

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin

DISSERTATION

HIV-1-Variabilität als Antwort auf den Selektionsdruck durch
zytotoxische Lymphozyten: Eine Genanalyse.

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.),

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Barbara Stauber

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Kurth
2. Prof. Dr. R. Ignatius
3. Prof. Dr. G. Sutter

Datum der Promotion: 21. November 2008

1	EINLEITUNG	1
1.1	Geschichte von HIV und AIDS	1
1.2	Epidemiologie der HIV-Infektion	3
1.3	Struktur und Morphologie des HIV	4
1.3.1	Akzessorische Proteine	5
1.3.2	Regulatorische Proteine	8
1.4	Replikationszyklus des HIV	10
1.5	Immunreaktion auf HIV	13
1.5.1	Humorale Immunantwort	13
1.5.2	Zelluläre Immunantwort	14
1.5.2.1	Die Rolle der Humanen-Leukozyten-Antigene (HLA)	14
1.5.2.2	Zytotoxische T-Lymphozyten	15
1.5.2.3	CTL-Escape	17
1.6	Pathogenese und Krankheitsverlauf der HIV-Infektion	18
1.7	HIV-Impfstoffentwicklung	21
1.8	Zielsetzung der Arbeit	25
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Material	27
2.1.1	Laborgeräte	27
2.1.2	Verwendete Puffer und Reagenzien	27
2.1.3	Studienmaterial	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Aufbereitung HIV-infizierter Blutproben	29
2.2.2	HLA-Typisierung der Patienten	30
2.2.2.1	Extraktion von Patienten-DNA	30
2.2.2.2	HLA-A-Typisierung	30
2.2.3	Verarbeitung der viralen RNA	31
2.2.3.1	Isolierung retroviraler RNA aus Plasma	31
2.2.3.2	Oligonukleotide	31
2.2.3.3	RT-PCR	33
2.2.3.4	Agarosegel-Elektrophorese	33

2.2.3.5	Klonierung	34
2.2.3.6	Bakterienkultur	35
2.2.3.7	Sequenzierung	36
2.2.3.8	Computergestützte Nachbearbeitung der Sequenzierergebnisse	36
2.2.4	Statistische Auswertung	37
3	ERGEBNISSE	40
3.1	Patienten- und Probeninformationen	40
3.2	HLA-A-Typisierung	40
3.3	Sequenzanalyse	41
3.3.1	Vif	43
3.3.2	Vpr	48
3.3.3	Vpu	52
3.3.4	Tat	57
3.3.5	Rev	64
3.4	Vergleich von HIV-Isolaten frisch Infizierter und LongTermNonProgressors	67
3.5	Vergleich von HIV-Isolaten HLA-A2-positiver und HLA-A2-negativer Patienten	69
3.5.1	Vif	69
3.5.2	Vpr	70
3.5.3	Vpu	73
3.6	statistische Auswertung der Ergebnisse	74
4	DISKUSSION	78
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	ANHANG	98
6.1	Plasmidkarte des pCR [®] 4-TOPO-Vektors	98
6.2	Aminosäuresequenzen der untersuchten Proteine	98
6.2.1	Vif	99
6.2.2	Vpr	107
6.2.3	Vpu	111
6.2.4	Tat Exon 1	115
6.2.5	Rev Exon 1	118

6.3 Darstellung der vorhergesagten CTL-Epitope und quantitativen Aminosäurevariabilität (Auswahl).	120
6.3.1 Vif, HIV 3-2, HLA-A*0201	120
6.3.2 Vpr, HIV 12-1, HLA-A*0201	123
6.3.3 Vpu, HIV 9-1, HLA-A*0201	125
6.3.4 Tat Exon 1, HIV 14-1, HLA-A*0201	126
6.3.5 Rev Exon 1, HIV 36-1, HLA-A*0201	127
6.4 Variabilität der experimentell nachgewiesenen HLA-A2-Epitope	128
6.4.1 Vif	128
6.4.2 Vpr	130
6.4.3 Vpu	131
6.5 Statistischen Auswertung	132
6.5.1 Graphische Darstellung der statistischen Auswertung, Gruppenpaar 1	132
6.5.2 Gruppenpaar 2 und 3	135
6.5.4 Gruppenpaar 5	137
7 LITERATURVERZEICHNIS	138

Abkürzungen

3'	DNA-Ende mit freiem Phosphat an Position 3 der Desoxyribose
5'	DNA-Ende mit freier OH-Gruppe an Position 5 der Desoxyribose
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
A	Adenin
A2 ⁺	HLA-A2-positiv
A2 ⁻	HLA-A2-negativ
Abb	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (dt.: Erworbenes Immundefektsyndrom)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CA	Capsid Antigen (dt.: Kapsidprotein)
CCR5	CC-Motiv Chemokinrezeptor 5
CD	Clusters of Differentiation
CD4/8 ⁺	CD4/8-positiv
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CMV	Cytomegalie-Virus
cpz	Chimpanzee (dt.: Schimpanse, Pan troglodytes)
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte (dt.: Zytotoxische T-Lymphozyten)
CXCR4	CXC Chemokinrezeptor 4
DNA	Deoxyribonucleic Acid (dt.: Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds-DNA	Doppelstrang-DNA
dt	deutsch
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl	englisch
<i>Env</i>	Envelope (dt.: Hülle)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigungskonstante (9,8 m/sec ²)
G	Guanin
Gag	Group antigen (dt.: gruppenspezifisches Antigen)

GDP	Guanosindiphosphat
gp	Glykoprotein
gsn	Greater Spot-nosed Monkeys (dt.: Große Weißnasenmeerkatze, <i>Cercopithecus nictitans</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HIV	Human Immunodeficiency Virus (dt.: Humanes Immundefizienz-Virus)
HLA	Human Leukocyte Antigen (dt.: Humanes Leukozyten Antigen)
HXB2	HIV-Referenzstamm
IL	Interleukin
K	Klon
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LB _{amp}	LB mit Ampicillin versetzt
LTNP	Long Term Non Progressor (dt.: Langzeit-Überlebender)
LTR	Long terminal repeat (dt.: endständige DNA-Wiederholungseinheit)
m	milli (10 ⁻³)
M	molar, Mol pro Liter
MA	Matrix Antigen (dt.: Matrix Protein)
MHC	Major Histocompatibility Complex (dt.: Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
mRNA	messenger-RNA (dt.: Boten-RNA)
n	nano (10 ⁻⁹)
NC	Nucleocapsid (dt.: Nukleokapsid)
Pat	Patient
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphate-buffered saline (dt.: Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (dt.: Polymerase-Kettenreaktion)
Pol	Polymerase
PTD	Protein Transduction Domain
RANTES	Regulated upon Activation T cell Expressed and Secreted
Rev	Regulator of expression of virion proteins
rgp	rekombinantes gp
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonucleic Acid (dt.: Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease

RP	Rapid Progressors (dt.: Patienten mit rascher Krankheitsprogression)
Rpm	Rounds per minute (dt.: Umdrehungen pro Minute)
RRE	Rev Response Element
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SHIV	chimäres SIV/HIV
SIV	Simian immunodeficiency virus (Simianes Immundefizienzvirus)
SK	akut Serokonvertierte
smm	Sooty Mangabey Monkeys (dt.: Rußmangabe, <i>Cercocebus atys</i>)
SSP	Sequenz spezifische Primer
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAR	Transactivating Response RNA Element
Tat	Transactivator of Transcription
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGFβ1	Transforming Growth Factor β1 (dt.: Wachstumsfaktor β1)
TNFα	Tumornekrosefaktor α
U	Uracil
U3 / U5	Untranslated, am 3'/5'-Ende gelegen
UNG-1	Uracil-DNA-Glycosylase 1
UV	Ultraviolett
Vif	Viral infectivity factor
Vpr	Viral protein rapid
Vpu	Viral protein U
Vpx	Viral protein X
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abkürzungen der Aminosäuren (Ein- und Dreibuchstabencode)

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

1 Einleitung

Mit der Isolation des Humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) im Jahr 1983^{1, 2} und HIV-2 im Jahr 1986³ sind diese beiden Viren als Auslöser des erworbenen Immundefektsyndroms AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) identifiziert. Seitdem hat die AIDS-Epidemie weltweit zu etwa 25 Millionen Todesfällen (UNAIDS 2006) geführt. Trotz immenser therapeutischer Fortschritte, die das Leben HIV-positiver Patienten um Jahrzehnte verlängern können, ist eine komplette Eradikation des Virus bisher nicht möglich. Ebenso fehlen bis heute prophylaktisch wirksame Vakzine.

1.1 Geschichte von HIV und AIDS

Seit Ende der siebziger Jahre wurden in den USA gehäuft Krankheitsbilder beobachtet, die durch persistierende Lymphadenopathien, Infektionen mit opportunistischen Krankheitserregern und bis dahin seltene Neoplasien (z.B. das Kaposi-Sarkom) gekennzeichnet waren. Gemeinsam war allen Patienten ein irreversibel geschädigtes Immunsystem, insbesondere eine beeinträchtigte zelluläre Abwehr. Schon früh vermutete man eine erworbene Immunschwächekrankheit. Die schwerste Form dieses neuen Krankheitsbildes wurde deshalb als Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) bezeichnet.

Erste vollständige Fallbeschreibungen zeigten eine selektive Depletion von CD4⁺ T-Lymphozyten im peripheren Blut⁴. Epidemiologische Untersuchungen in den USA zeigten, dass neben Homosexuellen vorwiegend Drogenabhängige, Empfänger von Blut und Blutprodukten sowie Kleinkinder von an AIDS leidenden Müttern erkrankten. Dies ließ annehmen, dass es sich um eine sexuell und parenteral übertragbare Krankheit handelte. 1983 und 1986 konnten die verantwortlichen Erreger erstmals isoliert werden^{1, 2, 3}. Es handelte sich um bis dahin unbekannte lymphotrope Lentiviren aus der Familie der Retroviren. Sie werden heute als Humane Immundefizienz-Viren (HIV-1 bzw. HIV-2) bezeichnet.

Die Infektion mit HIV war mit hoher Wahrscheinlichkeit ursprünglich eine Zoonose, bei der Viren auf den Menschen übergingen. HIV-2 wurde dabei vermutlich von infizierten *Cercocebus atys* (Sooty Mangabey Monkeys/Rußmangabe) in Form des Simianen Immundefizienz-Virus SIV_{simm} auf den Menschen übertragen. SIV_{simm} ist unter den Affen in Westafrika endemisch, dieselbe Region, in der auch HIV-2 prävalent ist⁵. Der genaue Ursprung des HIV-1 ist bis heute nicht vollständig geklärt. Man nimmt an, dass

ursprünglich mehrere Virusstämme verschiedener Affenarten – vor allem des *Cercocebus torquatus* (Halsbandmangabe) und des *Chlorocebus* (Meerkatze) ⁶ mittels Nahrungsaufnahme auf den Schimpansen übertragen worden waren. Wahrscheinlich ging dann eine Rekombination aus verschiedenen SIV_{cpz} von einer Schimpansenuntergruppe (*Pan troglodytes*) über Nahrungsaufnahme auf den Menschen über ⁷.

Phylogenetische Untersuchungen lassen vermuten, dass mehrere unabhängige Übertragungen des Lentiviruses von Schimpansen auf den Menschen in Zentral- bzw. Westafrika stattgefunden haben ⁸. Die älteste gesichert dokumentierte HIV-Infektion stammt aus dem Jahre 1959 und wurde in der Blutprobe eines Mannes aus dem Kongo nachgewiesen ⁹. Jedoch gibt es Hinweise dafür, dass HIV-1 bereits 1931 ¹⁰ und HIV-2 um 1940 ¹¹ erstmals auftraten.

Aus unterschiedlichen Übertragungen des HI-Virus auf den Menschen ⁸ entstanden die drei HIV-1-Subpopulationen: Hauptgruppe (M=main), neue Gruppe (N=new) und außen liegende Gruppe (O=outlier) (Abb. 1). Während N- und O-Stämme vor allem im Westen Zentralafrikas vorkommen,

hat sich die Gruppe M, die 95% der Virusisolate überhaupt ausmacht, über den Rest der Welt ausgebreitet. Die Gruppe M wird nochmals nach ihrem Genom unterteilt und die Subgruppen (Kladen, engl.: Clades)

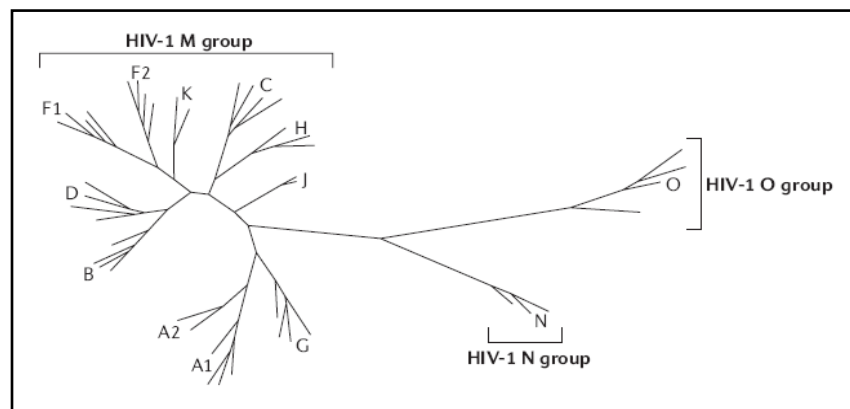


Abb. 1: Phylogenetischer Baum der HIV-1-Gruppen M, N, O ¹².

mit den Buchstaben A-K bezeichnet ¹³. Die Untergruppe A war in der Anfangsphase der Epidemie in Afrika der am häufigsten vorkommende Stamm. Mit der schnellen Ausbreitung des HIV über den Süden des Kontinents wurde dort Klade C mit 94% die vorherrschende Subspezies. Mittlerweile macht sie mehr als die Hälfte der HIV-Infektionen weltweit aus ¹⁴. Untergruppe B ist dagegen der am intensivsten untersuchte HIV-Stamm und ist vor allem in Europa und Nordamerika prävalent ¹⁴.

1.2 Epidemiologie der HIV-Infektion

Die HIV-Epidemie hat sich seit ihrem Auftreten Anfang der achtziger Jahre mit großer Geschwindigkeit in alle Teile der Welt ausgedehnt. Nach Schätzung von UNAIDS/WHO lebten Ende 2007 über 33 Millionen Menschen weltweit mit einer HIV-Infektion oder AIDS. Allein im Jahr 2007 haben sich 2,5 Millionen Menschen neu mit dem HI-Virus infiziert. Das *Acquired Immune Deficiency Syndrom* forderte bis heute etwa 25 Millionen Menschenleben (UNAIDS 2006). Zwei Drittel aller Infizierten leben auf dem afrikanischen Kontinent. Etwa die Hälfte sind Frauen und ihr Anteil wächst stetig. In Südafrika war in 2006 fast jede 3. schwangere Frau mit HIV infiziert (UNAIDS 2007). Besonders in Osteuropa und Zentral-/Ostasien dehnt sich derzeit die HIV-Epidemie rasant aus – seit 2003 hat sich die Zahl der AIDS-Toten dort fast verdoppelt. In Deutschland lag die Zahl der mit HIV-Infizierten im Jahr 2007 bei 59.000 (RKI 2007). In 2007 erfolgten etwa 3000 Neuinfektionen, ca. 650 Menschen verstarben an den Folgen von AIDS.

Dank der seit Mitte der neunziger Jahre deutlich verbesserten Therapiemöglichkeiten ist die Zahl der AIDS-Erstmanifestationen in den Industrieländern stark zurückgegangen. In Deutschland wurden 2007 etwa 1100 neue AIDS-Fälle registriert (RKI 2007). Auch außerhalb der reichen Länder Nordamerikas und Westeuropas konnte die Versorgung mit wirksamen Medikamenten seit 2003 verbessert werden. In einigen Ländern wie Chile, Argentinien und Brasilien steigerte sich die Zugänglichkeit zu antiretroviraler Therapie um bis zu 80%. Dennoch ist die medizinische Versorgung HIV-Positiver in weiten Teilen der Erde noch ungenügend: In Afrika oder Asien erhält nur jeder Zehnte bzw. jeder Siebte die benötigte antiretrovirale Therapie.

Dass HIV präventiv erfolgreich zu bekämpfen ist, zeigt das Beispiel Uganda: Die Prävalenz von HIV fiel unter den Frauen von 20% (1994/95) auf nur 8% (2005), unter Männern fiel sie im gleichen Zeitraum von 15% auf 5% (UNAIDS 2006). Grundlagen dieses Erfolges waren die landesweite Einführung von Sexualkundeunterricht, flächendeckende Kampagnen zur Steigerung der Akzeptanz von Kondomen und HIV-Tests sowie das Verteilen von Selbsthilfekits für sexuell übertragbare Krankheiten. Auch die erhöhte AIDS-Sterblichkeitsrate trägt einen Teil zur verminderten HIV-Prävalenz bei¹⁵.

Um die weitere Ausbreitung der AIDS-Epidemie jedoch wirksam und nachhaltig einzudämmen, ist ein effektiver Impfstoff gegen HIV notwendig.

1.3 Struktur und Morphologie des HIV

Das HIV ist ein komplexes Retrovirus und gehört zur Familie der Lentiviren. Die beiden Virustypen HIV-1 und HIV-2 unterscheiden sich in molekularen und virologischen Eigenschaften, morphologisch sind sie nicht zu differenzieren. Ein Viruspartikel ist im Durchmesser etwa 100 nm groß und setzt sich zusammen aus einer Lipoproteinhülle, einem Nukleokapsid und einem RNA/Enzymkomplex. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des HIV (Abb. 2).

HIV-1-Partikel sind von einer Lipoproteinhülle (Lipiddoppelmembran) umgeben, die zelluläre Proteine der Wirtszelle und virusspezifische Glykoproteine (Env) enthält. Letztere bestehen aus einem externen Anteil gp120 und einem Transmembranprotein gp41 und vermitteln die Anheftung des Virus an und das Eindringen in die Zelle. Das Matrixprotein p17 ist an der Innenseite der Virushülle verankert. Die Kapsidproteine p24

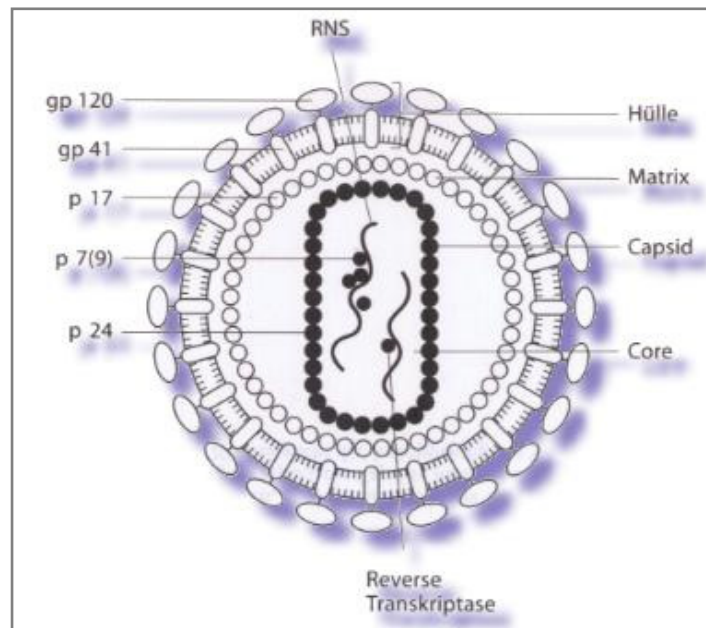


Abb. 2: Schematische Darstellung eines HIV-Partikels.

bilden das zylindrisch geformte Kapsid, das zwei Kopien der HIV-RNA enthält, die ihrerseits an das Nukleoprotein p7 (p9) und die Reverse Transskriptase gebunden sind. Weitere im Partikel enthaltene Enzyme sind die Integrase p32 und die Proteinase p11.

Als Träger der genetischen Information enthält das HIV ein Homodimer aus zwei identischen linearen eukaryotischen Einzelstrang-RNA. An die RNA gebunden ist eine t-RNA aus der Wirtszelle, die Primerfunktion besitzt. Das 3'-Ende ist polyadenyliert, das 5'-Ende trägt ein Cap. Ein RNA-Monomer ist ca. 9 Kilobasenpaare groß und enthält die Gene *env* (*Envelope*), codierend für die Hüllproteine, *gag* (*group specific antigen*), codierend für Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine und *pol* (*polymerase*) codierend für die viralen Enzyme (Reverse Transkriptase (RT), Integrase, Protease). Zusätzlich trägt die HIV-RNA Informationen für akzessorische und regulatorische Proteine indem es zusätzliche und sich überlappende, offene Leseraster besitzt (Abb. 3).

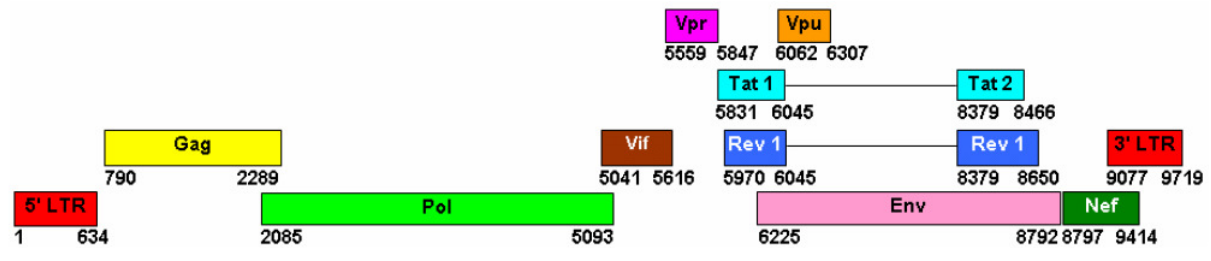


Abb. 3: Genomstruktur des HIV. Die Ziffern geben die Position der Gene in der Referenzsequenz HXB2 an.

An beiden Enden enthält die genomische RNA die regulatorischen Sequenzen U3 und U5 (untranslated, 3' bzw. 5' gelegen). Im Schritt der Reversen Transkription werden diese Sequenzblöcke dupliziert, so dass die resultierende Doppelstrang-DNA länger ist als das RNA-template und beidseitig die Genblöcke U3, R (= redundant), U5 trägt. Diese als Long Terminal Repeats (LTR) bezeichneten Basenpaarwiederholungen haben eine wichtige Funktion bei der Integration von HIV-DNA in das Wirtsgenom sowie als regulatorische Sequenzen, indem sie durch das Binden viraler und zellulärer Faktoren die virale Genexpression beeinflussen.

Im Folgenden sollen die Proteine, deren Gene in dieser Arbeit untersucht wurden, genauer charakterisiert werden:

1.3.1 Akzessorische Proteine

Vif, Vpr, Vpu, Nef werden als akzessorische Proteine bezeichnet, da sie in manchen Zellreihen *in vitro* zur Virusreplikation nicht notwendig sind. Für eine effiziente Vermehrung *in vivo* sind sie jedoch bedeutsam.

Vif – Viral infectivity factor

Das *vif*-Gen codiert für ein 23 kDa Protein aus 192 AS, und wird als Teil des Nukleoproteinkomplexes in die Viruspartikel integriert¹⁶. Schon früh konnte festgestellt werden, dass in nicht-permissiven Zellreihen, u.a. primären CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen, Vif für die Produktion von infektiösem HIV essentiell ist. Vif-defekte Viren zeigten eine veränderte Partikelmorphologie mit inhomogener Einlagerung der Kapsidproteine¹⁷ und bei Infektionsexperimenten eine inkomplette Synthese der doppelsträngigen DNA¹⁸. 2002 identifizierte Sheehy schließlich einen zellulären Faktor, der diese Ergebnisse erklärt¹⁹: APOBEC3G (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-

like 3G) gehört zu einer Familie von intrazellulären Enzymen (APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3F)²⁰, die in mRNA oder DNA die Nukleinbase Cytosin zu Uracil deaminiert²¹. Dadurch entstehen vermehrt Guanin-zu-Adenin-Mutationen sowie Stop-Codons²², die den Schritt der Reversen Transkription stören und letztendlich zur Degradation der proviralen DNA führen. Vif bildet Komplexe mit APOBEC3G, blockiert dieses zelluläre Enzym und führt zu dessen Ubiquitinylierung und proteosomalem Abbau²³. In Abwesenheit von Vif wird APOBEC3G in Viruspartikel inkorporiert und kann in neu infizierten Zellen den Schritt der reversen Transkription und Entstehung einer proviralen DNA behindern.

Vpr – Viral protein rapid

Das *vpr*-Gen encodiert für ein kleines Protein (11-15 kDa) von 78-96 AS (Abb. 4).

Ca. 275 Vpr-Proteine sind in jedem Viruspartikel enthalten und im Core lokalisiert, wo sie eng mit der viralen RNA assoziieren²⁴. Die Inkorporation in das Viruspartikel spricht dafür, dass Vpr in der frühen Phase des Replikationszyklus, also bereits vor der *de-novo*-Synthese von viralen Proteinen eine Rolle spielt.

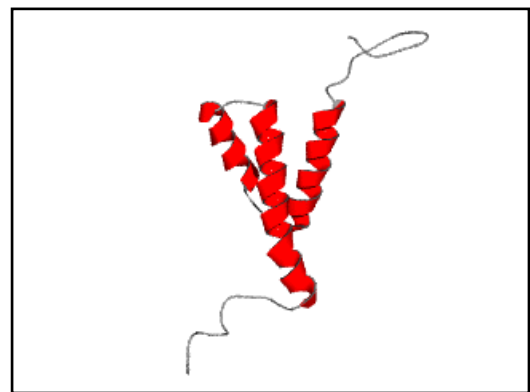


Abb. 4: Dreidimensionale Struktur des Vpr-Proteins. Die drei α -Helices sind als rote Spiralen dargestellt, Schleifen (loops) und flexible Domänen repräsentieren graue Linien.

Einige Arbeiten zeigten die Bedeutung des Vpr-Proteins für eine effiziente Replikation des HIV *in vivo*²⁵. Dabei konnten mehrere Funktionen des Vpr nachgewiesen werden, die jeweils durch verschiedene Domänen des Proteins vermittelt werden²⁶:

1. Verminderung der Mutationsrate bei der reversen Transkription: Vpr erhöht die Präzision der viralen DNA über eine Interaktion mit UNG1 (Uracil-DNA-Glykosylase)²⁷, einem Enzym, das mittels Vpr in die Viruspartikel inkorporiert wird. Beim Schritt der Reversen Transkription übernimmt es eine Art Reparaturfunktion, indem es Uracil aus der DNA entfernt. Die Mutationsrate der RT ist in Abwesenheit von Vpr um das Vier- bis Achtzehnfache erhöht²⁸.

2. Entscheidende Mitwirkung beim Transport des Präintegrationskomplexes (bestehend aus viraler ds-DNA, Integrase, RT, Vpr, MA) in den Zellkern²⁹: Vpr interagiert dazu mit zellulären Mikrotubuli³⁰ und Kernporenproteinen²⁹. Der genaue Mechanismus ist bisher

unklar.

3. Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase durch Hemmung der Aktivität des p34^{cdc2}-Cyclin-B-Kinase-Komplexes³¹. Diese Funktion des Vpr tritt innerhalb der ersten Stunden nach Infektion ein und kann durch antivirale Medikamente nicht gehemmt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die bereits im Viruspartikel enthaltenen Proteine dafür verantwortlich sind³². Der biologische Nutzen für das HIV ist bisher unklar. Ein möglicher Vorteil ist, dass in Zellen, die sich im G2-Stadium befinden, die LTR-gesteuerte Transkriptionsrate erhöht und die virale Replikation damit erleichtert ist^{33, 29}.

4. Beeinflussung des programmierten Zelltodes: Vpr löst die Apoptose von Lymphozyten und Zellen lymphatischen Gewebes aus³⁴. Der genaue Mechanismus bleibt umstritten. Es gab auch widersprüchliche Ergebnisse von Studien, die eine Hemmung der Apoptose zeigten³⁵.

5. Transaktivatorfunktion bei der LTR-gesteuerten Genexpression: Zum einen scheint diese im Zusammenhang mit der Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase zu stehen³³, zum andern interagiert Vpr direkt mit dem Coaktivator p300, den Transkriptionsfaktoren Sp1 und TFIIB sowie Glukokortikoidrezeptoren²⁹.

Das kleine Vpr-Protein greift also an verschiedensten Stellen in zelluläre Abläufe ein und spielt somit während der gesamten Pathogenese der HIV-Infektion *in vivo* eine wichtige Rolle.

Vpu – Viral protein U

Das *vpu*-Gen codiert für ein ca. 8 kDa Protein mit 80-82 AS (Abb. 5) und ist im Gegensatz zu den akzessorischen Genen *vif*, *vpr* und *nef* ausschließlich in HIV-1, SIV_{cpz} und SIV_{gsm} (*Cercopithecus nictitans*/Greater Spot-nosed Monkeys/Große Weißnasenmeerkatze) vorhanden. Es besteht jedoch eine ausgeprägte Homologie zu dem *vpx*-Gen des HIV-2 und der übrigen bisher bekannten SIV-Subgruppen.

Vpu wird an Serin-AS einer stark konservierten Region (AS 47-58) von einer Caseinkinase phosphoryliert³⁶,



Abb. 5: Dreidimensionale Struktur des Vpu-Proteins. Die α -Helices sind als rote Spiralen dargestellt, Schleifen (loops) und flexible Domänen repräsentieren graue Linien.

und es erfolgt seine Einlagerung in intrazelluläre Membranen (ER)^{37, 38}. Dabei befindet sich der hydrophobe aminotermine Proteinanteil in Form einer stabilen α -Helix in der Lipiddoppelschicht, der hydrophile Anteil aus zwei α -Helices ragt in das Zytoplasma. Freie Viruspartikel enthalten kein Vpu.

Hauptaufgaben von Vpu, die von unterschiedlichen Domänen des Proteins vermittelt werden und die HIV-Pathogenese beeinflussen, sind:

1. Verstärkung der Freisetzung von Nachkommenviren^{37, 38}: In HIV-1 Klonen mit fehlendem oder mutiertem Vpu konnte festgestellt werden, dass die Viruspartikel an der Zelloberfläche in Vesikeln verbleiben ohne freigesetzt zu werden. Wie genau Vpu die Freisetzung beeinflusst bleibt unklar. Untersuchungen ergaben, dass vor allem der aminotermine, transmembrane Anteil für diese Funktion wichtig ist³⁷. Eventuell ist aber auch die Fähigkeit des Vpu, Ionenkanäle zu formieren, von Bedeutung³⁹.

2. Herunterregulierung von CD4-Molekülen an der Zelloberfläche: Vpu bindet im ER mit seiner zytoplasmatischen Domäne an die dort befindlichen CD4-Rezeptormoleküle³⁷ und veranlasst deren Ubiquitylierung und Abbau⁴⁰. Dabei wird Env gp160, das mit CD4 im ER Komplexe bildet (und somit ebenso zu CD4-Downregulierung beiträgt), freigesetzt und kann weiter zur Zelloberfläche transportiert werden, wo es zur Neubildung von Virionen bereit steht^{37, 41}. Die Serin-AS an Position 52 und 56 scheinen bei der Degradation eine entscheidende Rolle zu spielen⁴⁰.

1.3.2 Regulatorische Proteine

Regulatorische Proteine nehmen Einfluss auf die Genexpression auf translationaler (Tat) und post-translationaler (Rev) Ebene.

Tat – Transactivator of transcription

Tat-Proteine (86-104 AS, 9-14 kDa) werden von zwei Exons codiert. Man vermutet, dass die entscheidenden Anteile für die Funktion dieses regulatorischen Proteins vornehmlich im ersten Exon lokalisiert sind⁴².

Tat wird als erstes der Virusproteine während des Infektionszyklus synthetisiert und wirkt im Zellkern. Es gelangt über die Kernporen in den Nukleus und verstärkt dort die Transkription des LTR-Promotors um etwa das 100fache, indem es an das

Transactivating Response RNA Element (TAR) am 5'-Ende der RNA bindet. Die Effektor-Domäne von Tat setzt sich aus einer Reihe von stark sauren AS (Position 1-21) sowie einem cysteinreichen (Position 22-37) und einem hydrophoben Anteil (Position 38-48) zusammen. Eine Mutation innerhalb dieser Domäne führt zu einem starken Funktionsverlust des Tat-Proteins⁴³. Die für die Bindung an das TAR-Element essentiellen AS liegen wie auch die der Protein-Transduktions-Domäne (PTD) (siehe unten) an Position 49-59 und enthalten zahlreiche Arginin-AS⁴³. Bei der Transaktivierung spielt außerdem die Interaktion mit dem zellulären Co-Faktor Cyclin T1 sowie die cyclin-abhängige Proteinkinase-9 (CDK9) eine entscheidende Rolle⁴⁴.

Tat verhindert den Abbruch der RNA-Polymerisation, stabilisiert den Initiationskomplex und erhöht die Transkriptionsrate. In Abwesenheit funktionierender Tat-Proteine kommt es zur Bildung unvollständiger und zu kurzer Transkripte⁴⁵.

Darüber hinaus haben Tat-Proteine Einfluss auf Nachbarzellen: Nach Sezernierung können Tat-Proteine an Zelloberflächenproteine binden, eine Signalkaskade auslösen und dort – abhängig vom Zelltyp – das Expressionsmuster von Zytokinen, Integrinen oder auch Wachstumsfaktoren verändern⁴⁶. So konnte z.B. gezeigt werden, dass durch Tat die Expression von TNF α ⁴⁷ und TGF β 1⁴⁸ gesteigert wird, wogegen andere zelluläre Proteine wie das Onkogen bcl2 (B-Cell Lymphoma)⁴⁹ oder das Chemokin MIP1- α ⁵⁰ (s.u.) herunterreguliert werden. Alternativ kann Tat auch in benachbarte Zellen eindringen⁵¹ – ein Mechanismus, der durch die PTD an Position 49-57 vermittelt wird⁵². Diese Fähigkeit macht Tat für die Entwicklung von intrazellulär wirkenden Medikamenten äußerst interessant, da diese an Tat gekoppelt in die Zellen eingeschleust werden können.

Rev – Regulator of expression of virion proteins

Rev-Proteine (116 AS, ca. 13 kDa) werden durch zwei Exons codiert, in der frühen Phase der Virusinfektion gebildet und reichern sich im Zellkern an (Abb. 6). Zur vollen Funktion des Rev-Proteins sind beide Exons von Bedeutung⁵³.

Rev enthält zwei funktionelle Bereiche: Eine argininreiche Domäne, die die RNA-Bindung vermittelt und die Lokalisation im Zellkern steuert, und einen hydrophoben Anteil zwischen AS-Position 73 und 84, der mehrere Leucin-Aminosäuren enthält und den Transport von mRNA aus dem Zellkern (Kernexport) vermittelt⁵⁴. Bei Mutation von

einem der drei Leucine an Position 78, 81 oder 83 verliert Rev seine Aktivität.

Zum Kernexport bindet das regulatorische Protein als Oligomer an das Rev Response Element (RRE) von ungesplicerter RNA und rekrutiert das zelluläre Transportprotein Exportin 1 (XPO)⁵⁵ sowie den nukleären Exportfaktor Ran-Guanosin-Triphosphatase (Ran-GTPase), um die RNA ins Zytosol zu transportieren⁵⁶. GTP wird dabei zu GDP dephosphoryliert und stellt so die nötige Energie bereit. Im Zytosol dissoziiert der Transportkomplex und Rev gelangt mittels Importin b zurück in den Nukleus^{57, 58}.

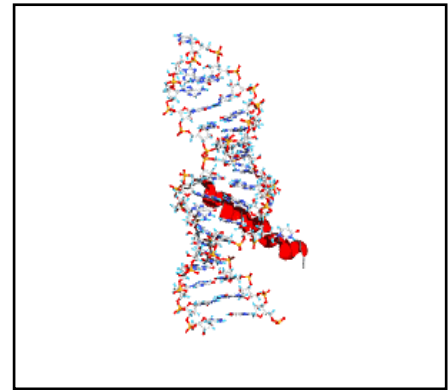


Abb. 6: Das Rev-Protein (rote, breite Spirale) in Bindung an das Rev Response Element einer mRNA.

Der oben genannte Vorgang bewirkt den bevorzugten Export ungespleißter (*gag*, *gag-pol*) und einfach-gespleißter (*env*, *vif*, *vpr*, *vpu*) mRNA-Transkripte durch die Kernporen ins Zytosol. Indem Rev also die Expression von Gag, Pol und Env verstärkt, während es die seinige sowie die von Tat als „early proteins“ abschwächt, induziert es den Übergang der frühen zur späten Replikationsphase des HIV. In Abwesenheit von Rev sind ungespleißte und einfach-gespleißte Proteine im Zytosol ungenügend vorhanden⁵⁷. Rev ist für die HIV-Replikation *in vitro* und *in vivo* essentiell.

1.4 Replikationszyklus des HIV

Der Replikationszyklus des HIV beginnt mit der rezeptorvermittelten Adsorption des Virus an die Zielzelle (Abb. 7). Dies erfolgt mittels Bindung des Oberflächenproteins Env gp120 des HIV an das CD4-Molekül der Wirtszelle. CD4 ist ein monomeres Glykoprotein und befindet sich auf der Oberfläche von ca. 60% aller T-Lymphozyten, auf Thymozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Es konnte bereits 1984 als primärer, für die Infektiosität von HIV-1, HIV-2 und SIV notwendiger Rezeptor identifiziert werden^{59, 60}.

Die Bindung des Virus an CD4 führt zu einer konformationellen Änderung von gp120, die die Interaktion der V3-Schleife des gp120 mit Korezeptoren der humanen Zelle (7TMH-Chemokinrezeptoren) ermöglicht. Die wichtigsten der Chemokinrezeptoren sind CCR5 und CXCR4, wobei Ersterer als Ligand für monozytotrope HIV-Isolate identifiziert wurde^{61, 62}, Letzterer als Korezeptor für T-zelltrope Viren⁶³. Die Rolle der Korezeptoren

wird besonders deutlich bei der Betrachtung von Individuen, die eine 32 bp lange Deletion im CCR5-Gen ($\Delta 32$) aufweisen. Homozygote wurden als weitestgehend resistent gegen HIV-1 identifiziert⁶⁴, Heterozygote zeigten meist eine ausgesprochen langsame Krankheitsprogression (LTNP)⁶⁵. Ein CCR5-Inhibitor wird derzeit in klinischen Studien auf seine Wirksamkeit in der HIV-Therapie getestet. Gp41, der transmembrane Anteil des Virushüllproteins gp160, spielt bei der nun folgenden Fusion der Membranen von Virus und Wirtszelle eine zentrale Rolle. Auch dieses Molekül erfährt nach Bindung an CD4 eine Konformationsänderung, die zur Insertion des hydrophoben N-Terminus in die Membran der Zielzelle führt⁶⁶. Das synthetische Peptid T-20 (Enfuvirtide / Fuzeon), das in der HIV-Therapie bereits zum Teil erfolgreich eingesetzt wird⁶⁷, hemmt genau diese konformationelle Änderung von gp41 und somit den Eintritt des Virus in die Zelle.

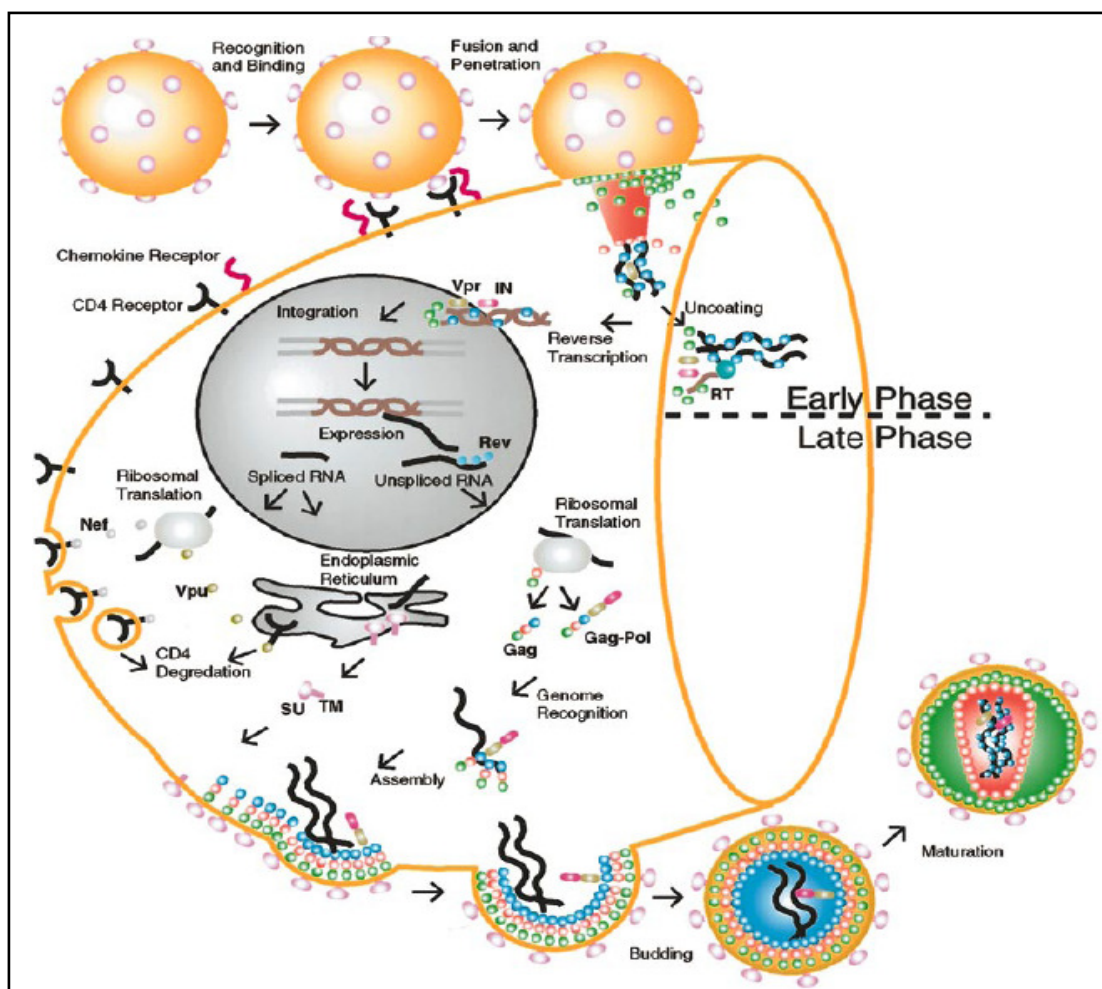


Abb. 7: HIV-1 Replikationszyklus. Die frühe Phase (oberer Bildanteil) beginnt mit der CD4-Erkennung und schließt alle Ereignisse bis zur Integration der proviralen DNA in die Wirtszell-DNA ein, die späte Phase umfasst alle folgenden Schritte von der Transkription bis zur Freisetzung reifer Viruspartikel⁶⁸.

Nach der Membranfusion und dem Freisetzen der Nukleinsäure aus den Viruspartikeln wird im Zytoplasma die Reverse Transkriptase (RT) aktiv und bildet in einem Komplex aus Nukleokapsidproteinen (NC), Integrase (IN) und viraler RNA eine doppelsträngige DNA. Eine zelluläre t-RNA_{Lys} dient als Primer für die DNA-Synthese.

Die fertig synthetisierte virale DNA wird als Teil eines Präintegrationskomplexes in den Kern transportiert. Diesen Vorgang steuert das akzessorische Protein Vpr, indem es sich an zelluläre Transportsysteme koppelt (s.o.)²⁹. Im Kern wird die virale DNA mittels Integrase als Provirus in das Wirtsgenom integriert⁶⁹. Dieser Vorgang erfolgt allerdings fast ausschließlich in aktivierten Zellen. Latent infizierte, ruhende Zellen mit einer nicht eingefügten HIV-DNA stellen neben Monozyten, Makrophagen und Zellen des ZNS langlebige Virusreservoir dar⁷⁰ und sind einer der Hauptgründe, warum das Retrovirus trotz spezifischer körpereigener Immunantwort und antiviraler Therapie bisher nicht aus dem Körper eradiziert werden kann.

Das integrierte Provirus dient als Template (dt.: Vorlage) für die virale, DNA-abhängige RNA-Polymerase II (Pol II). Anfangs wird von NF-κB die Bildung von kurzer, mehrfach-gespleißter mRNA induziert, die für die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef codiert. Die koordinierte Interaktion des viralen Tat-Proteins mit Pol II sichert dann die ausreichende Synthese längerer viraler mRNA. In einer späteren Phase werden diese ungespleißten (*gag*, *gag-pol*) und einfach gespleißten (*env*, *vpu*, *vif*, *vpr*) Transkripte mittels Rev aus dem Kern ins Zytoplasma zur Expression transportiert.

Das Polyprotein Gag wird von ungespleißter RNA an freien Ribosomen synthetisiert. Eine Verschiebung des Leserasters in der Translation führt außerdem zur Bildung des kleineren Gag-Pol-Proteins. Das Vorläuferprotein Env wird an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert, im Golgi-Apparat mehrfach glycosyliert und in Form von non-kovalenten, trimeren Strukturen zur Zellmembran transportiert. Da im ER ebenfalls CD4-Rezeptoren gebildet werden, kann eine verfrühte Bindung von Env an CD4 die Entstehung vollständiger Viruspartikel behindern. Vpu bindet dazu CD4 im ER und steuert dessen Degradation (s.o.). Ebenso werden CD4-Oberflächenmoleküle von Nef gebunden und führen zu deren endosomalem Abbau. Somit wird nicht nur Env freigegeben sondern auch die Anzahl der CD4-Moleküle an der Zelloberfläche vermindert und die körpereigene Immunreaktion abgeschwächt. Im Verlauf des Transports zur Zelloberfläche erfolgt die Spaltung von Env in den externen (gp120) und den membranverankerten Proteinanteil (gp41) und anschließend die Einlagerung in die Zellmembran.

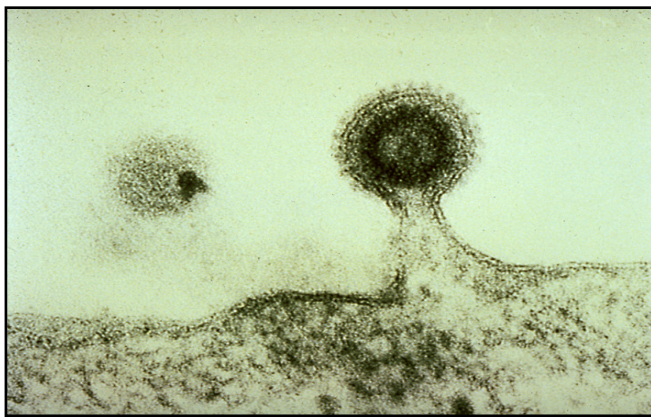


Abb. 8: Ein HI-Viruspartikel, das sich aus einer Zelle herauslöst (Budding). © H.R. Gelderblom, RKI

Env- und Gag-Proteine werden zur Zellmembran transportiert und bilden dort zusammen mit zwei genomischen RNA-Molekülen eine „Knospe“, die sich unter Mitnahme eines Teiles der Wirtszellmembran als unreifer Viruspartikel löst (Abb. 8).

Erst die folgende Proteolyse der Vorgängerproteine durch die HIV-Protease führt zu reifen, infektiösen HI-Viruspartikeln mit dem charakteristischen konischen Kapsid⁷¹. Pro Tag entstehen so im Körper eines HIV-Infizierten etwa 10^9 Nachkommenviren⁷².

1.5 Immunreaktion auf HIV

1.5.1 Humorale Immunantwort

Die humorale Abwehr erfolgt durch Antikörpermoleküle, die von spezifisch aktivierten B-Lymphozyten (Plasmazellen) sezerniert werden. Antikörper (Immunglobuline) können durch Bindung von Pathogenen diese neutralisieren, zur Aktivierung des Komplementsystems führen oder über eine durch ihren Fc-Anteil vermittelte Opsonierung die Phagozytose oder Zytolyse des Erregers beschleunigen. Des Weiteren induzieren IgG die Mechanismen der antikörpervermittelten Zelltoxizität durch natürliche Killerzellen (antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)).

