1:0.1%)  
 G(1:0.1%)  
**136:** E(607:92.1%) A(13:1.9%) Q(11:1.6%) T(8:1.2%) G(7:1%)  
 V(6:0.9%) D(3:0.4%) K(2:0.3%) S(1:0.1%) M(1:0.1%)  
**137:** E(470:71.3%) K(63:9.5%) Q(55:8.3%) D(34:5.1%) I(9:1.3%)  
 N(8:1.2%) G(7:1%) T(4:0.6%) A(4:0.6%) V(2:0.3%) S(1:0.1%)  
 L(1:0.1%) H(1:0.1%)  
**138:** S(607:92.1%) A(47:7.1%) Q(1:0.1%) M(1:0.1%)  
 P(1:0.1%)  
**140:** N(568:86.1%) I(41:6.2%) S(12:1.8%) T(12:1.8%) Y(8:1.2%)  
 K(4:0.6%) M(3:0.4%) L(3:0.4%) H(2:0.3%) R(2:0.3%)  
 F(1:0.1%) Q(1:0.1%) D(1:0.1%)  
 G(1:0.1%)  
**144:** K(622:94.3%) Q(12:1.8%) R(9:1.3%) E(6:0.9%) M(4:0.6%)  
 I(3:0.4%) N(2:0.3%)  
**151:** E(504:76.4%) A(114:17.2%) K(15:2.2%) Q(13:1.9%) G(9:1.3%)  
 T(1:0.1%) V(1:0.1%) L(1:0.1%) D(1:0.1%)  
**154:** K(599:90.8%) T(17:2.5%) N(12:1.8%) Q(12:1.8%) E(10:1.5%)  
 S(7:1%) W(1:0.1%) R(1:0.1%)  
**156:** A(614:93.1%) D(17:2.5%) T(11:1.6%) S(6:0.9%) E(6:0.9%)  
 G(2:0.3%) N(1:0.1%) K(1:0.1%) P(1:0.1%)  
**161:** W(656:99.5%) F(1:0.1%) R(1:0.1%)  
**162:** F(654:99.2%) L(2:0.3%) S(1:0.1%) Y(1:0.1%) D(1:0.1%)  
**163:** D(382:57.9%) S(121:18.3%) N(117:17.7%) T(13:1.9%)  
 G(8:1.2%) E(6:0.9%) H(5:0.7%) K(2:0.3%) A(2:0.3%)  
 I(2:0.3%)

### **III 2. Differenzierung der Mutationsorte**

Als „stark konserviert“ wurden Positionen bewertet, an denen eine einzige Aminosäure häufiger als in 95% der Datenbanksequenzen auftritt. Als „konserviert“ galten Aminosäurepositionen die bei 90-94,9% mit derselben Aminosäure besetzt waren. „Moderat variabel“ und „hoch variabel“ wurden Positionen mit 75-89,9% Konservierungsgrad genannt, bzw. solche mit weniger als 75% Konservierungsgrad.

Das N-terminale Ende von gp41 ist stärker konserviert als der ihm gegenüberliegende C-terminale Bereich. Im Zwischenstück mit Cysteinreichen Loop finden sich neben überwiegend stark konservierten Regionen einige konservierte, aber auch hoch variable Residuen.

Neben den vom Wildtyp abweichenden Aminosäuren an hoch konservierten Positionen, wurden auch solche Varianten als sehr wahrscheinliche T-20 assoziierte Mutationen bewertet, bei denen die vorgefundene Aminosäure einen Anteil von weniger als 1% der möglichen Polymorphismen in den Datenbanksequenzen von nicht T-20 exponierten Patienten ausmachte. Unter T-20-Therapie traten nämlich auch an weniger konservierten Positionen unübliche Aminosäuren auf. Als Beispiel hierfür sei die Mutation N42D genannt. Der Konservierungsgrad von Position N42 liegt nur bei ca. 85 %. Doch unter T-20-Therapie traten nicht die üblichen Polymorphismen an dieser Stelle zu Tage (R, S) sondern die Aminosäure Asparaginsäure (D), welche ohne T-20 Therapie nur bei 0,6% zu erwarten gewesen wäre. Im Folgenden wurden alle beobachteten Aminosäuren in drei Klassen eingeteilt: A) Auftreten einer Aminosäure bei weniger als 1%, B) bei 1-5% oder C) bei 5-10% der Unbehandelten an der jeweilig angegebenen Position.

In Kategorie A fielen die meisten beobachteten Varianten, die somit als hochgradig T-20 selektiert gelten müssen, in Kategorie B befanden sich die wahrscheinlich T-20 selektierten Aminosäuren 77G, 96D, 101D, 108H, 109K, 110T, 113H, 114K, 118I, 125E und 151K, und in Kategorie C die möglicherweise T-20 assoziierten Aminosäuren 110Y und 138A.

### **III 3. Mutationsergebnisse**

#### **III 3. 1. Verteilung der Mutationen auf die gp41-Regionen**

Bei 21 von 23 im Rahmen dieser Studie untersuchten, T-20 therapierten Patienten, konnten Mutationen im Transmembranprotein gp41 beobachtet werden.

Bei 16 Patienten lagen diese Mutationen gleichzeitig in HR1 und HR2 (Patient Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 21, 22, 23). 10 Patienten zeigten parallel Mutationen im Verbindungsstück mit Cysteinloop (Pat. Nr. 1, 3, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 22, 23).

Ein Patient zeigte eine Kombination von lediglich HR1 und Verbindungsstück-Mutationen (Pat. Nr. 19), zwei Patienten hatten HR2 und Verbindungsstück-Mutationen (Pat. Nr. 16, 18). Bei zwei Patienten waren ausschließlich Mutationen im Verbindungsstück präsent (Pat. Nr. 8, 20).

Keine Mutationen fanden sich bei den Patienten Nr. 7 und Nr. 17. Die Sequenz von Patient Nr. 7 stammte aus der Zeit vor Therapiebeginn.

#### **III 3. 2. N-terminal gelegene Mutationen**

In der N-terminalen Helix waren 10 Aminosäureresiduen betroffen, wobei acht dieser Mutationsorte stark konserviert waren, einer einfach konserviert und einer moderat variabel war. Es fanden sich folgende Mutanten: S35T, G36VD, V38A, Q40H, N42TD, N43DRSK, L44M, L45QM, R46M und E49Q. Am häufigsten betroffen waren Position 43 (10 Patienten: Nr. 1, 2, 4, 6, 9, 12, 13, 14, 19, 22), Position 42 (sechs Patienten: Nr. 1, 3, 4, 10, 14, 19) und Position 38 (fünf Patienten: Nr. 3, 4, 10, 11, 13).

Spitzenreiter war die Mutante N43D bei sechs Patienten, gefolgt von V38A und N42T, bei je fünf Patienten und N43S. Neben drei stark konservierten Residuen (V38, N43, E49), lag N42 an einer moderat variablen Position. Die Mutante N42T fand sich aber bei keiner der 659 Datenbanksequenzen.

#### **III 3. 3. C-terminal gelegene Mutationen**

C-terminal lagen 18 Mutationsorte, fünf waren stark und sieben einfach konserviert, daneben lagen zwei moderat und vier hoch variable Bereiche. Folgende Mutanten waren vertreten: N113EHK, H114K, T115L, M118IT,

N125E, N126K, Y127V, E136VG, E137S, S138A, N140D, K144I, E151K, K154DE, A156S, W161G, F162S, N163I. Am häufigsten betroffen waren Position 126 (fünf Patienten: Nr. 2, 3, 4, 9, 23) Position 113 (vier Patienten: Nr. 6, 17, 19, 23) und 138 (vier Patienten: Nr. 4, 5, 6, 12).

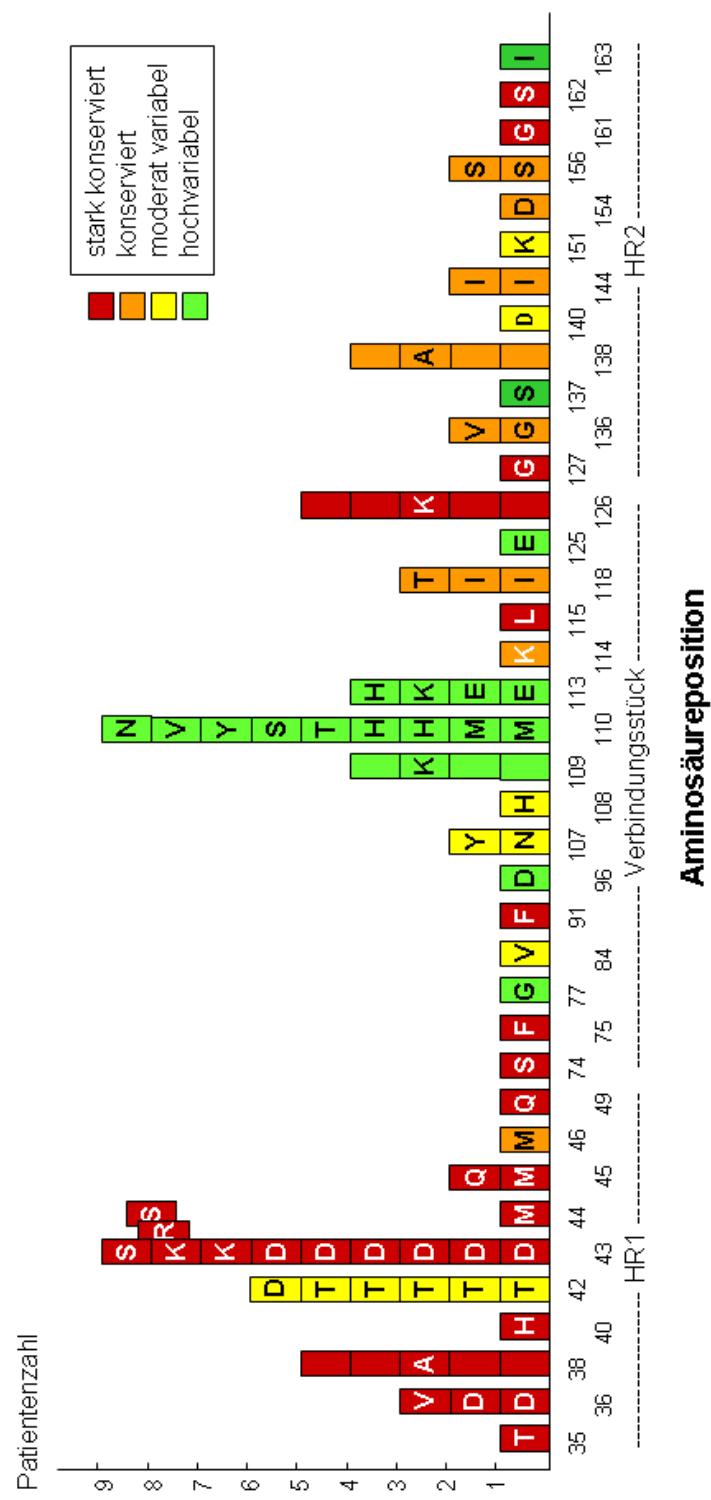
Spitzenreiter waren hier die Mutationen N126K bei fünf Patienten und S138A bei vier Patienten.

### **III 3. 4. Im Verbindungsstück mit Cystein-Loop gelegene**

#### **Mutationen:**

11 Mutationsorte konnten hier detektiert werden, positioniert an drei stark konservierten, drei moderat variablen, sowie fünf hoch variablen Bereichen: R74S, Y75F, K77G, I84V, L91F, A96D, A101D, S107NY, L108H, E109K, Q110YHMNTSV. Mengenmäßig überwogen die Positionen 110 (neun Patienten: Nr. 3, 8, 9, 11, 12, 15, 19, 22, 23) und 109 (vier Patienten: Nr. 1, 14, 16, 20). Bei vier Patienten, und damit am häufigsten, fand sich die Mutante E109K.

**Abb. 11:** Verteilung und Häufigkeit der gp41-Mutationen



### **III 3. 5. Kombination von Mutationspositionen**

Um Aussagen über das gemeinsame Vorkommen, die gegenseitige Beeinflussung und die Signifikanz von Mutationen verschiedener gp41-Bereiche machen zu können, wurden verschiedene Berechnungen vorgenommen. Zunächst wurde die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Mutation an einer bestimmten Position bei einem Patienten des Kollektivs errechnet. Position 38 z.B. war bei fünf von 23 Patienten mutiert. Die Wahrscheinlichkeit an Position 38 eine Mutation zu haben lag demnach bei  $5 \times 100 / 23 = 21,74\%$ . So wurde für jede mutierte Position verfahren. Anschließend wurden die Wahrscheinlichkeiten des Auftretens einer Mutation an einer bestimmten Positionscombination bei einem Patienten miteinander und mit der Gesamtzahl der Patienten multipliziert. Daraus ergab sich die errechnete Wahrscheinlichkeit eines Mutationspaars. In einem zweiten Schritt wurde die tatsächliche Anzahl der Patienten ermittelt, die Träger der entsprechenden Kombination mutierter Positionen waren. Aus der Division des tatsächlichen und des wahrscheinlichen Wertes ergab sich die Rate r .

**Tab. 2:** Auftreten und Bedeutung kombinierter Mutationspositionen in HIV-1 gp41

<b>Kombination mutierter Positionen</b>	<b>errechnete Wahrscheinlichkeit</b>	<b>Tatsächlich beobachtet</b>	<b>beobachtet/ errechnet = r</b>
38 + 42	1,3	3	2,3
38 + 107	0,4	1	2,5
38 + 108	0,2	1	5
38 + 110	2	2	1
38 + 126	1,1	1	1
38 + 138	0,9	2	2,2
42 + 43	2,6	3	1,2
42 + 77	0,3	1	3,3
42 + 109	1	2	2
42 + 110	2,3	2	0,9
42 + 126	1,3	1	0,8
42 + 138	1	1	1
43 + 49	0,4	1	2,5
43 + 77	0,4	1	2,5

43 + 107	0,9	1	1,1
43 + 109	1,7	2	1,2
43 + 110	3,9	4	1
43 + 113	1,7	2	1,2
43 + 126	2,2	4	1,8
43 + 138	1,7	1	0,6
49 + 110	0,4	1	2,5
49 + 126	0,2	1	5

Mit steigendem r-Wert, d.h. wachsender Diskrepanz zwischen den wahrscheinlich auftretenden und tatsächlich beobachteten Mutationen, zugunsten der tatsächlichen vorhandenen, erhöhte sich die Bedeutung der Mutationspaare. Besonders signifikant waren die Positionskombinationen 38 + 42, 38 + 107, 38 + 108, 38 + 138, 42 + 43, 42 + 77, 42 + 109, 43 + 49, 43 + 77, 43 + 109, 43 + 113, 43 + 126, 49 + 110 und 49 + 126.

### **III 3. 6. Kombination von Mutanten**

Die Mutationen an den unter III 3. 5. genannten relevanten Positionen wurden hinsichtlich ihrer Häufung auf Aminosäureebene analysiert. Führend war die Doppelmutante N43D+N126K bei vier von 23 Patienten (17,4% der Patienten: Nr. 2, 4, 9, 22). Drei Patienten waren Träger von N42T+N43S (13%: Nr. 1, 14, 19), bei je zwei Patienten (je 8,7%) konnten die Doppelmutationen V38A+N42T (Nr. 4, 10), V38A+S138A (Nr. 4, 11), N42T+E109K (Nr. 1, 14) und N43S+E109K (Nr. 1, 14) beobachtet werden.

Die Kombination E49Q+N126K fand sich bei Patient Nr. 22.

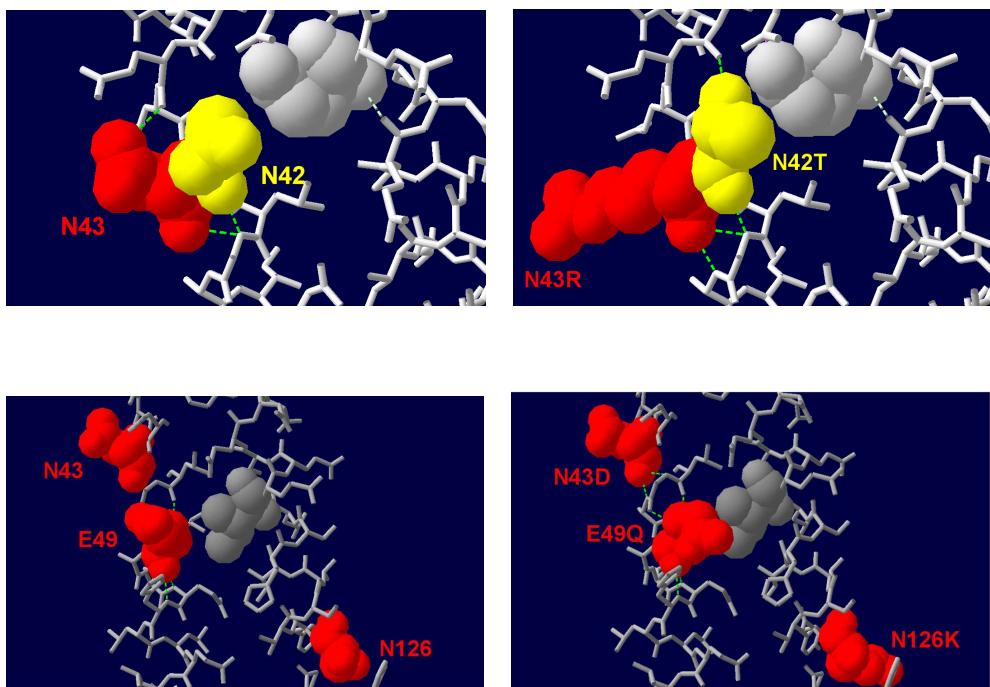
**Tab. 3:** Anzahl und Charakterisierung von HIV-1-Doppelmutanten an relevanten gp41-Positionen

Mutante	Anzahl der Träger (n = 24)	Mutante	Anzahl der Träger (n = 24)
V38A+N42T	2	N43D+E49Q	1
V38A+N42D	1	N43S+K77G	1
V38A+S107N	1	N43K+K77G	1
V38A+S138A	2	N43S+E109K	2
V38A+N42D	1	N43R+E109K	1
N42T+N43S	3	N43K+E109K	1
N42T+N43R	1	N43D+N113H	1
N42T+N43K	1	N43D+N126K	4
N42T+K77G	1	E49Q+Q110H	1
N42T+E109K	2	E49Q+N126K	1
N42T+S138A	1		

### III 3. 7. Darstellung der Mutationen im Modell

Die Mutationen wurden im Modell dargestellt (Glaxo Smith Kline „Swiss Pdb-Viewer“, Modell 1 FAV, Swiss Protein Datenbank, [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).