Die Assoziation zwischen dem Auftreten einer humoralen Immunantwort gegen HIV und dem Krankheitsverlauf bleibt bisher unzureichend charakterisiert. Innerhalb der ersten Wochen nach der HIV-Infektion kommt es zur Bildung von spezifischen Antikörpern, die vornehmlich gegen Epitope der Strukturproteine Gag und Env gerichtet sind. Im späteren Krankheitsverlauf sind Antikörper gegen fast alle viralen Proteine nachweisbar⁷³. *In vitro* sind einige dieser Antikörper virusneutralisierend und können dort die Infektion von $CD4^+$ T-Zellen mit HIV-Laborstämmen verhindern⁷⁴. Im Affenmodell kann die Verabreichung einer Mischung verschiedener, neutralisierender Antikörper eine mukosale SIV-Infektion verhindern⁷⁵. Vor allem in der frühen Phase der HIV-Infektion scheinen Strukturen des Hüllproteins frei zu liegen, gegen die Antikörper effektiv wirken⁷⁶.

Der langfristig effizienten Wirkung von Antikörpern steht entgegen, dass diese einen deutlichen Selektionsdruck auf das Virus ausüben. Es kommt rasch zur Entstehung von Fluchtmutanten, die sich der Wirkung der Immunglobuline entziehen⁷⁷.

Ein Tierversuch mit B-Zell-depletierten Rhesusaffen ergab, dass diese nach SIV-Infektion im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen spezifischen Unterschied im initialen Abfall der Plasmavirämie aufwiesen⁷⁸. Harrer et al. zeigte, dass LTNP eine schwache oder sogar nicht nachweisbare AK-Antwort aufwiesen⁷⁹. Für Env-spezifische AK konnte sogar eine die Infektion verstärkende Wirkung aufgezeigt werden⁸⁰. Exponierte, aber nicht infizierte Personen (highly exposed) weisen möglicherweise lokale Faktoren wie eine mukosale IgA-Antikörperbildung gegen HIV⁸¹ oder eine temporäre Antikörperbildung auf, die sich jedoch systemischen Messungen entzieht⁸².

Die Datenlage ist widersprüchlich. Doch scheinen AK keine dominante Rolle bei der Viruskontrolle einzunehmen. Vermutlich ist eine Kombination der beiden Abwehrmechanismen – zellulär und humoral – für einen effektiven Schutz gegen HIV notwendig.

1.5.2 Zelluläre Immunantwort

1.5.2.1 Die Rolle der Humanen-Leukozyten-Antigene (HLA)

Die Existenz von Patienten, die eine Art von immunologischer Kontrolle über das HI-Virus aufwiesen, zog die Aufmerksamkeit auf die Humanen Leukozyten Antigene (HLA), einem genetischen Faktor, der den Verlauf von Krankheiten beeinflussen kann. Es ist ein komplexes, autosomal-kodominant erbliches System von Gewebsantigenen, das eine wichtige physiologische Rolle bei immunologischen Abwehrmechanismen spielt. Der MHC-Genkomplex, der für die HLA (MHC-Moleküle) codiert, ist beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert und enthält zahlreiche Genloci mit einem extremen genetischen Polymorphismus. Der Mensch besitzt drei Hauptgene für die MHC-Klasse I-Moleküle, die mit HLA-A, -B und -C bezeichnet werden. In der MHC-Klasse II-Region liegen die Gene für die MHC-II-Moleküle HLA-DR, -DP, -DQ, -DM, -DO. Die Klasse III-Gene codieren für weitere Proteine mit Komplementfunktion (HLA-S).

MHC-I-Moleküle finden sich auf jeder kernhaltigen Körperzelle und präsentieren Peptide, die im Zytosol abgebaut werden (zellfremde und zelleigene Peptide), in ihren Bindungstaschen an der Zelloberfläche. Dort interagiert der MHC-I-Peptid-Komplex mit

CD8⁺ T-Zellen (CTL), die körperfremde Peptide erkennen können. Virus-infizierte Zellen präsentieren virale Peptide an der Zelloberfläche und werden von CTL gezielt abgetötet. MHC-II-Moleküle auf Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten binden extrazelluläre Proteine (z.B. von Erregern), die in Endosomen abgebaut wurden, und stellen sie an der Zelloberfläche dar. Hier werden sie von spezifischen CD4⁺ T-Helferzellen erkannt und führen zu deren Aktivierung. Bei beiden – Klasse-I und -II -Molekülen – interagieren die stets ein bestimmtes Motiv enthaltenden Peptide in den Bindungsrillen mit spezifischen Bereichen der T-Zell-Rezeptoren (TCR).

Untersuchungen von Genvariationen („Polymorphismen“) von HLA-Klasse I-Molekülen HIV-Infizierter haben die Bedeutung dieses genetischen Wirtsfaktors für den Verlauf der Krankheit deutlich gemacht⁸³. Im Allgemeinen scheint eine Heterozygotie der HLA-Genloci günstig zu sein, da sie die größtmögliche Variabilität in den präsentierten Peptiden bewirkt⁸⁴. Erhöhte Konkordanz der HLA-Klasse I-Allele zwischen Mutter und neugeborenem Kind können das Risiko der Infektion bei dem Kind erhöhen⁸⁵. Lockett (2001) und Dorak (2004) zeigten, dass nicht übereinstimmende HLA-Typen („*mismatch*“) zwischen HIV-diskordanten Paaren einen protektiven Effekt haben^{86, 87}.

Bestimmte HLA-Haplotypen (v.a. HLA-B27, -B51, -B57, -B14, -C8) sind mit einer besseren Kontrolle der Plasmavirämie verbunden⁸⁸. Eine Homozygotie in HLA-Bw4 gilt sogar als teilweise protektiv^{89, 90}. Andere hingegen (HLA-A23, -B08, -B22, -B35, -B37, -B49) scheinen mit einer raschen Progression der Krankheit assoziiert zu sein^{83, 84}.

1.5.2.2 Zytotoxische T-Lymphozyten

CTL sind CD8⁺ T-Lymphozyten und haben die Fähigkeit, virusinfizierte Zellen über einen Komplex aus dem körpereigenen MHC-I-Molekül und den darauf präsentierten viralen Peptiden zu erkennen (s.o.). Bekannt sind mittlerweile mehrere hundert Epitope von HIV, die von den entsprechenden MHC-I-Typen präsentiert werden. Eine Bindung des MHC-I-Komplexes mittels CD8-TCR führt zur Aktivierung der CTL mit folgender Abtötung der Zelle durch extrazelluläre Mechanismen. Dabei ist die Anwesenheit von CD4⁺ T-Lymphozyten zur zusätzlichen Aktivierung der CTL meist notwendig⁹¹. Spezifische CTL können bereits kurz nach HIV-Infektion – noch vor Auftreten von neutralisierenden Antikörpern – nachgewiesen werden^{92, 93}, anfangs gegen Epitope der viralen Proteine Nef, Tat, Vpr und Env gerichtet, im weiteren Krankheitsverlauf gegen Epitope aller HIV-Proteine^{93, 94}.

Die zelluläre Immunantwort mittels spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) spielt beim Krankheitsverlauf der HIV-Infektion eine wichtige Rolle^{95, 96}. Sie ist u.a. assoziiert mit der Suppression der initialen Virämie^{97, 98}. Im Vergleich von Long Term Non Progressors (LTNP) mit Rapid Progressors (RP) fällt bei Ersteren eine große Zahl an spezifischen CTL-Vorläuferzellen auf⁹⁹. Ein Abfall der effektiven CTL-Zahlen geht mit einer stärkeren Krankheitsprogression einher⁹⁵. So zeigten in einer Studie SIV-infizierte Rhesusaffen, die von CD8⁺ Zellen depletiert worden waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich höhere RNA-Kopienzahl/ml Plasma^{98, 100}. So eindeutig ist das Verhältnis zwischen CTL-Anzahl und Viruslast aber nicht: Selbst in Patienten, die an AIDS verstorben sind, konnten hohe CTL-Zahlen nachgewiesen werden¹⁰¹, wohingegen auch Fälle beschrieben sind, in denen es trotz einer eng begrenzten, spezifischen CTL-Reaktion zu keiner Krankheitsprogression gekommen ist¹⁰².

Die zelluläre Immunantwort kann das HIV jedoch nur zeitlich begrenzt an seiner Ausbreitung hindern. Zum einen wird durch die Bildung von Escape-Mutanten die Erkennung infizierter Zellen durch die CTL unmöglich (s.u.), zum anderen vermindern virale Proteine die Anzahl von MHC-I-Molekülen¹⁰³ an der Zelloberfläche. Ebenso gibt es Hinweise dafür, dass CTL ebenfalls von HI-Viren infiziert und zerstört werden¹⁰⁴.

Darüber hinaus sind CTL für eine maximale Aktivierung auf funktionierende CD4⁺ T-Helferzellen angewiesen⁹¹. Nach Aktivierung durch auf MHC-II-Molekülen präsentierte Pathogene sezernieren sie IL2 und weitere Chemokine, die CTL und die humorale Abwehr stimulieren. Da CD4⁺ T-Zellen bei Eintritt des HIV in den Körper die ersten befallenen Zellen darstellen¹⁰⁵, könnte der Rückgang der CTL-Effektivität auch dadurch, also sekundär bedingt sein.

Es konnte auch eine HLA-unabhängige Suppressoraktivität der CTL entdeckt werden: Wichtige Faktoren bei der hemmenden Wirkung auf die HIV-Vermehrung sind die sezernierten β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES¹⁰⁶. Diese Chemokine sind die natürlichen Liganden von CCR5 und hemmen den Zelleintritt M-troper Virusisolate. Auch dem IL16¹⁰⁷ und dem Chemokin MDC (Macrophage Derived Chemokine)¹⁰⁸ werden antivirale Funktionen zugesprochen.

1.5.2.3 CTL-Escape

Wie bereits erwähnt, kommt es bei der CTL-Antwort zu Alterationen, die vornehmlich durch Mutationen im HIV-Genom bedingt sind. Entscheidend sind dabei Mutationen, die im Bereich der Epitope liegen, die auf den MHC-I-Molekülen präsentiert und von spezifischen CTL erkannt werden. Aminosäureveränderungen in diesen Bereichen können unterschiedliche Folgen haben:

1. Fehlende oder gestörte Bindung des viralen Peptids auf dem MHC-Molekül,
2. Veränderung der Interaktion des MHC-Peptid-Komplexes mit dem TCR,
3. Generierung einer antagonistischen CTL-Antwort¹⁰⁹.

Letztendlich wird das Erkennen infizierter Zellen durch die CTL verändert, beeinträchtigt oder sogar verhindert.

Veränderungen in den Epitopen sind Hinweis dafür, dass spezifische CTL einen Selektionsdruck auf das Retrovirus ausüben, das sich diesem zu entziehen versucht (Escape-Mutation, dt.: Fluchtmutation)^{110, 111, 112}. Man geht davon aus, dass er für fast zwei Drittel aller Mutationen des HIV-Genoms verantwortlich ist¹¹³. Konservierte Regionen zeigen dagegen einen unerheblichen CTL-Angriff oder für die Virusfunktion essentielle Bereiche an.

Bereits 1991 beschrieben Phillips et al. das Auftreten von Fluchtmutanten. Weitere Studien folgten, die ergaben, dass CTL-Flucht sowohl in der akuten^{111, 112} als auch in der chronischen Infektionsphase^{102, 110} auftritt. So zeigt sich Variabilität im Tat-Protein bereits kurz nach dem initialen Viruspeak⁹³, wohingegen viele Escape-Mutationen im Bereich des Gag-Proteins erst im späteren Verlauf auftreten^{102, 114}.

Escape-Mutationen haben meist negativen Einfluss auf die virale „Fitness“, womit vor allem die Fähigkeit des Virus zur Replikation gemeint ist¹¹⁵. Dies kann zu einer Verminderung der Virämie führen und indiziert auch, dass bei Infektion eines HLA-diskordanten Individuums die zuvor erfolgten Escape-Varianten aufgrund fehlender spezifischer CTL nach und nach verschwinden und sich der Wild-Typ mit der größeren „Fitness“ wieder durchsetzt^{116, 117}. In einer Studie von Fernandez et al. trat diese Rückartung bereits innerhalb von zwei Wochen nach Infektion auf¹¹⁵. Wird HIV auf ein Individuum desselben MHC-I-Typs übertragen, wird dagegen der Großteil der Escape-Mutationen im Rezipienten beibehalten^{117, 118}.

Durch den oben beschriebenen „Fitness“-Verlust wirken sich also schnell auftretende Escape-Mutationen – entgegen früherer Annahmen – nicht unbedingt negativ¹¹⁰, sondern häufig sogar positiv auf die Verminderung der Viruslast aus. Bei einer spät auftretenden Escape-Mutation im Bereich des HLA-B27-restringierten Epitops in Gag KK10 und weiteren Mutationen ist dies jedoch nicht der Fall: Sie geht mit einer Krankheitsprogression einher^{102, 119}. Dass einige Mutationen spät auftreten, führte zu der Hypothese, dass Genomveränderungen in diesem Bereich zu einem immensen „Fitness“-Verlust führen würden, und demnach erst auftreten, wenn weitere, so genannte kompensatorische Mutationen vorliegen, die den Schaden abschwächen^{116, 120}. Versuche, in denen Klone mit der alleinigen Mutation generiert werden sollten, schlugen fehl und unterstreichen, dass eine solche Mutante ohne Kompensation nicht replikationsfähig ist²⁰⁰. Es fehlen weitere Versuche, um diese Hypothese zu stützen.

Mutationen im Virusgenom können darüber hinaus auch die Prozessierung der viralen Proteine beeinflussen, und auf diese Weise die Bindung an das MHC-I-Molekül verändern bzw. behindern^{121, 122}. Auch Bereiche in der Nähe von CTL-Epitopen können also wichtig für die CTL-Funktion sein.

Die Bedeutung des CTL-Escape ist noch nicht vollständig geklärt und wird eventuell noch unterbewertet.

1.6 Pathogenese und Krankheitsverlauf der HIV-Infektion

Infektionen mit Lentiviren verlaufen charakteristischer Weise chronisch, zeigen eine lange klinische Latenzphase, eine persistierende Virämie sowie eine Beteiligung des zentralen Nervensystems. HIV-1 und HIV-2 verursachen die Entstehung eines erworbenen Immundefektes (AIDS).

Der Krankheitsverlauf der HIV-Infektion lässt sich klinisch in drei Phasen aufteilen. Die akute HIV-Krankheit, die Latenzphase und die terminale AIDS-Krankheit. Nach der CDC (Centers for Disease Control, USA, 1993) wird die Infektionskrankheit nach Klinik und CD4⁺-Zellzahl in Stadien eingeteilt (Tab. 1):

Tab. 1: Die CDC (Centers of Disease Control)-Klassifikation unterscheidet drei klinische Kategorien A bis C und drei CD4⁺-Zellzahlbereiche 1 bis 3 (CDC 1993). LAS = Lymphadenopathiesyndrom

Laborstadien	Klinische Stadien		
	A	B	C
CD4+ T-Lymphozyten pro µl	HIV-Akutkrankheit, Latenzphase, LAS	HIV assoziierte Erkrankungen	AIDS-definierende Erkrankungen
1 > 500	A1	B1	C1
2 200 - 499	A2	B2	C2
3 < 200	A3	B3	C3

Etwa drei bis sechs Wochen nach Infektion durchlaufen etwa 40-90% der HIV-Infizierten eine akute HIV-Krankheit mit mononukleoseähnlichem Krankheitsbild. Typische Symptome sind Fieber, generalisierte Lymphknotenschwellung, Cephalgien, Arthralgien, Myalgien und Splenomegalie. Die Plasma-Viruslast variiert zu diesem Zeitpunkt stark zwischen Tausenden bis hin zu Millionen von Viruskopien pro ml¹²³. Während dieser Phase der hohen Viruslast breitet sich das Virus im ganzen Körper – insbesondere im lymphatischen Gewebe – aus¹²⁴ und führt zu einem rapiden Abfall der CD4⁺-Zellzahl¹²⁵. Im weiteren Krankheitsverlauf steigt diese meist wieder leicht an. Neben quantitativen Verlusten sind auch qualitative Einschränkungen der T-Helferzellen beschrieben¹⁰⁵. Beides hat negative Auswirkungen auf die Funktion effektiver HIV-1-spezifischer CTL.

Nach einem *Peak* (dt.: Spitze) sinkt die Viruslast im Verlauf von etwa sechs Monaten bis zum Erreichen eines *Setpoint* (dt.: Einstellwert) ab (meist etwa 3×10^5 RNA-Kopien/ml)¹¹⁰, der als prognostischer Marker gilt¹²⁶. Eine essentielle Rolle bei der initialen Viruskontrolle spielt die zelluläre Immunantwort (s.o). Es zeigt sich eine inverse Korrelation zwischen CTL-Zahl und Viruslast⁹⁵. Mehrmalig konnte eine zeitliche Assoziation zwischen dem Auftreten von spezifischen CTL und dem initialen Abfall der Virämie nachgewiesen werden^{97, 127}. In der frühen Phase der HIV-Infektion wurde außerdem eine massive, oligoklonale Expansion der CD8⁺ Zellen beobachtet¹²⁸. Neutralisierende HIV-1-Antikörper sind dagegen nur selten nachweisbar (Abb. 9).

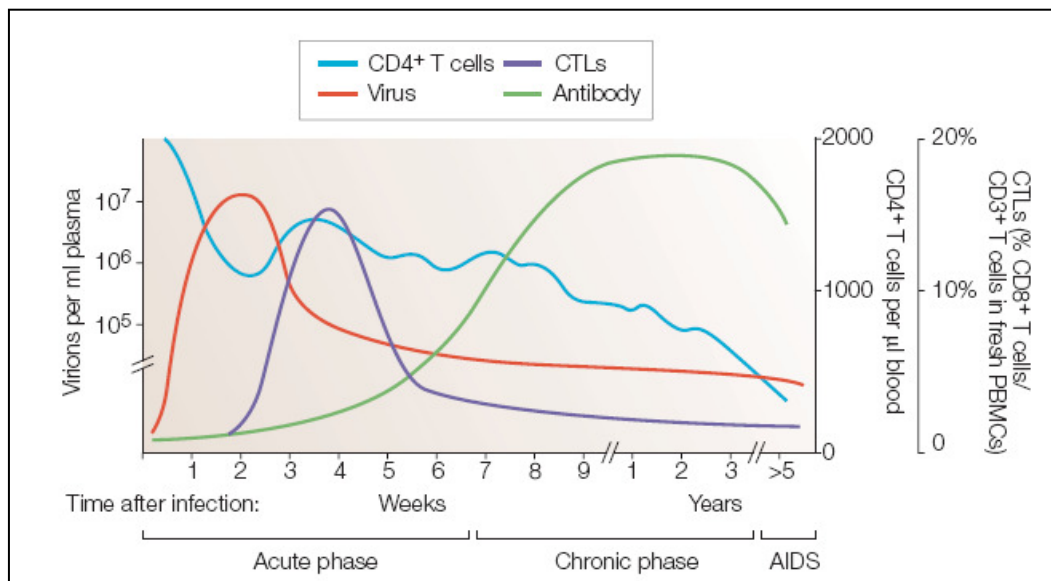


Abb. 9: Der natürliche Verlauf der HIV-Infektion am Beispiel von SIV. SIV ruft in Rhesusaffen ähnliche Symptome wie HIV beim Menschen hervor. Ein Abfall der Viruslast (rote Linie) geht mit einer klonalen Expansion der CTL-Population (violette Linie) einher. Antikörper treten erst später auf. Die Zahl der $CD4^+$ -Zellen (blaue Linie) nimmt graduell ab. Die HIV-Infektion verläuft ähnlich. Die Virämie liegt im Maximum bei etwa 10^7 RNA-Kopien/ml und sinkt auf anhaltende Werte von etwa 3×10^5 . Die akute Phase dauert etwa sechs Monate¹¹⁰.

Die primäre HIV-Infektion ist gefolgt von einer meist lang andauernden Latenzphase, während der keine Krankheitssymptome auftreten. Ein relativ stabiles Niveau von Virusreplikation und $CD4^+$ Zellen im Blut sind in dieser Phase typisch. Es stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Virusproduktion und Elimination ein. Pro Tag werden von einem infizierten Patienten in dieser Phase etwa 10^9 Viren produziert und vom Immunsystem wieder eliminiert. Die hauptsächlich infizierten $CD4^+$ Zellen haben dann eine Halbwertszeit von etwa 1,6 Tagen (normal: einige Tage bis zu Monaten/Jahren), die von freien Viruspartikeln im Plasma liegt bei etwa 6 Stunden¹²⁹. Diese scheinbare Stabilität zeigt sich aber nur im Blut, während die Virusreplikation und Depletion von $CD4^+$ Zellen im lymphatischen Gewebe weiter voranschreiten¹³⁰ und es anatomisch und funktionell zerstören. Dies und der hohe Zellumsatz von $CD4^+$ T-Lymphozyten führen dazu, dass eine effektive spezifische Immunantwort gegen das HIV auf Dauer nicht aufrechterhalten werden kann¹³¹.

Die endgültige Destruktion der körperlichen Abwehr zeigt sich schließlich in einem massiven $CD4^+$ -Zellverlust. Klinisch führt dies etwa 10-11 Jahre (60-70%) nach der Erstinfektion durch HIV zur AIDS-Krankheit, die durch eine $CD4^+$ -Zellzahl unter $200/\mu$ l oder das Auftreten von opportunistischen Erkrankungen definiert ist. In diesem Stadium ist der Patient aufgrund des stark geschädigten Immunsystems für viele, normalerweise harmlose oder apathogene Krankheitserreger anfällig. Es kommt beispielsweise zu

Cytomegalievirus-Infektionen, *Pneumocystis jiroveji*-Pneumonien oder viszerale *Candida*-Infektionen. Das Nervensystem wird durch HIV-bedingte Apoptoseinduktion sowie virale Replikation in Neuronen geschädigt. Außerdem kommt es zum gehäuften Auftreten von bestimmten Malignomen wie Non-Hodgkin-Lymphomen und Kaposi-Sarkomen¹³². Ohne eine antivirale Therapie kommt es in diesem Stadium des voll ausgeprägten AIDS-Syndroms innerhalb von 2-3 Jahren zum Tod.

Die Dauer der Latenzphase bis zum Auftreten von AIDS variiert beträchtlich. Bei etwa 10% der Patienten verläuft die Krankheit ausgesprochen schnell und führt innerhalb von weniger als 5 Jahren zum Ausbruch des vollen Krankheitsbildes (Rapid Progressors, RP). 8-10% dagegen gehören zu den Langzeitüberlebenden (Long Term Non Progressors, LTNP). Der Begriff LTNP wird dabei nicht einheitlich verwendet. Verschiedene Definitionen schließen eines oder mehrere der folgenden Kriterien ein:

1. dokumentierte HIV-Infektion über mehr als sieben Jahre,
2. stabile CD4⁺-Zellzahl von über 600/μl,
3. niedrige Viruslast von weniger als 1000 RNA-Kopien/ml,
4. keine durch HIV induzierten Krankheitssymptome
5. fehlende retrovirale Therapie.

Diese Patientengruppe bleibt über mehrere Jahre hinweg frei von AIDS und klinisch gesund¹¹⁰.

1.7 HIV-Impfstoffentwicklung

Vor allem in den Entwicklungsländern, deren Bevölkerung oft aus finanziellen Gründen der Zugang zu antiviralen, lebensverlängernden Medikamenten verwehrt ist, hat die AIDS-Epidemie verheerende Auswirkungen auf Individuum und Gesellschaft¹³³. Ein Impfstoff gegen das Humane Immundefizienz-Virus ist dringend notwendig. Trotz stetiger Fortschritte in der Erforschung des HIV gelang es bisher jedoch nicht, einen präventiven oder therapeutischen Wirkstoff gegen diesen Erreger zu generieren. Die größte Hürde ist, herauszufinden, welche Art Immunantwort vor HIV tatsächlich effizient schützen kann. Dies war bisher nicht zu klären. Darüber hinaus bereiten vor allem die hohe Variabilität sowie die komplexe Pathogenese des Virus Schwierigkeiten. Dazu gehört zum einen die Fähigkeit des Virus, sich dem Zugriff des Immunsystems durch

Integration in das Genom der Wirtszelle oder auch durch die Herunterregulierung der MHC-Moleküle zu entziehen, zum anderen die hohe Vermehrungsrate von HIV und die damit verbundene Zerstörung von CD4⁺ T-Lymphozyten, die wichtiger Bestandteil eines funktionierenden Immunsystems sind. Seit 1988 wurden 160 klinische Studien der Phase I, II oder III registriert. Momentan befinden sich weltweit 41 Impfkonzepete in klinischer Testung (IAVI, [www. iavi.org](http://www.iavi.org), November 2007). Jährlich werden etwa 2 Milliarden US\$ für die AIDS-Forschung ausgegeben, wovon 650 Millionen allein der Impfstoffentwicklung zugerechnet werden.

Nachdem – historisch gesehen – zunächst nach Möglichkeiten gesucht wurde, neutralisierende Antikörper (AK) zu induzieren, wurde später der Schwerpunkt auf eine Induktion der zellulären Immunantwort gelegt. Heute geht man davon aus, dass beide Strategien kombiniert eingesetzt werden sollten. Dabei rückt seit dem Jahr 2000 die Prime-Boost Kombinationstechnik in den Vordergrund, eine Impfstrategie, bei der nach dem Einbringen von DNA-Vektoren mit integrierten HIV-Genen (*prime*) eine Verstärkung der Immunantwort durch Virusproteine oder rekombinante Viren (*boost*) hervorgerufen wird¹³⁴ (s.u.).

Einige Studien unterstützen die Annahme, dass eine Antikörperinduktion die HIV-Infektion verhindern kann: So führte die passive Immuntherapie von Makaken-Affen mit spezifischen AK nach SIV-Infektion zu einer Abschwächung der viralen Replikation und Krankheitsprogression¹³⁵. Für die Verabreichung von *in vitro* neutralisierenden, monoklonalen AK an Rhesusaffen konnte eine partielle Blockierung der nachfolgenden mukosalen oder intravenösen Übertragung von chimären simianen/humanen Immundefizienz-Viren (SHIV) nachgewiesen werden¹³⁶. Als neutralisierende humane monoklonale Antikörper wurden außerdem b12, 2G12, 2F5 und 4E10 identifiziert⁷³. Problematisch an der Induktion einer humoralen Immunantwort ist, dass zahlreiche AK keine oder eine nur begrenzte Neutralisation von Primärisolaten bewirken, sobald diese sich von der Proteinsequenz des Immunogens stärker unterscheiden^{137, 138}. Die Entstehung von Mutationen sowie die natürliche hohe Variabilität des Hüllproteins gp120 können außerdem mit der Funktion der AK interferieren. Darüber hinaus kann eine ausgeprägte Glykolysierung oder eine nur vorübergehende Zugänglichkeit von strukturellen Domänen die Erkennung immunodominanter Peptidstrukturen erschweren^{77, 139}.

Große Erwartungen wurden in einen rekombinanten Impfstoff des Envelope-Proteins gp120 gesetzt. Dieses Immunogen verlieh im Gegensatz zu dem auf gp160 basieren-

den, synthetischen Impfstoff Schimpansen Schutz vor der Infektion mit einem HIV-1-Stamm¹⁴⁰. Eine Phase-III-Studie unter der Bezeichnung AIDSVAX wurde mit dem von Hamsterzellen produzierten HIV-1 rgp120 (Clade B) von VaxGen von 1998 bis 2003 parallel in USA/Kanada (VAX004) und in Thailand (VAX003) an insgesamt 7900 Freiwilligen mit Hochrisikoprofil durchgeführt. Das Ergebnis war enttäuschend: Der Impfstoff rief bei Menschen keinen signifikanten Schutz hervor¹⁴¹. Man geht davon aus, dass nur die Antikörperproduktion angeregt wurde, die allein nicht zum Schutz gegen HIV ausreichte. Seit 2003 läuft nun eine Phase-III-Effizienzstudie mit 16.000 Freiwilligen in Thailand, die die Wirkung des gleichen Immunogens unter Anwendung des Prime-Boost-Konzepts untersucht. Dabei kommt ein Canarypox-Vektor als *prime* (ALVAC CP1521 sanofi-aventis) und gp120 als *boost* (VaxGen) zum Einsatz. Man erhofft sich davon eine zusätzliche zelluläre Immunantwort. Die Weiterführung dieser Studie wird kontrovers diskutiert. Kritisiert wird, dass dasselbe Immunogen ohne *boost* in vorangegangenen Studien bei weniger als 20% der Freiwilligen eine CTL-Antwort hervorgerufen hatte¹⁴².

Versuche an Rhesusaffen haben gezeigt, dass eine durch Vakzinierung generierte zelluläre Immunantwort auch in Abwesenheit von neutralisierenden AK einen signifikanten Schutz gegen die Folgen einer Lentivirusinfektion gewähren kann. Zwar konnten sie den Erregereintritt nicht verhindern, doch kam es zu einer verlangsamten Krankheitsprogression^{143, 144, 145}. Lu et al. impften SIV-infizierte Rhesusaffen mit dendritischen Zellen, die vorher mit inaktiviertem SIV beladen worden waren. Die immunisierten Affen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe nach SIV-Infektion einen deutlichen Viruslastabfall von bis zu 80% sowie die Entwicklung einer SIV-spezifischen zellulären und auch humoralen Immunantwort¹⁴⁶.

Obwohl der Grad an Schutz durch induzierte CTL bisher nicht ideal ist, kann solch ein Vakzin wichtigen Nutzen haben: Es kann beispielsweise der initiale Viruspeak abgeschwächt und so das Übertragungsrisiko gesenkt werden¹⁴⁷. Auch ist es möglich, dass die Depletion der in den ersten Tagen nach Infektion vornehmlich befallenen CCR5-tragenden CD4⁺ T-Gedächtniszellen¹⁴⁸ teilweise verhindert wird. Damit bleibt das Immunsystem fähig, auf potentielle opportunistische Erreger und maligne Erkrankungen zu reagieren.

Es häufen sich jedoch die Anzeichen, dass die Wirkung der durch ein Vakzin induzierten CTL-Antwort zeitlich begrenzt ist. Die Replikationshemmung von SIV oder SHIV

kann in Rhesusaffen plötzlich nachlassen und mit einer massiven klinischen Verschlechterung einhergehen¹¹⁴. In diesen Fällen war eine Veränderung in einem immunodominanten CTL-Epitop aufgetreten, die es dem Virus ermöglichte, der CTL-Kontrolle zu entfliehen. Ähnliches beschreibt der Fall eines HLA-B27-positiven HIV-infizierten Mannes, bei dem die vor Infektion stattgefundenen Immunisierung eine frühe CTL-Flucht hervorrief. Dies führte zu einem schnelleren Krankheitsverlauf, als bei dem Patienten aufgrund seines HLA-Typs zu erwarten gewesen war²⁰⁴.

Jedoch muss die Induktion einer Escape-Mutation nicht unbedingt mit einem Schaden für den Patienten einhergehen, wenn sie nämlich die virale Fähigkeit zur Replikation behindert: Beispiele von zeitig auftretenden Fluchtmutationen im konservierten Kapsidprotein (Gag) sind bisher im Zusammenhang mit erfolgreicher Kontrolle von HIV und SIV beschrieben worden^{117, 149}. Eventuell ist aber auch eine Konzentration auf die frühe CTL-Antwort nötig. Die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef werden früh im viralen Lebenszyklus exprimiert. Eine spezifische CTL-Antwort gegen diese Antigene könnte den Effekt haben, infizierte Zellen noch vor Beendigung des viralen Replikationszyklus und vor Produktion von reifen Viruspartikeln abzutöten^{150, 151}. Für die Tat-, Rev- und Nef-spezifische Immunantwort konnte eine Assoziation mit einer langsamen oder sogar fehlenden Krankheitsprogression und *in vitro* eine Replikationshemmung nachgewiesen werden^{150, 152, 153}.

Am sinnvollsten wäre es also, eine Immunantwort gegen jene Bereiche zu induzieren, die entweder zu einem starken viralen „Fitness“-Verlust führen oder hochkonserviert sind. Es wird aber auch überlegt, ob ein HIV-1-Vakzin, das auf einer einzigen Sequenz beruht, nicht eine Immunantwort hervorruft, die zu fokussiert und typenspezifisch ist, als dass sie eine effektive Protektion gegen die zahlreichen Quasispezies des HIV in der menschlichen Population bieten könnte. Ein Vakzin, das die extreme Diversität des HIV berücksichtigt, wurde vom Vaccine Research Center am National Institute of Health in Maryland, USA, untersucht. Es schließt drei verschiedene Envelope-Konstrukte ein, codierend für die repräsentativen Proteine von Clade A, B, C¹⁵⁴. Vorangegangene Studien sprechen allerdings gegen eine Vereinigung mehrerer Immunogene in einem einzigen Impfstoff^{155, 156} oder lassen Zweifel an der Wirksamkeit einer breiten CTL-Antwort entstehen^{157, 158} und unterstützen damit die Hypothese, dass es entscheidend ist, wenige, aber dafür wichtige CTL-Epitope anzuvisieren¹⁵⁹.

Trotz oder gerade wegen des Auftretens von CTL-Escape¹⁶⁰ ist die Induktion einer

zellulären Abwehr weiterhin die viel versprechendste Strategie, gegen das HI-Virus vorzugehen. Derzeit werden mehrere auf CTL-Induktion basierende Impfstoffe klinisch getestet, so beispielweise eine Immunisierung nach der Prime-Boost-Methode mit Plasmid-DNA (*prime*; Vical, VRC) und rekombinalem Adenovirus (*boost*; GenVec, VRC) (Start Sept. 2005). Allerdings hat sich ein zunächst vielversprechender ebenfalls auf dem dem Adenovirus basierender rekombinanter Impfstoff in einer randomisierten Doppelblindstudie (Merck, STEP, Phase IIb, Dez. 2004 – Nov. 2007) als wirkungslos erwiesen. Es ergaben sich sogar Hinweise dafür, dass Studienteilnehmer, die den Impfstoff erhielten, eine erhöhte Empfänglichkeit für eine HIV-Infektion aufwiesen.

Die starke Diversität und Veränderbarkeit des HIV-Genoms erschweren die Entwicklung eines Impfstoffes gegen das Retrovirus. Die Stämme können sich von der Referenzsequenz HXB2 in bis zu 25% der AS unterscheiden¹⁶¹. Die Vielzahl an unterschiedlichen HLA-Typen des Menschen potenziert diese Immunogendiversität. Jedoch liegt das größte Hindernis zur Entwicklung eines Vakzins darin, dass bis heute nicht eindeutig geklärt ist, welche Immunantwort effizient schützt.

Trotz vieler ungelöster Probleme bei der Erzeugung eines effektiven HIV-1-Impfstoffes lassen die stetigen kleinen Fortschritte vorsichtigen Optimismus zu.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Analyse und Evaluation von bisher beschriebenen CTL-Epitopen, die zur Entwicklung eines schützenden Impfstoffs beitragen können.

Nach derzeitigem Wissensstand üben spezifische CTL einen Selektionsdruck auf das Retrovirus aus, wodurch es zur Ausbildung von Fluchtmutanten kommt, die sich diesem Druck zu entziehen suchen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die bisher beschriebenen Epitope, die in Abhängigkeit des Wirts-HLA-Typs von den CTL erkannt werden, tatsächlich eine vermehrte Variabilität aufweisen. Dabei ging man davon aus, dass vor allem diejenigen Epitope eine erhöhte Variabilität aufweisen, auf die ein starker und effizienter zellulärer Immundruck ausgeübt wird. Dies ist in vielerlei Hinsicht für die Impfstoffentwicklung interessant – unter anderem, um konservierte Genomregionen oder für das Virus nachteilige Mutationen zu identifizieren.

Da Veränderungen in den CTL-Epitopen bereits innerhalb von Wochen nach der Infektion auftreten können⁹³, untersucht diese Arbeit den Genomabschnitt (bp 5041-

6310, *vpr-vpu*) an Viren kürzlich Infizierter und von Langzeitinfizierten (LTNP). Die Hypothese ist, dass sich bei LTNP bereits eine Variante der vielen Quasispezies, die aufgrund der hohen Mutationsrate des Retrovirus entstehen, als die potenteste durchgesetzt hat und vorherrscht. Bei frisch Infizierten dagegen findet man vermutlich noch mehrere nebeneinander existierende Mutanten, von denen sich eine oder wenige im weiteren Verlauf der Erkrankung behaupten werden. Es ist aber zu bedenken, dass bei Infektionen, die weniger als ein bis zwei Wochen zurückliegen, eine spezifische Immunantwort noch fehlt und es bisher nicht zur Ausbildung von Mutanten gekommen ist, oder diejenige Variante vorherrscht, die im Überträger einen Selektionsvorteil besaß^{162, 163}.

Auch berücksichtigt diese Arbeit den HLA-A-Typ der Patienten. In mehreren Studien konnte der Einfluss der MHC-Moleküle auf den Verlauf der Krankheit gezeigt werden. Viele Arbeitsgruppen weltweit beschäftigen sich mit der Identifikation von HLA-Typ-spezifischen CTL-Epitopen und immer mehr davon werden entdeckt. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf den Vergleich von Viren HLA-A2-positiver und HLA-A2-negativer Patienten. Dies ist ein Ansatz, bei dem der gleiche Genomabschnitt (das HLA-A2-restringierte CTL-Epitop) unmittelbar miteinander verglichen und die Diversität in diesem Bereich direkt gegenüber gestellt werden kann. Zur objektiven Auswertung der Daten wurden statistische Methoden angewandt.

Die Auswahl des Genabschnitts erfolgte aufgrund der aktuellen Literatur, in der akzessorische und regulatorische Proteine als wichtige Ziele der spezifischen CTL beschrieben werden¹⁶⁴. Man geht davon aus, dass in früh im Infektionszyklus auftretenden viralen Proteinen wie Tat und Rev auch die ersten Mutationen zu beobachten sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Zentrifugen: Megafuge 1.0 R, Heraeus; Centrifuge 5810 R, Eppendorf; Centrifuge 5804 R, Eppendorf; Biofuge fresco, Heraeus, MiniCentrifuge C-1200, VWR/Labnet; Tube-Strip Picofuge[®]. PMC-860, Stratagene.

Thermocycler: Thermocycler PTC-200, MJ Research.

Schüttelinkubator: c24-Orbitalschüttel-Inkubator, New Brunswick Scientific.

Elektrophorese: PowerPac200, Bio-Rad.

UV-Spektrometer: UV1202 Photometer, Shimadzu.

Labormikroskop: Eclipse TS 100, Nikon.

2.1.2 Verwendete Puffer und Reagenzien

Agarplatten: 20 g/l Agar; in LB Medium; Antibiotikum (Ampicillin 1000µl/l) kurz vor dem Gießen hinzugeben.

DNA-Leiter: GeneRuler[™] 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas.

Luria-Bertani-Medium (LB-Amp): 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 1 g/l NaCl; in Aq.dest.; mit NaOH ad pH 7,5. Frisch anzusetzen: Ad 100 mg/l Ampicillin (Roth).

PCR-Cocktail, Biotest SSP-HLA Kit: 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 0,001% Gelatine; Kresolrot; Glycerin.

Phosphate-buffered Saline (PBS): 0,01 M NaH₂PO₄; 0,138 M NaCl; 0,0027 M KCl; in Aq.dest.; mit HCl ad pH 7,2.

Serum Free Cryopreservation Medium, Oligene (Cat.-No.: 2040102).

SOC-Medium: 20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 4 g/l Glucose; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 5 mM MgCl₂; Aq. dest.

TAE-Puffer 40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA;
Aq.dest., pH 8,2.

2.1.3 Studienmaterial

Die Studienteilnehmer werden in Zusammenarbeit mit Dr. med. D. Schürmann, Infektiologie und Pneumologie, Charité Campus Virchow Klinikum, rekrutiert. Das Studienmaterial sind Blutproben von bisher therapienaiven HIV-positiven Long Term Non Progressors (LTNP), die im Rahmen der Routineuntersuchung in der Klinik gesammelt und an das RKI weitergeleitet werden. Um die Anonymität der Patienten zu wahren, ist jede Blutprobe mit einem Zahlenschlüssel belegt, wobei die erste Zahl für den Patienten steht, die zweite für die Nummer der Blutprobe (z.B.: HIV 3-2 = Patient 3, 2. Blutprobe). Alle Patienten geben ihre schriftliche Zustimmung. Die Ethikkommission der Charité Berlin hat die Studie bewilligt. Die Kohorte wuchs mit der Dauer der Studie an, während der routinemäßig Blutproben verarbeitet wurde. Bis zum jetzigen Zeitpunkt (Ende 2007) wurden 80 Patienten (HIV1 bis 80) in die Studie eingeschlossen.

Darüber hinaus wurden Plasmaproben von Patienten, die von der Arbeitsgruppe Dr. C. Kücherer am RKI im Rahmen der Serokonverterstudie in Zusammenarbeit mit verschiedenen Kliniken und Arztpraxen gesammelt worden waren, in die Untersuchungen eingeschlossen. In der HIV-1-Serokonverterstudie werden Labordaten von HIV-infizierten Patienten erfasst, die eine dokumentierte (ein negativer und ein positiver HIV-Test mit einem zeitlichen Abstand von maximal drei Jahren) oder eine labor-diagnostisch gesicherte, akute Serokonversion aufweisen. Eine akute Serokonversion liegt unter folgenden Bedingungen vor:

- a: negativer HIV-ELISA und positiver HIV-RNA-Nachweis;
- b: negativer HIV-ELISA und positiver HIV-DNA-Nachweis;
- c: negativer HIV-ELISA und positiver p24-Antigen-Test;
- d: positiver HIV-ELISA und fraglicher Immunoblot.

Die Probenbezeichnung erfolgt in dieser Kohorte mit laufenden Nummern, denen die entsprechende Jahreszahl, in der die Probe abgenommen wurde, vorangestellt ist (z.B. Pat. 04-030 = Pat. 030 im Jahr 2004). Diese war für vorliegende Arbeit nicht von Belang und wird im Weiteren nicht mehr erwähnt.

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung HIV-infizierter Blutproben

Das Blut HIV-Infizierter wird in der AIDS-Ambulanz der Charité, Campus Virchow Klinikum im Rahmen der routinemäßigen Kontrollen abgenommen und an das RKI in Form von 20-40 ml EDTA-Blut weitergeleitet. Zwischen Blutentnahme und Verarbeitung vergehen meist nur 1-2 Stunden.

Um die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) vom Plasma zu trennen, wurde eine Dichtezentrifugation in Ficoll (Histopaque 1077, Sigma), einer Polysaccharose mit der Dichte 1,077 g/l, durchgeführt. Das EDTA-Blut wurde dazu auf die Membran eines mit 15 ml Ficoll gefüllten Leucosep-Röhrchen (Greiner) gegeben und bei 1000 g bei Raumtemperatur für 20 min zentrifugiert. Zuoberst sammelt sich das Plasma, das mit einer Pipette sorgfältig abgenommen werden muss, um eine Zellkontamination zu verhindern. Darunter liegt eine feine, weiße Schicht, die die Lymphozyten der Blutproben enthält. Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten sammeln sich unterhalb der Trennmembran.

Das Plasma wurde für 20 min bei 1150 g bei 4°C zentrifugiert, anschließend zu 1,8 ml in 2 ml Cryotubes (Greiner) aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren. Die PBMC wurden mitsamt Ficollresten in neue Röhrchen überführt und zweimalig mit PBS-Puffer gewaschen, um sie von der Polysaccharoselösung zu reinigen. Anschließend konnte ihre Anzahl nach Anfärbung mit Trypanblau mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Sechs bis zehn Zell-Pellets in Sarstedt tubes wurden hergestellt, indem nach Zentrifugation von etwa 5×10^5 PBMC für 3 min bei 1900 g (RT) der Überstand an PBS abgenommen wurde. Die Pellets wurden bei -80°C tiefgefroren und für die HLA-Typisierung verwendet. Die übrigen PBMC wurden ebenfalls vom PBS-Puffer befreit und mit einer synthetischen Cryoflüssigkeit (Serum Free Cryopreservation Medium, Oligene) resuspendiert, so dass eine Konzentration von 1×10^7 Zellen pro ml entstand. Die Suspension wurde zu je 1 ml in Cryotubes aliquotiert und zunächst mit Hilfe von Isopropanol (slow rate freezing container) langsam auf -80°C gekühlt (1°C pro min.), um sie dann nach ein bis zwei Tagen in flüssigen Stickstoff zu transferieren.

2.2.2 HLA-Typisierung der Patienten

2.2.2.1 Extraktion von Patienten-DNA

Die Patienten-DNA wurde mit Hilfe des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit von Qiagen® aus den oben genannten Zell-Pellets isoliert. Das Prinzip des Kits ist die Adsorption der durch Zell-Lyse freigesetzten DNA an eine Silica-Membran, die in einem Säulchen zum Einsatz in Eppendorf-Gefäße befestigt ist. Proteine, Salze und andere verunreinigende Substanzen werden durch Waschen mit chaotropen Puffern entfernt und die DNA kann dann mit destilliertem H₂O (hier 200µl) eluiert werden. Es wurde laut Protokoll des Herstellers verfahren.

Um die DNA Menge zu bestimmen, wurde das Eluat mit dH₂O im Verhältnis 1:15 verdünnt und die DNA-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Eine Absorption von 1 bei einer Wellenlänge von 260nm entspricht ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der Quotient A_{260}/A_{280} zeigt den Reinheitsgrad der Probe an und sollte bestenfalls zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ein höherer Wert zeigt eine Kontamination z.B. mit RNA oder Phenolen, ein niedrigerer die Kontamination mit Proteinen an.

2.2.2.2 HLA-A-Typisierung

Zur Bestimmung des HLA-A-Typs der Patienten wurde das HLA-A SSP Kit (SSP = Sequenz Spezifische Primer) von Biotest (Art.no. 826 201) verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren (Tab. 2). Der Test nutzt spezifische Primer, die bei entsprechend vorhandenen Gensequenzen mittels PCR zu einer Amplifikation eines definierten, HLA-A-Allel-spezifischen DNA-Fragments führen. Von der vorher aus den Zell-Pellets isolierten DNA wurden 100 +/-50 ng eingesetzt. Als Polymerase diente die HotStar Taq von Qiagen®.

Tab. 2: Protokoll zur HLA-Typisierung.

Pipettierschema für 24 Ansätze		Thermocycler-Profil:		
Substrat	Menge (µl)	Schritt	Temp (°C)	Zeit
PCR Cocktail	120	Initiale Denaturierung	94 °C	10 min
Hot Star Taq Polymerase	1,8	Denaturierung	94 °C	10 s
dH ₂ O	150	Annealing & Extension	65 °C	60 s
DNA (100 +/-50 ng/µl)	30	Denaturierung	94 °C	10 s
Total	301,8 µl	Annealing	61 °C	50 s
		Finale Extension	72 °C	60 s

Nach der Polymerisation wurden die 24 Ansätze in einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt, die Ergebnisse mittels UV-Transluminator sichtbar gemacht und phototechnisch dokumentiert. Die Auswertung konnte mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten SSP-Software durchgeführt werden.

2.2.3 Verarbeitung der viralen RNA

2.2.3.1 Isolierung retroviraler RNA aus Plasma

Zur Isolation der HIV-RNA aus dem Plasma wurde das QIAamp MinElute Virus Spin Kit von Qiagen[®] verwendet. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Nach dem Auftauen des bei -80 °C tiefgefrorenen, zu 2 ml aliquotierten Plasmas folgte eine Zentrifugation der Eppendorf-Gefäße für 90 min bei 20 000 g, 4 °C. Der Überstand (1,8 ml) des resultierenden Pellets konnte nun abgenommen werden und für die eventuelle Wiederverwendung erneut tiefgefroren werden. Nach Resuspendierung des Pellets in den verbleibenden 200 µl Plasma wurden spezielle Puffer und Enzyme in den folgenden Schritten hinzugefügt, um das Substrat zu lysieren und die selektive Adsorption der RNA zu verstärken. Das Lysat wurde dann auf eine Säule mit einer Silica-Membran überführt, an der die RNA gebunden wird. In anschließenden Waschschritten konnten Verunreinigungen wie Proteine oder Nukleasen beseitigt und die RNA schließlich mit RNase-freiem Wasser (150 µl) von der Membran eluiert werden. Aliquots zu 10 µl in PCR-Softtubes wurden bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.3.2 Oligonukleotide

Sämtliche spezifische und individuell gestalteten Primer lieferten die Firmen MWG oder Invitrogen.