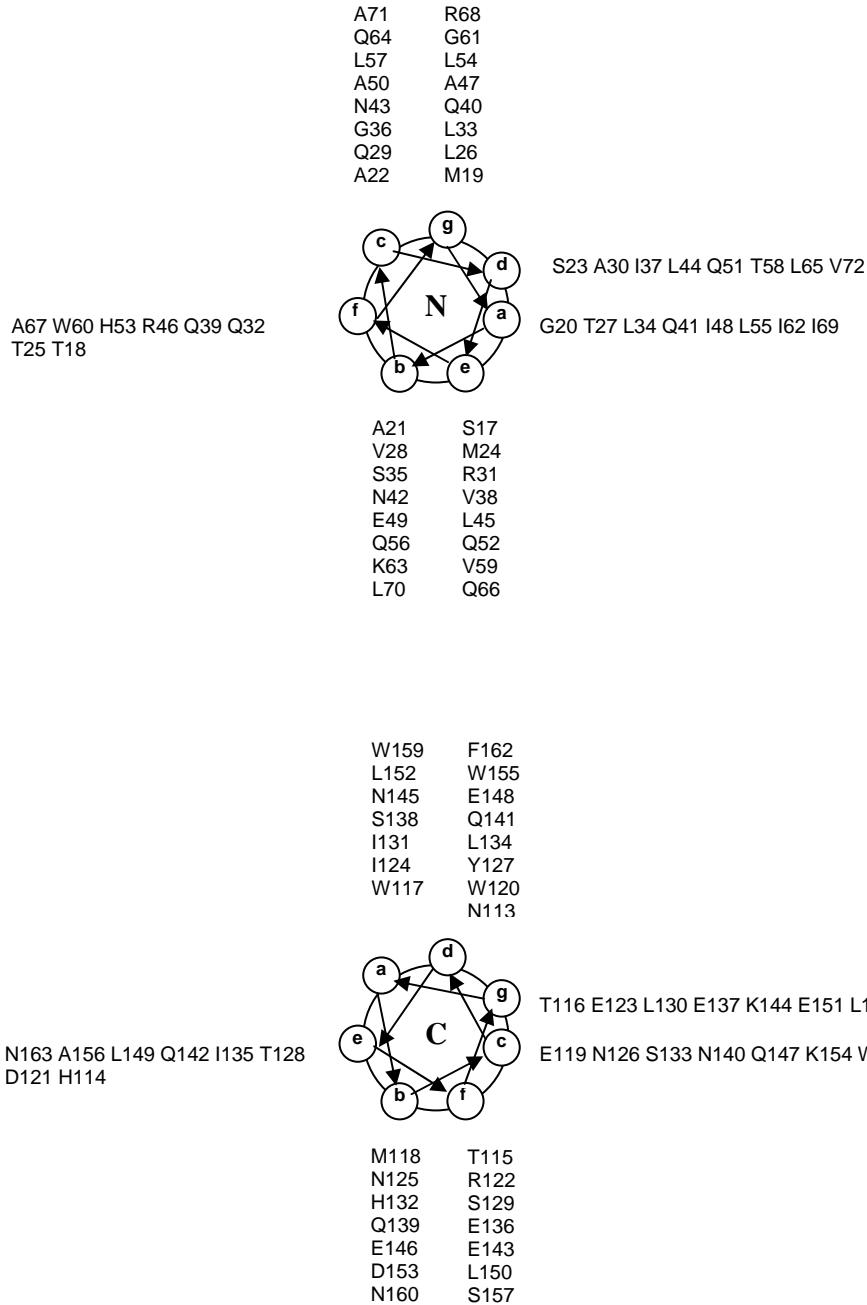
Dazu wurden die häufig beobachteten Mutanten an der jeweiligen gp41-Position eingebaut und mit der Wildtyppräsentation am betroffenen Areal verglichen. Dabei fiel auf, dass die Mutationen eines Patienten sowohl an der Innen-, als auch an der Außenseite der Helices lokalisiert waren, und sich wider Erwarten zwischen HR1 und HR2 nicht immer gegenüber lagen. Nur bestimmte Mutationen betreffend war ein Vorteil der Mutante gegenüber dem Wildtyp auf Anhieb ersichtlich.



**Abb. 12 oben:** Darstellung der HR1-Mutationen von Patient 1 im Modell. Die HR2-Mutationen liegen in großer räumlicher Distanz zu den N-terminalen Veränderungen und sind, neben den Mutationen im Verbindungsstück, nicht dargestellt.  
**unten:** gp41-Mutationen von Patient 22 im Modell. Neben der günstigeren Positionierung der Mutante E49Q gegenüber Wildtyp, imponieren die außen liegenden Mutationen N43D und N126K (links Wildtyp, rechts Mutante).

### III 3. 8. Lage der Mutationen in der $\alpha$ -Helix

Um weitere Erkenntnisse über die gegenseitige Beeinflussung der Mutanten zu erhalten, wurde die Lage der jeweiligen Mutationen nach dem „helical wheel Schema“ auf die N- und C-terminale Helix projiziert. Unter Berücksichtigung der Helixanordnung im gp41-Trimer (s. Abb. 6) und Simulation der Mutationen im Modell (s. III 3. 7.), konnten Aussagen hinsichtlich der Lage und räumlichen Distanz der HR1- und HR2-Mutationen eines Patienten gemacht werden.



**Abb. 13:** Darstellung der HXB2-Sequenz der N- und C-terminalen Helix von gp41 im „helical wheel“ (modifiziert nach Lu et al., 1995)

Die sieben Helixpositionen a-g wurden innerhalb des gp41-Heterodimers (intra gp41) in innen lokalisierte (NHR: b, e; CHR: e, a) und außen liegende (NHR: f; CHR: b, f, c) Residuen unterteilt. Diese Einteilung wurde zusätzlich auf inter-gp41-Ebene, d.h. unter Berücksichtigung der räumlichen Beziehungen zweier Heterodimere, vorgenommen. Zwischen zwei Heterodimeren lagen innen die NHR-Positionen g und c und die CHR-Positionen d und g. Innerhalb des Bündels N-terminaler Helices in der Mitte des gp41-Trimmers, näherten sich die an a und d gelegenen Aminosäuren an. Kombinierte NHR-CHR-Mutationen der Patienten wurden, unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen Helixposition, tabellarisch aufgelistet.

**Tab. 4 :** Darstellung kombinierter HR1-HR2-Mutanten betroffener Patienten (Pat.) an den jeweiligen Helixpositionen (Pos.). Hinweis auf mögliche intra- und inter gp41-Beziehungen, sowie evtl. Verbindungen zum benachbarten gp120-Trimer.

Pos. Pat.:	intra gp41				inter gp41				Verbindung zum nächsten gp120-Trimer?				
	NHR <b>b</b>	CHR <b>e</b>	NHR <b>a</b>	CHR <b>g</b>	NHR <b>d</b>	CHR <b>c</b>	NHR <b>g</b>	CHR <b>a</b>	NHR <b>d</b>	NHR <b>f</b>	CHR <b>b</b>	CHR <b>c</b>	CHR <b>f</b>
1 N42T	A156S						N43R/K/ S				M118I		
2						N43D	K144I					N126K	
3 N42D	N42D					G36V					N126K	N126K	
4 N42T		V38A	S138A				N43D				N126K		
5		L45Q	S138A										
6			S138A			N113H	N43D						
9						N113H	N43D					N126K	
10 N42T	N116I	V38A			F162S		N43D					N140D	
11		V38A	S138A					S151K				W161G	
12 A156S		L45M	S138A	Q40H			S151K					K154D	
13	H114K	V38A				N43D						K154D	
14 N42T	N43S	H114K					N43K					N125E	
15	N42T						N43S	E137S, K144I		L44M		M118T	T115L
21						Y127V	G36D				R46M		
22 E49Q												E136G	
23												E136V	
												N126K	

### III 3. 9. Viruslast und CD4-Zellzahl

Da nur bei sechs Patienten eine Baseline-Probe vor Therapiebeginn mit T-20 sequenziert und ausgewertet werden konnte, und bei 21 Patienten Mehrfachmutationen zugegen waren, ließ sich ein Einfluss bestimmter Einzel- oder Doppelmutationen für den Verlauf der beiden Infektionsparameter Viruslast und CD4-Zellzahl nicht immer verantwortlich machen. Das Hinzutreten oder der Wegfall einzelner Mutationen im Untersuchungsverlauf konnte hier lediglich Hinweise liefern. Zudem wurden alle Patienten mit einem optimierten Background therapiert, welcher Viruslast und CD4-Zellzahl ebenfalls modifizieren konnte.

Auf einige möglicherweise relevante Verläufe wird deshalb nur kurz im Rahmen der Diskussion eingegangen.

### III 3. 10. Änderung von Mutationen im Therapieverlauf mit T-20

Ebenso wie die Entstehung konnte der Verlust von Mutationen im Elektropherogramm beobachtet werden. Bei Patient 14 verloren sich die Mutationen N43S und T115L in der dritten im Verlauf untersuchten Probe. Gleichzeitig traten die Mutationen L44M und A96D auf.

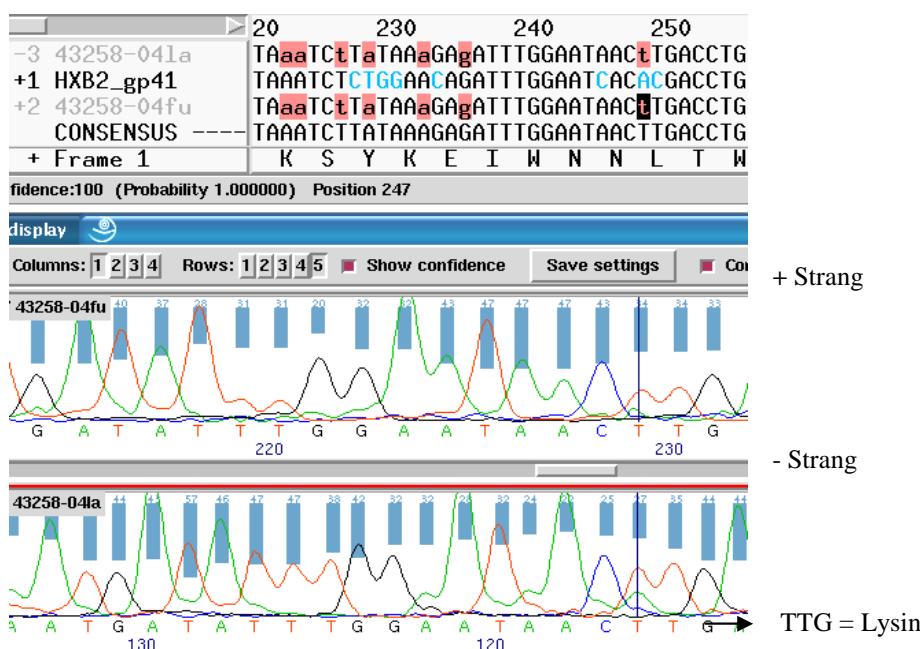
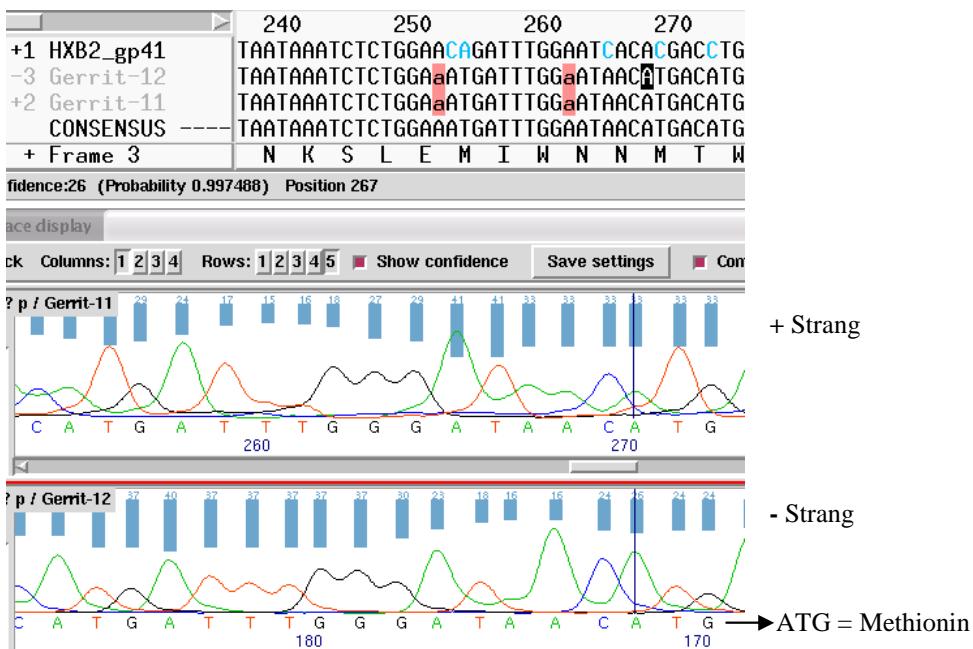


Abb. 14 a: Elektropherogramm Patient 14. Mutation an Position 115: M115 wird zu L115



**Abb. 14 b:** Elektropherogramm Patient 14. Verlust der Mutation an Position 115: M115 (vergl Referenzsequenz)

Um genauere Aussagen über das Mutationsverhalten machen zu können, wurde analysiert, ob zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens oder Wegfalls von Mutationen und der Therapie mit T-20 ein Zusammenhang ersichtlich wurde.

Bei sechs von 23 Patienten ergaben sich Änderungen der HR1-Mutationen im Verlauf der untersuchten Proben (Pat. Nr. 1, 3, 4, 10, 11, 14).

Bei vier Patienten verschwand die Mutation an Position 43 zwei, neun und 12 Monate nach Therapiebeginn mit T-20 bzw. war kurz nach Therapieende nicht mehr zugegen (Pat. Nr. 1, 4, 13, 14). Bei fünf Patienten konnte das Hinzutreten von Mutationen an N43 zwei oder drei Monate nach Therapiebeginn mit T-20 beobachtet werden (Pat. Nr. 2, 4, 6, 9, 13).

V38A verlor sich bei vier Patienten zwei, vier, fünf oder acht Monate nach Therapiebeginn (Pat. Nr. 3, 10, 11, 13), trat bei zwei Patienten im späteren Therapieverlauf aber wieder hinzu (Pat. Nr. 3, 13) und zudem bei einem anderen Patienten unter T-20 auf (Pat. Nr. 4).

N42DT war bei fünf von sechs Trägern bei allen untersuchten Proben präsent, sowohl unter Medikation, als auch unter Therapiepause mit T-20 (Pat. Nr. 1, 3, 10, 14, 19). Bei einem Patienten trat N42T sechs Monate nach Therapiebeginn mit T-20 auf (Pat. Nr. 4).

Bei einem Drittel der Patienten änderten sich HR2-Mutationen im Verlauf. Das Hinzutreten von N126K konnte bei vier von fünf Trägern beobachtet werden (Pat. Nr. 2, 3, 4, 9) und fand bei drei Patienten zwei, drei oder acht Monate nach Enfuvirtide-Einnahmestart statt. Bei einem Patienten entwickelte sich N126K im Laufe eines Monates nach Therapieende 8 (Pat. Nr. 2).

Das Auftreten von S138A konnte bei drei von fünf betroffenen Patienten im Verlauf observiert werden (Pat. Nr. 4, 5, 6). Bei zwei Patienten trat die Mutation acht bzw. 30 Monate nach Therapiebeginn zutage, bei einem Patienten drei Monate nach Therapieende (Pat. Nr. 4).

Zwei Patienten zeigten einen Wegfall von Mutationen im Verbindungsstück unter Pausierung bzw. Einnahme von Enfuvirtide (Pat. Nr. 1, 3).

Insgesamt überwog die Anzahl der unter T-20-Therapie auftretenden Mutationen.

## IV Diskussion

Die klinische Wirksamkeit von Enfuvirtide wurde durch die TORO-Studien bewiesen. In diese randomisierten, kontrollierten Phase-III-Studien wurden 995 therapieerfahrene HIV-1 infizierte Patienten eingeschlossen. Eine Gruppe erhielt über 48 Wochen eine optimale antiretrovirale Hintergrundtherapie unter zusätzlicher Einnahme von Enfuvirtide, die andere Gruppe wurde lediglich mit der Hintergrundtherapie behandelt. In der Enfuvirtide-Gruppe zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe ein zweifach höherer Baseline-CD4-Anstieg bei gleichzeitig signifikantem Rückgang der Viruslast (Katlama et al., 2003; Trottier et al., 2003).

Die Therapie mit T-20 bringt Vor- und Nachteile mit sich. Vorteile von Enfuvirtide liegen in der geringen Wechselwirkung mit Arzneimitteln, die durch Cytochrom-P450-Enzyme oder N-Acetyltransferase metabolisiert werden (Zhang et al., 2004) und im spezifischen Angriffspunkt am Virus. Als Fusionsinhibitor agiert Enfuvirtide außerhalb der Zelle und wird dadurch in seiner Konzentration und Effektivität im Gegensatz zu Nukleotidanalogen nicht durch zelluläre Transporter beeinträchtigt (Wijnholds et al., 2000). Gleichzeitig liegt ein verminderter Risiko von Kreuzresistenzen zu anderen antiretroviralnen Therapeutika vor (Sista et al., 2001). So ergänzt T-20 das HAART-Regime durch synergistische Wirkung (Nagashima et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass eine Kombination aus N- und C-Peptiden zur Bildung von Antikörpern gegen die aktivierte Form von gp41 führen kann (De Rosny et al., 2001). Wenngleich dies ein funktionierendes Immunsystem voraussetzt und die genannten Antikörper die HIV-Infektion nicht blockieren konnten, liegt hier möglicherweise ein weiterer potentieller Vorteil von Enfuvirtide.

Die Nachteile betreffend ist v. a. die Applikationsform aufzuführen. Nur durch eine subcutane Verabreichung kann eine therapeutische Wirkung erzielt werden. Diese resultiert häufig in Inflammation der Einstichstelle und erfordert eine hohe Compliance des Patienten (Kilby et al., 2002). Enfuvirtide scheint die antivirale Potenz des Immunsystems zu beeinträchtigen, was z.B.

zum vermehrten Auftreten grippaler Infekte führt, und die Clearance anderer Medikamente zu beeinflussen (Hartt et al., 2000; Greenberg und Cammack, 2004).