Verwendete Oligonukleotide für die RT-PCR zur Amplifikation des Genomabschnittes *vif-vpu* (bp 5041-6310) listet Tabelle 3 auf, die relative Genomposition ist in Abb. 10 dargestellt (Tab. 3, Abb. 10). Die Bezeichnung der Primer setzt sich aus einer Zahl und dem Buchstaben F (forward, dt.: vorwärts) oder R (reverse, dt.: rückwärts) zusammen. T_m ist der Schmelzpunkt – die Temperatur, bei der die Hälfte der Primer gebunden vorliegt.

Tab. 3: Spezifische Primer zur Amplifikation des HIV-Genomabschnittes *vif-vpu*. T_m = Schmelzpunkt.

Name	Genomposition (In HXB2)	Sequenz 3'-5'	Länge (Basen)	T _m (°C)
P22 F	4962 - 4981 bp	GGT GAA GGG GCA GTA GTA ATA C	22	50
P22 R	6359 - 6338 bp	CCA CAC AGG TAC CCC ATA ATA G	22	50

Zum Screening erfolgreich transformierter Bakterien wurden Primer der Firma Invitrogen verwendet, die mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing mitgeliefert werden und direkt am TOPO TA Vektor ansetzen. Die genaue Position im Vektor ist im Anhang dargestellt, die Nukleotidsequenz findet sich in Tabelle 4 (Tab. 4).

Zur Sequenzierung des Genabschnittes *vif-vpu* nach erfolgreicher Klonierung kamen in Tabelle 4 folgende Oligonukleotide zum Einsatz (Tab. 4). Die relative Genomposition der Primer zur RT-PCR sowie zur Sequenzierung ist in Abbildung 10 dargestellt (Abb. 10).

Tab. 4: Primer zum Bakterien-Screening und zur Sequenzierung. T_m = Schmelzpunkt

Name	Genomposition (in HXB2)	Sequenz 5'-3'	Länge (Basen)	T _m (°C)
M13 F	in Vektor	GTA AAA CGA CGG CCA G	17	55
M13 R	in Vektor	CAG GAA ACA GCT ATG AC	16	55
P22 F	4962-4983 bp	GGT GAA GGG GCA GTA GTA ATA C	22	55
P22 R	6359-6338 bp	CCA CAC AGG TAC CCC ATA ATA G	22	55
P23AF	5195-5213 bp	GTT CAG AAG TAC ACA TCC C	19	55
P23 R	5973-5956 bp	CCA TAG GAG ATG CCT AAG	18	55

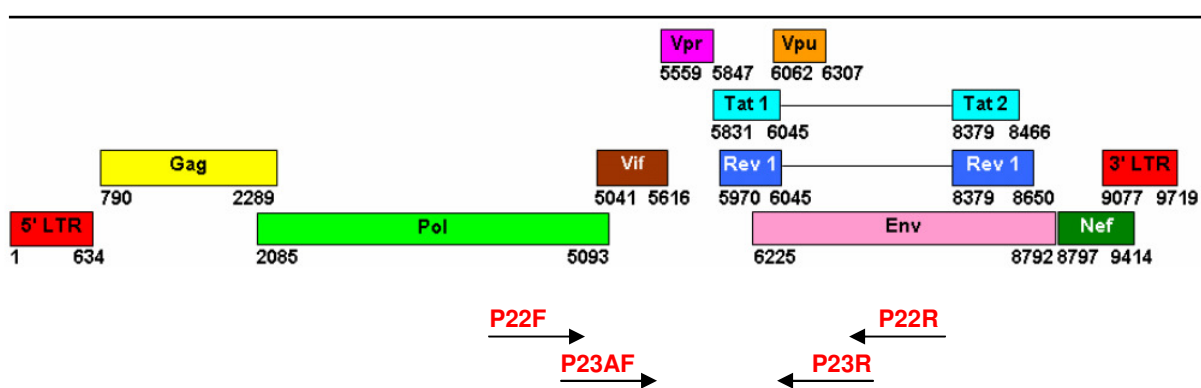


Abb. 10: Relative Genomposition der Primer zur RT-PCR und Sequenzierung in HXB2.

2.2.3.3 RT-PCR

Zur Durchführung der Reversen Transkription kam das OneStep RT-PCR Kit von Qiagen® zum Einsatz. Die in Aliquots à 10 µl bei -80°C gefrorene HIV-RNA wurde dem RT-PCR-Ansatz unter einer ausschließlich für RNA-Verarbeitung verwendeten Laborbank hinzugefügt, um eine DNA-Kontamination zu vermeiden. Da RNA bei Raumtemperatur schnell degradiert, erfolgte das Auftauen der RNA erst nach Fertigstellung des Ansatzes. Ansatz und Thermocycler-Profil basieren auf den Angaben des Herstellers und sind in der folgenden Tabelle 5 dargestellt (Tab. 5).

Tab. 5: Protokoll zur Durchführung der RT-PCR.

One-Step RT-PCR Ansatz:		Thermocycler-Profil:		
Substrat	Menge (µl)	Schritt	Temp (°C)	Zeit
RNA	10	Reverse Transkription	50°C	30min
Primer F/R	à 2,5	Aktivierung HotStar Taq	95°C	15min
5x Puffer	5	Denaturierung	94°C	0,5min
Q-Solution	1	Annealing	50°C	1min
Rnase-Inhibitor	1	Extension	72°C	2min
MgCl ₂	1	Finale Extension	72°C	10min
dNTPs	1			
Enzyme mix	1			
Total	25µl			

2.2.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Um das Molekulargewicht der PCR-Produkte zu bestimmen, wurden 10 µl DNA mit 5 µl DNA-Probenpuffer versetzt und in eine Tasche des Agarosegels aufgetragen. Die Herstellung eines 1%igen Agarosegels erfolgte mit 10 g/l SeaKem-LE-Agarose von Biozym in TEA-Puffer. Nach dem Aufkochen wurde zur DNA-Färbung 0,5 mg/l Ethidiumbromidlösung oder 40 µl Gelstar von Cambrex hinzugefügt. Letzteres kam vor allem bei der HLA-Typisierung zum Einsatz. Nach Auftragen der PCR-Produkte sowie einer 100 bp-DNA-Leiter von Fermentas erfolgte die Elektrophorese bei 100 V über 1 h mit einem BioRad PowerPac200 in einer BioRad Gelkammer, die mit TAE-Puffer gefüllt war. Anschließend erfolgte die Visualisierung der DNA-Fragmente mittels UV-Transluminator TFX-20M von Vilber Lourmat oder Photographie auf einer Geldokumentationsanlage von Biosystematica. Mit Hilfe der zum Vergleich der Molekulargewichte aufgetragenen Leiter konnte die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden.

2.2.3.5 Klonierung

Zur Klonierung der gewünschten Genabschnitte wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing von Invitrogen verwendet. Es kamen chemisch kompetente *E.coli* TOP10 zum Einsatz. Verfahren wurde nach dem Protokoll des Herstellers. Der Plasmid-Vektor pCR[®]4-TOPO[®] mit den Restriktionsstellen und Primerbindungspositionen ist im Appendix dargestellt.

Zunächst erfolgt die Ligations-Reaktion: Die bei der PCR eingesetzte Taq-Polymerase besitzt eine terminale Transferase-Aktivität, die an alle PCR-Produkte ein Deoxyadenosin am 3'-Ende anhängt. Der Plasmid-Vektor pCR[®]4-TOPO[®] enthält 3'-Deoxythymidin-Überhänge und eine kovalent gebundene Topoisomerase. Diese Voraussetzungen erlauben eine effektive Ligation zwischen PCR-Produkt und Vektor. Der Transformationsvektor wurde nach folgendem Schema hergestellt (Tab. 6):

Tab. 6: Pipettierschema zur Herstellung des Transformationsvektors.

Reagens	Menge (µl)
PCR Produkt	1-4
Salzlösung	1
Steriles Wasser	Ad 6
pCR4-TOPO Vektor	1
Total	6 µl

Nach Inkubation des Ansatzes zur Vektorherstellung für 15 min bei Raumtemperatur wurden 2 µl des Transformationsvektors in ein Fläschchen mit One Shot Chemically Competent *E.coli* gegeben und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Der nun folgende Hitzeschock der Bakterien im Wasserbad bei 42°C für 30 s führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Bakterienmembran und somit zum Eindringen des Vektors in die Bakterien. Versetzt mit 250 µl S.O.C.-Nährmedium erfolgte nun die Inkubation der *E.coli* für 1 h bei 37°C und 200 Rpm auf einem c24-Orbitalschüttel-Inkubator von New Brunswick Scientific, so dass die Resistenzgene auf dem Vektor exprimiert werden und die *E.coli* sich auf Amp-haltigem Nährboden vermehren können. Es folgte dann die Ausplattierung von je 50 µl und 150 µl des Bakterienansatzes auf den vorgewärmten, mit Amp versetzten LB-Agarplatten, die anschließend über 20 h bei 37°C in einem Heraeus B6060 Brutschrank inkubiert wurden. Das auf dem Vektor enthaltene Ampicillin-resistenzgen ermöglicht dabei die positive Selektion der Bakterien, die den Vektor mit

Resistenzgen aufgenommen haben. Ob dieser Vektor den gewünschten Genabschnitt enthält, kann in diesem Stadium noch nicht erkannt werden.

2.2.3.6 Bakterienkultur

Zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien wurden einzelne Kolonien der LB_{Amp}-Platten isoliert und in 2 ml LB_{Amp}-Medium bei 37°C und 200 Rpm Agitation über Nacht inkubiert. Je 2 µl der nach 16-18 h entstandenen Bakteriensuspension wurde zum Screen nach folgendem Schema verwendet (Tab. 7):

Tab. 7: Protokoll zum Bakterien-Screening.

Bakterienscreen-Ansatz		Thermocycler-Profil:		
Substrat	Menge (µl)	Schritt	Temp (°C)	Zeit
Bakteriensuspension	2	Aktivierung HotStar Taq	95 °C	15 min
M13 F/R	1	Denaturierung	95 °C	30 s
dNTPs	0,5	Annealing	50 °C	20 s
10x Puffer	2,5	Extension	72 °C	1 min
MgCl ₂	2			} 29x
HotStart/Ampli-Taq	0,25			
dH ₂ O	15,75			
Total	25µl			

Mittels Agarosegel-Elektrophorese konnten die Bakterienkolonien mit dem gewünschten Genabschnitt selektiert werden. Dabei wiesen die amplifizierte Gensegmente eine Größe von 1500 bp (Insert) plus etwa 200 bp des Vektors, also etwa 1700 bp auf. Aus transgenen Bakterienkolonien wurde im nächsten Schritt die Plasmid-DNA isoliert:

Dazu wurde das QIAprep 8 Miniprep Kit von Qiagen[®] verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Die über Nacht in 2 ml LB_{Amp}-Medium inkubierten Bakterien wurden zunächst bei 3345 g für 15 min in einer Heraeus Megafuge 1.0 R sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Der Niederschlag aus *E.coli* konnte nun in geringer Flüssigkeit resuspendiert und in weiteren Schritten die Zellmembranen lysiert und Proteine ausgefällt werden. Nach erneuter Zentrifugation wurde der die DNA enthaltende Überstand auf eine Silica-Membran überführt. Die Plasmid-DNA bleibt dabei an die Membran gebunden, wogegen Verunreinigungen in den darauf folgenden Waschschrinen beseitigt werden. Die DNA konnte mit 100-150 µl dH₂O eluiert und ihre Konzentration auf einem Shimadzu UV1202 Photometer gemessen werden.

2.2.3.7 Sequenzierung

Die Sequenzierreaktion basiert auf dem Prinzip, dass fluoreszierende Desoxynukleotide die Kettenverlängerung terminieren¹⁶⁵ und die jeweilige Basenposition sichtbar machen. Zum Erhalt der vollständigen Nukleotidfolge wurden vier Primer verwendet, die an unterschiedlichen Stellen des Genoms ansetzten (Tab. 4, Abb. 10). Dies wurde notwendig, da die komplette Gensequenz von ca. 1500 bp technisch nicht in einem Schritt zu sequenzieren war. Es wurde folgender Ansatz und entsprechendes Thermocycler-Programm verwendet (Tab. 8):

Tab. 8: Protokoll zur Sequenzierreaktion.

Sequenzier-Ansatz		Thermocycler-Profil		
Substrat	Menge (µl)	Schritt	Temp (°C)	Zeit
DNA (150-300 ng)	x(1-6)	Initiale Denaturierung	96 °C	2 min
Primer (5 mM)	1	Denaturierung	96 °C	15 s
5x ABI-Puffer	1	Annealing	55 °C	5 s
Big Dye 3.1	2	Extension	60 °C	4min
H2O	x(0-5)			
Total	10			

Anschließend konnten die PCR-Produkte im Sequenzierlabor des RKI mittels Kapillarelektrophorese auf einem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer ausgewertet werden.

2.2.3.8 Computergestützte Nachbearbeitung der Sequenzierergebnisse

Zum Alignment und zur Analyse der Sequenzen kam das Programm BioEdit[®] zum Einsatz, eine *Software* zur Sequenzanalyse. Bioedit ist eine *Freeware* und kann von der Webseite Tom Hall's Department der North Carolina University heruntergeladen werden: [URL:http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/)¹⁶⁶.

Mit Hilfe eines im Internet frei zugänglichen Programms (epitope2.immuneepitope.org/analyse/html/mhc_binding.html) können jene Aminosäuresequenzbereiche ermittelt werden, die gewisse Motive und ein bestimmtes Bindungsverhalten aufweisen und somit theoretisch als CTL-Epitop in Frage kommen. In die Suchmaske lässt sich die individuelle HIV-Genomsequenz jedes Klonen einfügen und in Hinblick auf potentielle HLA-assoziierte Epitope analysieren. Dabei bestimmt das Programm auch die Bindungsaffinität jedes errechneten Epitops. Mittels eines am Computer erstellten Makros konnten diese Daten graphisch dargestellt werden (s.u.). Die verschiedenen

Grautöne spiegeln die Bindungsstärke dieses Epitops an das MHC-Molekül wider (dunkel = starke Bindung, hell = schwächere Bindung). Ebenso wird in der Graphik mittels vertikaler Balken die Häufigkeit der Variationen in den jeweiligen Bereichen visualisiert. Somit kann quantitativ dargestellt werden, welche AS-Positionen stärker konserviert sind als andere.

2.2.4 Statistische Auswertung

Um die erhobenen Daten objektiv und eindeutig beurteilen zu können, wurde eine statistische Auswertung durchgeführt. Als Grundlage dienten die computergestützt errechneten Epitoppositionen (siehe 2.2.3.8). Ziel war es, eine eventuell erhöhte Variabilität von Aminosäuren innerhalb eines Epitops für jede Patientenprobe und die unterschiedlichen HLA-Typen rechnerisch zu ermitteln.

Hierzu erfolgte nachstehende Analyse (siehe Tab.9): Zunächst wurde die Anzahl der Aminosäuren (#AA) eines jeden Proteins bzw. Proteinanteils (Vif, Vpr, Vpu, Tat Exon 1, Rev Exon 1) in den einzelnen Patientenproben bestimmt. Für jede dieser 95 Sequenzen erfolgte die Auszählung variabler Positionen (#Var) der Patientenklone untereinander. Für die einzelnen MHC-Haplotypen wurde die Anzahl der AS, die innerhalb der HLA-restringierten Epitope lagen (#CTL), sowie die Zahl der AS, die sowohl variabel waren als auch innerhalb dieser CTL-Epitope lagen (#VarCTL), rechnerisch ermittelt.

Die Anzahl variabler Aminosäuren, die aufgrund zufälliger Verteilung innerhalb eines CTL-Epitops zu erwarten waren (#Exp), wurde folgendermaßen errechnet:

$$\# Exp = \frac{\# CTL}{\# AA} * \# Var$$

Das Ergebnis konnte nun mit der tatsächlichen Anzahl von variablen Aminosäuren innerhalb der zu erwartenden CTL-Epitope verglichen werden. Korrigiert in Bezug auf die Proteingröße ergab sich ein Verhältnis von erwarteter zu tatsächlicher CTL-Variabilität wie folgt:

$$CTLVarRat = \frac{\#VarCTL - \#Exp}{\#AA}$$

Werte für CTLVarRat > 0 weisen auf eine höhere Variabilität innerhalb der vorhergesagten CTL-Epitope hin, als es bei zufälliger Verteilung zu erwarten wäre.

Tab. 9: Beispiel der Datensammlung zur statistischen Auswertung. Vpu, HLA-A*0201. # = Anzahl, AA = Aminosäure, Var = Variabilität, Exp = Expected (dt.: erwartet), Ratio (dt.: Verhältnis).

Gen	Patient	#AA	#CTL	#Var	#VarCTL	#Exp	CTL/Var-Ratio
Vpu	Pat 12-1	81	51	13	12	8	0,05
Vpu	Pat 14-1	81	39	10	8	5	0,04
Vpu	Pat 2920	80	45	1	0	1	-0,01
Vpu	Pat 244	81	53	5	4	3	0,01
Vpu	Pat 175	83	46	5	3	3	0,00
Vpu	Pat 334	82	42	4	1	2	-0,01
Vpu	Pat 030	82	58	3	3	2	0,01
Vpu	Pat 239	81	51	8	4	5	-0,01

In einem letzten Schritt wurden die CTLVarRat-Werte in Abhängigkeit vom Vorliegen des entsprechenden MHC-Haplotyps des Patienten analysiert. In Variation der Gruppen (siehe unten) wurden die Daten anschließend mittels t-Test gegenübergestellt, um zu ermitteln, ob eine statistisch signifikante Häufung von Variabilität innerhalb von vorhergesagten CTL-Epitopen unter Berücksichtigung des MHC-Haplotyps des Patienten besteht. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ festgelegt. Die Nullhypothese nahm einen fehlenden Unterschied zwischen den unverbundenen Gruppen an.

Es wurden insgesamt fünf unterschiedliche, unabhängige Gruppen im t-Test gegenübergestellt. Die Gruppenpaare waren wie folgt:

1. n_1 = CTLVarRat aller Proteine der einzelnen MHC-positiven Patientenproben;
 n_2 = CTLVarRat aller Proteine der einzelnen MHC-negativen Patientenproben.

2. n_1 = CTLVarRat aller Proteine der einzelnen MHC-positiven, akut serokonvertierten Patientenproben; n_2 = CTLVarRat aller Proteine der einzelnen MHC-negativen, akut serokonvertierten Patientenproben.
3. n_1 = CTLVarRat aller Proteine der einzelnen MHC-positiven, langzeitinfizierten Patientenproben; n_2 = CTLVarRat aller Proteine der einzelnen MHC-negativen, langzeitinfizierten Patientenproben.
4. n_1 = CTLVarRat der eines jeden Proteins der einzelnen MHC-positiven Patientenproben; n_2 = CTLVarRat eines jeden Proteins der einzelnen MHC-negativen Patientenproben.
5. n_1 = CTLVarRat aller Proteine von allen MHC-positiven Patientenproben; n_2 = CTLVarRat aller Proteine von allen MHC-negativen Patientenproben.

Außerdem erfolgte die Analyse der einzelnen Patientensequenzen unter Berücksichtigung aller individueller HLA-Haplotypen. Hierzu wurden die experimentell nachgewiesenen CTL-Epitope herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten- und Probeninformationen

Von der gesamten LTNP-Studienkohorte (derzeit 80 Patienten, Stand 2007) wurden 12 Blutproben von 10 verschiedenen Patienten im Detail untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Analyse von sieben Serumproben von akut Serokonvertierten (SK), die von der Arbeitsgruppe Dr. C. Kücherer, RKI, zur Verfügung gestellt wurden. Die Proben von Patient HIV 6, der formal aus der LTNP-Kohorte stammt, wurden aufgrund des Serokonverter-Status (drei Monate nach Infektion) in der Analyse den SK zugerechnet.

3.2 HLA-A-Typisierung

Bei einem Teil der Patientenkohorte, war die HLA-A-Typisierung bereits von Dr. J. Richardt, RKI, durchgeführt worden. Informationen zum HLA-B-Typ der Patienten stammen ebenfalls aus diesen Untersuchungen. Davon wurden fünf Patienten mit und zwei ohne einem HLA-A2-Allel ausgewählt. Weitere Patienten aus der Studienkohorte sowie alle verwendeten Patientenproben der Serokonverterstudie wurden in Bezug auf den HLA-A-Typ untersucht. Die Analyse ergab eine Positivität für das HLA-A2-Allel in sechs (zwei LTNP plus vier SK) von zehn Patienten. Dies übersteigt die angegebene A2-Allelpräsenz in Europa, die mit 30% angegeben wird ¹⁶⁷, was bei der geringen Fallzahl aber allein mit der natürlichen Verteilung erklärt werden kann.

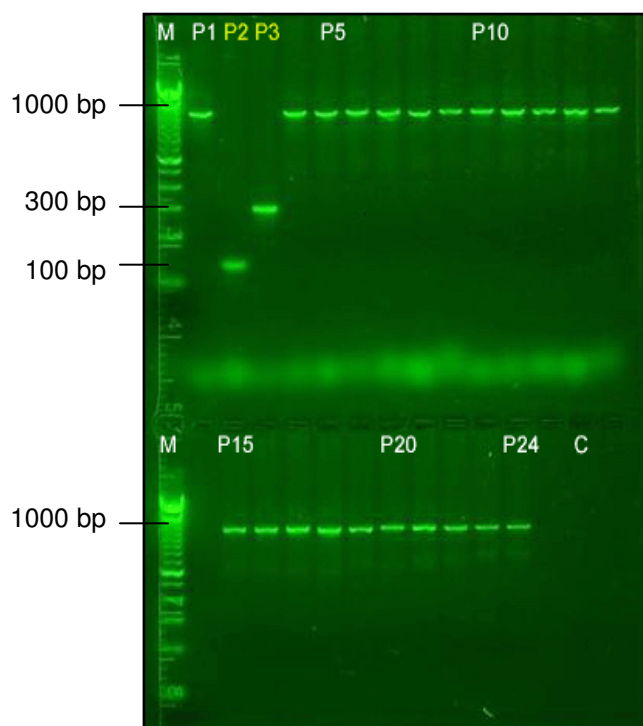


Abb. 11: HLA-Typisierung des Pat. 2920. Spezifische Banden bei 130 bp bzw. 300 bp in Gelspur P2 und P3. Alle weiteren Positionen zeigen die Kontrollbande bei etwa 1000 bp. Dies ergibt den HLA-A-Typ A2, A3. M = Marker/100bp DNA-Leiter; P1-P24 = HLA-Typ-spezifische Primer; C = Control (Negativkontrolle).

Wie unter 2.4. beschrieben kam zur HLA-A-Typisierung der Patienten das Biotest HLA-A SSP Kit zum Einsatz. Als Beispiel einer solchen PCR-gesteuerten Typisierung sei hier das Agarosegel von Pat. 2920 dargestellt (Abb. 11). Pat. 2920 trägt den HLA-A-Typ A2, A3.

Die Studie konzentrierte sich auf 11 HLA-A2-positive (A2⁺) und sechs HLA-A2-negative (A2⁻) Patienten (Tab. 9):

Tab. 10: a) HLA-Typen der LTNP-Kohorte b) HLA-Typen der SK-Kohorte. n.k. = not known (dt.: unbekannt).

a)

Patient	Anzahl der Klone	HLA-Haplotyp			
HIV 3-2	9	A2	A32	B7	B40
HIV 5-2	13	A2	A25	B18	-
HIV 6-0	10	A2	A29	B40	B44
HIV 6-1	10	A2	A29	B40	B44
HIV 7-1	10	A2	A24	n.k.	n.k.
HIV 12-1	8	A2	A1	n.k.	n.k.
HIV 20-0	12	A2	A3	B15	B44
HIV 36-1	13	A2	A33	B39	B51
HIV 36-2	8	A2	A33	B39	B51
HIV 9-1	8	A3	A11	B44	-
HIV 14-1	10	A68	-	n.k.	n.k.
HIV 32-1	12	A24	A32	B14	B35

b)

Patient	Anzahl der Klone	HLA-Haplotyp	
Pat. 030	8	A2	-
Pat. 239	8	A2	A3
Pat. 244	7	A2	A1 / A36
Pat. 2920	8	A2	A3
Pat. 175	8	A11	A24
Pat. 232	8	A24	A26
Pat. 334	11	A24	A29

3.3 Sequenzanalyse

Für die Sequenzanalyse des HIV-Genomabschnitts *vpr-vpu*, bp 5041-6310 (HXB2) wurde zunächst die RT-PCR mit der aus dem Plasma isolierten HIV-RNA durchgeführt. Trotz teilweise wiederholter Versuche konnte in einigen Fällen eine Amplifikation nicht gelingen. Zahlreiche Gründe dafür sind denkbar: Neben Geräte- und Materialfehlern kann es zu einer Verunreinigung mit RNasen gekommen sein. Auch ist es möglich, dass die Viruslast im Plasma zu niedrig war. Auf Letzteres weist hin, dass die RT-PCR in den Proben der SK mit bekanntlich hoher Viruslast ausgesprochen zuverlässig gelang. Auch die Klonierung des etwa 1500 bp langen Transkriptes erwies sich gele-

gentlich als schwierig, und mehrere Versuche waren nötig, um die gewünschte Zahl von etwa zehn Klonen pro Patientenprobe zu erhalten. Trotz Verwendung des Topo TA Cloning® Kits, das für große zu transformierende Transkripte vorgesehen ist, könnten die Schwierigkeiten auf die Länge des Genomabschnittes zurückzuführen sein.

Tabelle 10 zeigt eine Übersicht über die Anzahl der RT-PCR-Ansätze im Verhältnis zu den erfolgreichen Amplifikationen sowie dem von positiv befundenen Bakterienkolonien zu allen untersuchten Kolonien und die letztendliche Anzahl vollständig sequenzierter HIV-Klone für jede Patientenprobe (Tab. 10).

Tab. 11: Überblick über die Anzahl durchgeführter Versuche und positiver Ergebnisse.

Patient	Verhältnis von erfolg-reichen Amplifikationen zu RT-PCR Ansätzen	Verhältnis von positiv gescreenten zu gescreenten Bakterienkolonien	Vollständig sequenzierte HIV-Klone
HIV 3-2	1 / 7	15 / 15	09
HIV 5-2	2 / 4	23 / 50	13
HIV 6-0	1 / 1	11 / 40	10
HIV 6-1	1 / 5	18 / 95	10
HIV 7-1	1 / 3	14 / 40	10
HIV 9-1	4 / 6	08 / 08	08
HIV 12-1	1 / 2	15 / 15	08
HIV 14-1	1 / 1	16 / 25	10
HIV 20-0	1 / 2	15 / 25	12
HIV 32-1	1 / 1	19 / 30	12
HIV 36-1	1 / 2	15 / 35	13
HIV 36-2	1 / 5	10 / 15	08
Pat. 030	1 / 1	34 / 70	08
Pat. 175	3 / 3	13 / 35	08
Pat. 232	2 / 3	12 / 60	08
Pat. 239	1 / 2	14 / 15	08
Pat. 244	1 / 1	08 / 67	07
Pat. 334	1 / 1	17 / 25	11
Pat. 2920	1 / 3	15 / 30	08

Eine TOPO-Klonierung war aus folgendem Grund notwendig: Erfolgt nach durchgeführter Amplifikation direkt im Anschluss die Sequenzierung, so zeigt sich in der Einzelanalyse an einigen Positionen der DNA eine Doppelrepräsentanz von Nukleotiden, die auf das Vorliegen nebeneinander existierender Subpopulationen (Quasispezies) von HI-Viren hinweist. Als Beispiel ist hier ein Ausschnitt aus der HIV-Nukleotidsequenz bei Patient 12 aufgeführt (Abb. 12). Zu achten ist auf Nukleotidposition 148, 155, 156 mit einer Doppelrepräsentanz von G und A.

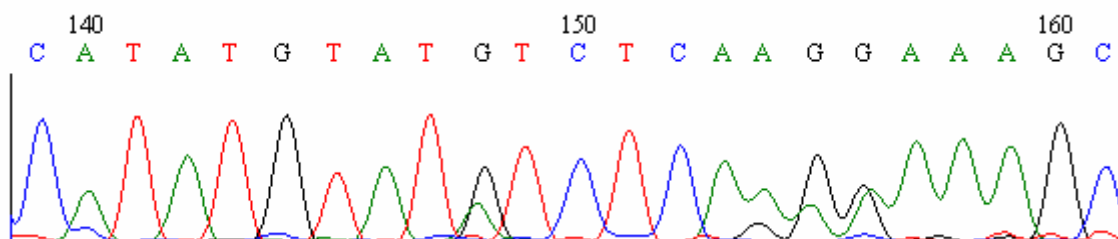


Abb. 12: Nukleotidsequenz von HIV 12-1, *vif*, bp 82-104. Hier erfolgte die Sequenzierung direkt nach der RT-PCR mit Plasma-RNA. Zu achten ist auf die Doppelrepräsentanz von G und A an Position 148, 155 und 156.

Um die individuellen Sequenzen der vorhandenen Virengruppen zu analysieren, musste eine TOPO-Klonierung durchgeführt werden, die die Doppelrepräsentanzen auflöst (Abb. 13).

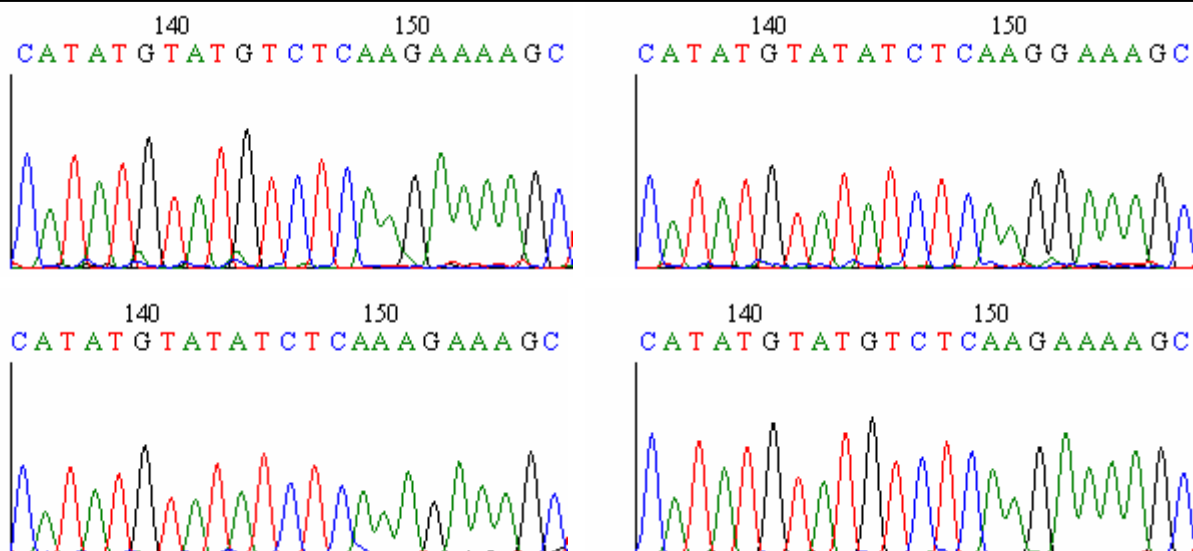


Abb. 13: Nukleotidsequenzen von HIV 12-1, *vif*, bp 82-104. Sequenzierung erfolgte nach TOPO-Klonierung. Die Sequenzen zeigen entweder A oder G in den in Abb. 12 sichtbaren Positionen mit Doppelrepräsentanzen und stehen für jeweils eine Quasispezies des HIV-1 in Patient HIV 12.

3.3.1 Vif

Das HIV-1-Gen *vif* konnte bei 180 Klonen von 19 unterschiedlichen Patientenproben (17 Pat.) vollständig und bei drei Klonen (zwei Pat.) unvollständig sequenziert werden.

Die derzeit auf dem Protein Vif beschriebenen CTL-Epitope für die einzelnen HLA-Haplotypen sind in Abbildung 14 markiert (Abb. 14). Sie stellt eine Zusammenfassung aller experimentell nachgewiesener und veröffentlichter CTL-Epitope dar.

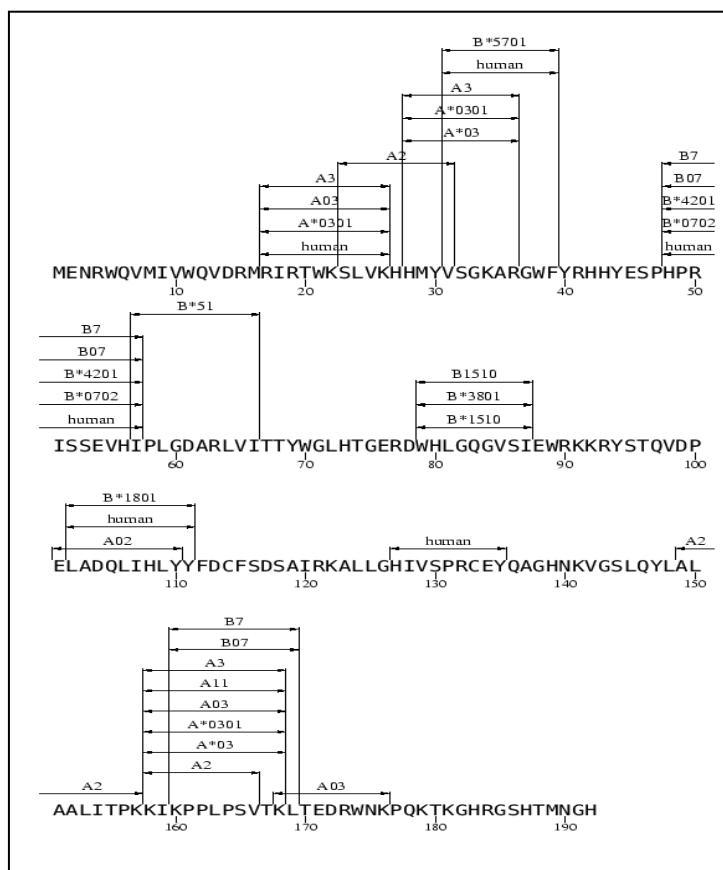


Abb. 14: Vif, CTL-Epitop-Map (dt.: Karte). Die bisher nachgewiesenen Epitope werden hier in der Position auf HXB2 angegeben (Stand 2005).

Abbildung 15 zeigt einen Ausschnitt aus der Aminosäurefolge (AS 98-180) des Vif-Proteins (Abb. 15). Die CTL-Epitope der relevanten HLA-Typen sind farblich markiert. Die komplette Darstellung befindet sich im Anhang (Abb. 39).

Die Vif-Proteine der 180 Virusisolate, die aus je etwa 193 AS bestehen, weisen eine ausgesprochene Variabilität auf. Die CTL-Epitope der verschiedenen HLA-Typen liegen in Clustern relativ eng nebeneinander. Wenn man diese Abschnitte genauer betrachtet, fällt eine größere Diversität in eben diesen Bereichen auf, die jedoch nicht streng auf die Epitope begrenzt ist. Dies könnte darauf hinweisen, dass nicht nur die beschriebenen Epitope bei der Erkennung durch die CTL eine Rolle spielen, sondern auch die direkt angrenzenden Strukturen^{121, 122}.

Die Diversität der HIV-Klone von Patient HIV 32-1 zeigt Abbildung 16 (Abb. 16). Die im oberen Bildabschnitt dargestellten vertikalen Balken spiegeln die Variabilität an der jeweiligen Position der Proteinsequenz wider. Die darunter angeordneten horizontalen Balken stellen die computertechnisch errechneten CTL-Epitope dar (in diesem Fall HLA-A*2403), wobei anhand der Grautöne die Bindungsstärke an das MHC-Molekül

kenntlich gemacht ist. Auffallend ist die ausgesprochene Variabilität im Bereich des zweiten Epitop-Clusters (AS 29-51) sowie im Anfangsbereich des Proteins (AS 7), wo ebenfalls ein Epitop liegt.

Auffällig ist außerdem: In Position 125 des Vif-Proteins findet sich in fast allen Sequenzen ein I statt dem L in der HXB2-Sequenz. Nur die Probe von Pat. 344 weist in allen Klonen die mit der Konsensussequenz übereinstimmende AS auf. Während sich der Großteil der Klone aus der Kohorte der LTNP mit geringen Variationen einheitlich zeigt, fallen bei Patient HIV 9-1 und HIV 12-1 viele Quasispezies und einzelne Aminosäureveränderungen auf. In der SK-Gruppe treten insgesamt eine größere Differenz zur HXB2-Sequenz sowie eine breitere Variabilität hervor als in der LTNP-Kohorte. Es stehen durchschnittlich 23 AS-Austausche bei den SK, 17 bei den LTNP gegenüber.

Pat 32-1 - Vif - A*2403

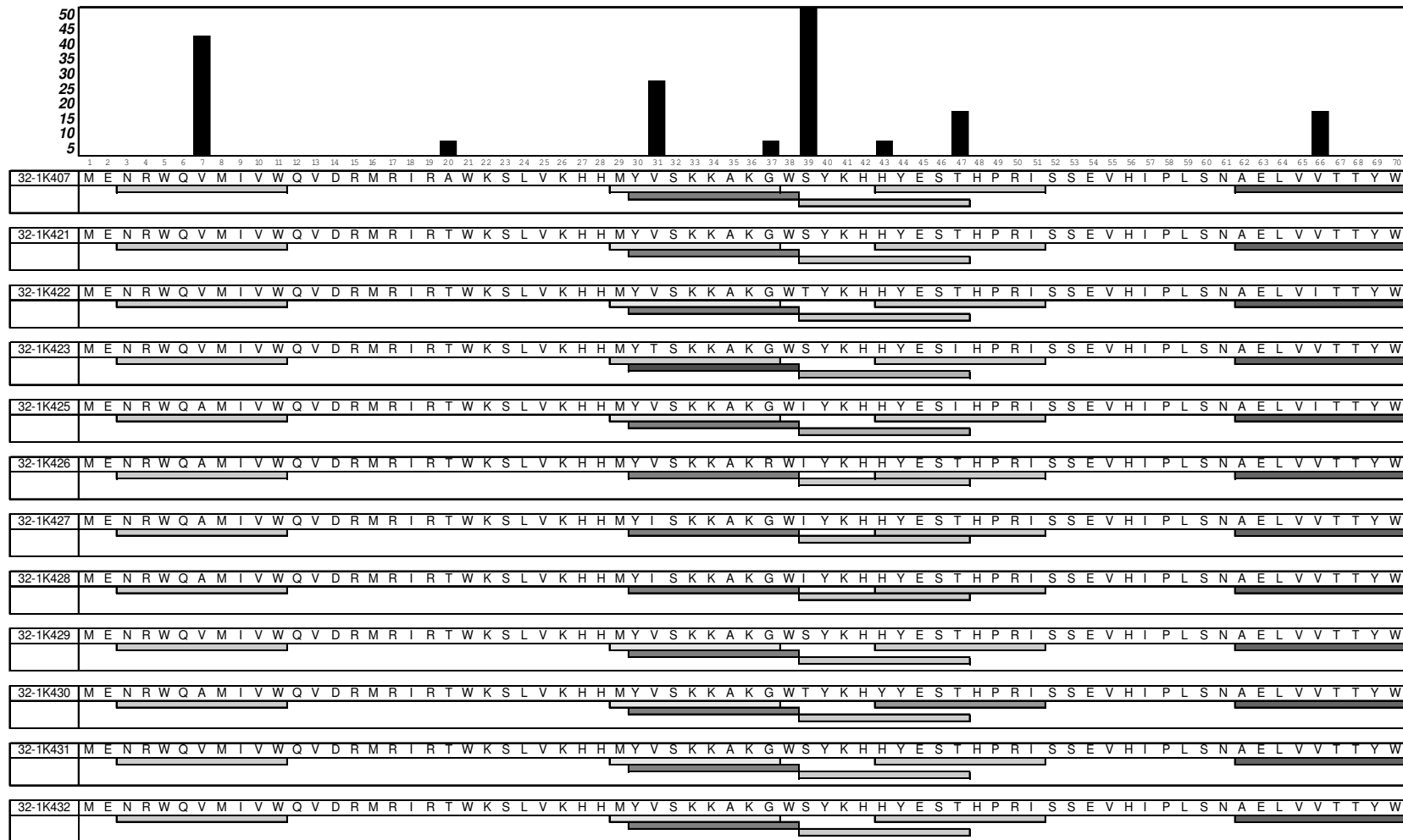


Abb. 16: Ausschnitt aus der Aminosäurefolge des Vif-Proteins der HIV-Klone des Patienten HIV 32-1. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA A*2403-restringierte CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. K=Klon.

3.3.2 Vpr

Das Gen *vpr* konnte bei 183 Klonen von 19 unterschiedlichen Patientenproben (17 Pat.) vollständig und bei einem Klon unvollständig sequenziert werden.

Die derzeit auf dem Protein Vpr beschriebenen CTL-Epitope für die einzelnen HLA-Haplotypen sind in folgender Grafik (Abb. 17) markiert. Sie stellt eine Zusammenfassung aller experimentell nachgewiesener und veröffentlichter CTL-Epitope dar.

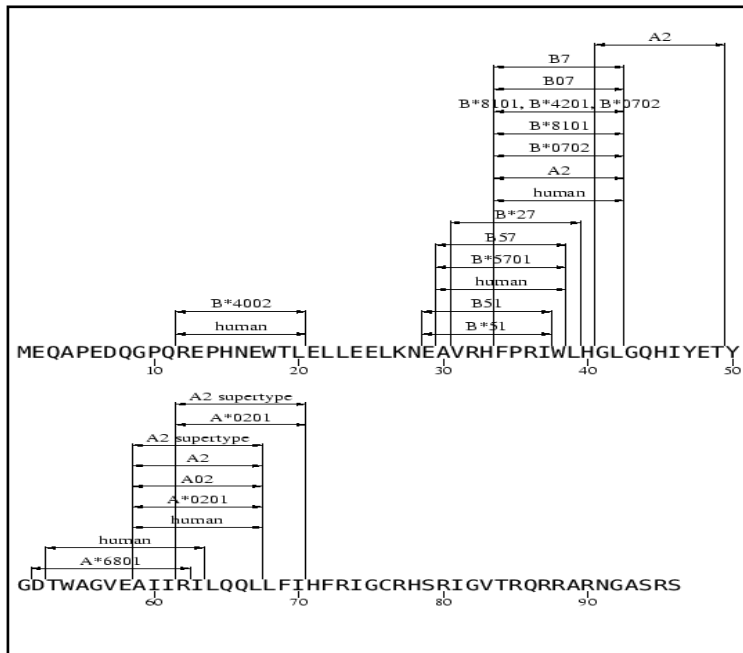


Abb. 17: Vpr, CTL-Epitop-Map (dt.: Karte). Die bisher nachgewiesenen Epitope werden hier in der Position auf HXB2 angegeben (Stand 2005).

Von diesen auf dem HXB2-Genom beschriebenen Epitopen gibt es in den hier untersuchten Patienten multiple genetische Unterschiede, von denen einige mit einem Aminosäureaustausch verbunden sind. Hier sei als Beispiel bp 5649-5708 (HXB2) bei Pat. 030 dargestellt (Abb. 18), ein Abschnitt, der ein CTL-Epitop für HLA-A2 enthält. An Position 37 stimmt Pat. 030 als einzige

der untersuchten Proben mit HXB2 überein. Das Serin an Position 1 des Epitops (Position 41) ist eine Variante, die in HLA-A2-Positiven auffallend häufiger vertreten ist, als in HLA-A2-Negativen. In Ersteren liegt sie bei 35,4 % vor, während sie bei Letzteren nur in 17,5 % der Fälle vertreten ist.

	90	100	110	120	130	140	150
HXB2vpr	GT T AGACATT	TTCCTAGGAT	TTGGCTCCAT	GGCTTAGGGC	AACATATCTA	TGAAACTTAT	
030K520vpr	GT C AGACATT	TC C CTAGGAT	ATGGCT T CAT	A GCTTAGGAC	AACATATCTA	TG A ACTTAT	
030K567vpr	GT C AGACATT	TC C CTAGGAT	ATGGCT T CAT	A GCTTAGGAC	AACATATCTA	TG A ACTTAT	
030K638vpr	GT C AGACATT	TC C CTAGGAT	ATGGCT T CAT	A GCTTAGGAC	AACATATCTA	TG A ACTTAT	
030K641vpr	GT C AGACATT	TC C CTAGGAT	ATGGCT T CAT	A GCTTAGGAC	AACATATCTA	TG A ACTTAT	
030K668vpr	GT C AGACATT	TC C CTAGGAT	ATGGCT T CAT	A GCTTAGGAC	AACATATCTA	TG A ACTTAT	
030K672vpr	GT C AGACATT	TC C CTAGGAT	ATGGCT T CAT	A GCTTAGGAC	AACATATCTA	TG A ACTTAT	
030K674vpr	GT C AGACATT	TC C CTAGGAT	ATGGCT T CAT	A GCTTAGGAC	AACATATCTA	TG A ACTTAT	
030K676vpr	GT C AGACATT	TC C CTAGGAT	ATGGCT T CAT	A GCTTAGGAC	AACATATCTA	TG A ACTTAT	

	30	40	50
HXB2vpr	V R H F P R I W L H	G L G Q H I Y E T Y	
030K520vpr	V R H F P R I W L H	S L G Q H I Y E T Y	
030K567vpr	V R H F P R I W L H	S L G Q H I Y E T Y	
030K638vpr	V R H F P R I W L H	S L G Q H I Y E T Y	
030K641vpr	V R H F P R I W L H	S L G Q H I Y E T Y	
030K668vpr	V R H F P R I W L H	S L G Q H I Y E T Y	
030K672vpr	V R H F P R I W L H	S L G Q H I Y E T Y	
030K674vpr	V R H F P R I W L H	S L G Q H I Y E T Y	
030K676vpr	V R H F P R I W L H	S L G Q H I Y E T Y	

Abb. 18: Ausschnitt aus der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Pat. 030, *vpr/Vpr*, bp 5649-5708 (HXB2). Mit Rot sind jene Nukleotidveränderungen gekennzeichnet, die zu einem AS-Austausch führen (ebenfalls Rot). Die Farbe Grün zeigt stumme Mutationen. Schwarz umrahmt ist das HLA-A2-CTL-Epitop. K = Klon (z.B.: K520 = Klon 520).

Die folgende Tabelle zeigt einen Ausschnitt aus der Aminosäurefolge des Vpr-Proteins (Abb. 19). Die CTL-Epitope der entsprechenden HLA-Typen sind farbig markiert. Die komplette Darstellung befindet sich im Anhang (Abb. 40). Zu bemerken ist eine besondere Verteilung der Mutationen im HLA-A2-Epitop IV: Eine vollständige Übereinstimmung der Epitopsequenz mit HXB2 findet sich bei Berücksichtigung aller HLA-A2-Positiver (LTNP und SK) in 47 % der Klone (Zweitproben nicht eingeschlossen, d.h. HIV 6-1 und HIV 36-2). Unter HLA-A2-Negativen ist sie mit 88 % vertreten. Trennt man nun die Kohorten der SK und LTNP ergibt sich Folgendes: Die HXB2-Sequenz in HLA-A2⁺ LTNP macht nur 22 % aus, in HLA-A2⁻ LTNP dagegen 87 %.