Ein entscheidender Nachteil von T-20 liegt, wie bei anderen antiviralen Therapeutika, in der Selektion von Resistenzmutationen. Rimsky et al. veröffentlichten dazu erste Untersuchungsergebnisse (1998). Die für die Entstehung von T-20-Resistenz verantwortlichen Positionen wurden *in vitro* im N-terminalen gp41-Bereich lokalisiert und dem GIV-Motiv (Pos.36-38) zugeschrieben. Dieses spielt durch seine hohe Konservierung eine Schlüsselrolle in der T-20-Bindung. Resistente Virusklone trugen an Stelle von GIV die Aminosäureabfolge SIM, DIM oder DTV (G36S, G36D, I37T, V38M) und Rimsky schlussfolgerte, dass zwei Aminosäuremutationen für die Entwicklung eines resistenten Phänotyps notwendig seien. Wei und Kollegen publizierten vier Jahre später (2002) erneut relevante Ergebnisse zu diesem Thema. Sie belegten, dass Einzelmutationen im GIV-Motiv für die Resistenzentwicklung ausreichend sind, wobei kombiniert auftretende Mutationen die virale Resistenz verstärken können.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Mutationen in HR1 traten hauptsächlich in dem (größtenteils) hochkonservierten Bereich auf, der infolge von Mutationen für die Entstehung von T-20-Resistenz verantwortlich gemacht wurde (Pos.36-45). Zudem wurden noch nicht beschriebene Mutationen beobachtet: S35T, L45Q und E49Q. Am häufigsten waren die Mutationen N43D, N42T und V38A die, wie in anderen Studien gezeigt wurde mit einer Verringerung der T-20-Empfindlichkeit um das 249-fache, 3,8-fache bzw. 60-fache einhergehen. Auch für G36D, Q40H, N43SK und L45M ist eine Steigerung der T-20-Resistenz beschrieben (450-fach, 19-fach, 6-fach, 1,4-fach). Die bei drei Patienten (= 13%) vorhandene Doppelmutante N42T+N43S erhöht die T-20-Resistenz um den Faktor 339, die Mutante V38A+N42T (gefunden bei zwei Patienten = 8,7%) um den Faktor 149 und Q40H+L45M (bei einem Patienten = 4,3%) um den Faktor 327 (Wei et al., 2002; Menzo et al., 2004; Mink et al., 2005).

Bei Darstellung der genannten Mutationen im Modell fiel auf, dass diese sowohl an der Innen- als auch an der Außenseite der N-terminalen Helix lokalisiert waren. Die vorteilhaftere Anordnung bestimmter, der C-terminalen Helix desselben gp41-Heterodimers gegenüberliegender Mutanten, wie N42T und V38A, deutet auf eine so erzielte Erhöhung der Bindungsaffinität der beiden Helices hin. Die Mutation N43D, welche nachweislich eine T-20-Resistenzentwicklung veranlassen kann, liegt in der N-terminalen Helix aber außen und spricht aufgrund ihres gehäuften Auftretens unter Therapie mit T-20 für die gleichzeitige Relevanz einer inter gp41-Assoziation.

Die Interaktion der beiden gp41-Helices im Rahmen des Fusionsprozesses warf die Frage nach Veränderungen im carboxyterminalen Bereich als Reaktion auf N-terminale Mutationen auf, da zunächst von einem Schloss-Schlüssel-Prinzip der beiden Helices ausgegangen wurde.

Eine ganze Reihe von HR2 Mutationen zeigte sich bei den hier untersuchten Patientenproben. Diese lagen sowohl innerhalb, als auch außerhalb des T-20 äquivalenten Bereiches und fanden sich teilweise an den von Hanna et al. (2002) beschriebenen kritischen Positionen für T-20-Resistenz (Y127, S138). Auch hier traten bisher unbekannte Mutationen auf: Y127V, E136V, E137S, N140D, K144I, K154D, W161G, F162F und N163I. Spitzenreiter waren N126K (5 Patienten) und S138A (4 Patienten).

Nameki et al. gingen davon aus, dass HR1 Mutationen die Bindungsaffinität des Fusionsinhibitors herabsetzen. Für die parallel auftretende Mutation N126K, wurde eine gleichzeitige Verstärkung der NHR-CHR-Bindungsaffinität auf intra gp41-Ebene angenommen (2005).

Im Rahmen dieser Studie trat N126K nie als HR2-Einzelmutation auf, sondern war in allen fünf Fällen mit HR1-Mutationen gepaart. Vier von fünf Trägern der Mutante N126K waren gleichzeitig Träger von N43D (Pat. 2, 4, 9, 22). Allerdings nehmen beide Mutationen, sowohl in der N-, als auch in der C-terminalen Helix c Positionen ein und liegen an den Außenseiten des gp41 Heterodimers, was durch Darstellung der Mutationen im Modell (s. Abb. 11, Seite 47) deutlich gemacht werden konnte. Trotzdem wurde für N43D eine 249-fach höhere Resistenz gegenüber dem Baseline-Virus beobachtet und auch N126K wurde ein resistenzsteigernder Effekt gegenüber T-20

zugeschrieben (Lohrengel et al., 2005). Dies spricht erneut für die Hypothese, dass im gp41-Trimer neben Intra- auch Inter-Helixbeziehungen eine Rolle spielen, welche die Formation und Stabilität des Sechs-Helix-Bündels positiv beeinflussen.

S138A befindet sich an einer von Hanna et al. (2002) als kritische Position für T-20-Resistenz charakterisierten Stelle. Darüber hinaus wurde die Bedeutung von S138A beim gemeinsamen Auftreten mit N43D belegt. Es steigert die, durch N43D hervorgerufene, 15-fache Enfuvirtide-Resistenz um den Faktor 3,1 auf das 47-Fache (Xu et al., 2005). S138A trat nur bei einem der insgesamt vier Träger in Kombination mit N43D auf und war in den restlichen drei Fällen mit anderen HR1-Mutationen (V38A, Q40H, N42T, L45QM) vergesellschaftet. S138 nimmt eine a Position in der C-terminalen Helix ein und steht damit in enger Beziehung zu dem N-terminal an einer e Position gelegenen L45 sowie zu der b Position N42. Durch Darstellung im Modell konnte der Vorteil der Mutanten auf Intra-gp41-Ebene verdeutlicht werden. Dies traf jedoch nur bedingt für die Mutante N43D+S138A zu, deren Aminosäureänderungen sich erneut in starker räumlicher Distanz innerhalb eines gp41 befanden. Aus S138A könnte eine Erhöhung der Bindungsaffinität zwischen HR1 und HR2 resultieren, während N43D die Bindungsaffinität zum benachbarten gp41-Dimer steigert und dadurch die Stabilität des Sechs-Helix-Bündels erhöht.

Das Auftreten, sowie der Wegfall von Mutationen korrelierte bei einigen Patienten mit der Einnahme oder Therapiepause von Enfuvirtide. Insofern Neuerungen auf Mutationsebene im Verlauf der untersuchten Proben beobachtet werden konnten, überwog ein Hinzutreten von Mutationen unter Therapie mit T-20. Dies stützt die Beobachtung, dass die relative replikative Fitness T-20 resistenter HIV-1-Mutanten *in vivo* höher in der An- als in der Abwesenheit von Enfuvirtide ist (Lu et al., 2004).

Es gibt aber dazu weitergehende Beobachtungen. Die Analyse der Doppelmutante V38A+N126K in einer anderen Studie, erbrachte Hinweise für die Existenz T-20 abhängiger HIV-1-Mutanten. Durch Erhöhung der Bindungsaffinität von NHR und CHR infolge der N126K-Mutation kam es zu

einer frühzeitigen Formation des Sechs-Helix-Bündels, was in einem defekten Envelope Spike resultierte. T-20 konnte hier als Protektor fungieren, da es sich an Stelle von CHR schützend an den N-terminalen Teil anlagerte und so die frühzeitige Interaktion der beiden Helices verhinderte. Dank der V38A Mutation in HR1 war seine Bindungsaffinität aber nicht besonders hoch, so dass es abdriftete und die N-terminale Helix für die folgende Assoziation mit der C-terminalen Helix freigab (Baldwin et al., 2005).

Die Doppelmutante V38A+N126K trat im Rahmen dieser Studie nur bei einem Patienten unter T-20-Einnahme auf. Sie war bei drei, über einen Zeitraum von acht Monaten untersuchten Proben präsent und ging mit einem Anstieg der Viruslast um das dreifache, sowie einem Absinken der CD4 Zahl von 14% einher, was Baldwins Theorie stützt.

N126K war bei vier Trägern mit N43D vergesellschaftet (s.o.). Bei drei dieser Patienten trat die Mutante unter T-20-Therapie auf, bei einem Patienten erschien sie transient einen Monat nach Beendigung der T-20-Einnahme und war zwei Monate später wieder verschwunden.

Neben der Verstärkung der T-20-Resistenz kommt den Mutationen der C-terminalen Helix noch eine weitere Bedeutung zu. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Mutanten mit Aminosäureänderungen im carboxy-terminalen Bereich von gp41 effizient das gp160 Processing, sowie die gp120-gp41 Assoziation inhibiert. Gleichzeitig konnten die Mutanten alle die Formation von Synzytien induzieren und waren dem Wildtyp diesbezüglich überlegen (Cao et al., 1993). Die Mutanten trugen Aminosäureänderungen an Positionen, an denen auch im Rahmen dieser Arbeit Mutationen beobachtet wurden (E136, W161, F162). Allerdings waren diese bei zwei von drei Patienten mit Resistenzmutationen in HR1 und/ oder HR2 vergesellschaftet. Es kann man nicht ausgeschlossen werden, dass das HI-Virus mehrere Wege nutzt, um dem Selektionsdruck von T-20 zu entkommen.