VPR

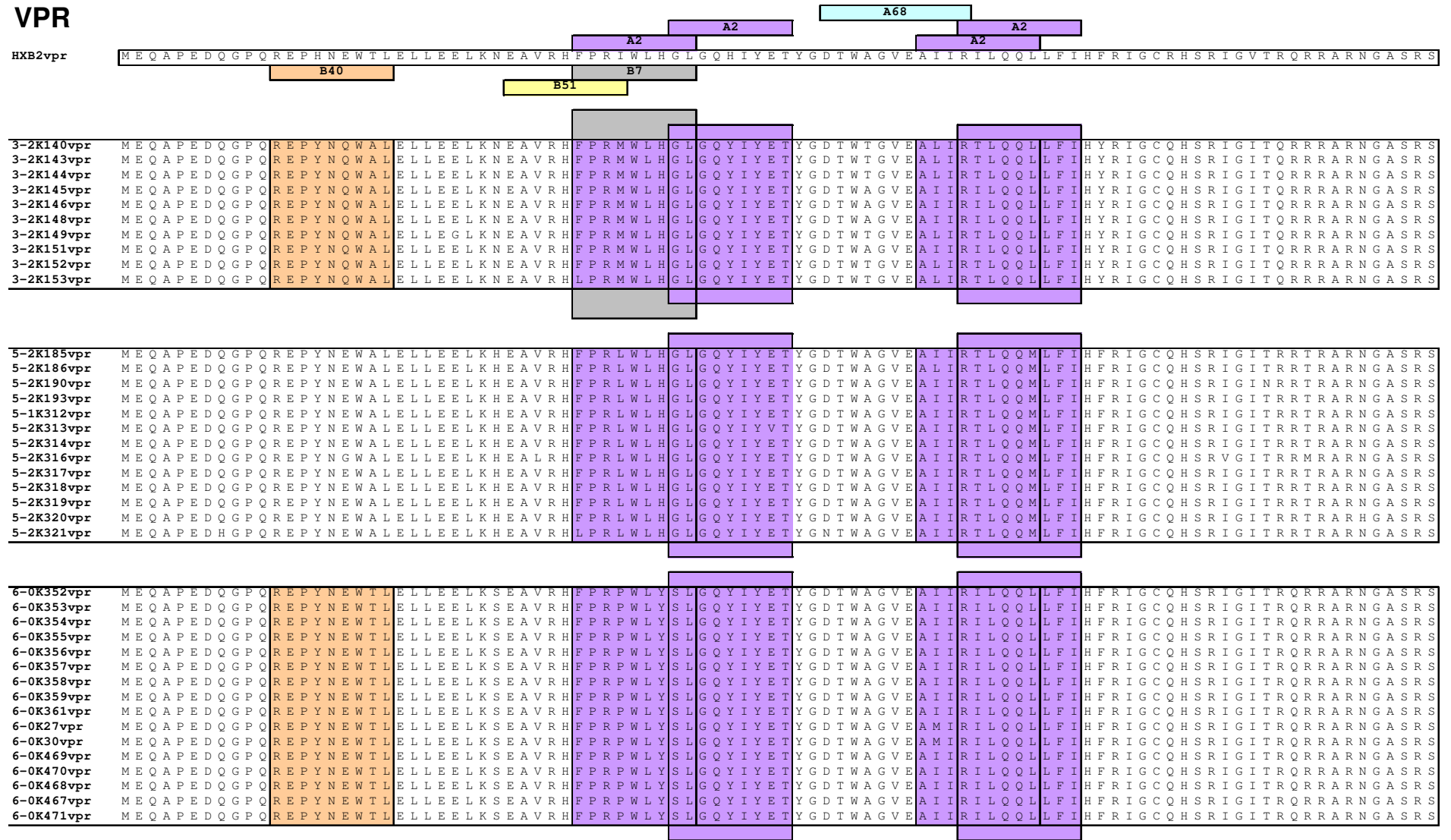


Abb. 19: Ausschnitt aus den Aminosäuresequenzen von HIV 3-2, 5-2, 6-0, Vpr, AS 1-72. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

Bei den SK zeigt sich diese eindeutige Verteilung nicht: Eine vollständige Übereinstimmung mit der Konsensussequenz bei den HLA-A2-Positiven liegt in 80,4 % der Klone vor, bei den HLA-A2-Negativen in 88,9 %. Diese Daten, die eine erhöhte Variabilität des HLA-A2-CTL-Epitops in den Isolaten von A2⁺ Patienten gegenüber den A2⁻ nachweisen, könnten auf die Existenz spezifischer CTL hindeuten, die diese Varianten provoziert haben. Eine Untersuchung auf zellulärer Ebene wäre hier sehr interessant.

Im gesamten *vpr*-Gen stimmt die HXB2-Nukleotidsequenz an vielen Stellen nicht mit den HIV-Isolaten überein. An bp 5772 vollzieht sich in der Kontrollsequenz durch Insertion von T ein Frameshift, der zu einer Verschiebung der Nukleotid-Triplets und im weiteren Verlauf zum vorzeitigen Auftreten eines Stop-Codons führt. Das vorzeitige Ende (engl.: *premature end*) von HXB2-Vpr nach dem Basentriplet TAG an bp 5793-5795 bildet somit ein Protein von 78 AS. Das „eigentliche“ Ende des Proteins liegt bei den meisten HIV-Spezies bei bp 5850 bzw. AS 96. Ein vorzeitiges Ende von Vpr, wie es HXB2 aufweist, ist *in vivo* unwahrscheinlich. Vermutlich konnte es nur in Zellkultur entstehen, unter deren Bedingungen das akzessorische Protein entbehrlich ist. Die Insertion wurde hier zum besseren Vergleich korrigiert.

Die absolute Länge von Vpr ist leicht variabel. So zeigt Pat. 175 eine Verkürzung von 96 auf 94 AS. Insgesamt fällt eine starke Einheitlichkeit der Klone innerhalb der Patienten auf. Es präsentieren sich nur wenige Quasispezies. Position 15 ist im Vergleich zu HXB2, das dort ein H aufweist, bei allen untersuchten Viren durchgehend mit Y besetzt. Innerhalb der ersten zwei HLA-A2-Epitope (AS 34-49) sind Position 37, 41 und 45 häufig verändert, die übrigen Bereiche der Epitope zeigen – abgesehen von HIV 6-0 an Position 40 und Pat. 334 an Position 36 – nur punktuelle Aminosäurevarianten.

Hinzuweisen ist auf die AS an Position 60. HXB2 trägt hier ein I, einige Patientenviren (HIV 14-1, HIV 20-0, HIV 3-2) weisen hier aber ein L auf. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Altfeld et al. zeigte, dass nur für die Epitop-Variation mit L spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten gebildet werden¹⁸³ (siehe Diskussion).

Von zehn LTNP-HIV-Isolaten in dieser Studie zeigen nur drei (HIV 7-1, HIV 9-1, HIV 12-1) ein Arginin an Position 77 in Vpr. Arginin an dieser Position scheint entscheidend für die Fähigkeit des Proteins zur Apoptoseinduktion zu sein¹⁶⁸ (siehe Diskussion). Außerdem weisen die 184 Klone dieser Studie ausnahmslos Leucin an Position 64 auf. Eine

Mutation von L64 soll die pro-apoptotische Aktivität von Vpr verstärken ¹⁶⁹ (siehe Diskussion).

3.3.3 Vpu

Das Gen *vpu* konnte bei 182 Klonen von 17 unterschiedlichen Patienten vollständig und bei einem Klon unvollständig sequenziert werden.

Die derzeit auf dem Protein Vpu beschriebenen CTL-Epitope für die einzelnen HLA-Haplotypen sind in folgender Grafik markiert (Abb. 20). Sie stellt eine Zusammenfassung aller experimentell nachgewiesener und veröffentlichter CTL-Epitope dar – bisher noch nicht so zahlreich wie bei den anderen Proteinen.



Abb. 20: Vpr, CTL-Epitop-Map (dt.: Karte). Die bisher nachgewiesenen Epitope werden hier in der Position auf HXB2 angegeben (Stand 2005).

Hier sei als Beispiel bp 6095–6151 bei Pat. 20-0 dargestellt, ein Abschnitt, der ein CTL-Epitop für HLA-A2 enthält (Abb. 21). An Position 16-18 innerhalb des CTL-Epitops weist HIV 20-0 im Vergleich zu HXB2 drei AS-Unterschiede in Folge auf.

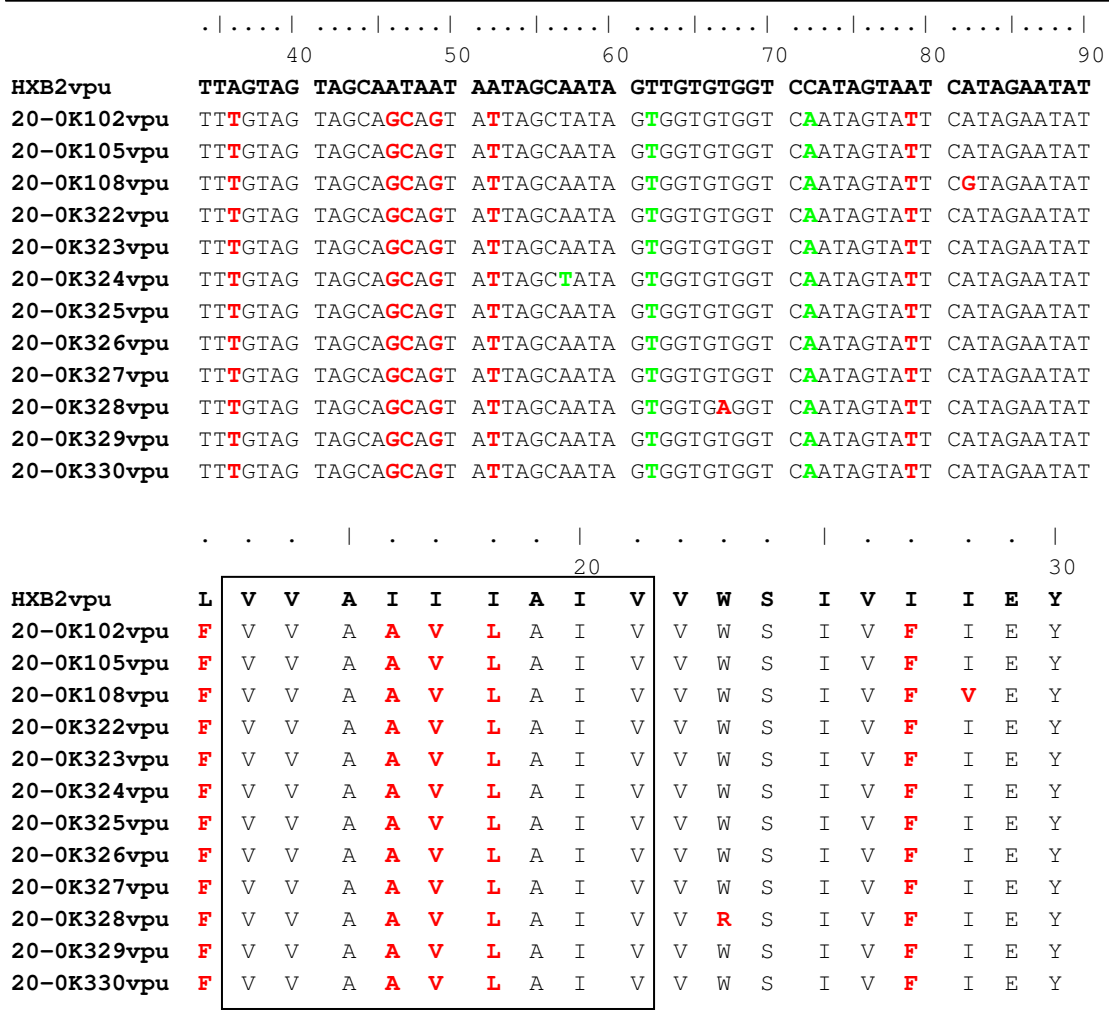


Abb. 21: Ausschnitt aus der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von HIV 20-0, vpu/Vpu, bp 6095-6151 (HXB2). Mit Rot sind jene Nukleotidveränderungen gekennzeichnet, die zu einem AS-Austausch führen (ebenfalls Rot). Die Farbe Grün zeigt stumme Mutationen. Schwarz umrahmt ist das HLA-A2-CTL-Epitop. K = Klon (z.B.: K102 = Klon 102).

Abbildung 22 zeigt einen Ausschnitt aus der Aminosäurefolge des Vpu-Proteins. Die CTL-Epitope der entsprechenden HLA-Typen sind farbig markiert. Die komplette Darstellung befindet sich im Anhang (Abb. 41).

Die Kohorte weist in der Vpu-Sequenz der HIV-Isolate starke Längenunterschiede auf. Das Protein ist in den untersuchten Proben zwischen 78 und 85 AS lang, während das von HXB2 mit einer Länge von 82 AS angegeben wird. Deletionen zeigen sich dabei nur im hinteren Bereich des Proteins – der Region, in der bisher keine Epitope bekannt sind. Sie treten, abgesehen von Pat. 030 und Pat. 334, in allen Proben auf und umfas-

sen 1-4 AS. Eine Ausnahme bildet HIV 7-1, hier zeigt das Vpu-Protein zusätzlich zu einer 1 AS-Deletion am Ende des Proteins eine Insertion von 3 AS im Anfangsbereich.

VPU

HXB2vpu

		A2										A33					
		T ~ ~ ~ Q P I P I V A I V A L V V A I I I A I V V W S I V I I E Y R K I L R Q R K															
		B7															

3-2K143vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	I	A	I	V	A	L	V	V	V	A	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	I	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
3-2K144vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	I	A	I	V	A	L	V	V	V	A	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	I	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
3-2K145vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	I	A	I	V	A	L	V	V	V	A	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	I	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
3-2K148vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	I	A	I	V	A	L	V	V	V	A	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
3-2K149vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	I	A	I	V	A	L	V	V	V	A	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	I	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
3-2K151vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	I	A	I	V	A	L	V	V	V	A	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	I	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
3-2K152vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	I	A	I	V	A	L	V	V	V	A	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	I	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
3-2K153vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	I	A	I	V	A	L	V	V	V	A	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	I	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
3-2K140vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	I	A	I	V	A	L	V	V	V	A	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	I	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
3-2K146vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	I	A	I	V	A	L	V	V	V	A	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	I	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R

5-2K185vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	A	A	I	V	A	L	V	I	V	T	I	L	A	I	A	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
5-2K186vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	A	A	I	V	A	L	V	I	V	T	I	L	A	I	A	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
5-2K190vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	A	A	I	V	A	L	V	I	V	T	I	L	A	I	A	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
5-2K193vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	T	A	I	V	A	L	V	I	V	T	I	L	A	I	A	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
5-1K312vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	A	A	I	V	A	L	V	V	V	T	I	L	A	I	A	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
5-2K313vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	A	A	I	V	A	L	V	I	V	T	I	L	A	I	A	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
5-2K314vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	V	A	A	I	V	A	L	V	I	V	T	L	L	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
5-2K316vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	A	A	I	V	A	L	V	V	G	T	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
5-2K317vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	A	A	I	V	A	L	V	V	V	T	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
5-2K318vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	T	A	I	V	A	L	V	I	V	T	I	L	A	I	A	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
5-2K319vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	V	A	A	I	V	A	L	V	I	V	T	L	L	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	I	R	Q	R	K
5-2K320vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	I	A	A	I	V	A	L	V	V	G	T	I	I	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
5-1K321vpu	M	~	~	~	Q	P	L	V	V	A	A	I	V	A	L	V	I	V	T	L	L	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	E

7-1K194vpu	M	Q	P	L	Q	P	L	Q	I	A	A	I	V	G	L	V	V	A	A	I	V	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
7-1K196vpu	M	Q	P	L	Q	P	L	Q	I	A	A	I	V	G	L	V	V	A	A	I	V	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
7-1K201vpu	M	Q	P	L	Q	P	L	Q	I	A	A	I	V	G	L	V	V	A	A	I	V	A	I	V	A	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
7-1K203vpu	M	Q	P	L	Q	P	L	Q	I	A	A	I	V	G	L	V	V	A	A	I	V	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
7-1K205vpu	M	Q	P	L	Q	P	L	Q	I	A	A	I	V	G	L	V	V	A	A	I	V	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
7-1K210vpu	M	Q	P	L	Q	P	L	Q	I	A	A	I	V	G	L	V	V	A	A	I	V	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
7-1K212vpu	M	Q	S	L	Q	P	L	Q	I	A	A	I	V	R	L	V	A	A	A	I	L	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	K	K	I	L	R	Q	R	R
7-1K213vpu	M	Q	S	L	Q	P	L	Q	I	A	A	I	V	G	L	V	V	A	A	I	V	A	I	V	V	*	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K
7-1K211vpu	M	Q	~	~	~	P	L	Q	I	A	A	I	I	G	L	V	V	A	A	I	V	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K

36-1K112vpu	M	~	~	~	P	S	L	Q	I	L	A	I	V	A	L	V	V	A	A	I	L	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	K	
36-1K279vpu	M	~	~	~	L	S	L	Q	I	L	A	I	V	A	L	V	V	A	A	I	L	A	I	V	V	W	S	I	V	I	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	Q	K	
36-1K282vpu	M	~	~	~	L	S	L	Q	I	L	A	I	V	A	L	V	V	A	A	I	L	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	Q	K	
36-1K284vpu	M	~	~	~	L	S	L	Q	I	L	A	I	V	A	L	V	V	A	A	I	L	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	Q	K	
36-1K285vpu	M	~	~	~	L	S	L	Q	I	L	A	I	V	A	L	V	V	A	A	I	L	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	Q	K	
36-1K287vpu	M	~	~	~	L	S	L	Q	I	L	A	I	I	A	L	V	V	A	A	I	L	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	Q	K	
36-1K288vpu	M	~	~	~	L	S	L	Q	I	L	A	I	V	A	L	V	V	A	A	I	L	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	E	I	L	R	Q	Q	K	
36-1K289vpu	M	~	~	~	L	S	L	Q	I	L	A	I	V	A	L	V	V	A	V	I	L	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	Q	K	
36-1K290vpu	M	~	~	~	L	S	L	Q	I	L	A	I	V	A	L	V	V	A	A	I	L	A	I	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	Q	K	
36-1K294vpu	V	~	~	~	L	S	L	Q	I	L	A	V	V	A	L	V	V	A	A	I	L	A	I	A	V	V	W	S	I	V	L	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	Q	K

244K922vpu	M	~	~	~	Q	S	L	I	V	V	S	I	V	A	L	V	V	V	T	L	I	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
244K923vpu	M	~	~	~	Q	S	L	I	V	V	S	I	V	A	L	V	V	V	T	L	I	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
244K925vpu	M	~	~	~	Q	S	L	I	V	V	S	I	V	A	L	V	V	V	T	L	I	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
244K929vpu	M	~	~	~	Q	S	L	I	V	V	S	I	V	A	L	V	V	V	T	L	I	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
244K932vpu	M	~	~	~	Q	S	L	I	V	V	S	I	V	A	L	V	V	V	T	L	I	A	I	V	V	R	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
244K935vpu	M	~	~	~	Q	S	L	I	V	V	S	I	V	A	L	V	V	V	T	L	I	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R
244K967vpu	M	~	~	~	Q	S	L	I	V	V	S	I	V	A	L	V	V	V	T	L	I	A	I	V	V	W	S	I	V	F	I	E	Y	R	K	I	L	R	Q	R	R

Abb. 22: Ausschnitt aus den Aminosäuresequenzen von HIV 3-2, 5-2, 7-1, 36-1, Pat. 244; Vpu, AS 1-38 (ohne Insertion). HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

In primären Virusisolaten codiert das *vpu*-Gen laut Literatur aufgrund der Präsenz von mutierten Start-Codons oder Deletionen¹⁷⁰ nicht immer für ein funktionierendes Protein – was darauf hindeutet, dass ein viraler Mechanismus existiert, der die Expression von Vpu reguliert¹⁷¹. In den hier untersuchten 180 Klonen war dies nicht der Fall: Stets war das Startcodon ATG – codierend für Methionin – vorhanden. Oben genannte Studien bieten aber eine mögliche Erklärung für das Basentriplet ACG am Beginn von *vpu* in der Konsensussequenz HXB2.

Auffallend ist die durchgehende Variation der in HXB2 vorhandenen AS L an Position 49 (L49I) und die der AS I an Position 7 (I7L; HIV 20-0 I7S, Pat. 2920 I7V). Auch findet sich an Position 8 nicht wie in HXB2 Prolin – sondern uneinheitlich V, Q, Y, H, T, E oder I. Die genannten Positionen sind jedoch nicht Teil eines HLA-A2-CTL-Epitops. Vier Aminosäuren in Folge unterscheiden sich von der Referenzsequenz an Position 63-66. Hier weisen 14 von 17 Patienten DQEE an Stelle von EISA auf, die übrigen Isolate DLEE (HIV 20-0), DQE~ (HIV 32-1) und DQKQ/DQEQ (Pat. 244).

Abbildung 23 zeigt die Variabilität im Vpu-Protein des HIV von Pat. 239. Zu beachten ist die erhöhte Variabilität zum einen innerhalb des ersten Epitop-Clusters, und zum anderen die in den Epitop-flankierenden Regionen. Es lässt sich nur vermuten, dass in diesem Fall die an das Epitop angrenzenden Bereiche für die Epitoperkennung eine Rolle spielen^{121, 122}.

Pat 239 - Vpu - A*0201

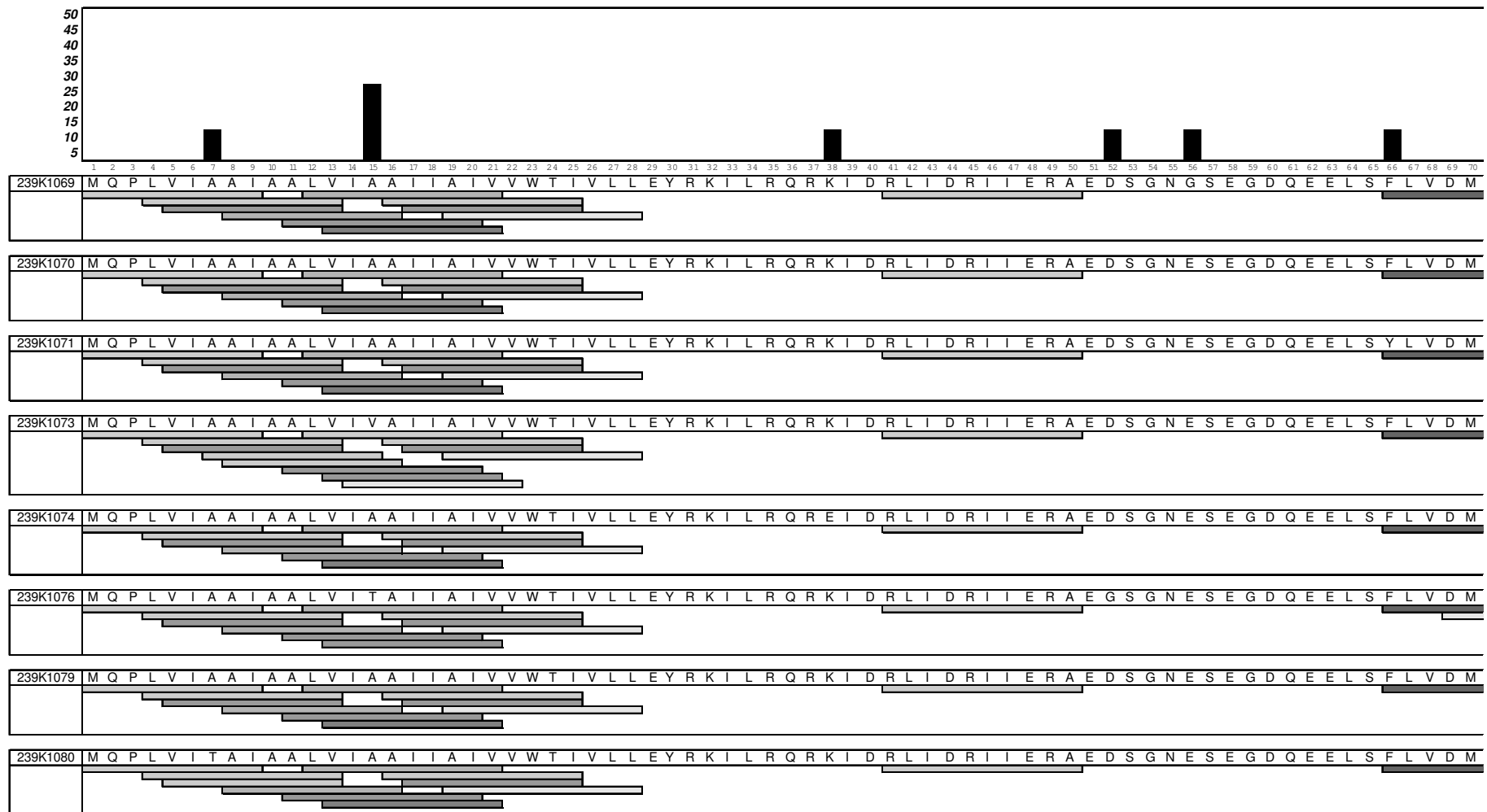


Abb. 23: Ausschnitt aus der Aminosäurefolge des Vpu-Proteins der HIV-Klone des Patienten 239. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA A*0201 -restringierte CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. K = Klon.

Ein bemerkenswertes Detail ist eine Quasispezies von HIV 36: Ein Alanin (A) an Position 77 ist regelmäßig mit Asparaginsäure (D) an Position 79 verknüpft (Abb. 24). Befindet sich an Position 79 aber ein Asparagin (N), was der vorherrschenden Variante entspricht, ist Position 77 mit D, K oder N besetzt. Diese Kombination von A77 mit D79 scheint zwingend zu sein und bedarf weiterer Abklärung. Allerdings ist es auch möglich, dass die Klon A77/D79 von nur einer Variante abstammen und das hier gezeichnete Bild täuscht.

	70 80
HXB2vpu	GHHAPWDVDD L*
36-1K112vpu	GHLAPWDIND L*
36-1K279vpu	GHLAPW A IDD L*
36-1K282vpu	GHLAPWKIND L*
36-1K284vpu	GHLAPWDIND L*
36-1K285vpu	GHLAPWDIND L*
36-1K287vpu	GHLAPW A IDD L*
36-1K288vpu	GHLAPWDIND L*
36-1K-289vu	GHPAPW A IDD L*
36-1K-290vu	GHLAPWDIND L*
36-1K-294vu	GHLASWDIND L*
36-2K124vpu	GHLAPWNIND L*
36-2K126vpu	GHPAPW A IDD L*
36-2K133vpu	GHLAPWDIND L*
36-2K136vpu	GHLAPW A IDD L*
36-2K135vpu	GHLAPWDIND L*
36-2K137vpu	GHLAPWDIND L*
36-2K138vpu	GHLAPW A IDD L*
36-2K127vpu	GHLAPWDIND L*

Abb. 24: Aminosäureausschnitt aus HIV 36-1, 36-2, Vpu, AS 71-82. Mit Grün ist das N der dominantesten Quasispezies an Position 79 gekennzeichnet. Rot zeigt eine Variante mit ausschließlich in Kombination auftretenden A und D. K = Klon; A = Alanin; D = Aspartat; N = Asparagin, * = Stopcodon.

Das auf Vpu beschriebene HLA-A2-Epitop (AS 13-21) zeigt ein unspezifisches Muster. Auffallend ist allein eine große Abweichung von der Konsensussequenz. Meist sind drei AS des neun AS langen Epitops verändert (Abb. 22), im Fall von HIV 5-2 treten sogar bis zu fünf AS-Austausche auf.

3.3.4 Tat

Das Gen *tat* Exon 1 konnte bei 184 Klonen von 19 unterschiedlichen Patientenproben (17 Patienten) vollständig sequenziert werden.

Die derzeit auf dem Protein Tat beschriebenen CTL-Epitope für die einzelnen HLA-Haplotypen sind in folgender Grafik markiert (Abb. 25). Sie stellt eine Zusammenfas-

sung aller experimentell nachgewiesener und veröffentlichter CTL-Epitope dar. Der in dieser Arbeit untersuchte Genomabschnitt beinhaltet nur die AS 1-71, die dem Tat Exon 1 entsprechen. Ein HLA-A2-restringiertes Epitop ist in diesem Bereich bisher nicht beschrieben.

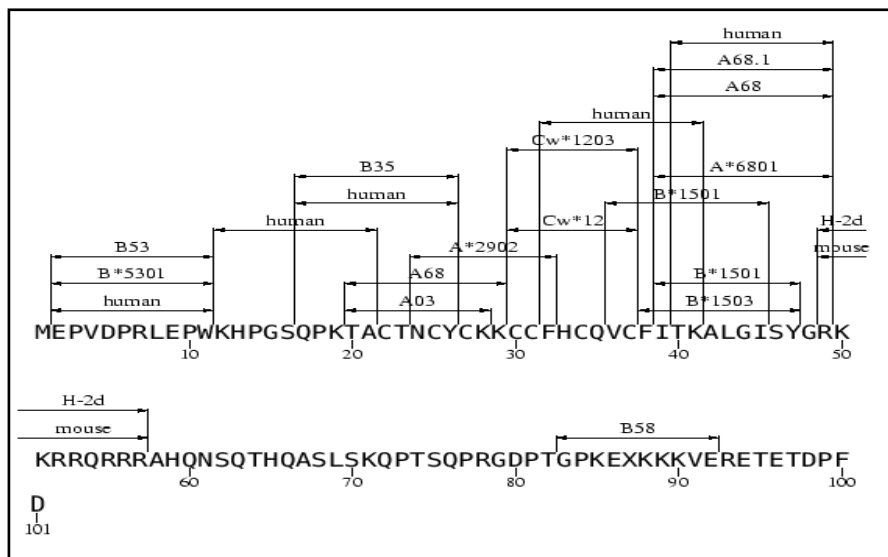


Abb. 25: Tat, CTL-Epitop-Map (dt.: Karte). Die bisher nachgewiesenen Epitope werden hier in der Position auf HXB2 angegeben (Stand 2005).

Abbildung 26 zeigt einen Ausschnitt aus der Aminosäurefolge des Tat-Proteins (Abb. 26). Die CTL-Epitope der entsprechenden HLA-Typen sind farblich markiert. Die komplette Darstellung befindet sich im Anhang (Abb. 42).

Das Exon 1 des Tat-Proteins bietet in den untersuchten HIV-1-Sequenzen ein uneinheitliches Bild. Dabei fällt auch kein quantitativer Unterschied der AS-Varianten in LTNP und SK auf: Sie liegt in dem 71 AS langen Abschnitt bei beiden Kohorten im Durchschnitt bei 10 AS-Veränderungen in Bezug auf die Referenzsequenz.

Besonders im Endstück des Exon 1 zeigt sich eine ausgesprochene Variabilität, die innerhalb und auch zwischen den Patientenproben stark divergiert. Dies steht der Vermutung entgegen, dass jener Bereich zum korrekten Spleißen unentbehrlich und damit hoch konserviert ist, wie es z.B. bei *rev* der Fall ist.

Position 42, mit einem Alanin (A) in HXB2, ist in 14 Patienten mit einem Glycin (G) besetzt. Position 59 weist in den Primärisolaten mit Ausnahme von Pat. 244 durchgehend ein P statt einem H in der Referenzsequenz auf. HIV 5-2 zeigt ein auffallend uneinheitliches Bild mit zahlreichen kodominanten Quasispezies (Position 19, 31, 32, 36, 57).

TAT-1

HXB2tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F I T K A L G I S Y G
6-0K352tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K353tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K354tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y R C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K355tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K R C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K356tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K357tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K358tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K359tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K361tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K469tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K470tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K468tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K467tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K471tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C Y I T K G L G I S Y G
6-0K27tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
6-0K30tat1	M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T E C T N C Y C K K C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
20-0K102tat1	M E P V D P K L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F M K K G L G I S Y G
20-0K105tat1	M E P V D P T L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F M K K G L G I S Y G
20-0K108tat1	M E P V D P K L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F M K K G L G I S Y G
20-0K322tat1	M E P V D P K L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F M K K G L G I S Y G
20-0K323tat1	M E P V D P K L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F M K K G L G I S Y G
20-0K324tat1	M E P V D P K L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F M K K G L G I S Y G
20-0K325tat1	M E P V D P K L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F M K K G L G I S Y G
20-0K326tat1	M E P V D P K L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F M K K G L G I S Y G
20-0K327tat1	M E P V D P K L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F M K K G L G I S Y G
20-0K328tat1	M E P V D P K L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F M K K G L G I S Y G
20-0K329tat1	M E P V D P K L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F V K K G L G I S Y G
20-0K330tat1	M E P V D P K L E P W K H P G S Q P K T A C N N C Y C K K C C F H C Q V C F M K K G L G I S Y G
36-1K112tat1	M E P V D P S L E P W K H P G S Q P K T A C T K C Y C K K C C F H C Q V C F I T K G L G I S Y G
36-1K279tat1	M E P V D P S L E P W K H P G S Q P K T A C T K C Y C K K C C F H C Q V C F I T K G L G I S Y G
36-1K282tat1	M E P V D P S L E P W K H P G S Q P K T A C T K C Y C K K C C F H C Q V C F I T K G L G I S Y G
36-1K284tat1	M E P V D P S L E P W K H P G S Q P K T A C T K C Y C K K C C F H C Q V C F I T K G L G I S Y G
36-1K285tat1	M E P V D P S L E P W K H P G S Q P K T A C T K C Y C K K C C F H C Q V C F I T K G L G I S Y G
36-1K287tat1	M E P V D P S L E P W K H P G S Q P K T A C T K C Y C K K C C F H C Q V C F I T K G L G I S Y G
36-1K288tat1	M E P V D P S L E P W K H P G S Q P K T A C T K C Y C K K C C F H C Q V C F I T K G L G I S Y G
36-1K-289tat1	M E P V D P S L E P W K H P G S Q S K T A C T K C Y C K K C C F H C Q V C F I T K G L G I S Y G
36-1K-290tat1	M E P V D P S L E P W K H P G S Q P K T A C T K C Y C K K C C F H C Q V C F I T K G L G I P Y G
36-1K-294tat1	M E P V D P S L E P W K H P G S Q P K T A C T K C Y C R K C C F H C Q V C F I T K G L G I S Y G
334K952tat1	M D P V D P R L E P W Q H P G S Q P K A A C T K C Y C K Q C C Y H C Q V C F I A K G L G I S Y G
334K956tat1	M D P V D P R L E P W Q H X G S Q P K T A C T K C Y C K Q C C H H C Q V C F I T K G L G I S Y G
334K959tat1	M D P V D P R L E P W Q H P G S Q P K T A C T K C Y C K Q C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
334K962tat1	M D P V D P R L E P W Q H P G S Q P K T A C T K C Y C K Q C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
334K963tat1	M D P V D P R L E P W Q H P G S Q P K T A C T K C Y C K Q C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
334K966tat1	M D P V D P R L E P W Q H P G S Q P K T A C T K C Y C K Q C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
334K997tat1	M D P V D P R L E P W Q H P G S Q P K T A C T K C Y C K Q R C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
334K999tat1	M D P V D P R L E P W Q H P G S Q P K T A C T K C Y C K Q C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
334K1002tat1	M D P V D P G L E P W Q H P G S Q P K T A C T K C Y C K Q C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
334K1005tat1	M D P V D P R L E P W Q H P G S Q P K T A C T K C Y C K Q C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G
334K1006tat1	M D P V D P R L E P W Q H P G S Q P K T A C T K C Y C R Q C C Y H C Q V C F I T K G L G I S Y G

Abb. 26: Ausschnitt aus den Aminosäuresequenzen von HIV 6-0, 20-0, 36-1, Pat. 334; Tat, AS 1-48. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

Die Proben 0 und 1 des Pat. HIV 6, zwischen deren Gewinnung nur etwa ein Monat liegt, zeigen im Tat-Exon-1-Segment nur geringfügige Veränderungen. Bemerkenswert ist aber der in 6-1 erstmals auftretende AS-Wandel an Position 24 (K statt N), der mit einem Anteil von 40% an der Gesamtpopulation eine starke Quasispezies bildet (Abb. 27).

	
	20 30	
<u>HXB2tat</u>	<u>GSQPKT</u>	<u>ACTNCYCKKC</u>
6-0K352tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K353tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K354tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K355tat	GSQPKT	ECTN C YCKRC
6-0K356tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K357tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K358tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K359tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K361tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K469tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K470tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K468tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K467tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K471tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K027tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-0K030tat	GSQPKT	ECTN C YCKKC
6-1K259tat	GSQP K A	ECTN C YCKKC
6-1K478tat	GSQP K T	ECTN C YCKKC
6-1K479tat	GSQP K T	ECTN C YCKKC
6-1K480tat	GSQP K T	ECT K CYCKKC
6-1K481tat	GSQP K T	ECT K CYCKKC
6-1K483tat	GSQP K T	ECT K CYCKKC
6-1K484tat	GSQP K T	ECTN C YCKKC
6-1K485tat	GSQP K T	ECTN C YCKKC
6-1K486tat	GSQP K T	ECT K CYCKKC
6-1K487tat	GSQP K T	ECTN C YCKKC

Abb. 27: Aminosäureausschnitt aus HIV 6-0 und HIV 6-1; Tat, AS 25-30. Mit Grün ist das N an Position 24 gekennzeichnet, das in HIV 6-0 die einzige Variante ausmacht. Rot zeigt eine Variante mit K, die sich erst in HIV 6-1 (etwa ein Monat später) präsentiert. 6-0K = Klon von HIV 6-0 (z.B.: 6-0K112 = Klon 112); K = Lysin; N = Asparagin.

Patient HIV 6 trägt den HLA-Typ A02, A29. Da Position 24 Teil des HLA-A29-restringierten CTL-Epitops ist, könnte die Veränderung möglicherweise Ausdruck einer Escape-Variante sein. Betrachtet man die *Software*-gestützte Auswertung ergibt sich eine Situation, die in Abbildung 28 und 29 dargestellt ist. Die oben beschriebene Mutation von N zu K führt zu einer kaum veränderten Bindungsstärke des Peptids an das MHC-Molekül. Auch zu beobachten ist das Verschwinden eines in HIV 6-0 bei einigen Klonen errechneten Epitops (AS 30-38) im weiteren Krankheitsverlauf. Nach einem Monat (vier Monate *post infectionem*) weist keines der HIV-Klone das Y an Position 38

auf, das zur Epitoperkennung nötig ist. Darüber hinaus hat diese AS anscheinend Einfluss auf das angrenzende Epitop, für das die *Software* eine verstärkte Bindung errechnet, obwohl die eigentliche Epitopsequenz unverändert ist.

Pat 6-0 - Tat - A*2902

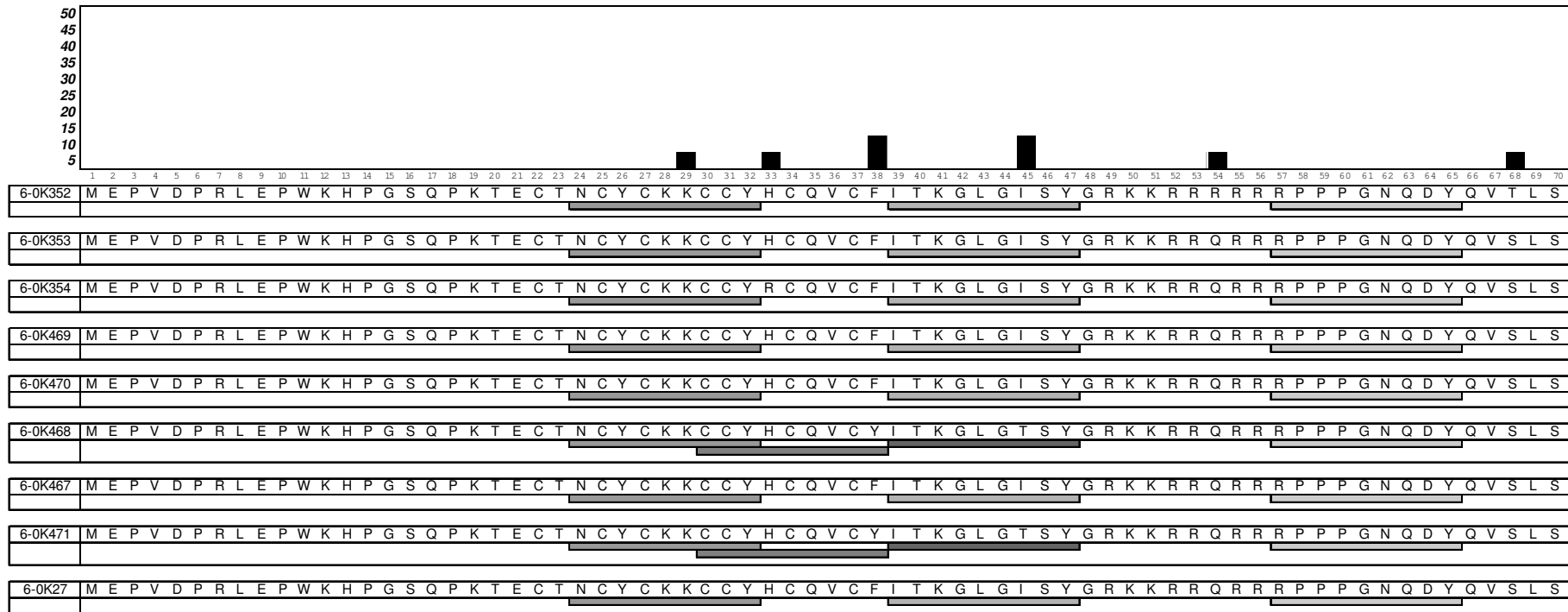


Abb. 28: Ausschnitt aus der Aminosäurefolge des Tat-Proteins aller HIV-Klone der Patientenprobe HIV 6-0. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA A*2902-restringierte CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. Zu achten ist auf das in manchen Klonen zu beobachtende Epitop AS 30-38, das bei Veränderung an Position 38 nicht mehr als Epitop erkannt wird. Darüber hinaus hat es anscheinend Einfluss auf das Bindungsverhalten des nachfolgenden Epitops.

Pat 6-1 - Tat - A*2902

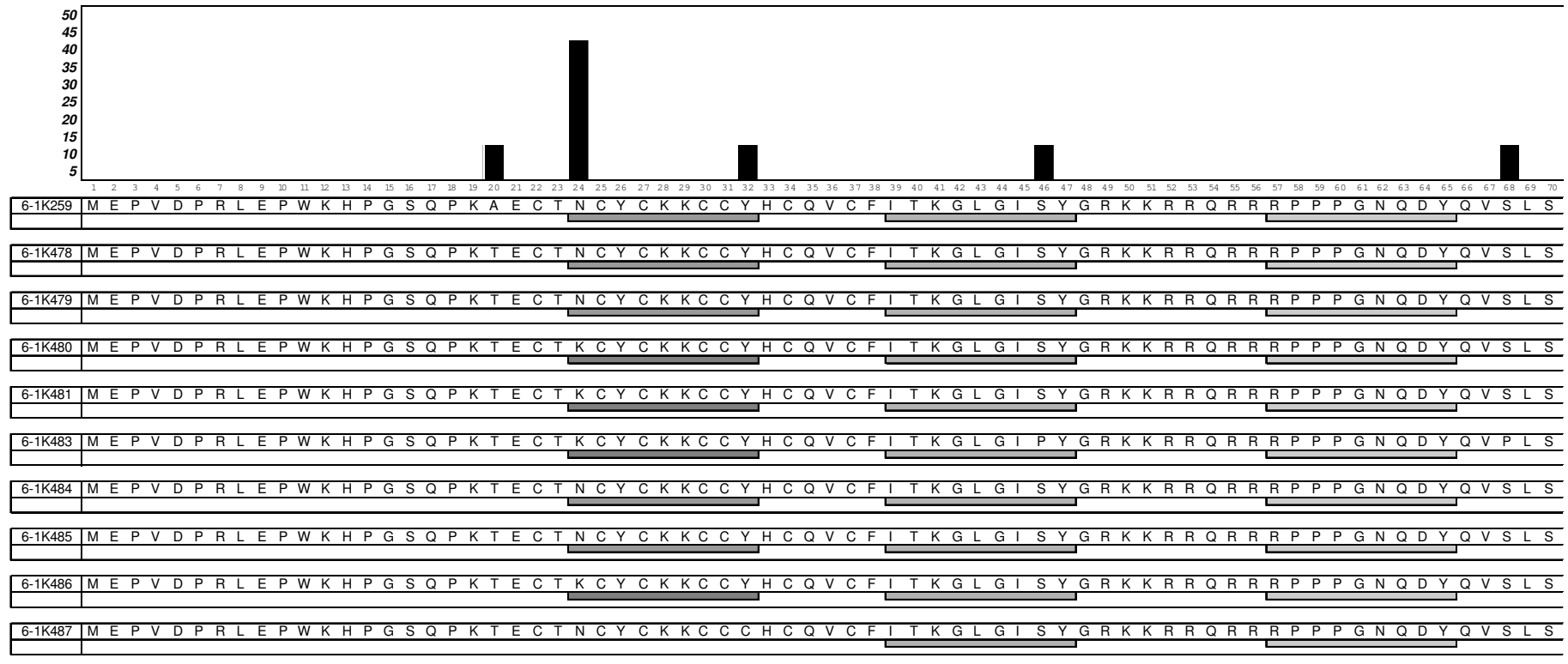


Abb. 29: Ausschnitt aus der Aminosäurefolge des Tat-Proteins aller HIV-Klone der Patientenprobe HIV 6-1. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA A*2902-restringierte CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. Zu achten ist auf die verminderte Bindungsstärke des Epitops bei Ersatz des N an Position 24 durch K. Da diese Variation in der Patientenprobe HIV 6-0 (ein Monat zuvor) nicht auftritt, ist es möglich, dass es sich hierbei um eine Fluchtmutation handelt. Das in HIV 6-0 (Abb. 28) teilweise vorhandene zusätzliche Epitop AS30-38 ist nicht mehr vertreten. K=Klon.

In den 184 hier untersuchten Klonen fanden sich an den als essentiell für die Funktion von Tat identifizierten Positionen C22, C25, C27, C37^{43, 172} nur zweimalig Veränderungen (siehe Diskussion). Ebenso ist die Tat-PTD an Position 49-57 hochkonserviert: Nur drei Patientenproben (Pat 334, HIV 36-1, HIV 12-1), in denen an Position 52 ein W statt R steht, ein Fall (HIV 7-1) mit einem G53R-Austausch, sowie neun isolierte Punktmutationen treten als Variationen in dieser Region auf (siehe Diskussion).

3.3.5 Rev

Das Gen *rev* konnte bei 184 Klonen von 19 unterschiedlichen Patientenproben (17 Patienten) vollständig sequenziert werden.

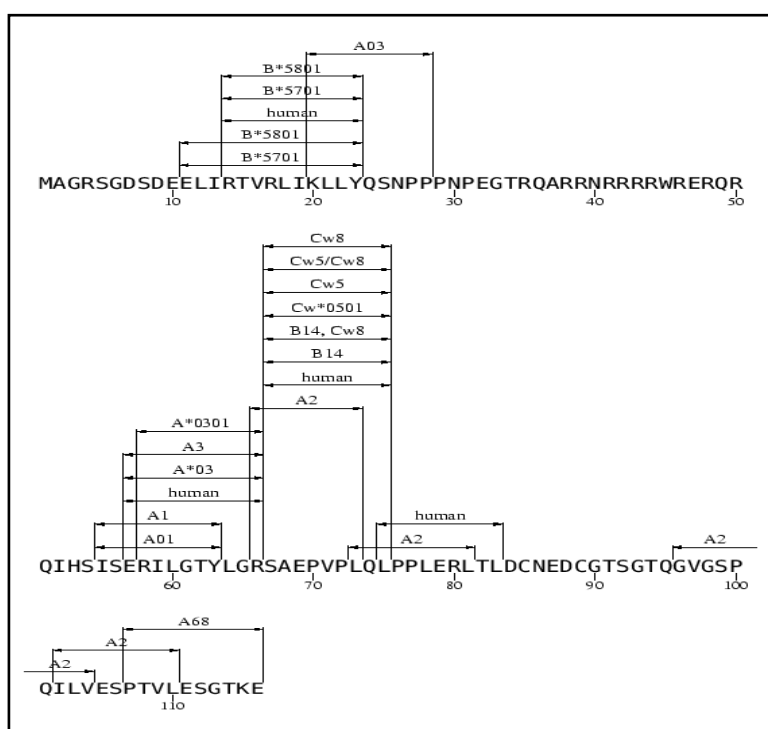


Abb. 30: Rev, CTL-Epitop-Map (dt.: Karte). Die bisher nachgewiesenen Epitope werden hier in der Position auf HXB2 angegeben (Stand 2005).

Die derzeit auf dem Protein Rev Exon 1 beschriebenen CTL-Epitope für die einzelnen HLA-Haplotypen sind in nebenstehender Grafik markiert (Abb. 30). Sie stellt eine Zusammenfassung aller experimentell nachgewiesener und veröffentlichter CTL-Epitope dar. Der in dieser Arbeit untersuchte Genomanteil schließt nur AS 1-25 des Rev-Proteins ein – das entspricht dem Rev Exon 1. In diesem Bereich wurde bisher kein HLA-A2-Epitop beschrieben.

In *rev* Exon 1 gibt es bei den hier untersuchten Patienten multiple genetische Unterschiede im Vergleich zur HXB2-Referenzsequenz. Einige von diesen Mutationen sind mit einem Aminosäureaustausch verbunden. Hier sei als Beispiel bp 5989-6044 bei HIV 5-2 dargestellt (Abb. 31). Auffallend ist eine Quasispezies mit einem Anteil von 3/13

Klonen (23%) – Türkis gekennzeichnet.

	20	30	40	50	60	70	
HXB2rev	GA	CAGCGACGAA	GAGCTCATCA	GAACAGTCAG	ACTCATCAAG	CTTCTCTATC	AAAGC
5-2K185rev	GA	CAGCGACGAA	GAGCTC C TCA	AG ACAGTCAG	ACT G ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC
5-2K186rev	GA	CAGCGACGAA	GAGCTC C TCA	AG ACAGTCAG	ACT G ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC
5-2K190rev	GA	CAGCGACGAA	GAGCTC C TCA	AG ACAGTCAG	ACT G ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC
5-2K193rev	GA	CAGCGACGAA	GAGCTC C TCA	AG ACAGTCAG	ACT G ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC
5-2K312rev	GA	CAGCGACGAA	GAGCTC C TCA	AG ACAGTCAG	ACT G ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC
5-2K313rev	GA	CAGCGACGAA	GAGCTC C TCA	AG ACAGTCAG	ACT G ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC
5-2K314rev	GA	CAGCGACG CA	A AGCTC C T C G	AG G CAG C CAG	ACT G ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC
5-2K316rev	GA	CAGCGACGAA	GAGCTC C TCA	AG ACAGTCAG	ACT A ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAG T
5-2K317rev	GA	CAGCGACGAA	GAGCTC C TCA	AG ACAGTCAG	ACT G ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC
5-2K318rev	GA	CAGCGACGAA	GAGCTC C TCA	AG ACAGTCAG	ACT G ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC
5-2K319rev	GA	CAGCGACG CA	A AGCTC C T C G	AG G CAGTCAG	ACT G ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC
5-2K320rev	GA	CAGCGACGAA	GAGCTC C TCA	AG ACAGTCAG	ACT A ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC
5-2K321rev	GA	CAGCGACG CA	A AGCTC C T C G	AG G CAG C CAG	ACT G ATCAAG	CA TCTCTATC	AAAGC

	10	20
HXB2rev	D S D E E L I R T V R L I K L L Y Q S	
5-2K185rev	D S D E E L L K T V R L I K H L Y Q S	
5-2K186rev	D S D E E L L K T V R L I K H L Y Q S	
5-2K190rev	D S D E E L L K T V R L I K H L Y Q S	
5-2K193rev	D S D E E L L K T V R L I K H L Y Q S	
5-2K312rev	D S D E E L L K T V R L I K H L Y Q S	
5-2K313rev	D S D E E L L K T V R L I K H L Y Q S	
5-2K314rev	D S D A K L L E A A R L I K H L Y Q S	
5-2K316rev	D S D E E L L K T V R L I K H L Y Q S	
5-2K317rev	D S D E E L L K T V R L I K H L Y Q S	
5-2K318rev	D S D E E L L K T V R L I K H L Y Q S	
5-2K319rev	D S D A K L L E A V R L I K H L Y Q S	
5-2K320rev	D S D E E L L K T V R L I K H L Y Q S	
5-2K321rev	D S D A K L L E A A R L I K H L Y Q S	

Abb. 31: Ausschnitt aus der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von HIV 5-2, rev/Rev, bp 5989-6044 (HXB2). Mit Rot sind jene Nukleotidveränderungen gekennzeichnet, die zu einem AS-Austausch führen (ebenfalls Rot). Die Farbe Grün zeigt stumme Mutationen. Türkis weist auf eine potente Quasispezies hin (23% aller Klone). K = Klon (z.B.: K952 = Klon 952).

Abb. 32 zeigt einen Ausschnitt aus der Aminosäurefolge des Rev-Proteins (Abb. 32). Die CTL-Epitope der entsprechenden HLA-Typen sind farbig markiert. Die komplette Darstellung befindet sich im Anhang (Abb. 43).

An Position 13 findet sich durchgehend eine Aminosäurevariation. Im Vergleich zu HXB2 ist dort I meist durch L ersetzt. Eine Ausnahme bildet das HIV-Isolat von Pat 244, dessen AS der der Referenzsequenz gleicht. Auch in Position 21 stimmen die individuellen HI-Viren selten mit der Konsensussequenz überein. Hier treten eine Vielzahl an unterschiedlichen Aminosäuren auf. Statt L finden sich Y, H, C, F, A, S, R oder E. Dies

impliziert, dass diese Position für die Funktion des Rev-Proteins nicht entscheidend ist.

REV

HXB2rev MAGRSGDSDEEELIRTVRLIKLLYQS A3

20-0K102rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQG
20-0K105rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQS
20-0K108rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQS
20-0K322rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQG
20-0K323rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQG
20-0K324rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQG
20-0K325rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQG
20-0K326rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQG
20-0K327rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQS
20-0K328rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQG
20-0K329rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQG
20-0K330rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KALYQS

030K520rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KSLYQS
030K567rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KSLYQS
030K638rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KSLYQS
030K641rev	MAGRSGDSNEDLIRTVRLV	KSLYQS
030K668rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KSLYQS
030K672rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KSLYQS
030K674rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KSLYQS
030K676rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KSLYQS

239K1069rev	MAGRSGVSDDEELIRTVRLV	KFPYQS
239K1070rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KFLYQS
239K1071rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KFLYQS
239K1073rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KFLYQS
239K1074rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KFLYQS
239K1076rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KFLYQS
239K1079rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KFLYQS
239K1080rev	MAGRSGDSDEEELIRTVRLV	KFLYQG

2920K712rev	MAGRSGDSDEEELIKVTRLV	KFLYQS
2920K713rev	MAGRSGDSDEEELIKVTRLV	KFLYQS
2920K715rev	MAGRSGDSDEEELIKVTRLV	KLLYQS
2920K716rev	MAGRSGDSDEEELIKVTRLV	KFLYQS
2920K728rev	MAGRSGDSDEEELIKVTRLV	KFLYQS
2920K730rev	MAGRSGDSDEEELIKVTRLV	KFLYQS
2920K731rev	MAGRSGDSDEEELIKVTRLV	KFLYQS

Abb. 32: Ausschnitt aus den Aminosäuresequenzen von HIV 20-0, Pat. 030, 239, 2920; Rev1, AS 1-25. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

Besonders zahlreich präsentiert sich die AS-Variabilität bei Patient HIV 6 (HIV 6-0, 6-1) und HIV 20. Hier sind sechs bzw. sieben AS der nur 25 AS zählenden Sequenz im Bezug auf HXB2 verändert. Das HIV-Isolat von Pat. 2920 weist sogar vier der AS-Veränderungen in Folge auf.

Bemerkenswert ist die Konservierung der letzten vier AS des Exon 1 des Rev-Proteins: Bis auf den Fall 20-0 stimmen sie komplett mit HXB2 überein. Auch die Nukleotidsequenz ist relativ stark konserviert, was darauf hindeutet, dass dieser Bereich entscheidend ist für das korrekte Spleißen der prä-mRNA.

3.4 Vergleich von HIV-Isolaten frisch Infizierter und LongTermNonProgressors

Zur Untersuchung von Proben frisch infizierter Patienten wurden Seren von akut Sero-konvertierten (SK) verwendet – eine Kohorte, die die Arbeitsgruppe von Dr. C. Kücherer, RKI, rekrutiert. Die Hypothese ist, dass das Virus kurz nach Eintritt in den Wirtskörper zeitlich wenig Gelegenheit hatte zu mutieren und den CTL auszuwei-chen – die spezifische Variabilität in den CTL-Epitopen also geringer ausgeprägt ist. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass nach Übertragung eines HIV-Klones sich mehrere Quasispezies entwickeln und nebeneinander existieren, bevor sich eine davon behauptet und wegen eines Selektionsvorteils durchsetzt. Aus diesem Grund wurden die Sequenzen von zehn LTNP denen von neun SK gegenübergestellt (HIV-6 wurde wegen seines SK-Status der SK-Kohorte zugerechnet).

Trotz eingehender Analyse konnte hier kein eindeutiges Muster – auch unter Berück-sichtigung der HLA-Typen – erkannt werden. Doch gibt es einzelne bemerkenswerte Auffälligkeiten:

Im Fall von Patient HIV 6, bei dem mehr als eine Blutprobe untersucht wurde (6-0 und 6-1 mit einem Abstand von etwa einem Monat), zeigte sich, dass anfangs bestehende Quasispezies im Laufe der Infektion verschwanden und sich eine der Varianten als die Potenteste durchsetzte. Besonders deutlich ist das in den HLA-A2-CTL-Epitopen von Vif zu erkennen (Abb. 33), weniger stark in denen von Vpr und Vpu. Dies unterstreicht die Existenz eines Selektionsdruckes, der die virale Entwicklung in eine bestimmte Richtung lenkt, und bestätigt die oben genannte Hypothese.

Auch konnte für das Vif-Protein der SK-Gruppe insgesamt eine größere Differenz zur HXB2-Konsensussequenz sowie eine breitere Variabilität nachgewiesen werden als für das der LTNP-Kohorte. In Zahlen stehen durchschnittlich 23 AS-Austausche pro HIV-Klon bei den SK, 17 bei den LTNP gegenüber (HIV 6-1, HIV 36-2 als Zweitproben eingeschlossen).

Dagegen präsentiert sich Epitop IV in Protein Vpr in der SK-Gruppe in größerer Über-einstimmung mit HXB2 (siehe 3.3.2).

In den Proteinen Vpu, Tat und Rev konnten keine regelhaften Veränderungen gefunden werden.

Vif

Patient	Epitop I	Klon. Häufigk.	Epitop II	Klon. Häufigk.	Epitop III	Klon. Häufigk.	Epitop IV	Klon. Häufigk.
HXB2	SLVKHHMYV		ELADQLIHLY		ALAALITPK		KIKPPLPSV	
HIV 6-0	-----I ---R----I	13/14 (93%) 1/14 (7%)	D----- DP----- A-----	12/14 (86%) 1/14 (7%) 1/14 (7%)	--T-----	16/16 (100%)	-T----- -TR----- -T-----A	14/16 (88%) 1/16 (6%) 1/16 (6%)
HIV 6-1	-----I	10/10 (100%)	D-----	10/10 (100%)	--T-----	10/10 (100%)	-T-----	10/10 (100%)

Vpr

Patient	Epitop I	Klon. Häufigk.	Epitop II	Klon. Häufigk.	Epitop III	Klon. Häufigk.	Epitop IV	Klon. Häufigk.
HXB2	FPRWLHGL		GLGQHIYET		AIIRILQQL		RILQQLLFI	
HIV 6-0	---P--YS-	16/16 (100%)	S---Y----	16/16 (100%)	----- -M-----	14/16 (87,5%) 2/16 (12,5%)	-----	16/16 (100%)
HIV 6-1	---P--YS-	10/10 (100%)	S---Y----	10/10 (100%)	-----	10/10 (100%)	-----	10/10 (100%)

VPU

Patient	Epitop I	Klon. Häufigk.
HXB2	VVAIIIAIV	
HIV 6-0	--VA-L--- --VAXL---	15/16 (94%) 1/16 (6%)
HIV 6-1	--VA-L---	10/10 (100%)

Abb. 33: Vif, HLA-A2-CTL-Epitope in HIV 6-0 und HIV 6-1 im Vergleich zur Referenzsequenz HXB2. Es sind nur veränderte Aminosäuren aufgeführt, unveränderte AS werden durch einen horizontalen Strich (-) repräsentiert. In der Spalte neben den einzelnen Epitopen ist die Anzahl der Klone mit der entsprechenden Variation aufgeführt, sowie deren Anteil an der gesamten Klon-Population in Prozent. Zu achten ist auf die Reduktion der Quasispezies auf eine dominante Variante in HIV 6-1. Zwischen der Gewinnung der Blutproben liegt ca. ein Monat. Probe 6-0 wurde etwa drei Monate nach Erstinfektion abgenommen. Klon. Häufigk. = Klonale Häufigkeit.

3.5 Vergleich von HIV-Isolaten HLA-A2-positiver und HLA-A2-negativer Patienten

Da HLA-A2 in der kaukasischen Bevölkerungsgruppe stark verbreitet ist und – wahrscheinlich aus demselben Grund – auch die meisten CTL-Epitope für dieses Allel beschrieben sind, wählte diese Studie eine HLA-A2-positive Patientengruppe (A2⁺) und verglich sie mit einer, die dieses Allel in ihrem Genom nicht aufweist (A2⁻). Die Tabellen mit Auflistung und Gegenüberstellung der HLA-A2-Epitope auf Vpu, Vpr, Vif befinden sich im Anhang (Abb. 49, 50, 51).

Bezüglich der bisher entdeckten, durch HLA-A2-restringierten CTL-Epitope gibt es Folgendes zu bemerken:

3.5.1 Vif

HLA-A2-CTL-Epitop I: Die AS Valin (V) an Position 9 des Epitops (31 in Vif, HXB2) ist fast immer durch Isoleucin (I) ersetzt. Dabei fällt auf, dass nur die Viren von Patient 36 hier ein T aufweisen, allein die von Pat. 239 ein R. Vermutlich bestimmen hier andere HIV-Subgruppen als Clade B die Konsensussequenz und ein Vergleich mit einer anderen Referenz könnte weitere Ergebnisse mit sich bringen. Während A2⁺ Proben vereinzelt Varianten in Position 1, 2 und 3 aufweisen (in 14 von 124 Klonen), sind diese in A2⁻ Proben nicht zu finden (in 0 von 57 Klonen)

HLA-A2-CTL-Epitop II: Die AS an Position 1 (102 in Vif, HXB2) ist fast durchgehend uneinheitlich mit HXB2 – sowohl bei A2⁺ als auch bei den A2⁻ Proben. Statt E zeigen die Klone N oder D, im Fall von HIV 20-0 ein G. Die einzige Ausnahme bildet Pat 2920, dessen HIV-Isolate mit der Kontrollsequenz übereinstimmen. Auffallend ist HIV 32-1 (A2⁻): Hier zeigen alle Klone in dem zehn AS langen Epitop einheitlich drei AS-Austausche. Auch insgesamt bieten die Isolate der HLA-A2-negativen Patienten ein uneinheitlicheres Bild. Das steht der Hypothese entgegen, dass die Variabilität der HLA-A2-spezifischen CTL-Epitope bei den Allel-Trägern als Ausdruck des antiviralen Drucks durch die zelluläre Immunantwort größer ist. Doch ist zu bedenken, dass in eben diesem Bereich auch weitere HLA-spezifische Epitope lokalisiert sein können, die bei dieser Betrachtung nicht berücksichtigt wurden.

Auffallend sind zwei Varianten, die ausschließlich in HLA-A2⁺ zu finden sind: Sowohl Lysin (K) als auch Methionin (M) sind in keinem der HLA-A2⁻ Klone enthalten (Abb. 34).

Patient	Epitop II	Klon. Häufigk.
HXB2	ELADQLIHL ^Y	
HIV 3-2 A2	N---K----- N-----MH	9/10 (90%) 1/10 (10%)
HIV 5-2 A2	N-----M-	13/13 (100%)
Pat 239 A2	G---K-----	8/8 (100%)

Abb. 34: Vif, HLA-A2-CTL-Epitop II von HIV 3-2, 5-2 und Pat. 239 (A2⁺). K und M sind nur in A2⁺-Proben aufgetreten. K = Lysin, M = Methionin. Klon. Häufigk. = Klonale Häufigkeit

HLA-A2-CTL-Epitop III: In den Klonen von HIV 9-1 fallen vergleichbar stark vertretene Quasispezies auf, in denen von HIV 14-1 zahlreiche Varianten. Die Sequenzen von Pat. 239 und HIV 9-1 sind in bis zu vier AS des neun-AS-Epitops im Vergleich zu HXB2 verändert. Bedeutende Unterschiede zwischen HLA-A2⁺ und -A2⁻ Isolaten ergaben sich nicht.

HLA-A2-CTL-Epitop IV: AS 1 (159 in Vif, HXB2) ist in mehr als einem Viertel der HIV-Isolate durch ein R ersetzt (42 von 183 Klonen). Insgesamt sind die ersten drei Epitop-Positionen sehr uneinheitlich, mit einer auffallend häufig vertretenen AS Arginin (R), die sich in der Kontrollsequenz im gesamten Epitop nicht findet. Der hintere Anteil des Epitops stimmt fast durchgehend mit HXB2 überein und könnte auf eine Region mit funktioneller Bedeutung für das Protein hinweisen. Bedeutende Unterschiede zwischen HLA-A2⁺ und -A2⁻ Isolaten ergaben sich nicht.

3.5.2 Vpr

HLA-A2-CTL-Epitop I: Position 4 des neun AS-Epitops ist häufig im Vergleich zu HXB2 verändert, wobei drei der A2⁺ Patienten in der dominanten Quasispezies hier ein Prolin (P) aufweisen, eine AS, die bei den A2⁻ Patienten nicht auftritt.

HLA-A2-CTL-Epitop II: In neun der 17 Patientenproben ist die AS Histidin (H) an Position 5 in HXB2 durch ein Tyrosin (Y) ersetzt. Größere Unterschiede zwischen HLA-A2⁺ und -A2⁻ fallen dabei nicht auf – lediglich ein Asparagin (N) an Position 1 des Proteins, das in zwei A2⁻ Patienten vertreten ist, in der A2⁺ Patientengruppe aber nicht auftritt. Dagegen gibt es in jener Gruppe einen häufigen Wechsel der HXB2 AS Glycin (G) zu Serin (S).

HLA-A2-CTL-Epitop III und IV: In diesen CTL-Epitopen, die sich in sechs AS über-

schneiden, zeigen sich die deutlichsten Unterschiede zwischen der A2⁺ und A2⁻ Kohorte (Abb. 35).

Vpr

Patient	Epitop I	Klon. Häufigk.	Epitop II	Klon. Häufigk.	Epitop III	Klon. Häufigk.	Epitop IV	Klon. Häufigk.
HXB2	FPRWLHGL		GLGQHIYET		AIIRILQQL		RILQQLLFI	
HIV 3-2	---M----- L--M-----	9/10 (90%) 1/10 (10%)	----Y----	10/10 (100%)	-L--T----- -----	6/10 (60%) 4/10 (40%)	-T----- -----	6/10 (60%) 4/10 (40%)
HIV 5-2	---L----- L--L-----	12/13 (92%) 1/13 (8%)	----Y----- ----Y--V-	12/13 (92%) 1/13 (8%)	----T---M -L--T---M	12/13 (92%) 1/13 (8%)	-T---M---	13/13 (100%)
HIV 7-1	---G---S-	10/10 (100%)	S---Y----	10/10 (100%)	-----	10/10 (100%)	-----	10/10 (100%)
HIV 12	--P----- --L-----	6/8 (75%) 2/8 (25%)	----- ----Y----	6/8 (75%) 2/8 (25%)	--T-A----- --T-A---Q	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	-A----- -A---Q--- -A---P--	6/8 (75%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%)
HIV 20-0	---V----- ---A---S- ---V*-----	10/12 (83%) 1/12 (8%) 1/12 (8%)	----- S-----	11/12 (92%) 1/12 (8%)	-L--T----- -L-*T----- ----T-----	7/12 (58%) 3/12 (25%) 2/12 (17%)	-T----- *T-----	9/12 (75%) 3/12 (25%)
Patient	Epitop I	Klon. Häufigk.	Epitop II	Klon. Häufigk.	Epitop III	Klon. Häufigk.	Epitop IV	Klon. Häufigk.
HIV 9-1 nonA2	----- --G-----	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	-----S -----A-	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	----- -----P--- -----P	6/8 (75%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%)	----- --P----- -----P---	6/8 (75%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%)
HIV 14 nonA2	---L---N- -----N-	9/10 (90%) 1/10 (10%)	N---Y----- N---Y---A	9/10 (90%) 1/10 (10%)	-LL----- VLL-----	9/10 (90%) 1/10 (10%)	----- -----P--	9/10 (90%) 1/10 (10%)
HIV 32-1 nonA2	---G---S- ---G---RR- ---G-----	10/12 (83%) 1/12 (8%) 1/12 (8%)	S---Y----- R---Y----- ----Y-----	10/12 (83%) 1/12 (8%) 1/12 (8%)	----- ----V-----	11/12 (92%) 1/12 (8%)	----- -V-----	11/12 (92%) 1/12 (8%)

Abb. 35: HLA-A2-CTL-Epitope in Vpr. Im oberen Abschnitt sind einige der A2⁺ Patienten aufgelistet, im unteren einige der A2⁻ (nonA2). Zu beachten ist das im Verhältnis zur A2⁺ Kohorte relativ häufigere Auftreten der HXB2-Sequenz in den A2⁻ Patienten in Epitop III und IV.

Das häufige Auftreten der HXB2-Sequenz bei den A2⁻ Patienten zeigt sich insbesondere in Epitop IV und macht dort einen Anteil von 88% aus. Unter Berücksichtigung der Infektionsdauer treten die Unterschiede noch deutlicher hervor: Die HXB2-Sequenz in A2⁺ LTNP macht nur 22 % aus, in A2⁻ LTNP dagegen 87 %. Bei den SK findet sich dagegen eine vollständige Übereinstimmung mit der Konsensussequenz bei den A2⁺ in 80,4 % der Klone, bei den A2⁻ in 88,9 %. Dies ist ein Ergebnis, das darauf hinweist, dass Allelträger in A2-restringierten CTL-Epitopen aufgrund des antiviralen Druckes durch spezifische CTL eine höhere Variabilität aufweisen. Noch dazu unterstützt es die Überlegung, dass sich Mutationen erst nach einiger Zeit *post infectionem* ausbilden. Eine Untersuchung auf zellulärer Ebene wäre hier sehr interessant.

Darüber hinaus ist in Epitop III (und IV) an Position 5 Threonin bei A2⁺ Patienten auffallend häufig vertreten (5 von 11 Patienten), während diese AS bei A2⁻ Patienten kein einziges Mal (0 von 6 Patienten) zu finden ist. Stark konserviert sind dagegen in beiden Patientengruppen Position 1 von Epitop III und Position 9 von Epitop IV. Hier liegen keine AS-Veränderungen vor.

3.5.3 Vpu

Das neun AS lange HLA-A2-Epitop präsentiert sich bei HLA-A2⁺ und HLA-A2⁻ Patienten durchgehend sehr variabel. Mindestens zwei AS sind jeweils ausgetauscht – HIV 5-2 weist sogar im Vergleich zu HXB2 bis zu fünf AS-Veränderungen in Folge auf. Die einzige Ausnahme bildet das HIV-Isolat von Pat. 030, das mit HXB2 in diesem Genomabschnitt vollständig übereinstimmt, eingeschlossen auch Position 4 des Epitops. Hier ist das Isoleucin (I) in HXB2 bei allen übrigen Isolaten durch ein A, G, E oder T ersetzt.

Alanin (A) und Isoleucin (I) an Position 7 und 8 sind in beiden Gruppen stark konserviert und nur in zwei von 183 Klonen verändert. Eventuell haben sie eine Bedeutung für die Funktion des Proteins. Auffallend ist außerdem eine Konservierung des Valins an Position 1 des Epitops. In der HLA-A2⁺ Kohorte ist diese stärker ausgeprägt (0,8% Veränderung) als bei den A2⁻ Proben (29,8% Veränderung).

3.6 statistische Auswertung der Ergebnisse

Da es sich bei dem untersuchten Genomabschnitt um eine Zahl von 1270 Basenpaaren handelt (bei ca. 180 Klonen bedeutet dies etwa 228600 bp), ist es sinnvoll, die Genomveränderungen auch mit Hilfe von Computerprogrammen und statistisch auszuwerten (siehe 2.2.4). Es ist darüber hinaus davon auszugehen, dass viele der *in vivo* existierenden CTL-Epitope noch nicht experimentell nachgewiesen wurden und somit eine Einbeziehung der von anhand von Bindungsmotiven errechneten Epitope in die Überlegungen von Vorteil ist (siehe 2.2.3.8).

In diesem Rahmen fiel auf, dass bei Berücksichtigung der Subgruppen von HLA-A2 die errechneten Epitoplokalisierungen teilweise stark voneinander abweichen. So finden sich z.B. in Protein Vpr bei Patient HIV 3-2, Klon 140 folgende Unterschiede, je nachdem ob der Subtyp HLA-A*0201 oder HLA-A*0202 den Rechnungen zugrunde gelegt wird (Abb. 36).

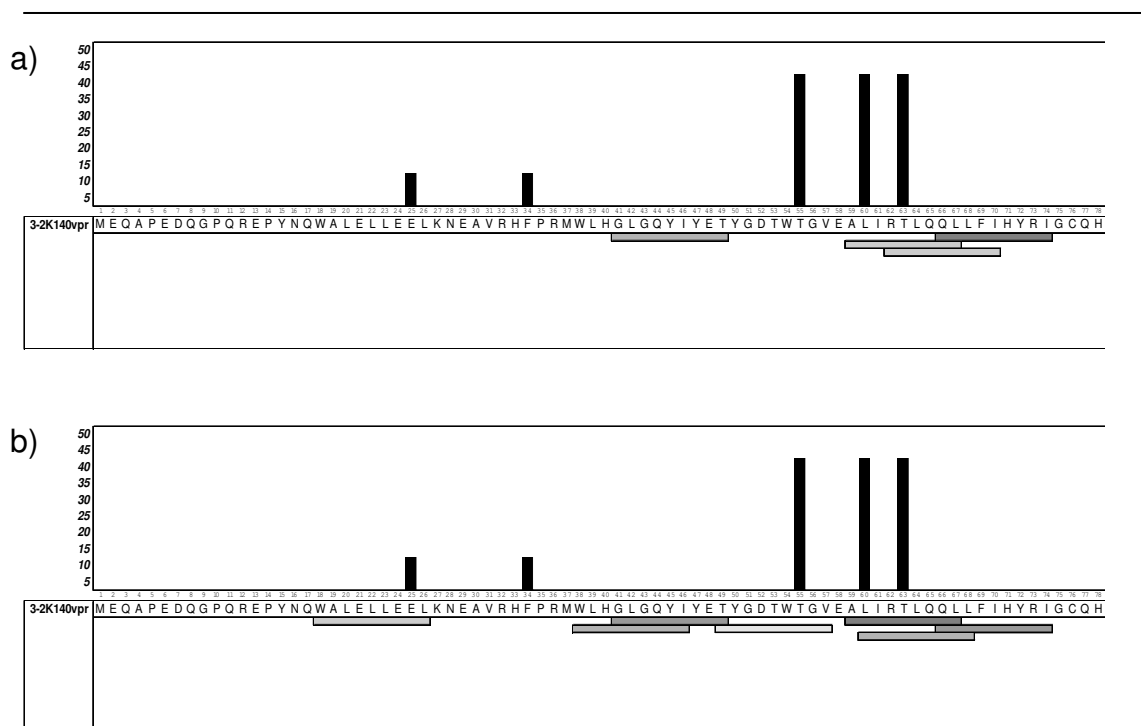


Abb. 36: nach Bindungsmotiven errechnete CTL-Epitope für Vpr (AS 1-78) in Pat 3-2, Klon 140. a) HLA-A*0201 b) HLA-A*0202. Im jeweils oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS in allen Klonen an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen die errechneten HLA-restringierten CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende.

Eine genauere HLA-Typ-Analyse erscheint zunächst also von bedeutender Wichtigkeit. Eine Studie von 1997¹⁷⁶ in Norditalien zeigte allerdings, dass 92,6% der HLA-A2 Positiven, den Untertyp A*0201 aufweisen. Insofern konzentrierte sich die Studie auf diesen in unserer Bevölkerungsgruppe vorherrschenden Subtypen des HLA-A2-Allels.

Wertet man die Variabilitätshäufigkeit innerhalb und außerhalb der Epitope in Abhängigkeit der HLA-Typen aus (Gruppenpaar 1, siehe 2.2.4) und stellt sie graphisch dar, ergeben sich Diagramme wie in Abbildung 37 beispielhaft dargestellt (Abb. 37). In jedem Diagramm sind die Untersuchungsergebnisse für einen bestimmten HLA-Typ zusammengefasst. Jede blaue Raute repräsentiert für jedes untersuchte Gen der einzelnen Patienten das Verhältnis von erwarteter und tatsächlicher Variabilität innerhalb der HLA-definierten Epitope. Liegt die Raute auf der zentralen horizontalen Linie ist die Variabilität innerhalb und außerhalb der Epitope als gleich errechnet worden und entspricht einer zufälligen Verteilung. Liegt er ober- oder unterhalb davon zeigt dies, dass die Variabilität innerhalb der Epitopbereiche erhöht bzw. erniedrigt ist. Über dem Plus-Zeichen sind die Werte der Patienten dargestellt, die eben jenen untersuchten HLA-Typ aufweisen, über dem Minus-Zeichen, die Ergebnisse derer, die den HLA-Typ nicht tragen. Der p -Wert bezeichnet bei dem t-Test unverbundener Stichproben die Irrtumswahrscheinlichkeit und steht in enger Beziehung mit dem Signifikanzniveau (Fehler 1. Art $\alpha = 5\%$). Bei einem p -Wert von $p > 0,05$ ist die Differenz zwischen den Mittelwerten nicht signifikant.

In Zusammenschau aller HLA-Typen und Proteine (Gruppenpaar 1) ließ sich innerhalb der Epitope keine eindeutig erhöhte Variabilität feststellen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nur wenige der Rechnungen ein signifikantes Ergebnis brachten. In einzelnen Fällen, wie A*6802, liegt der p -Wert unter 0,05 (Abb. 37). Die Daten weisen auf eine erhöhte Aminosäurevariabilität innerhalb der HLA-A*6802-restringierten CTL-Epitope in diesen Haplotyp tragenden Patienten hin. Allerdings lässt sich aufgrund der geringen Fallzahl von HLA-A*6802-positiven Patienten nur bedingt eine eindeutige Aussage machen. Bei den Berechnungen bezüglich HLA-A*0101, -A*0201, -A*0301, -A*2403, -B*0702 liegen die Ergebnisse nicht im signifikanten Bereich (Abb. 37). Alle weiteren Diagramme finden sich im Anhang (Abb. 52).

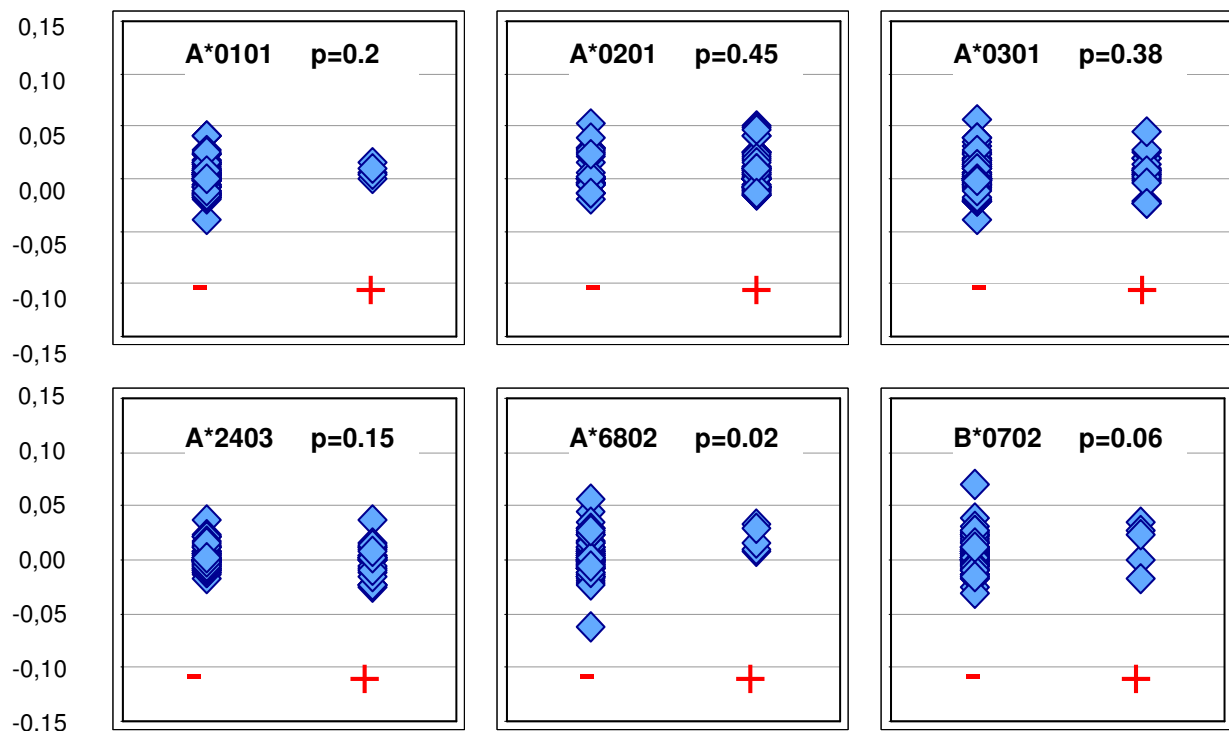


Abb. 37: Graphische Darstellung der Variabilitätshäufigkeit innerhalb der CTL-Epitope in Abhängigkeit der HLA-Typen (A*0101, A*0201, A*0301, A*2403, A*6802, B*0702). Eine blaue Raute repräsentiert für jedes untersuchte Gen der einzelnen Patienten das Verhältnis von erwarteter und tatsächlicher Variabilität innerhalb der HLA-definierten Epitope. Liegt die Raute auf der zentralen horizontalen Linie (0,00), entspricht die Variabilität innerhalb der Epitope einer zufälligen Verteilung. Liegt sie oberhalb davon, ist die Variabilität innerhalb der CTL-Epitope erhöht. + = Patienten, die das entsprechende MHC-Molekül tragen, - = Patienten, die das entsprechende MHC-Molekül nicht tragen. $p < 0,05$: es besteht eine signifikante Variabilitätshäufung innerhalb der berücksichtigten Epitope.

Um einen eventuellen Unterschied in Abhängigkeit von der Infektionsdauer aufzudecken wurden die Daten von Langzeitinfizierten und akut Serokonvertierten einzeln betrachtet (Gruppenpaar 2 und 3, siehe 2.2.4). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den MHC-positiven und -negativen Patientenproben festgestellt werden.

In der Analyse jedes einzelnen Proteins in Abhängigkeit des HLA-Typs, bestand die Möglichkeit, ein Protein zu identifizieren, das möglicherweise unter stärkerem Selektionsdruck steht als die anderen untersuchten (Gruppenpaar 4, siehe 2.2.4). Die Daten wiesen jedoch auch hier auf keine signifikant erhöhte Variabilität innerhalb der CTL-Epitope in den einzeln analysierten Proteinen hin.

Um den Fehler einer kleinen Stichprobe zu verringern, erfolgte außerdem die Analyse aller Proteine aller MHC-positiven Patientenproben zusammengefasst (Gruppenpaar 5, siehe 2.2.4). Auch hier ließ sich kein signifikantes Ergebnis erheben.

Da bei oben genannten Berechnungen, die Möglichkeit besteht, dass sich bei Berücksichtigung nur eines HLA-Haplotyps die Variabilität in entsprechendem Epitop durch die eines Epitops eines anderen HLA-Haplotyps außerhalb von Ersterem aufhebt und somit ein falsch negatives Ergebnis resultiert, wurde eine Analyse vorgenommen, die die einzelnen Patientensequenzen mit allen individuellen Haplotypen untersucht. Hierfür wurden die bereits experimentell nachgewiesenen CTL-Epitope herangezogen. Eine Häufung der Aminosäurevariabilität innerhalb der Epitope ergab sich nicht.

In Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse konnte die Hypothese, dass sich innerhalb der Epitope eine allgemein erhöhte Variabilität als Ausdruck des Selektionsdrucks des Immunsystems findet, für die hier untersuchten Gene bzw. Genabschnitte nicht bestätigt werden. Allerdings gelang dieser Nachweis wiederholt in vorangegangenen Studien (siehe 1.5.2.3). Die Existenz von durch Immundruck getriggerten Mutationen gilt als gesichert.

Die Daten bezüglich oben genannter Rechnungen finden sich im Anhang.

4 Diskussion

Die Immunantwort durch cytotoxische T-Lymphozyten spielt bei der Kontrolle der HIV-Virämie und somit beim Verhindern der Krankheitsprogression eine entscheidende Rolle^{98, 100}. Da CTL die viralen Proteinanteile (Epitope) in Verbindung mit dem MHC-I-Molekül auf der Zelloberfläche erkennen, ist ihre Antwort HLA-Typ-spezifisch. Nach gängiger Meinung üben spezifische CTL einen antiviralen Druck auf das Retrovirus aus und es kommt zur Ausbildung von viralen Fluchtmutanten, die sich diesem Druck zu entziehen suchen. Dabei ist es wahrscheinlich, dass sich nur diejenigen Epitope verändern, auf die ein starker und effizienter zellulärer Immundruck ausgeübt wird. Veränderungen in den CTL-Epitopen können bereits innerhalb von Tagen bis Wochen *post infectionem* auftreten^{93, 177}. Während zunächst mehrere Quasispezies nebeneinander existieren, setzt sich nach längerem Krankheitsverlauf eine von diesen aufgrund des größten Selektionsvorteils durch. Entgegen früheren Annahmen weiß man heute, dass der „Fitness“-Verlust, der durch die Escape-Mutationen im Bereich von CTL-Epitopen entsteht, auch zu einer Kontrolle des Virus führen kann – die Mutationen also nicht unbedingt schädlich für den Patienten sind. Manche Genomveränderungen jedoch, meist die, die spät im Verlauf der Infektion auftreten, sind mit einer starken Krankheitsprogression assoziiert^{102, 178}. Man vermutet, dass es hier zu kompensatorischen Mutationen gekommen ist, die den „Fitness“-Verlust, den die alleinige Mutation zur Folge hätte, abschwächen.

CTL-Escape-Mutationen sind ein entscheidender Aspekt in der HIV-Impfstoffentwicklung: zum einen, da konservierte Bereiche ein effizientes Ziel für antivirale Wirkstoffe darstellen, zum anderen, da auch Mutationen therapeutisch genutzt werden können, indem man durch Induktion eines „Fitness“-Verlustes eine Schwächung des Virus hervorruft.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse und Evaluation von CTL-Epitopen. In Hinblick auf den HLA-Typ A2 sollten die Art, der Ort, die Anzahl und das zeitliche Auftreten von Mutationen dokumentiert werden. Die Hypothese ist, dass innerhalb von Epitopen die Variabilität der Aminosäuren aufgrund des Immundrucks durch CTL erhöht ist und somit Ausdruck von Fluchtmutationen ist. Darüber hinaus strebte man eine Identifikation von eventuellen kompensatorischen Mutationen außerhalb der Epitop-Sequenzen an.

Um diese Ziele zu erreichen, wurde zum einen untersucht, ob die experimentell nachgewiesenen und die aufgrund bestimmter Motive vorhergesagten HLA-spezifischen CTL-Epitope tatsächlich eine vermehrte Variabilität aufweisen und damit den antiviralen Druck durch die CTL widerspiegeln, zum anderen, ob und wie sich die Epitop-Variabilität bei Kurz- und Langzeitinfizierten unterscheidet.

Zu diesem Zweck wurden die Blutproben zweier therapie-naiver Patientengruppen – den Long Term Non Progressors (LTNP) und den akut Serokonvertierten (SK) – untersucht. Dadurch sollten ein Aufdecken von „hot-spots“ von Variabilität bereits kurz nach der Infektion und ein Vergleich zwischen Langzeitinfizierten und frisch Infizierten möglich werden. Zur Eingrenzung der relevanten CTL-Epitope erfolgte die HLA-Typisierung der Patienten. Durch die Auswahl von das HLA-A2-Allel-tragenden HIV-Infizierten, die 65% der in die Studie einbezogenen Proben ausmachten, wurde die Möglichkeit zum direkten Vergleich mit A2-negativen Patienten geschaffen. Nach Isolation des Plasma-Virus wurde der Bereich bp 5041-6310 (*vpr-vpu*) des HIV-Genoms mittels RT-PCR amplifiziert. Die Auswahl des HIV-Genomabschnitts erfolgte aufgrund der aktuellen Literatur, in der akzessorische und regulatorische Proteine als wichtige Ziele der spezifischen CTL beschrieben werden^{164, 179}. Außerdem enthält der Abschnitt bp 5041-6310 eine Vielzahl von unterschiedlichen, sich überlappenden Genen, was eine große Anzahl an Analysen möglich machte.

Zur Untersuchung der Mutationen in dem Genomabschnitt erfolgte neben einer qualitativen Betrachtung (Vergleich der Isolate mit Referenzsequenz, Vergleich LTNP mit SK, Vergleich HLA-A2⁺ mit -A2⁻) eine statistische Auswertung, die anhand von bestimmten Bindungsmotiven vorhergesagte CTL-Epitope in die Überlegungen einbezog. Darüber hinaus wurden mit Hilfe einer dafür entwickelten *Software* jene Bereiche identifiziert, die eine hohe Variabilität innerhalb der einzelnen Klone aufweisen und somit möglicherweise *in vivo* einem Selektionsdruck durch CTL ausgesetzt waren – demnach CTL-Epitope repräsentieren könnten.

Die in der Arbeit untersuchten Sequenzen der Primärisolate unterscheiden sich teilweise stark von der Referenzsequenz HXB2, von einem Zeitpunkt zum anderen (wenn mehrere Blutproben eines Patienten vorlagen), und auch innerhalb der Patientenproben zeigten sich Differenzen. Auffallend sind Häufungen von CTL-Epitopen – sowohl von beschriebenen als auch von errechneten – in bestimmten Genomregionen. Dabei überlagern sich auch solche, die für verschiedene HLA-Typen und -Untertypen spezifisch

sind ¹⁶¹. Entgegen der Annahme, Mutationen beschränkten sich vornehmlich auf die CTL-Epitope, treten sie zahlreich auch außerhalb dieser Bereiche auf. In einigen Sequenzen weisen die CTL-Epitope eine ausgeprägte Variabilität auf (z.B. Vpu Epitop I), manchmal zeigt sich jedoch auch eine Konservierung der Region (z.B. Vif Epitop II in LTNP). Die Hypothese, dass sich innerhalb der Epitope eine erhöhte Variabilität als Ausdruck des Selektionsdrucks des Immunsystems findet, konnte demnach für die untersuchten Gene bzw. Genabschnitte nicht bestätigt werden. Es lässt sich auch nicht vorhersagen, wo im HIV-Genom nach Infektion Mutationen stattfinden werden. Ein solches Wissen wäre ausgesprochen hilfreich für die Entwicklung eines langfristig wirksamen, therapeutischen oder primär-prophylaktischen Medikaments.

Variabilität des Virusgenoms

Jeder mit HIV infizierte Patient „beherbergt“ eine Vielzahl von genetisch unterschiedlichen Viruspopulationen, und neue Varianten entstehen konstant während des Krankheitsverlaufs. Verantwortlich dafür ist die hohe Mutationsrate des HI-Virus in Verbindung mit dem Fehlen einer Proofreading-Funktion der Reversen Transkriptase (RT) ¹⁸⁰. Bei Retroviren wird die Mutationsrate mit etwa 10^{-4} pro Base pro Zyklus angegeben ¹⁸¹. Diese, sowie einen viralen *turnover* (dt.: Umsatz) von 10^9 Viren pro Tag ⁷² vorausgesetzt, kommt *in vivo* jede mögliche Punktmutation täglich 10^4 bis 10^5 Mal im HIV-Genom vor ¹⁸¹.

Bei diesen Angaben ist man leicht dazu geneigt, die zahlreichen Punktmutationen und Genomvariationen allein stochastisch zu erklären. Doch trifft dies nur teilweise zu, da sie nach und nach eine Art Optimierung des Virus bewirken. Ein Großteil der zufälligen Mutationen ist zwar nachteilig oder sogar tödlich für das Virus, doch ermöglichen sie auch die Bildung von Escape-Varianten, die sich dem humanen Immunsystem oder der antiviralen Therapie entziehen, und somit einen Selektionsvorteil bewirken. Der Selektionsdruck nimmt also rasch Einfluss auf die Virusentwicklung, und von neutralen Mutationen kann nicht mehr die Rede sein. Eine gerichtete Variabilität zeigt das Beispiel von HIV 6-0 und 6-1: Eine Mutante setzt sich in diesem Fall im Infektionsverlauf durch (Abb. 33). Allen et al. zeigte 2005, dass der antivirale Druck durch die CTL für fast zwei Drittel aller Mutationen des HIV-Genoms verantwortlich ist ¹¹³.

Diese enorme Variabilität des HIV stellt eines der größten Hindernisse bei der Entwick-

lung eines effektiven Impfstoffes gegen HIV dar.

CTL-Antwort und Fluchtmutationen – wann, wie, wo?

Wegweisend für die Generierung dieser Studie waren Hinweise, dass spezifische CTL bereits kurze Zeit nach der Infektion auftreten¹⁷⁷. Gegen frühere Annahmen sind nicht nur Strukturproteine Ziel von CD8⁺ T-Lymphozyten, sondern auch akzessorische sowie regulatorische Proteine^{164, 182}. Die zelluläre Antwort gegen diese tritt besonders zeitig auf, da sie früh im Replikationszyklus translatiert werden^{93, 182}. Spezifische CTL mit effektivem antiviralem Druck führen zu einer Flucht des Virus, die im Virusgenom nachweisbar wird.

Die Arbeit konzentriert sich auf einen Genomabschnitt, der die akzessorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu* und die regulatorischen Gene *tat* Exon 1 und *rev* Exon 1 enthält. Um frühe Mutationen zu erkennen, wurden Proben der Serokonverterstudie (Dr. C. Kücherer, RKI) analysiert. Man ging davon aus, dass die HI-Viruspopulation frisch Infizierter nach einigen Wochen eine größere Zahl an Quasispezies enthält. Ein einheitlicheres Bild mit der für das Virus „optimalen“ Variante war bei den Langzeitinfizierten zu erwarten. In beiden Gruppen vermutete man eine Konzentrierung der Mutationen und der Aminosäurevariabilität in den beschriebenen und errechneten CTL-Epitopen.

In den vorliegenden Daten zeigte die SK-Gruppe lediglich im Protein Vif eine größere AS-Variabilität (3.3.1). Auffallend war außerdem eine deutliche HXB2-Prävalenz in Vpr, HLA-A2-CTL-Epitop III und IV, bei den HLA-A2⁻ Patienten. Die A2⁺ Kohorte zeigte dagegen eine ausgeprägte Variabilität in dieser Region. Dies kann auf einen zellulären Immundruck auf die entsprechenden CTL-Epitope (A2⁺) hinweisen, der konsekutiv zu Fluchtmutationen geführt hat. Ein Ergebnis, das eine Bestätigung der oben genannten Hypothese darstellt und durch zahlreiche Studien gestützt wird^{110, 111, 112}.