15 von 23 (65%) Patienten waren Träger von Mutationen im Verbindungsstück zwischen HR1 und HR2. Keine der Mutationen war im cysteinreichen Loop lokalisiert, welcher an der gp120-gp41-Assoziation beteiligt ist und die Fusion nachteilig beeinflussen kann. Weitere Residuen des Verbindungs-

stückes werden als Konnektoren zwischen den CD4 und Korezeptor induzierten Konformationsänderungen in gp120, und der fusiogenen Aktivierung von gp41 angesehen (Maerz et al., 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Mutationen traten vor allem an hoch variablen Residuen auf und sind in der Literatur größtenteils noch nicht beschrieben (K77G/W, I84V, L91F, A96D, A101D, S107N/Y, L108H, E109K und Q110M/N/V/Y/H/T/S). Aufgrund des gehäuften Vorkommens von E109K (bei ca. einem Sechstel der Patienten) ist ein Einfluss dieser Mutation auf die Fusion nicht auszuschließen. Dies ist vor dem Hintergrund bedeutsam, dass E109K nur 1,8% der Polymorphismen der Aminosäureposition ausmacht und sich die Mutante in relevanter Anzahl in Kombination mit anderen Mutationen fand.

Unter Therapie mit Enfuvirtide müssen neben der Resistenzentwicklung weitere Einflussgrößen der T-20-Wirkung in Betracht gezogen werden. Die Korezeptor-Dichte und -Bindungsaffinität wurden für die T-20-Sensitivität mitverantwortlich gemacht. Eine Erhöhung beider Parameter beschleunigt die Formation des Sechs-Helix-Bündels und reduziert so das kinetische Fenster, in dem HIV-1 sensibel für T-20 ist.

Mutationen in der V3-Schleife, wo die Korezeptor-Spezifität determiniert ist, können die T-20-Wirkung beeinflussen. HI-Viren die CCR5 als Korezeptor benutzen zeigten eine sechsfach erhöhte T-20-Resistenz (Derdeyn et al., 2001; Reeves et al., 2002). Hier liegen mögliche Erklärungen für das individuell unterschiedliche Ansprechen auf Enfuvirtide. In diesem Zuge müssen noch natürliche Primärmutationen und Polymorphismen der Env-Region genannt werden, die als Modifikatoren der T-20-Wirkung diskutiert wurden.

Da die virale Reverse Transkriptase keine Mechanismen zur Kontrolle der Lesegenauigkeit besitzt, werden mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit ( $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$ ) falsche Basen in die neusynthetisierten Stränge eingebaut, was eine hohe genetische Variabilität der Retroviren zur Folge hat (Modrow et al., 2003). Diese wird verstärkt durch den Selektionsdruck, den gegen bestimmte Regionen von HIV-1 gerichtete Antikörper oder T-Zellen ausüben. Carmona et al. (2005) fanden mit T-20-Resistenz assoziierte Mutationen bei 10,5% von 200 untersuchten Proben T-20 unerfahrener Patienten (größtenteils Subtyp B).

Dazu zählten L44M und R46M, Mutationen die bei zwei von 23 Patienten im Rahmen dieser Studie auftraten (Pat.14 und 21). Da bei keinem dieser Patienten eine Baseline-Probe vor Therapiebeginn mit Enfuvirtide untersucht werden konnte, bleibt bei diesen vereinzelt aufgetretenen Änderungen allerdings unklar, ob es sich um natürliche, oder um unter T-20-Selektionsdruck entstandene Mutationen handelt. Auf letztere weist die Präsenz von L44M unter T-20-Therapie bei Patient 14 hin, welche erst in der dritten Probe auftritt. Durch den mit dem Auftreten von L44M stattfindenden Wegfall von T115L kann jedoch die Existenz verschiedener HIV-1-Wildtypen in einem Individuum nicht ausgeschlossen werden. Unter T-20-Selektionsdruck könnte sich auch die natürliche, primär resistente Mutante durchsetzen und zu einem Therapieversagen des Fusionsinhibitors führen. Die Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit nicht bei allen Patienten Baseline-Proben zur Verfügung standen, wirkte hier limitierend.

Der Fusionsprozess von HIV-1 ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Erst kürzlich konnten Aussagen zum nativen Zustand des Transmembranproteins gp41 gemacht werden, die darauf hinwiesen, dass die N-terminalen Helices hier nicht als trimerisches Bündel vorliegen, Konformationsänderungen in gp41 und gp120 aber auch nicht der Trigger für die Formation dieses Zwischenstadiums sein müssen.

Der Anti-HIV Antikörper 2F5 bindet an das in der C-terminalen Helix gelegene Epitop ELDKWAS. Die strukturelle Analyse zeigte, dass dieser membrannahe Bereich während der Fusion entgegen bisheriger Annahmen in zwei verschiedenen Sekundärstrukturen vorliegt und eine Konformationsänderung von einer  $\beta$ -Faltblatt- in eine  $\alpha$ -Helix-Anordnung durchmacht (Barbato et al., 2003).

Die Theorie zum Fusionsprozess von HIV-1, sowie zu Aufbau und Formation des Transmembranproteins gp41, basiert auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen, unter starker Berücksichtigung anderer Viren, wie Influenza oder Moloney (Yu et al., 1994, Chen et al., 1995; Weissenhorn et al., 1996, 1997). Neben großen Parallelen gibt es wichtige Unterschiede, wie z.B. die pH-abhängige Fusionsaktivierung bei Influenza entgegen der pH-unabhängigen bei HIV-1 (Bullough et al., 1994).

Die beobachteten Mutationen fanden sich an verschiedenen Helix-Positionen, die im Proteinmodell teilweise in großer räumlicher Distanz lagen, welche einen Vorteil durch Interaktion innerhalb des Heterodimers unmöglich machte. Ein neues Modell (Dr. Martin Obermeier) unter Zuhilfenahme einer HIV-1 Subtyp B Konsensussequenz, Röntgenstrukturinformation der RCSB-Proteindatenbank und Erweiterung durch die RCSB-Modelle 1ENV (Weissenhorn et al., 1997), 1FAV (Zhou et al., 2000), 1I5X + 1I5Y (Lu et al., 2001) und 2EZP (Caffrey et al., 1998), zeigt in einigen Punkten eine bessere Übereinstimmung mit den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Mutationen, da es neben intra- auch inter-gp41-Beziehungen berücksichtigt.

Die weitere Entschlüsselung des HIV-1 Fusionsprozesses ist unerlässlich für ein verbessertes Design oder sogar die individuelle Anpassung von Peptiden, um die Wirkung zu steigern. Dazu gehört auch ein detailgenaues, molekulares Verständnis der Resistenzmechanismen. Vom Grad des Wissenszuwachses auf diesem Sektor hängt es ab, welche Rolle zukünftig dem Einsatz von Fusionsinhibitoren in den um Korezeptor-Antagonisten und Integrase-Inhibitoren erweiterten Therapieoptionen zukommt.

## V Zusammenfassung

Für die Therapie der HIV-Infektion stehen verschiedene Substanzklassen zur Verfügung. T-20 (Handelsname Fuzeon®) ist ein Fusionsinhibitor, der in seinem Aufbau einem Teil des Hüllproteins von HIV-1 entspricht. Die Hülle von HIV-1 wird von mehreren gp120-gp41-Komplexen durchsetzt, welche Trimere bilden und durch nicht-kovalente Bindungen assoziiert sind. Die Ektodomäne von gp41 besteht aus vier wichtigen Strukturen: einem hydrophoben, glycinreichen Fusionspeptid, einer N-terminalen stabartigen  $\alpha$ -Helix (Heptad repeat 1), einem Verbindungsstück mit cysteinreichem Loop (zwischen HR1 und HR 2) und einer zweiten C-terminalen  $\alpha$ -Helix (Heptad repeat 2). Die Fusion wird u. a. durch Konformationsänderungen im gp120-gp41-Komplex und innerhalb eines gp41 ermöglicht. Gp41 liegt während des Fusionsprozesses in drei Stadien vor- in einem nativen, in einem fusionsaktiven Zustand und in einem Zwischenstadium. Als Inhibitor der räumlichen Umstrukturierung von HIV-1-gp41 agiert T-20 durch spezifische extra-zelluläre Bindung an das Virusprotein im Zwischenstadium von gp41. Dadurch wird die Fusion zwischen viraler Zellmembran und Zielzelle blockiert und das Eindringen der viralen RNA in die Zielzelle verhindert. Die T-20-Resistenz wurde zunächst dem GIV-Motiv im N-terminalen Teil von gp41 zugeschrieben. Auch C-terminale Mutationen betreffend wurden resistenzsteigernde Effekte beschrieben. Ziel dieser Arbeit war die Erforschung C-terminaler Mutationen als Antwort auf N-terminale Aminosäureänderungen und ihre Darstellung in einem Proteinmodell. Entgegen den Erwartungen lagen die beobachteten Mutationen in HR2 oftmals den HR1-Mutationen nicht gegenüber, sondern waren häufig sogar an der Außenseite der Helix lokalisiert. Neben Mutationen, die auf intra-gp41-Ebene eine Rolle spielen, spricht dies für das Vorhandensein von inter-gp41-Beziehungen. Es muss davon ausgegangen werden, dass das bisherige Proteinmodell unvollständig ist. Ein neues Proteinmodell zeigt in einigen Punkten eine bessere Übereinstimmung mit den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Mutationen.