Die Proben 0 und 1 des Patienten HIV 6 (HLA-A2, A29), zwischen deren Gewinnung nur etwa ein Monat liegt, zeigen im Tat-Exon-1-Segment nur geringfügige Veränderungen. Bemerkenswert ist aber der in 6-1 erstmals auftretende AS-Wandel an Position 24 (K statt N), der mit einem Anteil von 40% an der Gesamtpopulation eine starke Quasi-spezies bildet (siehe 3.3.4, Abb. 27). Da Position 24 von Tat Exon 1 Teil des HLA-A29-restringierten CTL-Epitops ist, könnte die Veränderung möglicherweise Ausdruck einer Fluchtvariante sein. Bestätigung findet diese Vermutung in der

Tatsache, dass nur die Patienten HIV 3 und HIV 36 unter den HLA-A29-Negativen (15 Pat.) ebenfalls ein Lysin an dieser Stelle aufweisen. Außerdem tragen auch die HIV-Klone des Pat. 334 (A29⁺) ein K an Position 24. Nicht zu klären ist allerdings, ob dies Ausdruck einer früh stattgefundenen Fluchtmutation ist, oder ob Pat. 334 bereits mit dieser Variante infiziert wurde.

Eine Auffälligkeit war in Protein Vpr zu beobachten: Die HXB2-Sequenz trägt an Position 60 ein I, einige Patienten (HIV 14-1, HIV 20-0, HIV 3-2) weisen hier aber ein L auf. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Altfeld et al. zeigte, dass nur für die Epitop-Variation mit L spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten gebildet werden¹⁸³. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass sich eine Escape-Variante in der Evolution durchgesetzt hat und bereits so oft vertreten ist, dass sie in die Konsensussequenz eingegangen ist. Auffallend ist, dass die I60L-Variante nur in der LTNP-Kohorte auftritt. Ein Zusammenhang mit einer effektiveren Viruskontrolle ist möglich.

Insgesamt ergab sich ein uneinheitliches Bild in den hier untersuchten Sequenzen, so dass eine umfassende Regel nicht aufgestellt und die Hypothesen nicht eindeutig belegt werden konnten. Dies führt zu folgenden Überlegungen:

1. War im Fall der Serokonvertierten für eine Entstehung von HLA-A2-spezifischen Fluchtmutanten nicht ausreichend Zeit vergangen?
2. Sind bereits vorhandene Epitop-Veränderungen vom Überträger übernommen worden und somit nicht Ausdruck der zellulären Antwort des neuen Wirtes? Wird im weiteren Verlauf der Infektion eine Rückmutation zum Wildtyp stattfinden¹¹⁵?
3. Konnten bestimmte Mutationen wegen des damit verbundenen „Fitness“-Verlustes nicht auftreten? Mangelte es an kompensatorischen Mutationen?
4. Sind die Bereiche, die CTL-Epitope flankieren, entscheidender, da sie die Prozessierung der Proteine beeinflussen?
5. Hat das Immunsystem der Patienten überhaupt Epitop-spezifische CTL ausgebildet, die einen Mutationsdruck auf das Virus ausüben? Oder waren vorhandene CTL ineffektiv?

Vorangegangene Punkte fordern Nachuntersuchungen und Folgestudien, die mehr Klarheit in die vorhandenen Daten bringen können. Vor allem wäre der Nachweis von individuellen spezifischen CTL von Bedeutung, womit sich auch die mit Hilfe einer *Soft-*

ware ermittelten Epitope überprüfen ließen. Dass der rechnergestützte Weg ein viel versprechender ist, um zeitsparend eine Großzahl von Epitopen zu identifizieren, ist mittlerweile von unterschiedlichen Arbeitsgruppen bestätigt worden¹⁸⁴.

Ebenfalls interessant ist, ob gegen Escape-Varianten neue spezifische CTL gebildet werden, die die zelluläre Abwehr aufrechterhalten. Aufgrund der Destruktion von CD4⁺ Zellen, dendritischen Zellen und lymphatischem Gewebe ist dies für das Immunsystem erschwert, doch beschreibt es eine Studie von Allen et al.¹⁸⁵.

Oben genannter Punkt 5 scheint vor allem in Beziehung auf die akzessorischen Proteine Vpu und Vpr eine Rolle zu spielen. Vpu ist eines der Proteine von HIV-1 mit der geringsten antigenetischen Wirkung. Trotz der Beschreibung von zwei immunodominanten B-Zell-Epitopen in Vpu, zeigen nur 20-30% der getesteten Patienten eine nachweisbare Immunantwort^{186, 187}. Vpu scheint auch ein schwaches Ziel für CTL zu sein. Obwohl ein Haupt-CTL-Epitop identifiziert wurde, zeigte in einer Studie von Addo et al. nur zwei Prozent der 70 untersuchten Patienten eine nachweisbare CTL-Antwort¹⁸⁸. Eine denkbare Erklärung für diese Daten ist, dass die Vpu-Sequenz diejenige mit der höchsten Variabilität unter den HIV-1-Genen ist¹⁸⁹. Eine Überlegung, die sich auch in der vorliegenden Arbeit bestätigte. Ebenso ergab eine Studie von Altfeld 2005 wenige Hinweise dafür, dass HLA-A2-spezifische CTL gegen ein Vpr-Epitop einen immunologischen Selektionsdruck auf HIV-1 Clade B ausüben¹⁸³. Dies geht in Einklang mit der in diesen Versuchen gefundenen hohen und diversen Variabilität der Vpr-Epitope.

Serokonvertierte versus LTNP

Die spezifische CTL-Antwort auf HIV ist besonders in der Anfangsphase der Infektion von großer Bedeutung. Nachgewiesen effektiv übt sie einen antiviralen Druck auf den Erreger aus, der diesem mit Fluchtmutationen zu entgehen versucht. Da Veränderungen in den CTL-Epitopen bereits innerhalb von Wochen nach Viruseintritt nachzuweisen sind^{93, 177} konzentrierte sich vorliegende Arbeit nicht nur auf Langzeitinfizierte, sondern untersuchte auch Viren kürzlich Infizierter.

Die Hypothese bestätigend, dass sich bei Frischinfizierten die dominante Variante noch nicht durchgesetzt hat, übersteigt bei Betrachtung des Vif-Proteins die Zahl der Quasispezies der akut Serokonvertierten die der LTNP (siehe 3.3.1). Jedoch war dies nicht in den übrigen Proteinen zu bestätigen. Stark konservierte Sequenzen in den SK-Isolaten

lassen sich zumindest teilweise durch eine zu kurze Infektionsdauer erklären. Zwar sind spezifische CTL bereits nach einigen Tagen nachweisbar, doch treten die Mutationen meist erst innerhalb der ersten Wochen auf^{177, 182}. So war in einer Untersuchung von Cao et al., die die akute Infektion von zwei Patienten verfolgte, zwar bereits nach acht Tagen *post infectionem* eine CTL-Antwort gegen Epitope in Tat und Vpr nachweisbar, die volle Stärke erreichte sie erst bis zum Tag 34. Es folgte eine graduelle Abschwächung der CTL-Antwort, und nach 298 Tagen sank sie unter die Nachweisgrenze. Parallel dazu trat bei einem der von Cao et al. untersuchten Patienten eine Escape-Variante auf. Nach 50 Tagen war sie bei 40% der Klone, nach 259 Tagen bei 94%, nach 1037 Tagen bei 100% der Klone zu beobachten.

In Einklang mit dieser Studie (die SK-Proben wurden nur einige Monate nach der Infektion gewonnen, s.o.) weist die SK-Kohorte häufig eine Koexistenz von Quasispezies auf. Eine Art Dokumentation des Vorgangs der Selektion bietet die Betrachtung von HIV 6-0 und HIV 6-1. Anfangs bestehende Quasispezies (HIV 6-0) verschwinden innerhalb des Zeitraums von einem Monat (HIV 6-1) zu Gunsten einer dominanten Variante (siehe 3.4., Abb.33).

Ebenfalls bestätigt vorliegende Arbeit, dass HLA-Typ spezifische Mutationen sich erst nach einigen Wochen bis Monaten voll durchsetzen. Auffallend waren diesbezüglich die HLA-A2-CTL-Epitope III/IV in Vpr, in denen sich in A2⁺ Patienten gehäuft AS-Variationen fanden. Dies war jedoch nur in der LTNP-Kohorte, nicht dagegen in der SK-Gruppe der Fall (siehe 3.5.2, Abb. 35). Es ist davon auszugehen, dass die A2⁺ SK eine ähnliche Variabilität nach einer gewissen Infektionsdauer entwickeln werden.

Die genaue Untersuchung der zellulären Immunreaktion im Verlauf der HIV-Infektion ist ausgesprochen sinnvoll. Verschiedene Untersuchungen haben bereits ergeben, dass die Breite und Spezifität der CD8⁺-T-Zellantwort in der akuten Infektionsphase Charakteristiken hat, die sich von der in der späten Phase unterscheidet^{201, 202}. So zeigten Cao et al. 2003, dass die CTL-Antwort bei akut Infizierten spezifischer und weniger breit ist als nach einem Krankheitsverlauf von 3 Monaten¹⁸². Jones et al. wiesen nach, dass zahlreiche Escape-Mutationen mit einer schnelleren Krankheitsprogression einhergehen, und propagieren, dass ein Vakzin auf viele verschiedene Epitope zielen muss, um wirksam zu sein¹⁷⁷.

Zusammengefasst sind die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten mit dem der-

zeitigen Stand der Forschung vereinbar und die Ergebnisse fügen sich in die bisher veröffentlichten Studien im Bereich der zellulären Immunabwehr gegen HIV ein.

Mutationen und ihr Einfluss auf die Virusfunktion

Genomveränderungen haben einen mehr oder weniger großen Einfluss auf die Virusfunktion. Treten sie zum Beispiel an einer Position auf, die die Struktur eines Proteins verändert, kann dies zu einem Funktionsverlust desselben führen. Dagegen gibt es Bereiche, die ohne größere Folgen für das Virus verändert werden können.

Erst kürzlich wurde aufgedeckt, dass LTNP mit hoher Frequenz eine Mutation an der Stelle R77 (Arginin) in Vpr aufweisen. Arginin an dieser Position scheint entscheidend für die Fähigkeit des Proteins zur Apoptoseinduktion zu sein¹⁶⁸. Interessanterweise zeigen von zehn LTNP-HIV-Isolate in dieser Studie nur drei (HIV 7-1, HIV 9-1, HIV 12-1) ein Arginin an dieser Position. Etwa zwei Drittel weisen also die von Lum et al. als schützend postulierte Mutation an Position 77 auf¹⁶⁸. Doch ist sie mit vergleichbarer Häufigkeit in zwei der sieben SK vertreten. Auch wurde berichtet, dass eine Mutation von L64 die pro-apoptotische Aktivität von Vpr verstärkt¹⁶⁹. Die 184 Klone dieser Studie weisen ausnahmslos Leucin auf. Vor allem in der LTNP-Gruppe war dieses Ergebnis zu erwarten. Beide oben genannten Studien weisen darauf hin, dass Veränderungen im carboxyterminalen Bereich des Proteins das apoptotische Potential von Vpr beeinflussen.

Die Inaktivierung von Tat durch eine Mutation der Cystein-AS an Position 22, 25, 27 und 37 wurde erstmals von Garcia et al. und Ruben et al. nachgewiesen^{43, 172}. Das *tat*-Gen mit Veränderungen an C22 und C37 konnte seitdem als potentiell prophylaktisches und/oder therapeutisches Vakzin identifiziert werden^{173, 174}. Auffallenderweise finden sich in den 184 hier untersuchten Klonen nur zwei Austausche der genannten Cystein-AS. Dies bestätigt die Studien, die diesen Proteinabschnitt als essentiell für die Funktion von Tat nachwiesen.

Die Tat-PTD an Position 49-57 enthält sechs Arginin und zwei Lysin und vermittelt den Transport über Zellmembranen¹⁷⁵. In Einklang mit der Studie von Park et al. (2002) ist auch in den hier untersuchten HIV-Sequenzen diese Region hochkonserviert. Bis auf drei Patientenproben (Pat 334, HIV 36-1, HIV 12-1) mit einer W52R-Veränderung, einem Fall (HIV 7-1) mit einem G53R-Austausch sowie neun isolierten Punktmuta-

tionen, stimmt die PTD-Region in den untersuchten Proben mit der HXB2-Sequenz überein.

Die Bedeutung des HLA-Typs

Der Einfluss des Major Histokompatibilitätskomplexes (MHC) auf die immunologische Anfälligkeit eines Individuums für virale Infektionen wurde ursprünglich von Zinkernagel und Doherty entdeckt, die ermittelten, dass nicht nur das virale Antigen, sondern auch das polymorphe MHC-Molekül die Erkennung durch CTL beeinflussen¹⁹⁰. Seitdem ist die Assoziation zwischen dem HLA-Typ und der Suszeptibilität gegenüber verschiedenen Viren – insbesondere dem HIV – eingehend untersucht worden^{84, 191} (siehe 1.5.2.1). Von der genauen Analyse der HLA-Typ-spezifischen CTL-Epitope verspricht man sich Fortschritte in der HIV-Impfstoffentwicklung. Konträr dazu steht allerdings eine erst kürzlich veröffentlichte Studie von Kiepiela et al.¹⁹². In deren Kohorte waren eine niedrige Viruslast und die Stärke der CTL-Antwort unabhängig vom HLA-Typ des Patienten oder auch von Veränderungen in den CTL-Epitopen.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf den Vergleich von Viren HLA-A2-positiver und HLA-A2-negativer Patienten. Dies ist ein Ansatz, bei dem gleiche Genomabschnitte miteinander verglichen und die Diversität in diesen Bereichen direkt gegenüber gestellt werden kann. Es wurde angenommen, dass die Variabilität jener A2-restringierten Epitope als Ausdruck vorhandener spezifischer CTL bei den das Allel tragenden Patienten höher ist als bei A2-negativen Patienten.

Bestätigung dieser Hypothese findet sich in Vpr, HLA-A2-CTL-Epitop III und IV, in denen bei A2⁺ Individuen eine deutlich höhere Variabilität im Vergleich zu den A2⁻ zu erkennen ist (siehe 3.5.2). Die HXB2-Sequenz macht hier bei den A2⁻ LTNP 87% aus, bei den A2⁺ LTNP ist sie nur zu 22% vertreten. Betrachtet man dahingegen die SK-Kohorte, zeigt sich – A2⁺ oder A2⁻ – kein bedeutender Unterschied in der Häufigkeit der Übereinstimmung mit HXB2 (A2⁺: 80%, A2⁻: 88,9%). Dies ist ein Ergebnis, das darauf hinweist, dass Allelträger in A2-restringierten CTL-Epitopen aufgrund des antiviralen Druckes durch spezifische CTL eine höhere Variabilität aufweisen. Noch dazu unterstützt es die Überlegung, dass sich Mutationen erst nach einiger Zeit *post infectionem* ausbilden. Eine Untersuchung auf zellulärer Ebene wäre hier sehr interessant.

Eine durchgehend Bestätigung der oben genannten Hypothese konnte in der unter-

suchten Kohorte allerdings nicht gefunden werden. Es ist denkbar, dass gegen einige der untersuchten Epitope keine spezifischen CTL gerichtet waren, die einen effektiven antiviralen Druck ausgeübt hätten (s.o.). Dies implizieren die Ergebnisse einer am RKI durchgeführten Studie von Dr. J. Richardt: In nur 6,6% der Fälle reagierten die CTL im Elispot auf die patienteneigenen, HLA-spezifischen Epitopeptide. Die Reaktion auf die HXB2-Epitope war demgegenüber vergleichbar schwach. Dieses unerwartete Ergebnis wirft die Frage auf, ob die beschriebenen Epitope tatsächlich mit den individuellen Epitopen bzw. spezifischen CTL-Epitopen übereinstimmen. Sind die hier untersuchten Epitope evtl. gar nicht aussagekräftig? Es muss also in Erwägung gezogen werden, dass viele der *in vivo* existierenden CTL-Epitope noch gar nicht dokumentiert wurden. Mittels computergestützter Erkennung von Motiven, die auf MHC-Molekülen gebunden werden können, war es möglich, die Anzahl möglicher HLA-spezifischer Epitope zur Analyse zu erhöhen. Allerdings fehlt hier eine experimentelle Bestätigung.

Eine weitere mögliche Erklärung für fehlende Veränderungen in den hier untersuchten CTL-Epitopen deutet eine Studie von Moore et. al. an: Sie analysierte in einer großen Kohorte die individuellen CTL-Epitope in der RT-Aminosäuresequenz und wertete die Ergebnisse unter Berücksichtigung des HLA-Typs statistisch aus. Manche Bereiche mit ausgeprägtem Polymorphismus befanden sich in Abschnitten bereits beschriebener Epitope, andere häuften sich außerhalb davon¹⁹³. Dies kann zum einen auf noch nicht dokumentierte Epitope hinweisen und zum anderen Untersuchungen bestätigen, die zeigten, dass auch Mutationen in den Epitop-flankierenden Bereichen für die CTL-Funktion wichtig sind^{121, 122}, indem sie durch eine Beeinflussung der Prozessierung viraler Proteine die Bindung an das MHC-I-Molekül verändern bzw. behindern (s.o.).

Goulder et al. überlegten, dass sich in einer Population mit einem häufigen HLA-Typ die Wahrscheinlichkeit vergrößert, dass eine für diesen Typ spezifische Escape-Variante auf eine Person mit dem gleichen HLA-Typ übertragen wird und so die Escape-Mutationen erhalten bleiben¹¹⁸. Bei einem Infizierten mit einem häufig vertretenen HLA-Typ ist demnach das Risiko für einen ungünstigen Krankheitsverlauf höher als bei einem mit einem seltenen HLA-Typ. Verfolgt man diesen Gedanken weiter, beeinflusst die HLA-spezifische Immunantwort also die Evolution des HIV. Korber et al. postulierten, dass die ethnische Verteilung von MHC-Molekülen zu unterschiedlichen HIV-Typen in verschiedenen Populationen führen wird¹⁹⁴. Auch Brander et al. vermuten eine schrittweise Anpassung des Virus an die Eigenschaften des Wirtes¹⁹⁵.

Andererseits gibt es Daten dafür, dass sich Viren mit CTL-Escape-Mutationen bei Übertragung in einen Empfänger ungleichen HLA-Typs zum Wild-Typ zurückwandeln, vorausgesetzt, dass die Escape-Variante mit einer verminderten viralen „Fitness“ assoziiert ist¹¹⁷.

Leslie et al. sieht einen möglichen Grund für in Sequenzanalysen fehlende Veränderungen der Epitope in Folgendem: Eine positive Selektion der Escape-Mutante mit einer stabilen Transmission führt zu dem Punkt, an dem diese Variante in der Population vorherrscht und selber die Konsensussequenz bestimmt¹⁹⁶. Diese Ansicht stützt eine 2007 von Bhattacharya et al. veröffentlichte Studie²⁰⁵. Mittels statistischer Methoden wurden phylogenetische Einflüsse auf die genetische Variabilität des HIV betrachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die virale Abstammung einen größeren Effekt auf jene hat als bisher angenommen und auch für zahlreiche Aminosäurevariationen verantwortlich ist, die im Rahmen früherer Analysen dem CTL-getriggerten Immundruck zugeschrieben worden waren. Eine durch phylogenetische Auswertungen bereinigte Datenlage verspräche eine exaktere Identifizierung von Escape-Mutanten.

Bei den computergestützt errechneten CTL-Epitopen zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen von HLA-A2 (siehe 3.6). Eine genauere HLA-Typisierung erscheint demnach zunächst bedeutsam – aufgrund des deutlichen Überwiegens des Subtyps HLA-A*0201 (92,6%) in der kaukasischen Bevölkerung¹⁷⁶ wurde darauf jedoch verzichtet.

Die zelluläre Immunantwort ist ausgesprochen komplex. Beweiskräftige und überzeugende Assoziationsstudien bezüglich des Einflusses von HLA auf den Verlauf und die Suszeptibilität von Infektionskrankheiten erfordern große Fallzahlen, einen sinnvollen ethnischen Hintergrund, akkurate klinische Informationen und Modelle, die auch weitere genetische Faktoren berücksichtigen. Alle diese Kriterien zu erfüllen ist schwierig, so dass viele durchgeführte Allel-Assoziationsstudien (häufig mit kleinen Fallzahlen) erst noch bestätigt werden müssen¹⁹¹.

Kompensatorische Mutationen

Mit der statistischen Auswertung wurde die Möglichkeit geschaffen, quantitativ zu bestimmen, welche Genomabschnitte eine Häufung von Mutationen aufweisen. Da-

durch sind auch Zusammenhänge zwischen verschiedenen Mutationen zu analysieren und eventuelle kompensatorische Mutationen aufzudecken. Kompensatorische Genomveränderungen haben die Fähigkeit den „Fitness“-Verlust, den eine andere Mutation hervorruft, abzuschwächen oder sogar aufzuheben. Bestimmte Escape-Mutationen, die sich wegen des damit verbundenen viralen Schadens alleine nicht durchsetzen können, werden durch kompensatorische Mutationen für das Retrovirus möglich.

Studien von Liang, Rong und Russell zeigten, dass Deletionen im Bereich der nahe der U5-Region liegenden *Dimerization initiation site* (DIS, dt.: Dimerisationsinitiationsbereich), die isoliert zu einer Beeinträchtigung der viralen Enkapsidierung (engl.: packaging) und Verhinderung der Replikation führen, durch Punktmutationen in der Gag-Region (Gag interagiert mit der DIS während des Packvorgangs), zu kompensieren sind^{198, 199, 200}. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Friedrich (2004) beschäftigt sich mit der erst spät im Krankheitsverlauf auftretenden Escape-Mutation CM9 in einem CTL-Epitop der Gag-Region von SIV_{mac}¹⁷⁸. Allein führte diese Mutation zu einer stark verminderten Infektiosität des Retrovirus. Fast ausschließlich in Kombination mit der CM9-Variation und mit signifikantem Zusammenhang wurden außerhalb des Epitops liegende Zweitmutationen beobachtet, die die Replikationsfähigkeit des SIV wiederherstellten.

Die Primärmutation und die kompensierende Mutation müssen demnach nicht zwangsläufig in unmittelbarer Nähe zueinander liegen. Auch Zweit-Mutationen mit einem ausgesprochenen räumlichen Abstand von der ursprünglichen Mutation können kompensatorisch wirken und den dadurch bedingten viralen „Fitness“-Verlust abschwächen. Zur Aufdeckung kompensatorischer Mutationen dürfen also die CTL-Epitope nicht isoliert, sondern eingebettet in ihr weiteres Umfeld betrachtet werden.

Die vorliegende Studie untersuchte konsequenterweise die gesamte Nukleotidsequenz eines Proteins und dessen Aminosäureabfolge. Bei eingehender Betrachtung der Vpu-Aminosäurefolge in HIV 36-1 fällt auf, dass ein Alanin (A) an Position 77 regelmäßig mit Asparaginsäure (D) an Position 79 verknüpft ist. Befindet sich an Position 79 aber ein Asparagin (N), was der vorherrschenden Variante entspricht, ist Position 77 mit D, K oder N besetzt (siehe 3.3.3, Abb. 24). Diese Kombination von A77 mit D79 scheint zwingend zu sein und könnte Ausdruck einer kompensatorischen Mutation sein. Dieser Sachverhalt bedarf weiterer Abklärung.

Statistische Auswertung

Um die erhobenen Daten objektiv beurteilen zu können, wurde eine statistische Auswertung vorgenommen. Aufgrund der Masse der Daten und vielfältigen zu berücksichtigenden Faktoren ist eine akkurate Analyse nur auf diese Weise möglich. Somit konnte die Variabilitätswahrscheinlichkeit jeder Aminosäureposition inner- und außerhalb eines Epitops für jede Patientenprobe und die unterschiedlichen HLA-Typen errechnet und graphisch dargestellt werden. Ziel war es eine eventuell erhöhte Variabilität von Aminosäuren innerhalb eines Epitops für jede Patientenprobe und die unterschiedlichen HLA-Typen zu ermitteln.

Das Verhältnis der Anzahl variabler Aminosäuren, die aufgrund zufälliger Verteilung innerhalb eines CTL-Epitops zu erwarten waren, und der tatsächlichen Anzahl von variablen Aminosäuren innerhalb der vorhergesagten Epitope (siehe 2.2.3.8) wurde hierzu rechnerisch analysiert. Mit Hilfe eines t-Tests für unverbundene Stichproben wurden verschiedene Gruppenpaare untersucht (siehe 2.2.4). Zunächst wurden – unter Berücksichtigung des HLA-Typs – alle untersuchten Proteine der diesen Haplotyp aufweisenden Patienten, denen ohne diesen Haplotyp gegenübergestellt. Um dabei ein Protein, das eventuell verstärkt unter immunologischen Selektionsdruck steht, nicht zu übersehen, wurde oben beschriebene Rechnung durch eine Analyse unter Berücksichtigung der einzelnen Proteine ergänzt. Ebenso erfolgte eine Analyse der Langzeitinfizierten und akut Serokonvertierten getrennt voneinander, sowie eine, die alle Proteine aller für irgendeinen der HLA-Typen positiven Patientenproben (die einzelnen MHC-Haplotypen zusammengefasst) betrachtet, insbesondere um den Fehler durch eine geringe Stichprobe zu verringern.

Bei Berücksichtigung nur eines HLA-Haplotyps besteht allerdings die Möglichkeit, dass die Variabilität in entsprechendem Epitop durch die eines Epitops eines anderen HLA-Haplotyps außerhalb von Ersterem aufgehoben wird und somit ein falsch negatives Ergebnis resultiert. Eine aus diesem Grund durchgeführte Analyse, die die einzelnen Patientensequenzen mit allen individuellen Haplotypen untersuchte, ergab allerdings auch hier keine signifikante Variabilitätshäufung innerhalb der Epitope.

Wie im Ergebnisteil erwähnt, konnte bei den unterschiedlichen Analysen keine eindeutig erhöhte Variabilität innerhalb der Epitope festgestellt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nur wenige der Rechnungen ein signifikantes Ergebnis

erbracht. In einzelnen Fällen, wie z.B. bei HLA-A*6802 (Gruppenpaar 1), liegt der p -Wert unter 0,05. Die Daten weisen auf eine erhöhte Aminosäurevariabilität innerhalb der HLA-A*6802-restringierten CTL-Epitope in den diesen Haplotyp tragenden Patienten hin. Allerdings lässt sich aufgrund der geringen Fallzahl von HLA-A*6802-positiven Patienten nur bedingt eine eindeutige Aussage machen und das Ergebnis ist eher als zufällig zu interpretieren.

In Zusammenschau der statistischen Analysen konnte die Hypothese, dass sich innerhalb der HLA-definierten Epitope eine erhöhte Variabilität als Ausdruck des Selektionsdrucks des Immunsystems findet, für die hier untersuchten Gene bzw. Genabschnitte nicht bestätigt werden. Dies ist ein Hinweis dafür, dass jene Gene nicht unter einem starken CTL-vermittelten Selektionsdruck stehen.

Methoden-Diskussion

Zur Untersuchung der oben genannten Fragestellungen wäre eine Kohorte mit Individuen ideal, deren Infektionsverlauf von der Serokonversion bis in die späte Infektionsphase mit regelmäßigen Blutproben dokumentiert wird. Dies würde einen besseren Vergleich in Hinblick auf die virale Mutationsrate und das zeitliche Auftreten von Escape-Mutationen innerhalb und zwischen den Patienten erlauben. Die große Variabilität des HIV hat zur Folge, dass die hier untersuchten Virus-Sequenzen eine Momentaufnahme darstellen und nur als Referenzpunkt für die Situation *in vivo* dienen können. Um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten, wäre außerdem eine größere Anzahl an Proben wünschenswert gewesen. Beide Punkte waren aus praktischen und zeitlichen Gründen nicht realisierbar.

In Hinblick auf den untersuchten Genomabschnitt ist anzumerken, dass er zwar eine Reihe von Genen einschließt, die regulatorischen Gene *tat* und *rev* jedoch nur inkomplett (jeweils das Exon 1). Auch wenn man annimmt, dass im Falle von Tat vornehmlich das Exon 1 für die Funktion des Proteins verantwortlich ist⁴², sind nachhaltige Aussagen auf dieser Basis nur bedingt zu treffen. Im Idealfall – besonders hinsichtlich der Identifizierung kompensatorischer Mutationen – erfolgt eine Analyse des kompletten HIV-Genoms. Dabei muss aber bedacht werden, dass bei Größenzunahme der zu bearbeitenden Nukleotidsequenz vermehrt Probleme bei der RT-PCR und Klonierung zu erwarten sind.

Zum Erhalt der Virussequenzen wurden etablierte Methoden des Klonierens und Sequenzierens verwendet. Denkbar wäre, dass der Einsatz von elektrokompetenten *E.coli* zu einer größeren Transformationsrate geführt hätte. Das Screening transformierter Bakterienkolonien zeigte sich als nicht sehr verlässlich, so dass hier vermutlich zahlreiche falsch negativ getestet wurden. Aus Kostengründen war dieses Vorgehen dennoch erforderlich.

Da ein Großteil der HLA-Polymorphismen mit serologischen Mitteln nicht detektiert werden kann, wurde hier die molekulare Methode, basierend auf einer PCR, angewandt, die sehr akkurat die zahlreichen Allelvarianten unterscheiden kann. Subtypen wurden nicht differenziert. Wie oben beschrieben zeigen sich bei den errechneten CTL-Epitopen allerdings deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen von HLA-A2. Auf eine genauere Analyse wurde aufgrund des deutlichen Überwiegens des Subtyps HLA-A*0201 (92,6%)¹⁷⁶ verzichtet.

Wünschenswert wäre eine Analyse des HLA-B-Typs aller Patienten gewesen, insbesondere da Studien darauf hinweisen, dass dieser eine stärkere CTL-Antwort auslöst und einen größeren Einfluss auf den Infektionsverlauf hat als HLA-A¹⁹⁷.

Bei der Auswertung ist zu hinterfragen, ob die Verwendung von HXB2 als Referenzsequenz sinnvoll ist, da in Deutschland fast ausschließlich HIV-Clade B auftritt. Hinsichtlich des internationalen Einsatzes dieser Konsensussequenz und des auch ausländischen Patientenanteils in der Kohorte erscheint dies aber als gerechtfertigt¹⁶¹. Auch bei der Impfstoffentwicklung wird mit Hilfe einer Konsensussequenz versucht, die genetischen Unterschiede zwischen einem Vakzin und den zirkulierenden Viren zu reduzieren²⁰³

Zur Fortsetzung der Arbeit sind weiterführende Versuche notwendig, die die tatsächliche Präsenz von Epitop-spezifischen CTL belegen. Bisher fehlt der Beweis für eine Existenz von spezifischen CTL, die einen Selektionsdruck auf die bisher bekannten Epitope ausüben, sowie die Bestätigung der computergestützt errechneten Epitope. Diese Untersuchungen hat der zeitliche Rahmen der Studie nicht zugelassen, verspricht aber interessante Ergebnisse in Folgeuntersuchungen.

Ausblick

Die zelluläre Immunabwehr, vermittelt durch spezifische zytotoxische T-Lymphozyten, ist ein maßgeblicher Faktor zur Kontrolle der HIV-Infektion und wird eine wichtige Rolle bei therapeutischen und prophylaktischen Arzneimitteln spielen. Die Identifikation von Virus-spezifischen Epitopen, die effektiv und dauerhaft von CTL erkannt werden, ist dabei ein wichtiger Schritt in der Entwicklung zukünftiger Vakzine.

Die einzig langfristige Lösung für die HIV-Epidemie ist die Entwicklung eines Impfstoffes, der entweder die Infektion verhindert oder aber zumindest die Transmission bedeutsam reduziert. Bereits ein Abfangen des initialen Viruspeaks, unter dem die Transmissionsrate am höchsten ist, kann die Epidemie eindämmen: Patienten mit einer Viruslast unter 1700 RNA-Kopien/ml verfehlten laut Studien die Ansteckung ihrer HIV-negativen Partner¹⁴⁷.

Die Umstände und Wechselwirkungen protektiver Immunität gegen das humane Immundefizienz-Virus bleiben jedoch bis heute ein ungelöstes Rätsel. Zu Beginn der AIDS-Epidemie nahm man an, dass sich Patienten mit einer breiten Antikörper-Reaktion gegen das Virus schützen können. Doch waren wenige dieser Immunglobuline tatsächlich in der Lage die virale Infektion zu blockieren und zusätzlich verloren sie aufgrund der HIV-Variabilität bald ihre Wirkung.

Auch bei den CTL-Antworten geht man davon aus, dass sie unterschiedlich effektiv wirken. Aufgrund der ausgesprochenen Variabilität des HIV ist anzunehmen, dass ein Virus, das auf ein immunisiertes Individuum trifft, sich zu mindestens 10% von der Sequenz des Vakzin-Agens unterscheidet. Zusätzlich führt die Fähigkeit des Virus, sich mittels Fluchtmutationen der CTL-Antwort zu entziehen, zu einem Verlust effektiver Epitope. Es ist also nötig, diejenigen der zahlreichen CTL-Antworten zu identifizieren, die während der akuten Phase der HIV-Infektion tatsächlich dazu beitragen, die virale Replikation zu reduzieren¹⁵⁹. Das gegenwärtige Verständnis von Fluchtmutationen indiziert auch, dass ein Vakzin selektiv eine effiziente CTL-Antwort gegen Epitope in jenen Regionen des Virus hervorrufen sollte, in denen funktionell oder strukturell wichtige Informationen codiert sind. Es ist unwahrscheinlich, dass Veränderungen in solchen Bereichen vom Virus toleriert werden können, da sie zu einem starken „Fitness“-Verlust führen würden. Dadurch sind diese Genabschnitte stark konserviert, und die Sequenzdifferenzen zwischen Vakzin-Immunogen und den zirkulierenden HIV-

Stämmen ist entsprechend gering.

Die kürzlich veröffentlichte Beobachtung eines HIV-Infizierten, bei dem trotz eines zellulären Angriffs von 25 dokumentierten CTL-Epitopen ein Verlust der Immunkontrolle auftrat¹⁵⁷, deutet an, dass ein Vakzin nicht allein darauf abzielen sollte, so viele CTL-Antworten wie möglich hervorzurufen. Für einen Impfstoff könnte es vielleicht sogar wichtig sein, während der akuten Infektionsphase gezielt eine Escape-Mutation zu erzwingen, die einen hohen „Fitness“-Verlust für das Virus herbeiführt. Beispiele von früh auftretenden Fluchtmutationen im stark konservierten Kapsid Protein (Gag) sind bisher nur im Zusammenhang mit erfolgreicher Kontrolle von HIV und SIV beschrieben worden^{117, 149}. Jedoch sind nicht nur Veränderungen in p24 Gag mit negativen Konsequenzen für das Virus verbunden. Eine Evaluation von Schlüssel-Epitopen, auch in den variableren Proteinen (wie Tat, Nef, Vpr, Env), ist notwendig und viel versprechend.

Die Schwierigkeiten, die bei der Entwicklung eines auf CTL basierenden Impfstoffes aufkommen können, zeigte ein kürzlich veröffentlichter Bericht über die HIV-Infektion eines HLA-B27-positiven, mit Canarypox geimpften Individuums²⁰⁴: In diesem Impfling wurde noch vor Infektion die CTL-Antwort gegen das HLA-B27-restriktive Epitop KK10 durch ein Vakzin induziert – ein Epitop, für das die Assoziation mit einer effektiven Langzeitkontrolle des HI-Virus nachgewiesen wurde. Die Impfung erhöhte die Zahl KK10-spezifischer CD8⁺ T-Zellen während der frühen Infektionsphase. Dann jedoch trat ausgesprochen zeitig eine Escape-Mutation in ebendiesem Epitop auf und führte zu einer *steady-state* (dt.: stationären) Viruslast, die höher war, als es in einem nicht geimpften HLA-B27-Positiven zu erwarten gewesen wäre. Sicherlich handelt es sich hierbei um einen Einzelfall, doch zeigen diese Ergebnisse die feine Balance, die zwischen den Kräften, die eine Immunkontrolle bewirken, und denen, die ein Entfliehen von der Immunkontrolle hervorrufen, besteht. Immunmodulatorische Interventionen stören dieses empfindliche Gleichgewicht und die Folgen lassen sich nicht immer vorhersagen.

Die Entwicklung eines effektiven Impfstoffes gegen HIV ist auch nach Jahren intensiver Forschung ein nicht einfach zu erreichendes Ziel. Doch lassen die stetigen kleinen Fortschritte vorsichtigen Optimismus zu. Übereinstimmung herrscht mittlerweile darin, dass ein wirksames Vakzin ohne eine Komponente, die eine zelluläre Immunantwort induziert, nicht auskommt. Wegen der hohen Variabilität des Virus und der Inhomogenität des HLA-Typs der Menschen ist eine genaue Analyse der von CTL anvisierten Epitope notwendig. Dabei sind nicht allein die Strukturproteine von Bedeutung. Die

hohe Immunogenität der regulatorischen und akzessorischen Proteine macht diese zu attraktiven Zielen der Impfstoffforschung. Auch wenn diese allein nicht dazu ausreichen eine umfassend schützende Immunantwort gegen das Virus herbeizuführen, so ist ihr Einschluss in ein Multikomponenten-Vakzin, das sowohl strukturelle als auch regulatorische und akzessorische Proteine enthält, sicherlich von Nutzen.

5 Zusammenfassung

Die Entdeckung von HIV-1 und HIV-2 als den Erregern von AIDS liegt nun mehr als 20 Jahre zurück und noch immer ist diese neuzeitliche Infektionskrankheit nicht heilbar oder mit einem Wirkstoff prophylaktisch zu bekämpfen.

Das HI-Virus ist ein in hohem Maße optimiertes System, das mit nur wenigen Genen absolut effizient funktioniert. Dabei erfüllt jedes virale Protein *in vivo* eine für das Virus bedeutsame Funktion und bietet einen potentiellen Ansatz für antiretrovirale Therapien. Da akzessorische und regulatorische Proteine im Replikationszyklus des HIV früh entstehen – damit also in die Virusvermehrung zeitig eingegriffen werden könnte – stellen sie darüber hinaus ein attraktives Ziel für zellvermittelte antivirale Impfstrategien dar.

Nach dem bisher vergeblichen Versuch, einen Impfstoff zu entwickeln, der mittels Induktion einer humoralen Abwehr vor der Infektion mit dem Retrovirus schützt, konzentriert sich die Forschung zunehmend auf die Induktion einer zellulären Abwehr. Diese wird durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) vermittelt, die infizierte Zellen anhand der auf der Zelloberfläche in den Bindungstaschen der MHC-Moleküle präsentierten viralen Proteine spezifisch erkennen und abtöten. Zur Entwicklung eines auf zellulärer Abwehr basierenden Impfstoffes ist also sowohl der HLA-Typ des Wirtes von Bedeutung, der die Form und Bindungseigenschaften der MHC-Moleküle bestimmt, als auch die entsprechend präsentierten viralen Peptide. Als Reaktion auf den antiviralen Druck durch die CTL verändert sich das Virusgenom im Bereich der Epitope, um von dem Immunsystem nicht mehr erkannt zu werden. Diese als „Fluchtmutationen“ bezeichneten Veränderungen des HIV-Genoms erhöhen dessen Variabilität und erschweren die Generierung eines nachhaltig wirksamen und effizienten Impfstoffes.

Die vorliegende Arbeit ist thematisch einzuordnen in die Entwicklung eines prophylaktischen oder therapeutischen Wirkstoffes, der auf der Induktion einer zellulären Immunantwort basiert. Ziel war die genaue Analyse von CTL-Epitopen in den akzessorischen Proteinen Vif, Vpr, Vpu und den regulatorischen Proteinen Rev, Tat vor dem Hintergrund des individuellen HLA-Typs des Wirtes. Die Hypothese war, dass aufgrund des antiviralen Drucks durch spezifische CTL, die Aminosäurevariabilität innerhalb der CTL-Epitope erhöht ist.

Dazu erfolgte die HLA-Typisierung von HIV-infizierten Patienten mit anschließender Auswahl von 11 HLA-A2-positiven und sechs HLA-A2-negativen Patienten (zehn Lang-

zeitinfizierte, sieben akut Serokonvertierte). Es wurden von 19 Patientenproben (17 Patienten) 180 HIV-Klone sequenziert und die resultierenden 900 Proteinsequenzen qualitativ und statistisch analysiert.

In der qualitativen Analyse der CTL-Epitope und der örtlichen Variationen der Proteinsequenzen konnte keine eindeutige Korrelation zwischen Variabilität und Epitoplokalisierung festgestellt werden. Die HLA-A2-spezifische Auswertung zeigte nur singulär auffallende Ergebnisse: so weist z.B. ein CTL-Epitop in Vpr eine eindeutig erhöhte Variabilität in den A2-positiven Proben von Langzeitinfizierten (LTNP) im Vergleich zu den A2-negativen auf, was auf Fluchtmutationen hinweist. Ein umfassendes Muster der Variationen im Sinne von gezielten Fluchtmutationen lässt sich jedoch nicht erkennen. Bei Gegenüberstellung der HIV-Sequenzen von Proben nach unterschiedlicher Infektionsdauer war zu erkennen, dass die Zahl der Quasispezies in einigen Proteinsequenzen bei der Gruppe der akut Serokonvertierten erhöht war. Dies deutet darauf hin, dass sich die dominante Virusform nach kurzem Infektionsverlauf noch nicht durchsetzen konnte. Auffällig war außerdem das oben bereits erwähnte CTL-Epitop in Vpr, das unter den akut Serokonvertierten - ob A2-positiv oder A2-negativ – keine Differenzen zeigte. Hier haben spezifische CTL möglicherweise noch keinen effizienten Selektionsdruck ausgeübt oder die Zeit zur Ausbildung von Escape-Varianten war nicht ausreichend. Bei Analyse von mehreren Blutproben eines Patienten im Infektionsverlauf gelang die Dokumentation der Selektion der dominanten Quasispezies, sowie die des Auftretens einer möglichen Fluchtmutation innerhalb eines CTL-Epitops. Ebenso zeigte sich eine stets gekoppelt auftretende Aminosäurevariation als möglicher Hinweis auf eine kompensatorische Mutation.

In der statistischen Auswertung konnte die Hypothese, die von einer erhöhten Aminosäurevariabilität innerhalb der CTL-Epitope ausging, nicht bestätigt werden. Statistisch signifikante Ergebnisse konnten nicht durchgehend erhoben werden. Die Zahlen deuten darauf hin, dass die Variabilität innerhalb der Epitope im Vergleich der außerhalb der Epitope in den hier untersuchten Genen und Genabschnitten nicht erhöht ist.

Für eindeutigere Aussagen sind Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an analysierten HIV-Sequenzen notwendig. Die erhobenen Daten bieten jedoch bereits eine gute Grundlage für weitere Studien, insbesondere für solche, die die zelluläre Ebene in die Analyse einbeziehen.

6 Anhang

6.1 Plasmidkarte des pCR[®]4-TOPO-Vektors

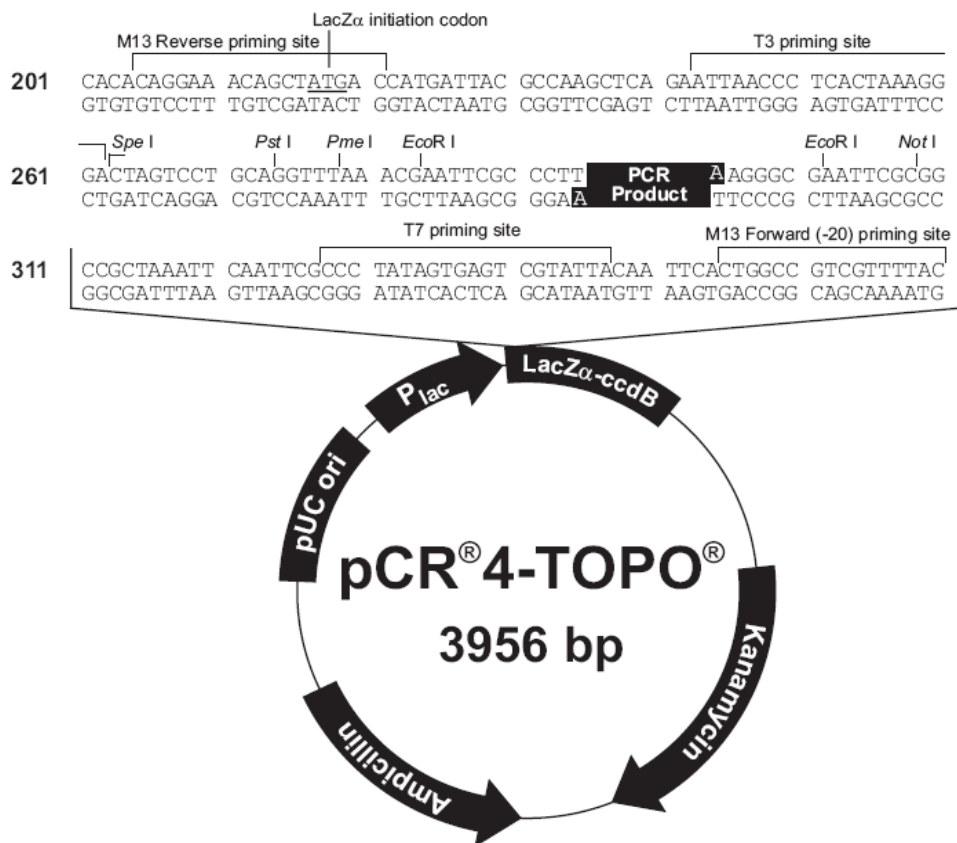


Abb. 38: pCR[®]4-TOPO-Vektor mit Darstellung der Nukleotidsequenz, die die TOPO Cloning site umgibt. Die 3'-Deoxythymidin-Überhänge erlauben eine effiziente Ligation mit 5'-Deoxyadenosin-Überhängen des PCR-Produkts.

6.2 Aminosäuresequenzen der untersuchten Proteine

6.2.1 Vif

Diagram showing A3, A2, and B7 regions above the HXB2 vif sequence.