## VI Literaturliste

- Albert, J., Fenyo, E. (1990). Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 1560-1564
- Allan, J.S., Coligan, J.E., Barin, F. et al. (1985) Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* 228, 1091-1094
- Barbato, G., Bianchi, E., Ingallinella, P., et al. (2003). Structural analysis of the epitope of the anti-HIV antibody 2F5 sheds light into its mechanism of neutralization and HIV fusion. *Journal of Molecular Biology* 330, 1101-1115.
- Bullough, P., Hughson, F., Skehel, J. et al. (1994). Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371, 37-43
- Caffrey, M. et al. (1998). Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *EMBO Journal* 17, 4572-4584
- Cao, J., Bergeron, L., Helseth, E. et al. (1993). Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. *Journal of Virology* 67, 2747-2755
- Carmona, R., Pérez-Alvarez, L., Muñoz, M. et al. (2005). Natural resistance-associated mutations to Enfuvirtide (T20) and polymorphisms in the gp41 region of different HIV-1 genetic forms from T20 naive patients. *Journal of Clinical Virology* 32, 248-253
- Chan, D., Fass, D., Berger, J. et al. (1997). Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein. *Cell* 89, 263-273
- Chan, D., Kim, P. (1998). HIV Entry and Its Inhibition. *Cell* 93, 681-684
- Chen, C., Matthews, T., McDanal, C. et al. (1995). A molecular clasp in the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 TM protein determines the anti-HIV activity of gp41 derivatives: implication for viral fusion. *Journal of Virology* 69, 3771-3777
- Chesbro, B., Nishio, J., Perryman, S. et al. (1991). Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry into CD4-positive HeLa cells, T-leukemia cells, and macrophages. *Journal of Virology* 65, 5782-5789
- Clapham, P., McKnight, A. (2002). Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *Journal of General Virology* 83, 1809-1829

Crick, F. (1953). The packing of alpha-helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallographica* 6, 689–697

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W. et al. (1996). Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661–666

De Rosny, E., Vassell, R., Wingfield, P. T. et al. (2001). Peptides corresponding to the heptad repeat motifs in the transmembrane protein (gp41) of human immuno-deficiency virus type 1 elicit antibodies to receptor-activated conformations of the envelope glycoprotein. *Journal of Virology* 75, 8859–8863

Derdeyn, C., Decker, J., Sfakianos, J. et al. (2001). Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to fusion inhibitors targeted to the gp41 first heptad repeat involves distinct regions of gp41 and is consistently modulated by gp120 interactions with the coreceptor. *Journal of Virology* 75, 8605–8614

Derdeyn, C., Decker, J., Sfakianos, J. et al. (2000). Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *Journal of Virology* 74, 8358–8367

Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion <http://www.rki.de>

Earl, P., Doms, R., Moss, B. (1990). Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 648–652

Fikkert, V., Cherepanov, P., Van Laethem, K. et al. (2002). Env chimeric virus technology for evaluating human immunodeficiency virus susceptibility to entry inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 3954–3962

Fouchier, R., Groenink, M., Kootstra, N. et al. (1992). Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *Journal of Virology* 66, 3183–3187

Gallaher, W. (1987). Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* 50, 327–328

Gallaher, W., Ball, J., Garry, R. et al. (1989). A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Research and Human Retroviruses* 5, 431–440

Gelderblom, H., Hausmann, E., Ozel, M. et al. (1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156, 171–176

Greenberg M, McDanal C, Stanfield-Oakley S. et al. (2001). Virus sensitive to T-20 and T-1249 is independent of coreceptor usage. 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, IL, 4-8 February 2001, Abstract 473

Greenberg, M., Cammack, N. (2004). Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor Antimicrobial Chemotherapy 54, 333–340

Greenberg, M., Cammack, N., Salgo, M. et al. (2004). HIV fusion and its inhibition in antiretroviral therapy. Reviews in Medical Virology 14, 321-337

Hanna, S., Yang, C., Owen, S. et al. (2002). Resistance mutation in HIV entry inhibitors. AIDS 16, 1603–1608

Hart, T., Kirsh, R., Ellens, H. et al. (1991). Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. Proceedings of the National Academy of Sciences 88, 2189–2193

Hartt, J., Liang, T., Sahagun-Ruiz, A. et al. (2000). The HIV-1 cell entry inhibitor T-20 potently chemoattracts neutrophils by specifically activating the N-formylpeptide receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications 272, 699–704

Helseth, E., Olshevsky, U., Gabuzda, D. et al. (1990). Changes in the transmembrane region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein affect membrane fusion. Journal of Virology 64, 6314-6318

Helseth, E., Olshevsky, U., Furman, C. et al. (1991). Human immunodeficiency virus type 1 gpl20 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. Journal of Virology 65, 2119-2123

Hwang, S., Boyle, T., Lyerly, H., Cullen, B. (1991). Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. Science 253, 71–74

Jiang, S., Lin, K., Strick, N., Neurath, A. (1993) HIV-1 inhibition by a peptide. Nature 365, 113

Katlama, C., Arastéh, K., Clotet, B. et al. (2003). Enfuvirtide TORO studies, 48 week results confirm 24 week findings. Antiviral Therapy 8, Suppl. 1, LB02

Kilby, J., Lalezari, J., Eron, J. et al. (2002). The safety, plasma pharmacokinetics, and antiviral activity of subcutaneous enfuvirtide (T-20), a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIVinfected adults. AIDS Research and Human Retroviruses 18, 685–693

- Kirsh, R., Hart, T., Ellens, H. et al. (1990). Morphometric analysis of recombinant soluble CD4-mediated release of the envelope glycoprotein gp120 from HIV-1. AIDS Research Human Retroviruses 6(10), 1209-1212
- Kliger, Y., Gallo, S., Peisajovich, S. G. et al. (2001). Mode of action of an antiviral peptide from HIV-1. Inhibition at a post-lipid mixing stage. Journal of Biological Chemistry 276, 1391–1397
- Koning, F., van Rij, R., Schuitemaker, H. (2002). Biological and Molecular Aspects of HIV-1 Coreceptor Usage. HIV Sequence Compendium 2002, 28-30. <http://hiv-web.lanl.gov>
- Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L. et al. (1987). Functional regions of the human immunodeficiency virus envelope glycoproteins. Science 237, 1351-1355
- Kwok, S., Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. Nature 339, 237-238
- Kwong, P., Wyatt, R., Robinson, J. et al. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. Nature 393, 648–659
- Kwong, P., Wyatt, R., Sattentau, Q. et al. (2000). Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. Journal of Virology 74, 1961–1972
- Lohrengel, S., Hermann, F., Hagmann, I. et al. (2005). Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to Membrane-Anchored gp41-Derived Peptides. Journal of Virology 79, 10237–10246
- Lu, J., Sista, P., Gigué, F. et al. (2004). Relative replicative fitness of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide (T-20). Journal of Virology 78, 4628–4637
- Lu, M., Blacklow, S., Kim, P. (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein . Nature Structural Biology 2, 1075–1082
- Lu, M., et al. (2001). Structural and functional analysis of interhelical interactions in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein by alanine-scanning mutagenesis. Journal of Virology 75, 11146-11156
- Maerz, A., Drummer, H., Wilson, K. et al. (2001). Functional Analysis of the Disulfide-Bonded Loop/Chain Reversal Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Reveals a Critical Role in gp120-gp41 Association. Journal of Virology 75, 6635–6644
- Mandell, Gerald L. et al. Principles and Practice of Infectious Disease (2004). Sixth Edition Churchill Livingstone, 2122

- Melikyan, G., Markosyan, R., Hemmati, H. et al. (2000). Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *Journal of Cell Biology* 151, 413–423
- Menzo, S., Castagna, A., Monachetti, A. et al. (2004). Genotype and phenotype patterns of human immunodeficiency virus type 1 resistance to enfuvirtide during long-term treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 3253–3259
- Mink, M., Mosier, S., Janumpalli, S. et al. (2005). Impact of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Amino Acid Substitutions selected during Enfuvirtide Treatment on gp41 Binding and Antiviral Potency of Enfuvirtide In Vitro, *Journal of Virology* 79, 12447–12454
- Mische, C., Yuan, W., Strack, B. et al. (2005). An alternative conformation of the gp41 heptad repeat 1 region coiled coil exists in the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein precursor. *Virology* 338, 133-143
- Modrow, S., Falke,D., Truyen, U. (2003). *Molekulare Virologie*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg – Berlin, ISBN3-8274-1086-X, Kapitel 18, 390-426
- Moore, J., McKeating, J., Norton, W., Sattentau, Q. (1990). Dissociation of gp120 from HIV-1 virion induced by soluble CD4. *Science* 250, 1139-1142
- Nagashima, K., Thompson, D., Rosenfield, S. et al. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors PRO 542 and T-20 are potently synergistic in blocking virus-cell and cell-cell fusion. *Journal of Infectious Diseases* 183, 1121–1125
- Nameki, D., Kodama, E., Ikeuchi, M. et al. (2005). Mutations conferring resistance to HIV-1 fusion inhibitors are restricted by gp41 and Rev response element functions. *Journal of Virology* 79, 764–770
- O'Brien, W., Koyanagi, Y., Namazie, A. et al. (1990). HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* 348, 69–73
- Pinter, A., Honnen, W., Tilley, S. et al. (1989). Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* 63, 2674-2679
- Reeves, J., Gallo, S., Ahmad, N. et al. (2002). Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 16249–16254
- Rimsky, L., Shugars, D., Matthews, T. (1998). Determinants of human immuno-deficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *Journal of Virology* 72, 986–993

Robert Koch Institut Archiv 2007. Abgerufen am 06.01.2007 unter:  
[http://www.rki.de/cln\\_011/nn\\_197444/sid\\_B233D2A0B0B0F1E66F7197E324F9BB97/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2007/20\\_2007.htm?\\_\\_nnn=true](http://www.rki.de/cln_011/nn_197444/sid_B233D2A0B0B0F1E66F7197E324F9BB97/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2007/20_2007.htm?__nnn=true)

Roche Fachinformation Fuzeon® 90 mg/ml, Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung. April 2005