HXB2 vif

3-2K140vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYI	SKKTKGWVYKHHYENP	HPRVGSSEVHI	PLGDAKLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI
3-2K143vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWNS	SLVKHHHMYI	SKKTKGWVYKHHYENP	HPRVGSSEVHI	PLGDAKLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI
3-2K144vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWNS	SLVKHHHMYI	SKKTKGWVYKHHYENP	HPRVGSSEVHI	PLGDAKLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI
3-2K145vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWNS	SLVKHHHMYI	SKKTKGWVYKHHYENP	HPRVGSSEVHI	PLGDAKLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI
3-2K148vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWNS	SLVKHHHMYI	SKKTKGWVYKHHYENP	HPRVGSSEVHI	PLGDAKLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI
3-2K149vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWNS	SLVKHHHMYI	SKKTKGWVYKHHYENP	HPRVGSSEVHI	PLGDAKLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI
3-2K151vif	MENRWQVMIVRQVDRMRIRITWNS	SLVKHHHMYI	SKKTKGWVYKHHYENP	HPRVGSSEVHI	PLGDAKLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI
3-2K152vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWNS	SLVKHHHMYI	SKKTKGWVYKHHYENP	HPRVGSSEVHI	PLGDAKLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI
3-2K153vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWNS	SLVKHHHMYI	SKKTKGWVYKHHYENP	HPRVGSSEVHI	PLGDAKLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI
3-2K146vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWK	SLVKHHHMYV	SKKAKGWFYRHHYESH	HPRVGSSEVHI	PLGDAKLVITTYWGLHAGERDWHLGQGVSI
5-2K185vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLIATYWGLHTGERDWHLGQGVSM	
5-2K186vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLIATYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
5-2K190vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLIATYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
5-2K193vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLIATYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
5-2K312vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLIATYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
5-2K313vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAELIATYWGLHTGERDWHLDQGVSI	
5-2K314vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLIATYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
5-2K316vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVXHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLTITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
5-2K317vif	MENRWQVMIVWQVDRMGIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLTITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
5-2K318vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLIATYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
5-2K319vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLIATYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
5-2K320vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLTITTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
5-1K321vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRITWKS	SLVKHHHMYV	SRKAKGWIYRHHYESTHPRISSEVHI	PLGDAKLIATYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K352vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K353vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K354vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K355vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K356vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K357vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K358vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K359vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K361vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHLRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSV	
6-0K467vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K468vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K469vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVRRHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K470vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K471vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-0K27vif	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	
6-0K30vif	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	~ ~ ~ ~ ~	
6-1K259vif	MENRWQVMIVWQVDRMRIRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-1K478vif	MENRWQVMIVWQVDRMRITRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-1K479vif	MENRWQVMIVWQVDRMRITRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-1K480vif	MENRWQVMIVWQVDRMRITRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-1K481vif	MENRWQVMIVWQVDRMRITRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-1K483vif	MENRWQVMIVWQVDRMRITRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-1K484vif	MENRWQVMIVWQVDRMRITRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-1K485vif	MENRWQVMIVWQVDRMRITRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-1K486vif	MENRWQVMIVWQVDRMRITRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	
6-1K487vif	MENRWQVMIVWQVDRMRITRAWKS	SLVKHHHMYI	SGKAKWFWYRHHYESHHPRISSEVHV	PLGDARLVVTTYWGLHTGERDWHLGQGVSI	

Abb. 39a: Aminosäuresequenz von HIV 3-2, 5-2, 6-0, 6-1; Vif, AS 1-87. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

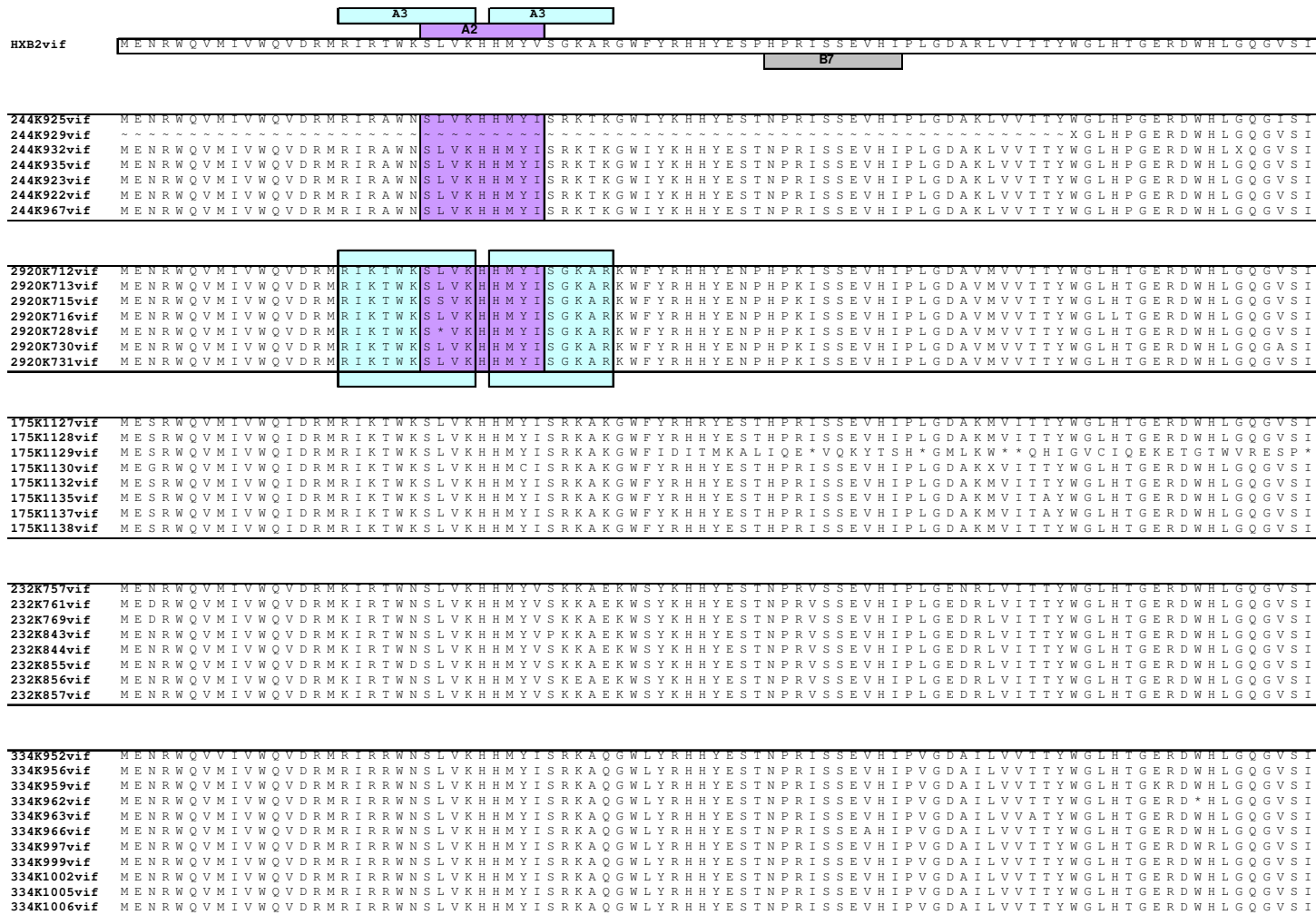


Abb.39d: Aminosäuresequenzen von Pat. 244, 2920, 175, 232, 334; Vif, AS 1-87. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

	A2										A2										A3, A11										A3									
HXB2vif	EWRKKRYSTQVDP										ELADQLIHLVY										FDFCFSES AIRKALLGHIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										LALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
											B18																				B7									
7-1K196vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDYPAGHNQVGSLOQYL										ALAALVTPKRIKPPPLPSVAKLTEDRWNKPKRTKGR									
7-1K200vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDYPAGHNQVGSLOQYL										TALAALVTPKRIKPPPLPSVAKLTEDRWNKPKRTKGR									
7-1K201vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDYPAGHNQVGSLOQYL										ALAALVTPKRIKPPPLPSVAKLTEDRWNKPKRTKGR									
7-1K203vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDYPAGHNQVGSLOQYL										ALAALVTPKRIKPPPLPSVAKLTEDRWNKPKRTKGR									
7-1K205vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDYPAGHNQVGSLOQYL										ALAALVTPKRIKPPPLPSVAKLTEDRWNKPKRTKGR									
7-1K210vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDYPAGHNQVGSLOQYL										ALAALVTPKRIKPPPLPSVAKLTEDRWNKPKRTKGR									
7-1K211vif	EWRKKRYSTQVDP										DLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDYPAGHNQVGSLOQYL										ALAALVTPKRIKPPPLPSVAKLTEDRWNKPKRTKGR									
7-1K212vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDYPAGHNQVGSLOQYL										ALAALVTPKRIKPPPLPSVAKLTEDRWNKPKRTKGR									
7-1K213vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDYPAGHNQVGSLOQYL										ALAALVTPKRIKPPPLPSVAKLTEDRWNKPKRTKGR									
12-1K787vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALLKPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
12-1K788vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALLKPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
12-1K789vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALLKPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
12-1K792vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALLKPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
12-1K795vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALLKPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
12-1K799vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALLKPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
12-1K800vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALLKPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
12-1K801vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALLKPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
20-0K102vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
20-0K105vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										APAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
20-0K108vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
20-0K322vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
20-0K323vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
20-0K324vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
20-0K325vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
20-0K326vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
20-0K327vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
20-0K328vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
20-0K329vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
20-0K330vif	EWRKKRYSTQVDP										GLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGHIVSPSCDFQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNEPQKTKGR									
36-1K112vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-1K279vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-1K282vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-1K284vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-1K285vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-1K287vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-1K288vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-1K-289vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRQAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-1K-290vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-1K-294vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-2K124vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-2K137vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-2K136vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALVALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-2K135vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-2K133vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-2K126vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-2K138vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRNAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									
36-2K127vif	EWRKKRYSTQVDP										NLADQLIHLVY										YFDFCFSES AIRKAILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLA										ALAALITPKRIKPPPLPSVTKLTEDRWNKPKRTKGR									

Abb. 39f: Aminosäuresequenz von HIV 7-1, 12-1, 20-0, 36-1, 36-2; Vif, AS 88-192. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

	A2										A2										A2										A3, A11										A3									
HXB2vif	EWRKKRYSSTQVDFELADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLLA										LAALITPKKIKPPLPSVTKL										TEDRWNKPKQTKGH																			
	B18																														B7																			
244K925vif	EWRKRQRYSTQIDP										NLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHIGSPRCEYQAGHNKVGSLQYLLA										LAALIKPRKTKPPLPSV										RKLTEDRWNKPKQTKGH									
244K929vif	EWRKRQRYSTQIDP										NLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHIGSPRCEYQAGHNKVGSLQYLLA										LAALIKPRKTKPPLPSV										RKLTEDRWNKPKQTKGH									
244K932vif	EWRKRQRYSTQIDP										NLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHIGSPRCEYQAGHNKVGSLQYLLA										LAALIKPRKTKPPLPSV										RKLTEDRWNKPKQTKGH									
244K935vif	EWRKRQRYSTQIDP										NLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHIGSPRCEYQAGHNKVGSLQYLLA										LAALIKPRKTKPPLPSV										RKLTEDRWNKPKQTKGH									
244K923vif	EWRKRQRYSTQIDP										NLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHIGSPRCEYQAGHNKVGSLQYLLA										LAALIKPRKTKPPLPSV										RKLTEDRWNKPKQTKGH									
244K922vif	EWRKRQRYSTQIDP										NLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHIGSPRCEYQAGHNKVGSLQYLLA										LAALIKPRKTKPPLPSV										RKLTEDRWNKPKQTKGH									
244K967vif	EWRKRQRYSTQIDP										NLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHIGSPRCEYQAGHNKVGSLQYLLA										LAALIKPRKTKPPLPSV										RKLTEDRWNKPKQTKGH									
2920K712vif	EWRKGRYSTQVDF										ERADQLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVPRCEYQAGHNKVGTLQYLLA										LTALITPKKTRPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKDH									
2920K713vif	EWRKGRYSTQVDF										ERADQLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVPRCEYQAGHNKVGTLQYLLA										LTALITPKKTRPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKDH									
2920K715vif	EWRKGRYSTQVDF										ERADQLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVPRCEYQAGHNKVGTLQYLLA										LTALITPKKTRPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKDH									
2920K716vif	EWRKGRYSTQVDF										ERADQLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVPRCEYQAGHNKVGTLQYLLA										LTALITPKKTRPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKDH									
2920K728vif	EWRKGRYSTQVDF										ERADQLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVPRCEYQAGHNKVGTLQYLLA										LTALITPKKTRPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKDH									
2920K730vif	EWRKGRYSTQVDF										ERADQLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVPRCEYQAGHNKVGTLQYLLA										LTALITPKKTRPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKDH									
2920K731vif	EWRKGRYSTQVDF										ERADQLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVPRCEYQAGHNKVGTLQYLLA										LTALITPKKTRPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKDH									
175K1127vif	EWRKERYNTQVDF										PDLADHLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVSPRCEYQAGHTKVGSLQYLLA										LAAALVTPKIKPPLPSLKKL										TEDRWNKPKQTKGH									
175K1128vif	EWRKERYNTQVDF										PDLADHLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVSPRCEYQAGHTKVGSLQYLLA										LAAALVTPKIKPPLPSLKKL										TEDRWNKPKQTKGH									
175K1129vif	EWRKERYNTQVDF										PDLADHLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVSPRCEYQAGHTKVGSLQYLLA										LAAALVTPKIKPPLPSLKKL										TEDRWNKPKQTKGH									
175K1130vif	EWRKERYNTQVDF										PDLADHLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVSPRCEYQAGHTKVGSLQYLLA										LAAALVTPKIKPPLPSLKKL										TEDRWNKPKQTKGH									
175K1132vif	EWRKERYNTQVDF										PDLADHLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVSPRCEYQAGHTKVGSLQYLLA										LAAALVTPKIKPPLPSLKKL										TEDRWNEPKQTKGH									
175K1135vif	EWRKERYNTQVDF										PDLADHLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVSPRCEYQAGHTKVGSLQYLLA										LAAALVTPKIKPPLPSLKKL										TEDRWNKPKQTKGH									
175K1137vif	EWRKERYNTQVDF										PDLADHLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVSPRCEYQAGHTKVGSLQYLLA										LAAALVTPKIKPPLPSLKKL										TVDRWNKPKQTKGH									
175K1138vif	EWRKERYNTQVDF										PDLADHLIHLYYFDCFS										ESAIRNAILGHRVSPRCEYQAGHTKVGSLQYLLA										LAAALVTPKIKPPLPSLKKL										TEDRWNKPKQTKGH									
232K757vif	EWRKKRYSTQVDF										PGLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHRVSPSCEYQAGHDKVGSLQYLLA										LVALRTPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
232K761vif	EWRKKRYSTQVDF										PGLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHRVSPSCEYQAGHDKVGSLQYLLA										LVALRTPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
232K769vif	EWRKKRYSTQVDF										PGLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHRVSPSCEYQAGHDKVGSLQYLLA										LVALRTPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
232K843vif	EWRKKRYSTQVDF										PGLADQLIHLYYSDCF										ESAIRKAILGHRVSPSCEYQAGHDKVGSLQYLLA										LVALRTPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
232K844vif	EWRKKRYSTQVDF										PGLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHRVSPSCEYQAGHDKVGSLQYLLA										LVALRTPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
232K855vif	EWRKKRYSTQVDF										PGLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHRVSPSCEYQAGHDKVGSLQYLLA										LVALRTPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
232K856vif	EWRKKRYSTQVDF										PGLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHRVSPSCEYQAGHDKVGSLQYLLA										LVALRTPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
232K857vif	EWRKKRYSTQVDF										PGLADQLIHLYYFDCFS										ESAIRKAILGHRVSPSCEYQAGHDKVGSLQYLLA										LVALRTPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
334K952vif	EWRSSRYSTQVDF										PNLADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHRVSPRCDYQAGHTKVGSLQYLLA										LALTALITPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
334K956vif	EWRSSRYSTQVDF										PNLADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHRVSPRCDYQAGHTKVGSLQYLLA										LALTALITPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
334K959vif	EWRSSRYSTQVDF										PNLADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHRVSPRCDYQAGHTKVGSLQYLLA										LALTALITPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
334K962vif	EWRSSRYSTQVDF										PNLADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHRVSPRCDYQAGHTKVGSLQYLLA										LALTALITPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
334K963vif	EWRSSRYSTQVDF										PNLADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHRVSPRCDYQAGHTKVGSLQYLLA										LALTALITPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
334K966vif	EWRSSRYSTRVDF										PNLADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHRVSPRCDYQAGHTKVGSLQYLLA										LALTALITPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
334K997vif	EWRSSRYSTQVDF										PNLADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHRVSPRCDYQAGHTKVGSLQYLLA										LALTALITPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
334K999vif	E*RSRRYSTQVDF										PNLADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHRVSPRCDYQAGHTKVGSLQYLLA										LALTALITPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKDH									
334K1002vif	EWRSSRYSTQVDF										PNLADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHRVSPRCDYQAGHTKVGSLQYLLA										LALTALITPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
334K1005vif	EWRSSRYSTQVDF										PNLADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHRVSPRCDYQAGHTKVGSLQYLLA										LALTALITPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									
334K1006vif	EWRSSRYSTQVDF										PNLADQLIHLYYFDCFS										SDSAIRKALLGHRVSPRCDYQAGHTKVGSLQYLLA										LALTALITPKRRKPPPLPSVA										KLTEDRWNKPKQTKGH									

Abb.39h: Aminosäuresequenz von Pat. 244, 2920, 175, 232, 334; Vif, AS 88-192. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A68</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A2</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A2</div> </div>																										
HXB2vpr	MEQAPEDQGGPQREPHNEWLELLELLEELKNEAVRRHFPRIWLHGLGQHIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFRIIGCRHSRIGVTRQRRARNGASRS																										
	B40										B7					B51											
7-1K194vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKSEAVRRHFPFRGWLHSLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRPRNGASRS																										
7-1K196vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKSEAVRRHFPFRGWLHSLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRPRNGASRS																										
7-1K200pr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKSEAVRRHFPFRGWLHSLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRPRNGASRS																										
7-1K201vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKSEAVRRHFPFRGWLHSLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRPRNGASRS																										
7-1K203vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKSEAVRRHFPFRGWLHSLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRPRNGASRS																										
7-1K205vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKSEAVRRHFPFRGWLHSLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRPRNGASRS																										
7-1K210vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKSEAVRRHFPFRGWLHSLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRPRNGASRS																										
7-1K211vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKSEAVRRHFPFRGWLHSLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRPRNGASRS																										
7-1K212vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKSEAVRRHFPFRGWLHSLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRPRNGASRS																										
7-1K213vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKSEAVRRHFPFRGWLHSLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRPRNGASRS																										
12-1K787vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQHIYETIYGDTWEGVEAIIIRALQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRTRNGASRS																										
12-1K788vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQHIYETIYGDTWEGVEAIIIRALQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRTRNGASRS																										
12-1K789vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQHIYETIYGDTWEGVEAIIIRALQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRTRNGASRS																										
12-1K792vpr	TEQAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKNEAVRRHFPRLWLHGLGLGQHIYETIYGDTWEGVEAIIIRALQQLLFIHLRIGCRHSRIGITQRQRTRNGASRS																										
12-1K795vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQHIYETIYGDTWEGVEAIIIRALQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRTRNGASRS																										
12-1K799vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQHIYETIYGDTWEGVEAIIIRALQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRTRNGASRS																										
12-1K800vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQHIYETIYGDTWEGVEAIIIRALQQLLFIHFRIIGCRHSRIGITQRQRTRNGASRS																										
12-1K801vpr	TEQAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKNEAVRRHFPRLWLHGLGLGQHIYETIYGDTWEGVEAIIIRALQQLLFIHLRIGCRHSRIGITQRQRTRNGASRS																										
20-0K102vpr	MERAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKSEAVRRHFPFRVWLHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
20-0K105vpr	MERAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKSEAVRRHFPFRVWLHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
20-0K108vpr	MERAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKNEAVRRHFPFRVWLHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
20-0K322vpr	MERAPEDQGGPQRETYNEWLELLELLEELKSEAVRRHFPFRVWLHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIR*TLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
20-0K323vpr	MERAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKSEAVRRHFPFRVWLHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIR*TLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
20-0K324vpr	MERAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKSEAVRRHFPFRVWLHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
20-0K325vpr	MERAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKSEAVRRHFPFRVWLHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
20-0K326vpr	MERAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKSEAVRRHFPFRVWLHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
20-0K327vpr	MERAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKNEAVRRHFPFRV*LVHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
20-0K328vpr	MERAPEDQGGPQREPYNEWLELLEELPKSEAVRRHFPFRVWLHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIR*TLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
20-0K329vpr	MERAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKSEAVRRHFPFRVWLHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
20-0K330vpr	MERAPEDQGGPQREPYNEWLELLELLEELKSEAVRRHFPFRVWLHGLGLGQHIYETIYGDTWTGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGITQRQRARNGASRS																										
36-1K112vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-1K279vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-1K282vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-1K284vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-1K285vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWPHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-1K287vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-1K288vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-1K289vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-1K290vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-1K294vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-2K124vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRGHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-2K126vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-2K127vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-2K133vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-2K135vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHLPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-2K136vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-2K137vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELLELLEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										
36-2K138vpr	MEQAPEDQGGPQREPYNEWALELSEELKNEAVRRHFPFRPWLHGLGLGQYIYETIYGDTWAGVEAIIIRTLQQLLFIHFRIIGCQHSRIGINRRRRARNGASRS																										

Abb. 40: Aminosäuresequenz von HIV 7-1, 12-1, 20-0, 36-1, 36-2; Vpr. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

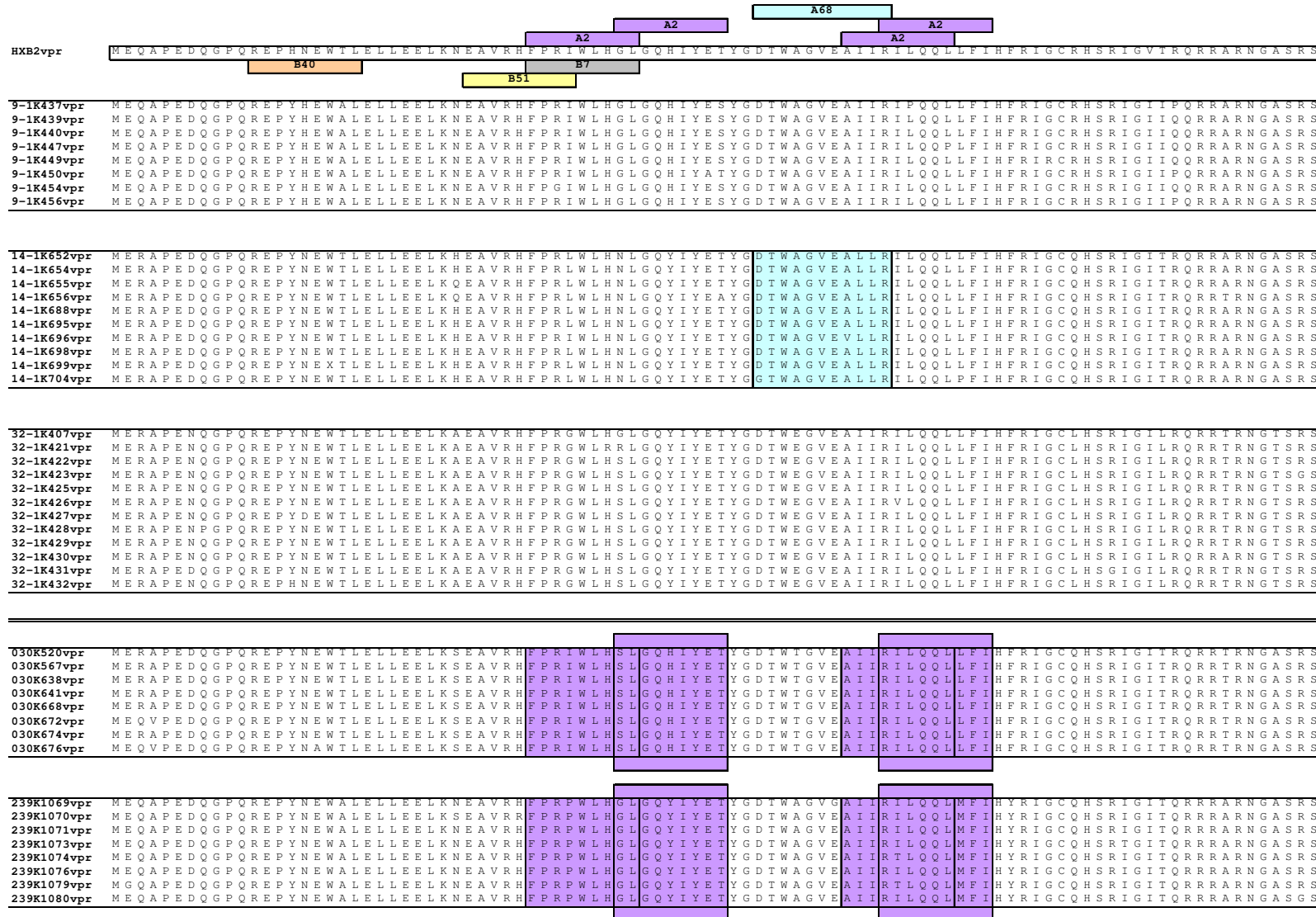


Abb. 40c: Aminosäuresequenz von HIV 9-1, 14-1, 32-1, Pat. 030, 239; Vpr. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbige unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

HXB2vpr	MEQAPEDQGFQREPHNEWTLLELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGVTRQRRARNGASRS
244K922vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITQRRRGRNGASRS
244K923vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITQRRRGRNGASRS
244K925vpr	MEQAPEDQGFQREPYDEWTLLELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHSYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITQRRRGRNGASRS
244K929vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLGLLEELKNGAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITQRRRGRNGASRS
244K932vpr	MERAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITQRRRGRNGASRS
244K935vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVNLWGYLGRSGSHNKNKSNAPTAVHSFQNVST*QNRHYSTEERKRWSQ*IL.....
244K967vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITQRRRGRNGASRS
2920K712vpr	MEQAPENQGFQREPYNEWALELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITPQRRTRNGASRS
2920K713vpr	MEQAPENQGFQREPYNEWALELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITPQRRTRNGASRS
2920K715vpr	MEQAPENQGFQREPYNEWALELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITPQRRTRNGASRS
2920K716vpr	MEQAPENQGFQREPYNEWALELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITPQRRTRNGASRS
2920K728vpr	MEQAPENQGFQREPYNEWALELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITPQRRTRNGASRS
2920K730vpr	MEQAPENQGFQREPYNEWALELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITPQRRTRNGASRS
2920K731vpr	MEQAPENQGFQREPYNEWALELLEELKNEAVRHFFPRIWLHLGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCRHSRIGITPQRRTRNGASRS
175K1127vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFPRMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRRTRNGASRS
175K1128vpr	MEQAPENQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVKHFFPRMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIISILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRRTRNGASRS
175K1129vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVKHFFPRMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILRQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRRTRNGASRS
175K1130vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVKHFFPRMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRRTRNGASRS
175K1132vpr	MERAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVKHFFPRMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRRTRNGASRS
175K1135vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVKHFFPRMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRRTRNGASRS
175K1137vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVKHFFPRMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRRTRNGASRS
175K1138vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVKHFFPRMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRRTRNGASRS
232K757vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKREAVRHFFRTWLHNLGQYIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
232K761vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKREAVRHFFRTWLHNLGQYIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
232K769vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKREAVRHFFRTWLHNLGQYIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
232K843vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKREAVRHFFRTWLHNLGQYIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
232K844vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKREAVRHFFRTWPHNLGQYVYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
232K855vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKREAVRHFFRTWLHNLGQYIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
232K856vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKREAVRHFFRTWLHNLGQYIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
232K857vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKREAVRHFFRTWLHNLGQYIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
334K952vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFSMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
334K956vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFSMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
334K959vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFSMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
334K962vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFSMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
334K963vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFSMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
334K966vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFSMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
334K997vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFSMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
334K999vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFSMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
334K1002vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFSMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
334K1005vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFSMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS
334K1006vpr	MEQAPEDQGFQREPYNEWTLLELLEELKNEAVRHFFSMVLHGLGQHIIYETYGDTWAGVEAIIIRILQQLLFIHFIRIGCHHSRIGITRQRTRNGASRS

Abb. 40d: Aminosäuresequenz von Pat. 244, 2920, 175, 232, 334; Vpr. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

		A2	A33	
HXB2vpu	TQPIPIVAIVALVVAIIIIAIVVWSIVLIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGEISALVEMGVEMGHHPWDVDDL	B7		
9-1K437vpu	MQFLYIVTIVALGLAAIIAIVVWSIVFIEYRRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSTLVDMGHDAALWVNDL			
9-1K439vpu	MQSLHIVAIVALVLAIIAIVVWSIVFIEYRRILRHRRIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHDAAPWVNDL			
9-1K440vpu	MQSLHIVAIVALVLAIIAIVVWSIVFIEYRRILRHRRIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHDAAPWVNDL			
9-1K447vpu	MQPLNIVAIVALVLAIIAIVVWSIVFIEYRRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHDAAPWVNDL			
9-1K449vpu	MQSLYIVTIVALALAAIIAIVVWSIVFIEYRRILKQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHDAALWVNDL			
9-1K450vpu	MQSLYIVTIEALVLAIIAIVVWSIVFIEYRRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHDAALWVNDL			
9-1K454vpu	MQSLYIVTIVALVLAIIAIVVWSIVFIEYRRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHDAALWVNDL			
9-1K456vpu	MQSLYIVTIVALVLAIIAIVVWSIVFIEYRRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHDAALWVNDL			
14-1K652vpu	MQSLQIAAIVALVVGIIAIVVWSIVLIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIEREEDSGDESEGDQEELARLVEMGHGLVFPWDVDDL			
14-1K654vpu	MQSLQIAAIVALVVGIIAIVVWSIVLIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIEREEDSGNESEGDQEELSRVEMGHGLVFPWDVDDL			
14-1K655vpu	MQSLQIVSIAALVVGIIAIVVWSIVLIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIEREEDSGNESEGDQEELSRVEMGHGLVFPWDVDDL			
14-1K656vpu	MQSLQIAAIVALVVGIIAIVVWSIVLIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIEREEDSGNESEGDQEELSRVEMGHGLVFPWDVDDL			
14-1K688vpu	MQSLQIAAIVALVVGIIAIVVWSIVLIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIEREEDSGNESEGDQEELSRVEMGHGLVFPWDVDDL			
14-1K695vpu	MQSLQIAAIVALVVGIIAIVVWSIVLIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIEREEDSGNESEGDQEELSRVEMGHGLVFPWDVDDL			
14-1K696vpu	MQSLQIAAIVALVVGIIAIVVWSIVLIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIEREEDSGNESEGDQEELSRVEMGHGLVFPWDVDDL			
14-1K698vpu	MQSLQIVSIAALVVGIIAIVVWSIVLIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIEREEDSGNESEGDQEELSRVEMGHGLVFPWDVDDL			
14-1K699vpu	MQSLQIAAIVALVVGIIAIVVWSIVLIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIEREEDSGNESEGDQEELSRVEMGHGLVFPWDVDDL			
14-1K704vpu	MQSLQIAAIVALVVGIIAIVVWSIVLIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIEREEDSGNESEGDQEELSRVEMGHGLVFPWDVDDL			
32-1K407vpu	MPGLYILSIVALVVAIIAIVVWTVFIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGGDQEALLEMGYDAPWDIDDDL			
32-1K421vpu	MPGLYILSIVALVVAIIAIVVWTVFIEYWKILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGGDQEALLEMGYDVPWDIDDDL			
32-1K422vpu	MPGLYILSIVALVVAIIAIVVWTVFIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNGVKGIKKHFWRWGMMLLGLIMIC			
32-1K423vpu	MPYLYILSTVALVVAIIAIVVWTVFIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGGDQEALLEMGYDAPWDIDDDL			
32-1K425vpu	MPGLYILPIVALVVAIIAIVVWTVFIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGGDQEALMEMGHDPWDIDDP			
32-1K426vpu	MPGLYILSIVALVVAIIAIVVWTVFIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGGDQEALLEMGYDAPWDIDDDL			
32-1K427vpu	MPYLYILSIVALVVAIIAIVVWTVFIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGGDQEALLEMGYDAPWNIDDL			
32-1K428vpu	MPYLYILTIVALVVAIIAIVVWTVFIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGGDQEALLEMGYDAPWDIDDDL			
32-1K429vpu	MPGLYILSIVALVVAIIAIVVWTVFIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGGDQEALLEMGYDVPWDIDDDL			
32-1K430vpu	MPGLYILAIVALVVAIIAIVVWTVFIEYRKRILRQRKIDGLIDRLIERAEDSGNESEGGDQEALLEMGYDAPWDIDDDL			
32-1K431vpu	MPGLYILAIVALVVAIIAIVVWTVFIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGGDQEALLEMGYDAPWDIDDDL			
32-1K432vpu	MPGLYILSIVALVVAIIAIVVWTVFIEYRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGGDQEALLEMGYDAPWDIDDDL			
030K520vpu	MQPLEITAIIVALVVAIIIAIVIWTIVLIEYRKRILRQRKIDRLIERISERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHHPAPWDVNDL			
030K567vpu	MQPLEITAIIVALVVAIIIAIVIWTIVLIEYRKRILRQRKIDRLIERISERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHHPAPWDVNDL			
030K638vpu	MQPLEITAIIVALVVAIIIAIVIWTIVLIEYRKRILRQRKIDRLIERISERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHHPAPWDVNDL			
030K641vpu	MQPLEITAIIVALVVAIIIAIVIWTIVLIEYRKRILRQRKIDRLIERISERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHHPAPWDVNDL			
030K668vpu	MQPLEITAIIVALVVAIIIAIVIWTIVLIEYRKRILRQRKIDRLIERISERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHHPAPWDVNDL			
030K672vpu	MQPLEITAIIVALVVAIIIAIVIWTIVLIEYRKRILRQRKIDRLIERISERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHHPAPWDVNDL			
030K674vpu	MQPLEITAIIVALVVAIIIAIVIWTIVLIEYRKRILRQRKIDRLIERISERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHHPAPWDVNDL			
030K676vpu	MQPLEITAIIVALVVAIIIAIVIWTIVLIEYRKRILRQRKIDRLIERISERAEDSGNESEGDQEELSAALVDMGHHPAPWDVNDL			
239K1069vpu	MQPLVIAAIAALVIAAIIAIVVWTIVLLEYSRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNGSEGDQEELSFVDMGHHPAPWDANDL			
239K1070vpu	MQPLVIAAIAALVIAAIIAIVVWTIVLLEYSRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSFVDMGHHPAPWDAGDL			
239K1071vpu	MQPLVIAAIAALVIAAIIAIVVWTIVLLEYSRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSYLVDMGHHPAPWDADDL			
239K1073vpu	MQPLVIAAIAALVIAAIIAIVVWTIVLLEYSRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSFVDMGHHPAPWDADDL			
239K1074vpu	MQPLVIAAIAALVIAAIIAIVVWTIVLLEYSRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSFVDMGHHPAPWDADDL			
239K1076vpu	MQPLVIAAIAALVIAAIIAIVVWTIVLLEYSRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSFVDMGHHPAPWDAGDL			
239K1079vpu	MQPLVIAAIAALVIAAIIAIVVWTIVLLEYSRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSFVDMGHHPAPWDANDL			
239K1080vpu	MQPLVITAIIVALVIAAIIAIVVWTIVLLEYSRKRILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGDQEELSFVDMGHHPAPWDANDL			

Abb. 41c: Aminosäuresequenz von HIV 9-1, 14-1, 32-1, Pat. 030, 239; Vpu. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

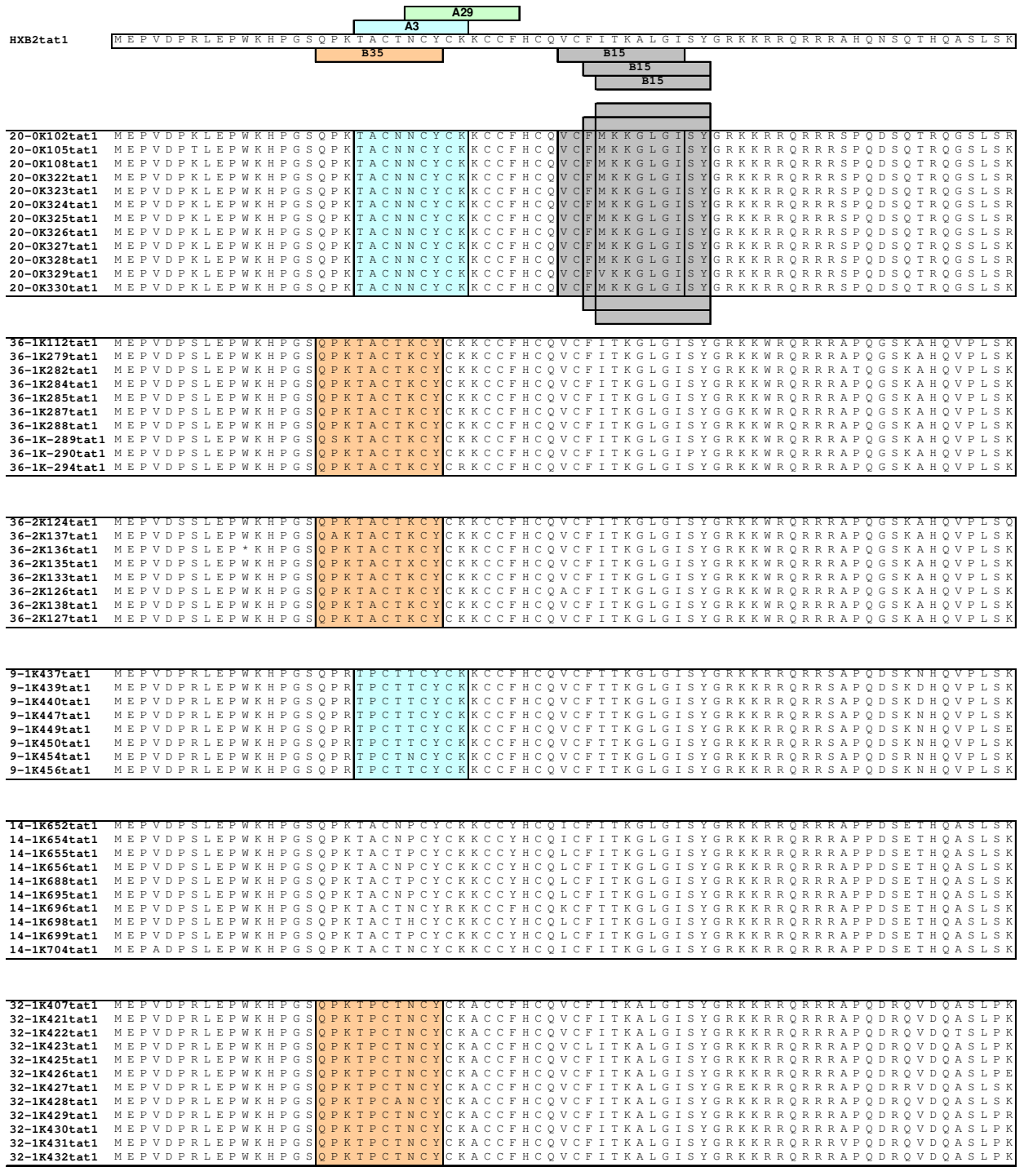


Abb. 42b: Aminosäuresequenz von HIV 20-0, 36-1, 36-2, 9-1, 14-1, 32-1; Tat Exon 1. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

Accession	Sequence	Epitopes
HXB2tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKALGISYGRKKRRQRRAHQNSQTHQASLSK	A3, A29, B35, B15, B15
030K520tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTACTNICYCKKCCFHCQVCFMFKKGLGISYGRKKRRQRRRGSPQDSQTHQISLPSK	
030K567tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTACTNICYCKKCCFHCQVCFMFKKGLGISYGRKKRRQRRRGSPQDSQTHQISLPSK	
030K638tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTACTNICYCKKCCFHCQVCFMFKKGLGISYGRKKRRQRRRGSPQDSQTHQISLPSK	
030K641tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTACTNICYCKKCCFHCQVCFMFKKGLGISYGRKKRRQRRRGSPQDSQTHQISLPSK	
030K668tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTACTNICYCKKCCFHCQVCFMFKKGLGISYGRKKRRQRRRGSPQDSQTHQISLPSK	
030K672tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTACTNICYCKKCCFHCQVCFMFKKGLGISYGRKKRRQRRRGSPQDSQTHQISLPSK	
030K674tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTACTNICYCKKCCFHCQVCFMFKKGLGISYGRKKRRQRRRGSPQDSQTHQISLPSK	
030K676tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFMFKKGLGISYGRKKRRQRRRGSPQDSQTHQISLPSK	
239K1069tat1	MEPVDPRLPEWEHPGSPRTACTNICYCKACCLHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSPTHQVPLSK	
239K1070tat1	MEPVDPRLPEWEHPGSPRTACTNICYCKACCLHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSPTHQVPLSK	
239K1071tat1	MEPVDPRLPEWEHPGSPRTACTNICYCKACCLHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSPTHQVPLSK	
239K1073tat1	MEPVDPRLPEWEHPGSPRTACTNCCCKACCLHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSPTHQVPLSK	
239K1074tat1	MEPVDPRLPEWEHPGSPRTACTNICYCKACCLHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSPTHQVPLSK	
239K1076tat1	MEPVDPRLPEWEHPGSPRTACTNICYCKACCLHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSPTHQVPLSK	
239K1079tat1	MEPVDPRLPEWEHPGSPRTACTNICYCKACCLHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSPTHQVPLSK	
239K1080tat1	MEPVDPRLPEWEHPGSPRTACTNICYCKACCLHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSPTHQVPLSK	
244K925tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAHQDSETHQGTLSK	
244K929tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAHQDSETHQGTLSK	
244K932tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAHQDSETHQGTLSK	
244K935tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAHQDSETHQGTLSK	
244K923tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAHQDSETHQGTLSK	
244K922tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAHQDSETHQGTLSK	
244K967tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAHQDSETHQGTLSK	
2920K712tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSQAHQVSLPE	
2920K713tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSQAHQVSLPE	
2920K715tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSQAHQVSLPE	
2920K716tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSQAHQVSLPE	
2920K728tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSQAHQVSLPE	
2920K730tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSQAHQVSLPE	
2920K731tat1	MEPVDSRLEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQNSQAHQVSLPE	
175K1127tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTPTCTPCYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSKTHQASLSSE	
175K1128tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTPTCTPCYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSKTHQASLSSE	
175K1129tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTPTCTPCYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSKTHQASLSSE	
175K1130tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTPTCTPCYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSKTHQASLSSE	
175K1132tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTPTCTPCYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSKTHQASLSSE	
175K1135tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTPTCTPCYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSKTHQASLSSE	
175K1137tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTPTCTPCYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSKTHQASLSSE	
175K1138tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPRTPTCTPCYCKKCCFHCQVCFITKKKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSKTHQASLSSE	
232K757tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCCLHCQVCFMFKKALGISYGRKKRRQRRAAPQDSQSHQVSLSK	
232K761tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCCLHCQVCFMFKKALGISYGRKKRRQRRAAPQDSQSHQVSLSK	
232K769tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCCLHCQVCFMFKKALGISYGRKKRRQRRAAPQDSQSHQVSLSK	
232K843tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKAACTNICYCKKCCCLHCQVCFMFKKALGISYGRKKRRQRRAAPQDSQSHQVSLSK	
232K844tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCCLHCQVCFMFKKALGISYGRKKRRQRRAAPQDSQSHQVSLSK	
232K855tat1	IEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCCLHCQVCFMFKKALGISYGRKKRRQRRAAPQDSQSHQVSLSK	
232K856tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCCLHCQVCFMFKKALGISYGRKKRRQRRAAPQDSQSHQVSLSK	
232K857tat1	MEPVDPRLPEPWKHPGSPKRTACTNICYCKKCCCLHCQVCFMFKKALGISYGRKKRRQRRAAPQDSQSHQVSLSK	
334K952tat1	MDPVDPRLPEPWQHFGSPKAACTKCYCKQCCYHCQVCFITKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSQTDQASLPSK	
334K956tat1	MDPVDPRLPEPWQHFGSPKTACTKCYCKQCCYHCQVCFITKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSQTDQASLPSK	
334K959tat1	MDPVDPRLPEPWQHFGSPKTACTKCYCKQCCYHCQVCFITKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSQTDQASLPSK	
334K962tat1	MDPVDPRLPEPWQHFGSPKTACTKCYCKQCCYHCQVCFITKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSQTDQASLPSK	
334K963tat1	MDPVDPRLPEPWQHFGSPKTACTKCYCKQCCYHCQVCFITKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSQTDQASLPSK	
334K966tat1	MDPVDPRLPEPWQHFGSPKTACTKCYCKQCCYHCQVCFITKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSQTDQASLPSK	
334K997tat1	MDPVDPRLPEPWQHFGSPKTACTKCYCKQCCYHCQVCFITKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSQTDQASLPSK	
334K999tat1	MDPVDPRLPEPWQHFGSPKTACTKCYCKQCCYHCQVCFITKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSQTDQASLPSK	
334K1002tat1	MDPVDPRLPEPWQHFGSPKTACTKCYCKQCCYHCQVCFITKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSQTDQASLPSK	
334K1005tat1	MDPVDPRLPEPWQHFGSPKTACTKCYCKQCCYHCQVCFITKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSQTDQASLPSK	
334K1006tat1	MDPVDPRLPEPWQHFGSPKTACTKCYCKQCCYHCQVCFITKGLGISYGRKKRRQRRAAPQDSQTDQASLPSK	

Abb. 42c: Aminosäuresequenz von Pat. 030, 239, 244, 2920, 175, 232, 334; Tat Exon 1. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

6.2.5 Rev Exon 1

A3	
HXB2rev	MAGRS GDS DEELIRTVRLIKLLYQS
3-2K140rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKYLYQS
3-2K143rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKYLYQS
3-2K144rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKYLYQS
3-2K145rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKYLYQS
3-2K148rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKYLYQS
3-2K149rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKYLYQS
3-2K151rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKYLYQS
3-2K152rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKYLYQS
3-2K153rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKYLYQS
3-2K146rev	MAGRS GDS DEELLKTVRIKFLYQS
5-2K185rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKHLYQS
5-2K186rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKHLYQS
5-2K190rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKHLYQS
5-2K193rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKHLYQS
5-1K312rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKHLYQS
5-2K313rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKHLYQS
5-2K314rev	MAGRS GDS DAKLLEAARLIKHLYQS
5-2K316rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKHLYQS
5-2K317rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKHLYQS
5-2K318rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKHLYQS
5-2K319rev	MAGRS GDS DAKLLEAARLIKHLYQS
5-2K320rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKHLYQS
5-1K321rev	MAGRS GDS DAKLLEAARLIKHLYQS
6-0K352rev	MAGRS GDGDEDLLLRVIRIK*LYQS
6-0K353rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K354rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYLS
6-0K355rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K356rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K357rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K358rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K359rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K361rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K27rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K30rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K467rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K468rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K469rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K470rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-0K471rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-1K259rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-1K478rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-1K479rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-1K480rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-1K481rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-1K483rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-1K484rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-1K485rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-1K486rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
6-1K487rev	MAGRS GDS DEDLLLRVIRIKCLYQS
7-1K194rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFYQS
7-1K196rev	MAG*SGDS DEELLKTVRLIKFYQS
7-1K200rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFYQS
7-1K201rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFYQS
7-1K203rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFYQS
7-1K205rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFYQS
7-1K210rev	MAGRS GDS DEFLKTVRLIKFYQS
7-1K211rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFYQS
7-1K212rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFYQS
7-1K213rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFYQS
12-1K787rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
12-1K788rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
12-1K789rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
12-1K792rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
12-1K795rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
12-1K799rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
12-1K800rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
12-1K801rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
20-0K102rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQG
20-0K105rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQS
20-0K108rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQS
20-0K322rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQG
20-0K323rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQG
20-0K324rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQG
20-0K325rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQG
20-0K326rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQG
20-0K327rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQS
20-0K328rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQG
20-0K329rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQS
20-0K330rev	MAGRS GDS DEELLKIVRLVKALYQS

A3	
HXB2rev	MAGRS GDS DEELIRTVRLIKLLYQS
36-1K112rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-1K279rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-1K282rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-1K284rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-1K285rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-1K287rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-1K288rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-1K289rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-1K290rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFPYQS
36-1K294rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-2K124rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYHS
36-2K137rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-2K136rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-2K135rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-2K133rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-2K126rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-2K138rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
36-2K127rev	MAGRS GDS DEELLKAVRLIKFLYQS
9-1K437rev	MAGRS GDS DEVLKTVRIIKFLYQS
9-1K439rev	MAGRS GDS DEVLKTVRIIKFLYQS
9-1K440rev	MAGRS GDS DEVLKTVRIIKFLYQS
9-1K447rev	MAGRS GDS DEVLKTVRIIKFLYQS
9-1K449rev	MAGRS GDS DEVLKTVRIIKFLYQS
9-1K450rev	MAGRS GDS DEVLKTVRIIKFLYQS
9-1K454rev	MAGRS GDS DEVLKTVGIKFLYQS
9-1K456rev	MAGRS GDS DEVLKTVRIIKFLYQS
14-1K652rev	MAGRS GDS DEELLRTVRLIKPLYQS
14-1K654rev	MAGRS GDS GEELLRTVRLIKLLYQS
14-1K655rev	MAGRS GDS DEELLRTVRLIKLLYQS
14-1K656rev	MAGRS GDS DEELLRTVRLIKLLYQS
14-1K688rev	MAGRS GDS DEELLRTVRLIKLLYQS
14-1K695rev	MAGRS GDS DEELLRTVRLIKLLYQS
14-1K696rev	MAGRS GDS DEELLRTVRLIKLLYQS
14-1K698rev	MAGRS GDS DEELLRTVRLIKLLYQS
14-1K699rev	MAGRS GDS DEELLRTVRLIKLLYQS
14-1K704rev	MAGRS GDS DEELLRTVRLIKLLYQS
32-1K407rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKLLYQS
32-1K421rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKLLYQS
32-1K422rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKLLYQS
32-1K423rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKLLYQS
32-1K425rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKLLYQS
32-1K426rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKLLYQS
32-1K427rev	MAGRS GDS DEELLKTVGLIKLLYQS
32-1K428rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKLLYQS
32-1K429rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKLLYQG
32-1K430rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKLLYQS
32-1K431rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKLLYQS
32-1K432rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKLLYQS
030K520rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKSLYQS
030K567rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKSLYQS
030K638rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKSLYQS
030K641rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKSLYQS
030K668rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKSLYQS
030K672rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKSLYQS
030K674rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKSLYQS
030K676rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKSLYQS
239K1069rev	MAGRS GVS DEELLKTVRLIKFPYQS
239K1070rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
239K1071rev	MAGRS GDS DEELLRTVRLIKFLYQS
239K1073rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
239K1074rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
239K1076rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
239K1079rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQS
239K1080rev	MAGRS GDS DEELLKTVRLIKFLYQG
244K925rev	MAGRS GDS EEELIKTVRLIKELYQS
244K929rev	MAGRS GDS EEELIKTVRLIKELYQS
244K932rev	MAGRS GDS EEELIKTVRLIKELYQS
244K935rev	MAGRS GDS EEELIKTVRLIKELYQS
244K925rev	MAGRS GDS EEELIKTVRLIKELYQS
244K929rev	MAGRS GDS EEELIKTVRLIKELYQS
244K967rev	MAGRS GDS EEELIKTVRLIKELYQS

Abb.43a: Aminosäuresequenz von HIV 3-2, 5-2, 6-0, 6-1, 7-1, 12-1, 20-0, 36-1, 36-2, 9-1, 14-1, 32-1, Pat. 030, 239, 244; Rev Exon 1. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

	A3
HXB2rev	M A G R S G D S D E E L I R T V R L I K L L Y Q S
2920K712rev	M A G R S G D S D E E L L K V T R L I K F L Y Q S
2920K713rev	M A G R S G D S D E E L L K V T R L I K F L Y Q S
2920K715rev	M A G R S G D S D E E L L K V T R L I K L L Y Q S
2920K716rev	M A G R S G D S D E E L L K V T R L I K F L Y Q S
2920K728rev	M A G R S G D S D E E L L K V T R L I K F L Y Q S
2920K730rev	M A G R S G D S D E E L L K V T R L I K F L Y Q S
2920K731rev	M A G R S G D S D E E L L K V T R L I K F L Y Q S
175K1127rev	M A G R S G D S D E E L L K T V R L I K R L Y Q S
175K1128rev	M A G R S G D S D E E L L K T V R L I K R L Y Q S
175K1129rev	M A G R S G D S D E E L L K T V R L I K R L Y Q S
175K1130rev	M A G R S G D S D E E L L K T V R L I K R L Y Q S
175K1132rev	M A G R S G D S D E E L L K T V R L I K R L Y Q S
175K1135rev	M A G R S G D S D E E L L K T V R L I K R L Y Q S
175K1137rev	M A G R S G D S D E E L L K T V R L I K R L Y Q S
175K1138rev	M A G R S G D S D E E L L K T V R L I K R L Y Q S
232K757rev	M A G R S R D S E E E L L R T A R V I K F L Y Q S
232K761rev	M A G R S G D S E E E L L R T V R V I K F L Y Q S
232K769rev	M A G R S G D S E E E L L R T V R V I K F L Y Q S
232K843rev	M A G R S G D S E E E L L R T V R V I K F L Y Q S
232K844rev	M A G R S G D S E E E L L R T V R V I K F L Y Q S
232K855rev	M A G R S G D S E E E L L R T V R V I K F L Y Q S
232K856rev	M A G R S G D S E E E L L R T V R V I K F L Y Q S
232K857rev	M A G R S G D S E E E L L R T V R V I K F L Y Q S
334K952rev	M A G R S G D S D E D L L K T V R L I K L L Y Q S
334K956rev	M A G R S G D S D E D L L K T V R L I K L L Y Q S
334K959rev	M A G R S G D N D E D L L K T V R L I K L L Y Q S
334K962rev	M A G R S G D S D E D L L K T V R L I K L L Y Q S
334K963rev	M A G R S G D S D E D L L K T V R L I K L L Y Q S
334K966rev	M A G R S G D S D E D L L K T V R L I K L L Y Q S
334K997rev	M A G R S G D S D E D L L K T V R L I K L L Y Q S
334K999rev	M A G R S G D S D E D L L K T V R L I K L L Y Q S
334K1002rev	M A G R S G D S D E D L L K T V R L I K L L Y Q S
334K1005rev	M A G R S G D S D E D L L K T V R L I K L L Y Q S
334K1006rev	M A G R S G D S D E D L L K T V R L I K L L Y Q S

Abb. 43b: Aminosäuresequenz von Pat. 2920, 175, 232, 334; Rev Exon 1. HLA-Typ-spezifische CTL-Epitope sind schwarz umrahmt und farbig unterlegt. In der HXB2-Sequenz sind sie entsprechend bezeichnet.