Sanger, F., Icklen, S., Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5463-5467

Schawaller, M., Smith, G., Skehel, J., Wiley, D. (1989). Studies with crosslinking reagents on the oligomeric structure of the env glycoprotein of HIV. *Virology* 172, 367-369

Shioda, T., Levy, J., Cheng-Mayer, C. (1991). Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* 349, 167–169

Sista, P., Melby, T., Dhingra, U. et al. (2001). The fusion inhibitors T-20 and T-1249 demonstrate potent in vitro antiviral activity against clade B HIV-1 isolates resistant to reverse transcriptase and protease inhibitors and non-B clades. *Antiviral Therapy* 6, Suppl. 1, 3

Trottier, B., Arastéh, K., Henry, K. et al. (2003). Durability of response of enfuvirtide through 48 weeks in the TORO trials. In *Proceedings of the Forty-third Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Chicago, IL, USA, 14-17 September 2003, Abstract H-835, p. 55. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA

Trujillo, J., Wang, W., Lee, T. et al. (1996). Identification of the envelope V3 loop as a determinant of a CD4- negative neuronal cell tropism for HIV-1. *Virology* 217, 613–617

UNAIDS Bericht (2007). Abgerufen am 06.01.2008 unter:  
[http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007\\_epiupdate\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_en.pdf)

Veronese, F., Vico, A., Copelanf, T. et al. (1985). Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* 229, 1402-1405

Wei, X., Decker, J., Liu, H. et al. (2002). Emergence of resistant human immuno-deficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) mono-therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1896–1905

Weissenhorn, W., Wharton, S., Calder, L. et al. (1996). The ectodomain of HIV-1 env subunit gp41 forms a soluble, Alphahelical, rod-like oligomer in the absence of gp120 and the N-terminal fusion peptide. *EMBO Journal* 15, 1507–1514

Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. et al. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387, 426–430

Weiss, C., Levy, J., White, J. (1990). Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *Journal of Virology* 64, 5674-5677

Wild, C., Oas, T., McDanal, C. et al. (1992). A synthetic inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proceedings of the National Acadamy of Sciences* 89, 10537-10541

Wild, C. T., Shugars, D. C., Greenwell, T. et al. (1994). Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 9770–9774

Wijnholds, J., Mol, C., van Deemter, L. et al. (2000). Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs  
*Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7476–7481

Xu, L., Pozniak, A., Wildfire A. et al. (2005). Emergence and evolution of enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations with gp41. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 1113–1119

Yu, Y., King, D., Shin, Y. (1994). Insertion of a coiled-coil peptide from influenza virus haemagglutinin into membranes. *Science* 266, 274–276

Zeeck, A., Eick, S., Krone, B. et al. (1992). *Chemie für Mediziner* 2. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, ISBN 3-541-13912-9, Kapitel 15, 268-275

Zhang, X., Lalezari, J., Badley, A. et al. (2004). Assessment of drug-drug interaction potential of enfuvirtide in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 75, 558-568

Zhou, G., et al. (2000). The structure of an HIV-1 specific cell entry inhibitor in complex with the HIV-1 gp41 trimeric core. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 8, 2219-2227

Zhu, P., Liu, J., Bess, J. Jr et al. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 441, 847-852

## VII Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Josef Eberle, der sich immer Zeit für Gespräche und Fragen nahm, mich sehr selbstständig arbeiten ließ, und mich sowohl forderte als auch förderte.

Ebenfalls sehr herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Martin Obermeier für die große Hilfe bei der Darstellung und Auswertung der Ergebnisse auf elektronischer Ebene.

Frau Hiroko Matsuba und Frau Helga Mairhofer danke ich sehr für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Labortätigkeiten, die große Hilfe bei Extraktion, PCR und Sequenzierung, sowie die vielen nützlichen Tipps und Anregungen.

Mein Dank richtet sich an Frau Gerlinde Dörr-Fuchs für die Sequenzierung unzähliger Patientenproben.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. Hans Nitschko, an den ich mich mit Fragen jederzeit wenden konnte.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Johannes Bogner, Herrn Professor Dr. Frank-Detlef Goebel, Herrn Dr. Hans Jäger und Frau Dipl.-Phys. Eva Wolf für die klinische Datensammlung und die zur Verfügung gestellten Patientenproben.

Ich danke meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung.

Zu guter letzt bedanke ich mich bei meinem Freund Jasper, für sein stetiges Zuhören und die gezielten Fragen, die zur Entstehung dieser Arbeit beitrugen.

## **VIII Anhang**

### **VIII 1. Datentabelle**

Pat. Nr.	Alter (in Jahren)*	Geschlecht	Probendatum	Proben-Nr.	VL-Datum	VL cop/ml	CD41 µl	Therapiebeginn T20		Therapieende T20		Pos. HR1-Mutation	Pos. HR2-Mutation	Pos. Loop-Mutation
								Initiales Ansprechen	26.03.2002	18.02.2003	N42T, N43R	M118I, A166S		
1	48	m	25.03.2003	2709	23.04.2002	128977	1							
			25.02.2004	7323	25.03.2003	102630	2							
			09.03.2004	9138	29.12.2003	228000	3		25.02.2004					
			16.03.2004	9997	09.03.2004	131541	3							
			06.04.2004	13017	21.04.2004	622283	4							
			21.04.2004	14171	21.04.2004	622283	4							
			05.05.2004	16562	18.05.2004	158783	3							
			18.05.2004	18662	18.05.2004	158783	3							
			15.06.2004	27212	13.07.2004	188324	4							
			13.07.2004	27223	13.07.2004	188324	4							
2	41	w	10.08.2004	676	12.10.2004	37072	13.09.2004	500000	18					
			12.10.2004	12018	31.03.2004	69069	49							
			11.05.2004	17666	11.05.2004	38392	35							
			15.07.2004	27224	11.05.2004	38392	35							
			12.10.2004	37069	12.10.2004	26904	43							
			30.05.2005	20732	13.05.2005	159647	7							
			baseline	07.05.2002	56181	62			18.06.2002					
				Initiales Ansprechen	16.07.2002	5082	53							K144I
				15.05.2003	4357	15.04.2003	4480	104		26.09.2003				L108H, Q110H
				19.02.2004	6710	19.02.2004	6718	91						L108H
				06.05.2004	17076	19.02.2004	6532	81						N126K
				29.07.2004	680	29.07.2004	18993	78						L108H
				10.01.2005	5409	26.10.2004	331131	15						N126K
				06.12.2001	10864	21.02.2001	245471	9		29.04.2002				N126K
				22.07.2002	2	22.07.2002								
				21.10.2002	2140	21.10.2002	501187	5						
4	34	m	30.12.2002	11047	28.01.2003	908	29.01.2003	4700						
			16.03.2003	2472	29.01.2003									S138A
			baseline	16.01.2003	1601	16.01.2003	65167	110		01.08.2002				
				02.07.2003	4	02.07.2003	44967	155						L45Q
				01.02.2005	32	01.02.2005	13209	200						L45Q
				23.04.2002	3477	23.04.2002	97909	7						S138A
				16.07.2002	3	16.07.2002	23813	107		21.05.2002				N113H
6	59	m	20.01.2003	2301	10.12.2002	10529	45							N113H
			17.02.2003	1702	17.02.2003	7132	72			17.02.2003				S138A
7	33	w	31.01.2002	972	15.01.2002	140761	79			23.05.2002				N113H, S138A
			baseline	31.01.2002										N113H, S138A



24	33	m	26.05.2003	4664	16.04.2003	11500
25	63	m	13.04.2004	13534	04.02.2004	2439
			27.04.2004	15519		
26	37	m	20.04.2004	14463	11.03.2004	313
			05.05.2004	16561	20.04.2004	75
			18.05.2004	18563		
27	46	m	13.04.2004	13535	01.03.2004	85
			26.04.2004	15323	26.04.2004	85
			10.05.2004	17676	10.05.2004	85
28	38	m	13.04.2004	13536	16.02.2004	105
			07.04.2004	13145	08.03.2004	662
29	58	m	21.04.2004	14720	07.04.2004	140
			03.05.2004	16269		
30	51	m	19.04.2004	14343	22.03.2004	154

## **VIII 2. Curriculum vitae**

Gerrit- Heide Thole

geboren am  
in

21.06.1978  
Goslar

1984-1988  
1988-1997

Grundschule Bergheim  
Gymnasium Bergheim,  
Liebfrauenschule Köln,  
Gymnasium Gummersbach  
Allgemeine Hochschulreife

1997/98

Praktikum Kreiskrankenhaus  
Gummersbach

1998-1999

Ausbildung zur Kinderkranken-  
schwester am Universitätsklinikum  
Köln

10/1999

Beginn des Medizinstudiums an der  
Martin-Luther Universität Halle

04/2002

Studienortwechsel an die Technische  
Universität München

11/2003

Beginn der Doktorarbeit  
„Therapieversagen unter Einsatz des  
ersten HIV-Fusionsinhibitors T-20.  
Analyse von Resistenzmutationen“ bei  
Doktorvater Prof. Dr. J. Eberle am  
Max von Pettenkofer-Institut der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

2005-2006

Praktisches Jahr in Afrika, USA und  
München

10/2006

3. Staatsexamen

2001-2006

berufliche Nebentätigkeiten auf der  
Intensivstation des Klinikums  
Bergmannstrost Halle und der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München, sowie in der  
Frauenarztpraxis Dr.Villinger,  
München

12/2006

Beginn der Tätigkeit als Assistenz-  
ärztin im Israelitischen Krankenhaus  
Hamburg, Innere Medizin