6.3 Darstellung der vorhergesagten CTL-Epitope und quantitativen Aminosäurevariabilität (Auswahl).

6.3.1 Vif, HIV 3-2, HLA-A*0201

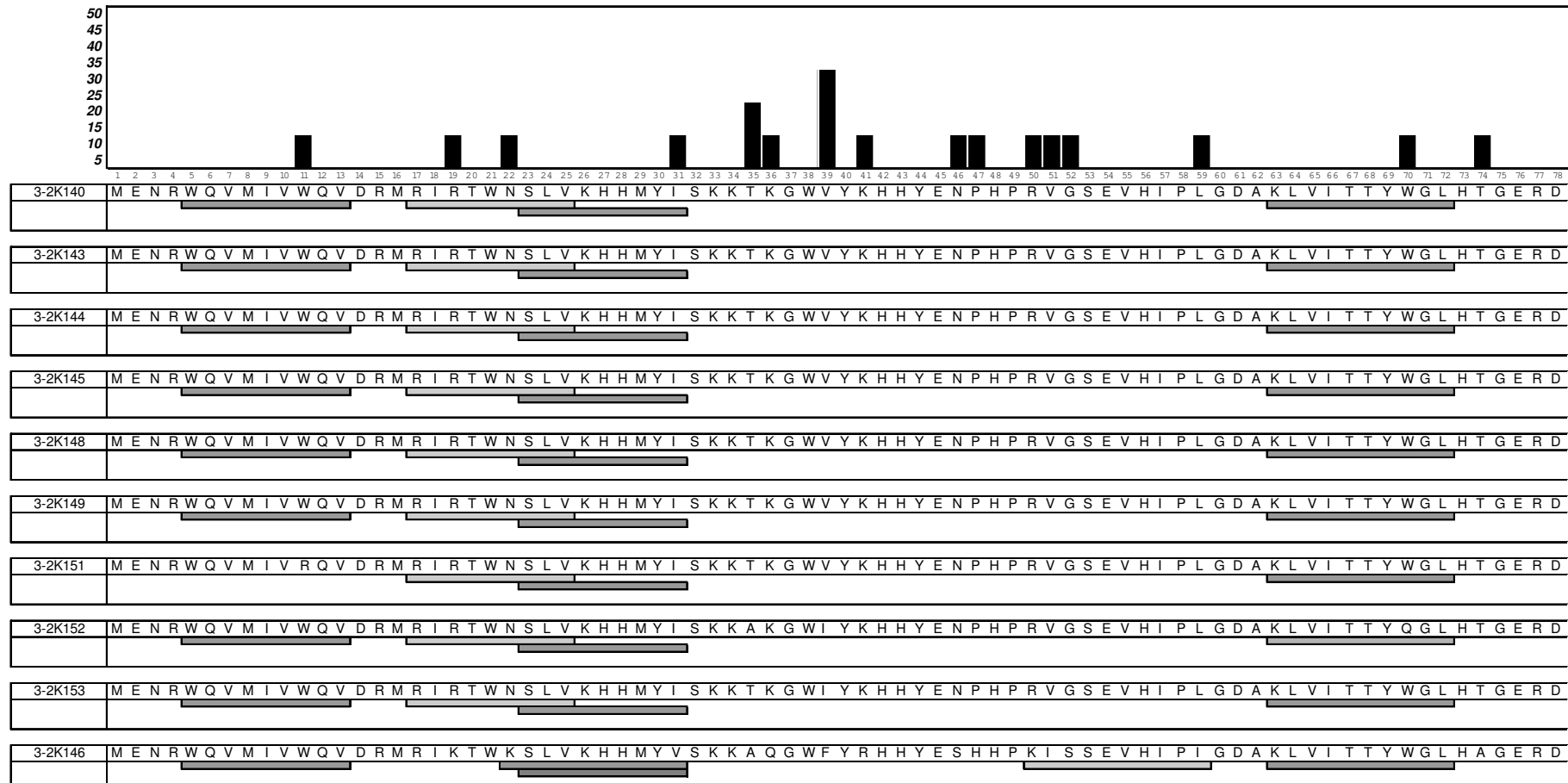


Abb. 44a: Ausschnitt auf der Aminosäurefolge des Vif-Proteins (AS 1-78) der HIV-Klone des Patienten HIV 3-2. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA-A*0201-restringierte CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. 3-2K140 = HIV 3-2, Klon 140.

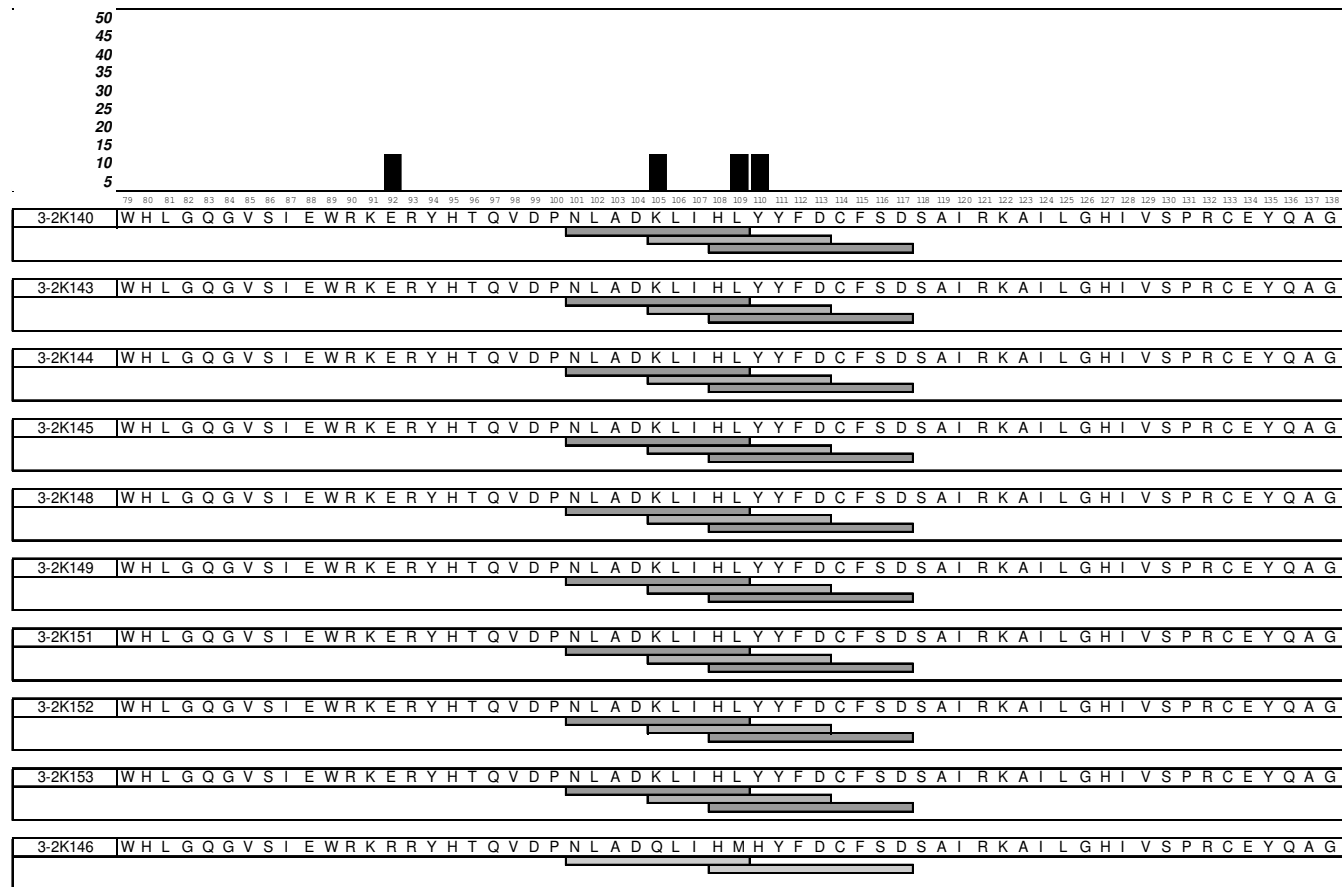


Abb. 44b: Fortsetzung der Aminosäurefolge des Vif-Proteins (AS 79-138) der HIV-Klone des Patienten HIV 3-2. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA-A*0201-restringierte CTL-Eptope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. 3-2K140 = HIV 3-2, Klon 140.

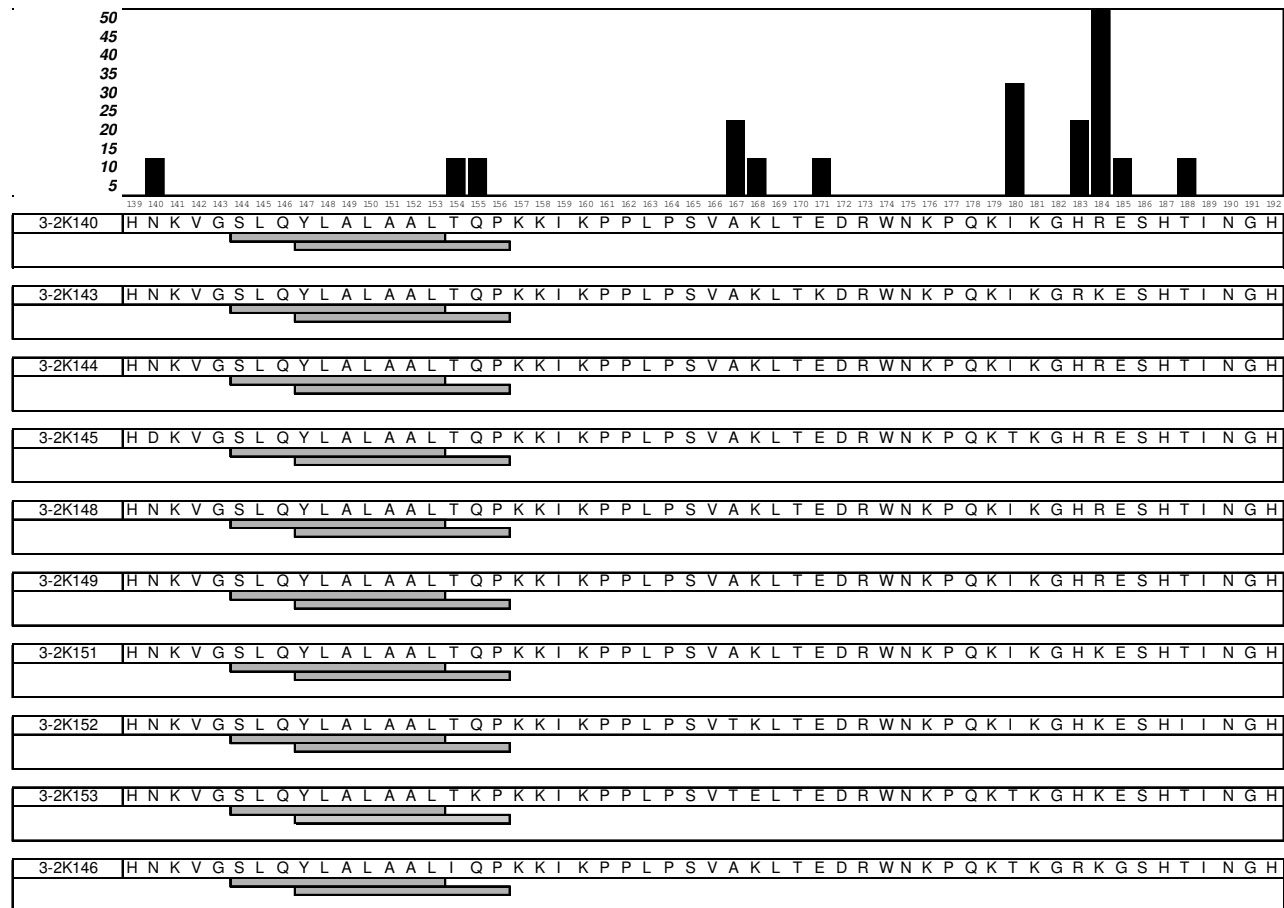


Abb. 44c: Fortsetzung der Aminosäurefolge des Vif-Proteins (AS 139-192) der HIV-Klone des Patienten HIV 3-2. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA-A*0201-restringierte CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. 3-2K140 = HIV 3-2, Klon 140.

6.3.2 Vpr, HIV 12-1, HLA-A*0201

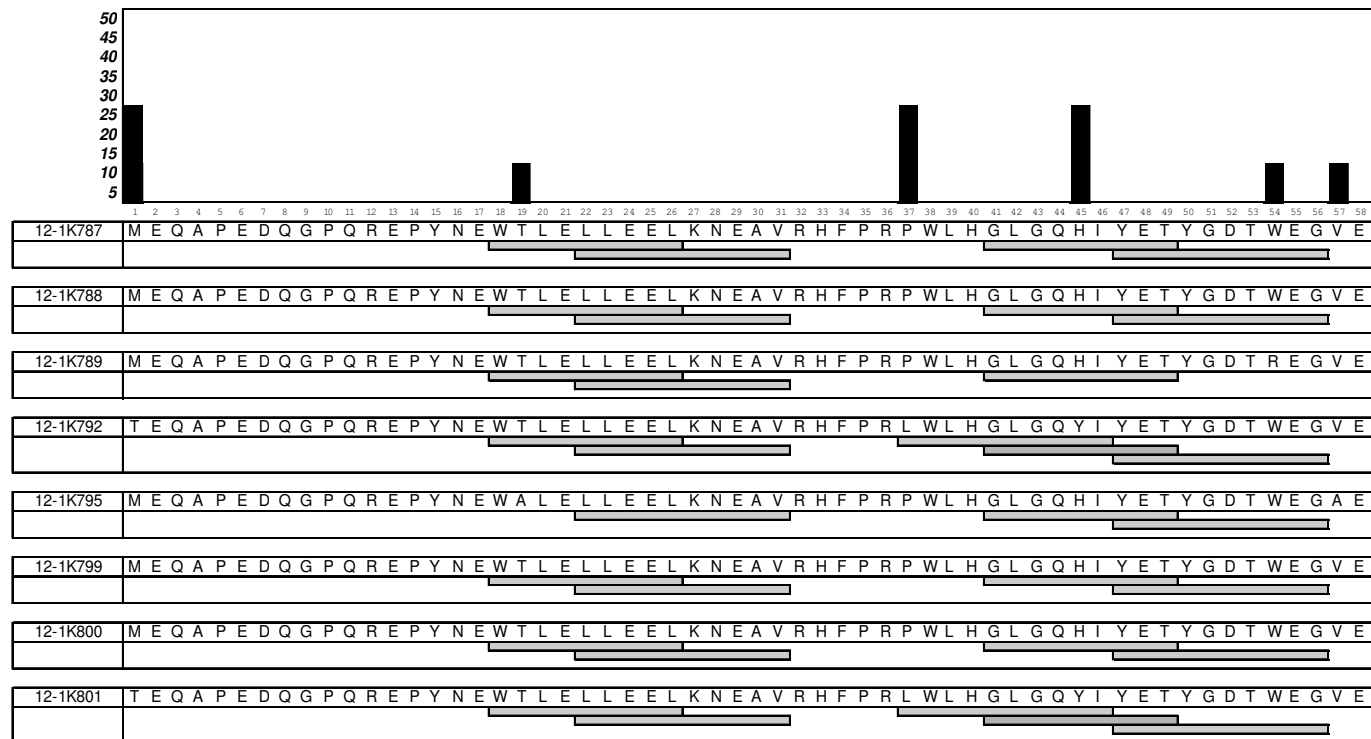


Abb. 45a: Ausschnitt aus der Aminosäurefolge des Vpr-Proteins (AS 1-58) der HIV-Klone des Patienten HIV 12-1. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA-A*0201-restringierte CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. 12-1K787 = HIV 12-1, Klon 787.

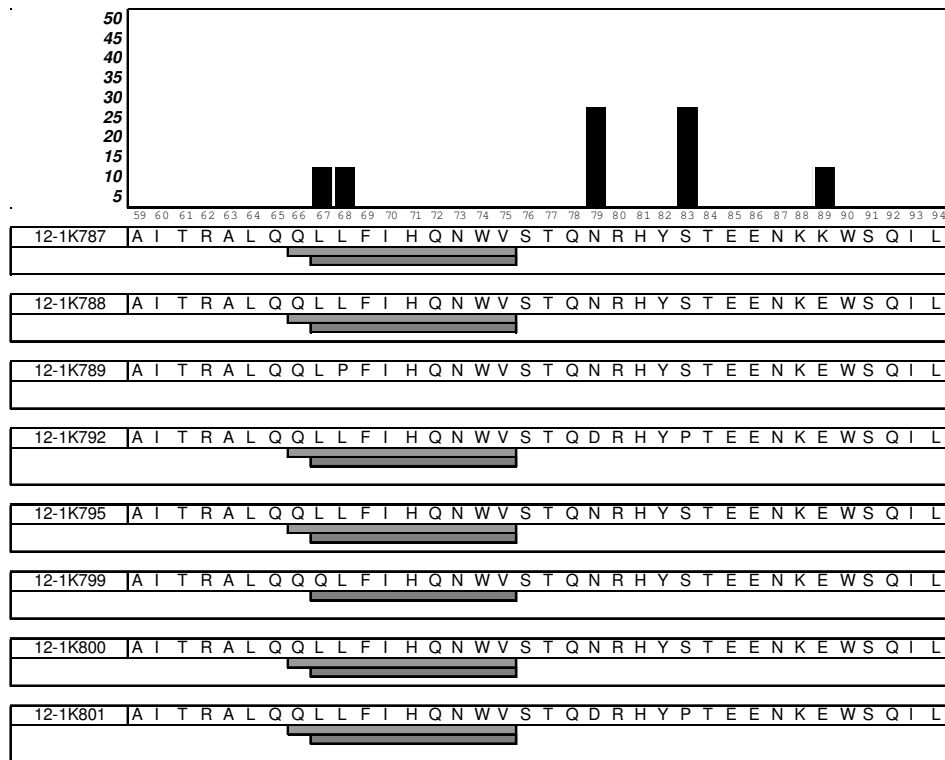


Abb. 45b: Fortsetzung der Aminosäurefolge des Vpr-Proteins (AS 59-94) der HIV-Klone des Patienten HIV 12-1. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA-A*0201-restringierte CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. 12-1K787 = HIV 12-1, Klon 787.

6.3.3 Vpu, HIV 9-1, HLA-A*0201

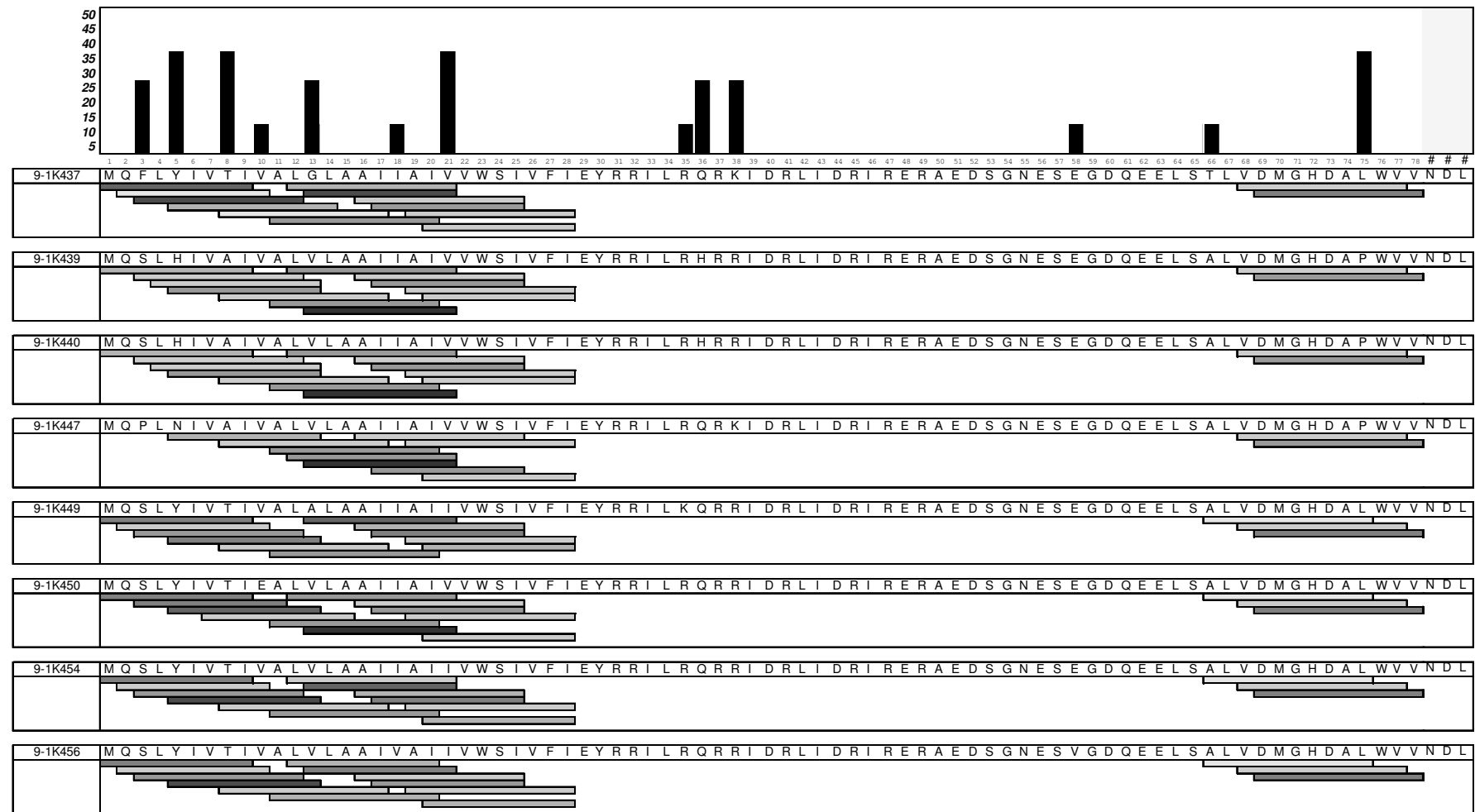


Abb. 46: Aminosäurefolge des Vpu-Proteins der HIV-Klone des Patienten HIV 9-1. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA-A*0201-restringierte CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. 9-1K437 = HIV 9-1, Klon 437.

6.3.4 Tat Exon 1, HIV 14-1, HLA-A*0201

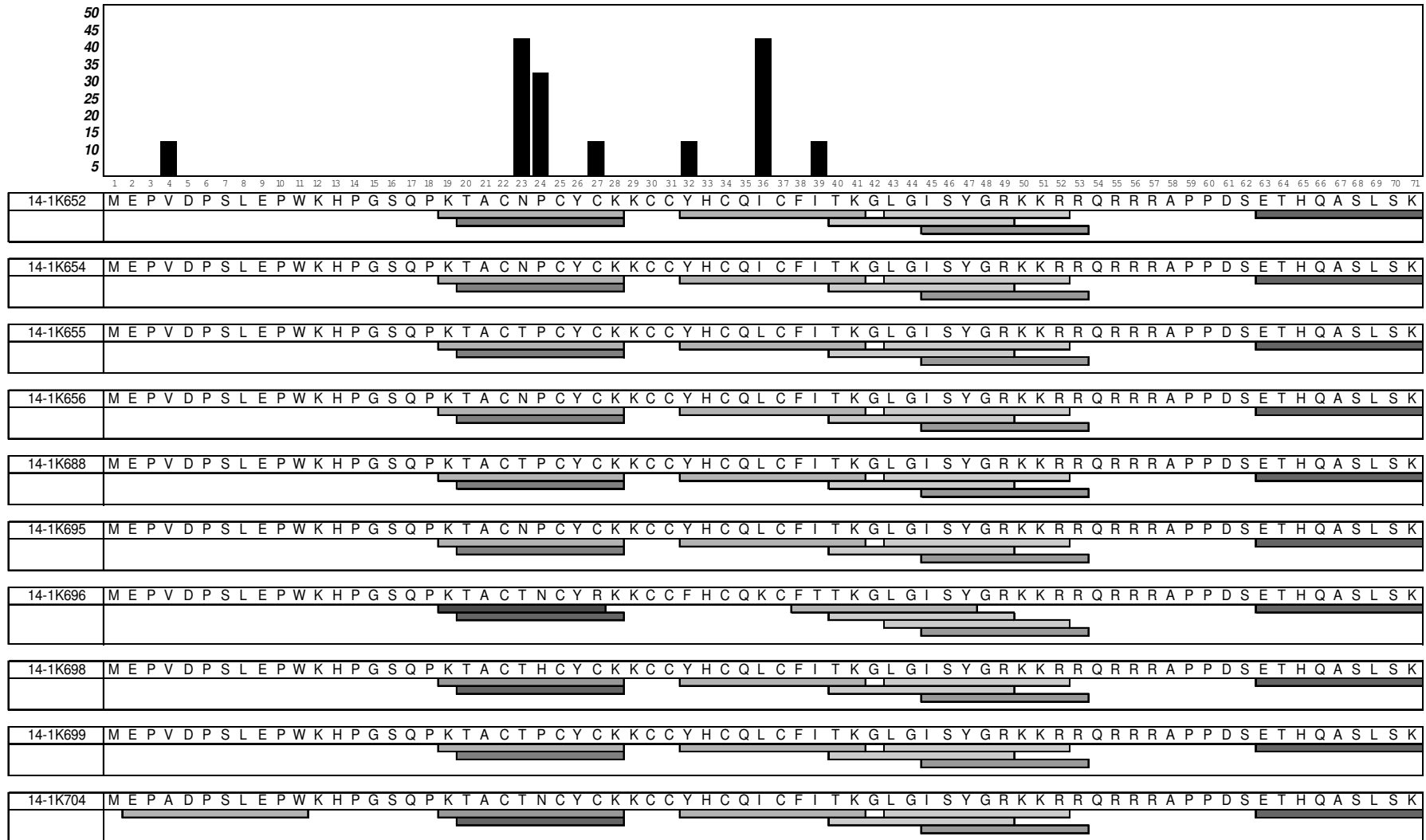


Abb. 47: Aminosäurefolge des Proteins Tat Exon 1 der HIV-Klone des Patienten HIV 14-1. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA-A*0201-restringierte CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. 14-1K652 = HIV 14-1, Klon 652.

6.3.5 Rev Exon 1, HIV 36-1, HLA-A*0201

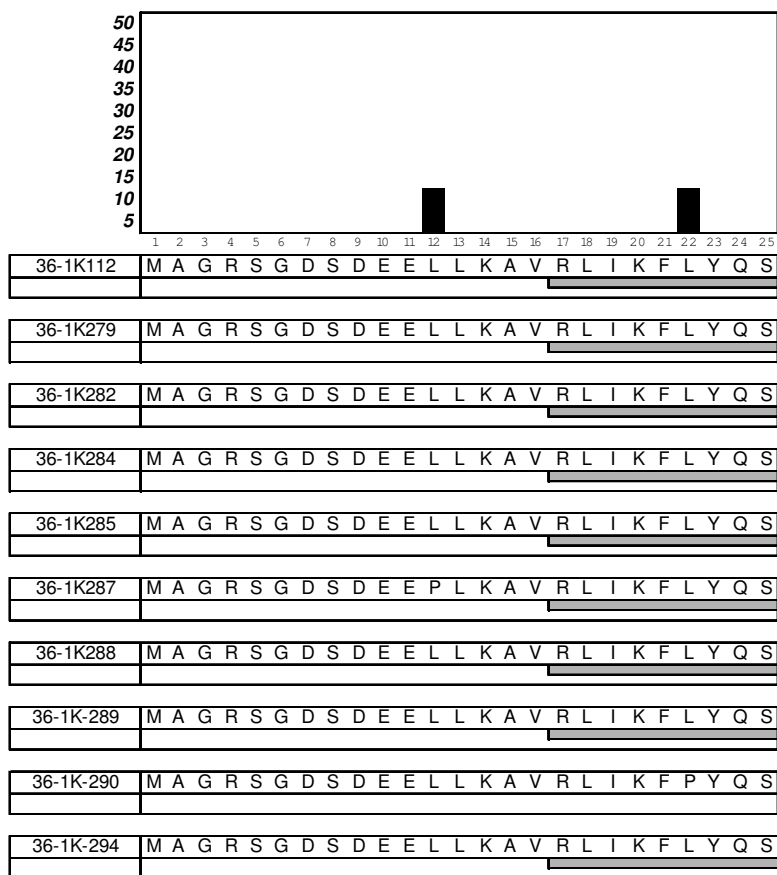


Abb. 48: Aminosäurefolge des Proteins Rev Exon 1 der HIV-Klone des Patienten HIV 36-1. Im oberen Bildabschnitt ist mit vertikalen Balken die Variabilität der AS an entsprechender Position in Prozent angegeben. Die horizontalen Balken zeigen errechnete, HLA-A*0201-restringierte CTL-Epitope. Dunkle Grautöne repräsentieren stark an MHC-Moleküle bindende Epitope, helle Grautöne schwach bindende. 36-K112 = HIV 36-1, Klon 112.

6.4 Variabilität der experimentell nachgewiesenen HLA-A2-Epitope

6.4.1 Vif

Patient	Epitop I	Klonale Häufigkeit	Epitop II	Klonale Häufigkeit	Epitop III	Klonale Häufigkeit	Epitop IV	Klonale Häufigkeit
HXB2	SLVKHHMYV		ELADQLIHLV		ALAALITPK		KIKPPLPSV	
HIV 3-2	-----I -----	9/10 (90%) 1/10 (10%)	N---K----- N-----MH	9/10 (90%) 1/10 (10%)	----TQ-- ----TK-- -----Q--	8/10 (80%) 1/10 (10%) 1/10 (10%)	-----	10/10 (100%)
HIV 5-2	----- ---X-----	12/13 (92%) 1/13 (8%)	N-----M-	13/13 (100%)	-----V--	13/13 (100%)	----- R----- --R----- ---L-----	9/13 (69%) 2/13 (15%) 1/13 (8%) 1/13 (8%)
HIV 6-0	-----I ---R-----I	13/14 (93%) 1/14 (7%)	D----- DP----- A-----	12/14 (86%) 1/14 (7%) 1/14 (7%)	--T-----	16/16 (100%)	-T----- -TR----- -T-----A	14/16 (88%) 1/16 (6%) 1/16 (6%)
HIV 6-1	-----I	10/10 (100%)	D-----	10/10 (100%)	--T-----	10/10 (100%)	-T-----	10/10 (100%)
HIV 7-1	-----I	10/10 (100%)	N----- D-----	9/10 (90%) 1/10 (10%)	-----V-- T---V---	9/10 (90%) 1/10 (10%)	R----- R-R-----	9/10 (90%) 1/10 (10%)
HIV 12-1	-----I ----- -S-----	4/8 (50%) 3/8 (37,5%) 1/8 (12,5%)	N-----	8/8 (100%)	-----K-- -----LK-- -----VK--	5/8 (62,5%) 2/8 (25%) 1/8 (12,5%)	-----	8/8 (100%)
HIV 20-0	-----I	12/12 (100%)	G-----	12/12 (100%)	-----T--R -P---T--R	11/12 (92%) 1/12 (8%)	-----	12/12 (100%)
HIV 36-1	-----T N-----T	9/10 (90%) 1/10 (10%)	N-----	10/10 (100%)	-----R--	9/10 (90%) 1/10 (10%)	R-----	9/10 (90%) 1/10 (10%)
HIV 36-2	-----T -----P--T	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	N-----	8/8 (100%)	----- --V----- -----R--	6/8 (75%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%)	R-----	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)
Pat 030	-----M- -----RM-	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	G-----	8/8 (100%)	--T--V---	8/8 (100%)	----- -V-----	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)
Pat 239	G---Y-I-R	8/8 (100%)	G---K----	8/8 (100%)	----IVK-R	8/8 (100%)	RG-----	8/8 (100%)
Pat 244	-----I	6/6 (100%)	N-----	7/7 (100%)	-----K-R	7/7 (100%)	-T----- -T----H--	6/7 (86%) 1/7 (14%)
Pat 2920	-----I -S----- -*-----	5/7 (71%) 1/7 (14%) 1/7 (14%)	-R-----	7/7 (100%)	--T----- --T---I--	6/7 (86%) 1/7 (14%)	-TR----- -TR----R-	6/7 (86%) 1/7 (14%)

Abb. 49: HLA-A2-CTL-Epitope in Vif der HLA-A2-positiven Patientenproben im Vergleich zur Referenzsequenz HXB2. Es sind nur veränderte Aminosäuren aufgeführt, unveränderte werden durch horizontale Striche repräsentiert. In der Spalte neben den einzelnen Epitopen ist die Anzahl der Klone mit der entsprechenden Variation aufgeführt, sowie deren Anteil an der gesamten Klon-Population in Prozent.

Patient	Epitop I	Klonale Häufigkeit	Epitop II	Klonale Häufigkeit	Epitop III	Klonale Häufigkeit	Epitop IV	Klonale Häufigkeit
HXB2	SLVKHHMYV		ELADQLIHLV		ALAALITPK		KIKPPLPSV	
HIV 9-1 nonA2	-----I -----	6/8 (75%) 2/8 (25%)	N---R----- N---R-T---	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	--T--VK-- -----V-Q- --T--VK-R	5/8 (62,5%) 2/8 (25%) 1/8 (12,5%)	RR----- -T-----	5/8 (62,5%) 3/8 (37,5%)
HIV 14 non A2	-----I-I	10/10 (100%)	N----- N-----H	9/10 (90%) 1/10 (10%)	-----P-- -----T-- ---V--T-- ---T--T-- -----A-- -----	3/10 (30%) 1/10 (10%) 1/10 (10%) 1/10 (10%) 1/10 (10%) 1/10 (10%)	-T----- RTR----- -TR-----	8/10 (80%) 1/10 (10%) 1/10 (10%)
HIV 32-1 nonA2	----- -----I -----T	9/12 (75%) 2/12 (17%) 1/12 (8%)	D---R---H D---*---H	11/12 (92%) 1/12 (8%)	--T--V--- --T--V-S-	11/12 (92%) 1/12 (8%)	----- -----A	11/12 (92%) 1/12 (8%)
Pat 175 non A2	-----I -----CI	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	D---H----- D--GH----- C	6/8 (75%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%)	-----V--- X	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	-----L X	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)
Pat 232 non A2	-----	8/8 (100%)	G-----	8/8 (100%)	--V--R---	8/8 (100%)	RR----- RRR-----	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)
Pat 334 non A2	-----I	11/11 (100%)	N-----Y	11/11 (100%)	-----	11/11 (100%)	-R----- -R---S---	10/11 (91%) 1/11 (9%)

Abb. 50: HLA-A2-CTL-Epitope in Vif der HLA-A2-negativen Patientenproben (non A2) im Vergleich zur Referenzsequenz HXB2. Es sind nur veränderte Aminosäuren aufgeführt, unveränderte werden durch horizontale Striche repräsentiert. In der Spalte neben den einzelnen Epitopen ist die Anzahl der Klone mit der entsprechenden Variation aufgeführt, sowie deren Anteil an der gesamten Klon-Population in Prozent.

6.4.2 Vpr

Patient	Epitop I	Klonale Häufigkeit	Epitop II	Klonale Häufigkeit	Epitop III	Klonale Häufigkeit	Epitop IV	Klonale Häufigkeit
HXB2	FPRIWLHGL		GLGQHIYET		AIIRILQQL		RILQQLFI	
HIV 3-2	---M----- L--M-----	9/10 (90%) 1/10 (10%)	---Y----	10/10 (100%)	-L--T----- -----	6/10 (60%) 4/10 (40%)	-T----- -----	6/10 (60%) 4/10 (40%)
HIV 5-2	---L----- L--L-----	12/13 (92%) 1/13 (8%)	---Y----- ---Y--V-	12/13 (92%) 1/13 (8%)	---T---M -L--T---M	12/13 (92%) 1/13 (8%)	-T---M---	13/13 (100%)
HIV 6-0	---P--YS-	16/16 (100%)	S---Y----	16/16 (100%)	----- -M-----	14/16 (87,5%) 2/16 (12,5%)	-----	16/16 (100%)
HIV 6-1	---P--YS-	10/10 (100%)	S---Y----	10/10 (100%)	-----	10/10 (100%)	-----	10/10 (100%)
HIV 7-1	---G---S-	10/10 (100%)	S---Y----	10/10 (100%)	-----	10/10 (100%)	-----	10/10 (100%)
HIV 12	--P----- --L-----	6/8 (75%) 2/8 (25%)	---Y----	6/8 (75%) 2/8 (25%)	--T-A----- -T-A---Q	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	-A----- -A---Q--- -A---P--	6/8 (75%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%)
HIV 20-0	---V----- ---A---S- ---V*-----	10/12 (83%) 1/12 (8%) 1/12 (8%)	----- S-----	11/12 (92%) 1/12 (8%)	-L--T----- -L-*T----- ---T-----	7/12 (58%) 3/12 (25%) 2/12 (17%)	-T----- *T-----	9/12 (75%) 3/12 (25%)
HIV 36-1	---P----- ---P-P---	9/10 (90%) 1/10 (10%)	---Y----	10/10 (100%)	---T----- ----- ---T--R-	7/10 (70%) 2/10 (20%) 1/10 (10%)	-T---I--- -----M-- -T--R-I---	7/10 (70%) 2/10 (20%) 1/10 (10%)
HIV 36-2	---P----- L--P-----	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	---Y----	8/8 (100%)	---T----- -----	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	-T---I--- -----M--	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)
Pat 030	-----S-	8/8 (100%)	S-----	8/8 (100%)	-----	8/8 (100%)	-----	8/8 (100%)
Pat 239	---P-----	8/8 (100%)	---Y----	8/8 (100%)	----- ---T-----	6/8 (75%) 2/8 (25%)	-----M-- -T---M--	6/8 (75%) 2/8 (25%)
Pat 244	----- X-----	6/7 (86%) 1/7 (14%)	----- ---S--- X-----	5/7 (71%) 1/7 (14%) 1/7 (14%)	----- X-----	6/7 (86%) 1/7 (14%)	----- X-----	6/7 (86%) 1/7 (14%)
Pat 2920	-----	7/7 (100%)	----- ---T---	6/7 (86%) 1/7 (14%)	-----	7/7 (100%)	-----	7/7 (100%)

Patient	Epitop I	Klonale Häufigkeit	Epitop II	Klonale Häufigkeit	Epitop III	Klonale Häufigkeit	Epitop IV	Klonale Häufigkeit
HIV 9-1 nonA2	----- --G-----	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	-----S -----A-	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	-----P--- -----P	6/8 (75%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%)	----- --P----- -----P--	6/8 (75%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%)
HIV 14 nonA2	---L---N- -----N-	9/10 (90%) 1/10 (10%)	N---Y--- N---Y---A	9/10 (90%) 1/10 (10%)	-LL----- VLL-----	9/10 (90%) 1/10 (10%)	----- -----P--	9/10 (90%) 1/10 (10%)
HIV 32-1 nonA2	---G---S- ---G--RR- ---G-----	10/12 (83%) 1/12 (8%) 1/12 (8%)	S---Y--- R---Y--- ---Y---	10/12 (83%) 1/12 (8%) 1/12 (8%)	----- ---V-----	11/12 (92%) 1/12 (8%)	----- -V-----	11/12 (92%) 1/12 (8%)
Pat 175 non A2	---M----- ---M--Y--	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	-----	8/8 (100%)	---S----- ---V----- -----R--	5/8 (62,5%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%)	----- S----- ---R----- -----L-	5/8 (62,5%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%) 1/8 (12,5%)
Pat 232 non A2	---T---N- ---T-P-N-	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	N---Y--- N---YV---	7/8 (87,5%) 1/8 (12,5%)	-----	8/8 (100%)	-----	8/8 (100%)
Pat 334 nonA2	--SM----- --SMR----	10/11 (91%) 1/11 (9%)	----- --E-----	10/11 (91%) 1/11 (9%)	-----	11/11 (100%)	-----	11/11 (100%)

Abb. 51: HLA-A2-CTL-Epitope in Vpr der HLA-A2-positiven (oberer Bildanteil) und HLA-A2-negativen (unterer Bildanteil, non A2) Patientenproben im Vergleich zur Referenzsequenz HXB2. Es sind nur veränderte Aminosäuren aufgeführt, unveränderte werden durch horizontale Striche repräsentiert. In der Spalte neben den einzelnen Epitopen ist die Anzahl der Klone mit der entsprechenden Variation aufgeführt, sowie deren Anteil an der gesamten Klon-Population in Prozent.

6.4.3 Vpu

Patient	Epitop I	Klonale Häufigkeit
HXB2	VVAIIIAIV	
HIV 3-2	--VA-----	10/10 (100%)
HIV 5-2	-IVT-L--A	6/13 (46%)
	-IVTLL---	3/13 (23%)
	--GT-----	2/13 (15%)
	--VT-L--A	1/13 (8%)
	--VT-----	1/13 (8%)
HIV 6-0	--VA-L---	15/16 (94%)
	--VAXL---	1/16 (6%)
HIV 6-1	--VA-L---	10/10 (100%)
HIV 7-1	---A-V---	8/10 (80%)
	-A-A-V---	1/10 (10%)
	---A-V-*L	1/10 (10%)
HIV 12	---T-----	4/8 (50%)
	---A-----	3/8 (27,5%)
	I--T-----	1/8 (12,5%)
HIV 20-0	---AVL---	10/10 (100%)
HIV 36-1	---A-L---	8/10 (80%)
	---V-L---	1/10 (10%)
	---A-L--A	1/10 (10%)
HIV 36-2	---A-L---	8/8 (100%)
Pat 030	-----	8/8 (100%)
Pat 239	-I-A-----	6/8 (75%)
	-IVA-----	1/8 (12,5%)
	-ITA-----	1/8 (12,5%)
Pat 244	--VTL---	7/7 (100%)
Pat 2920	--VG-----	6/7 (86%)
	?	1/7 (14%)

Patient	Epitop I	Klonale Häufigkeit
HXB2	VVAIIIAIV	
HIV 9-1 nonA2	-L-A-----	4/8 (50%)
	-L-A----I	1/8 (12,5%)
	-L-A-V--I	1/8 (12,5%)
	AL-A----I	1/8 (12,5%)
	GL-A-----	1/8 (12,5%)
HIV 14 nonA2	--VG-----	9/10 (90%)
	-IVG-----	1/10 (10%)
Pat 32-1 nonA2	---A-----	8/12 (67%)
	---A-L---	2/12 (17%)
	I--A-L---	1/12 (8%)
	-A-A-----	1/12 (8%)
Pat 175 non A2	---G-L---	6/8 (75%)
	---E-L---	2/8 (25%)
Pat 232 non A2	--VT-----	8/8 (100%)
Pat 334 non A2	I-VA-----	10/11 (91%)
	I-VA---T-	1/11 (9%)

Abb. 52: HLA-A2-CTL-Epitope in Vpu der HLA-A2-positiven (linker Bildanteil) und HLA A2-negativen (rechter Bildanteil, non A2) Patientenproben im Vergleich zur Referenzsequenz HXB2. Es sind nur veränderte Aminosäuren aufgeführt, unveränderte werden durch horizontale Striche repräsentiert. In der Spalte neben den einzelnen Epitopen ist die Anzahl der Klone mit der entsprechenden Variation aufgeführt, sowie deren Anteil an der gesamten Klon-Population in Prozent.

6.5 Statistischen Auswertung

6.5.1 Graphische Darstellung der statistischen Auswertung, Gruppenpaar 1

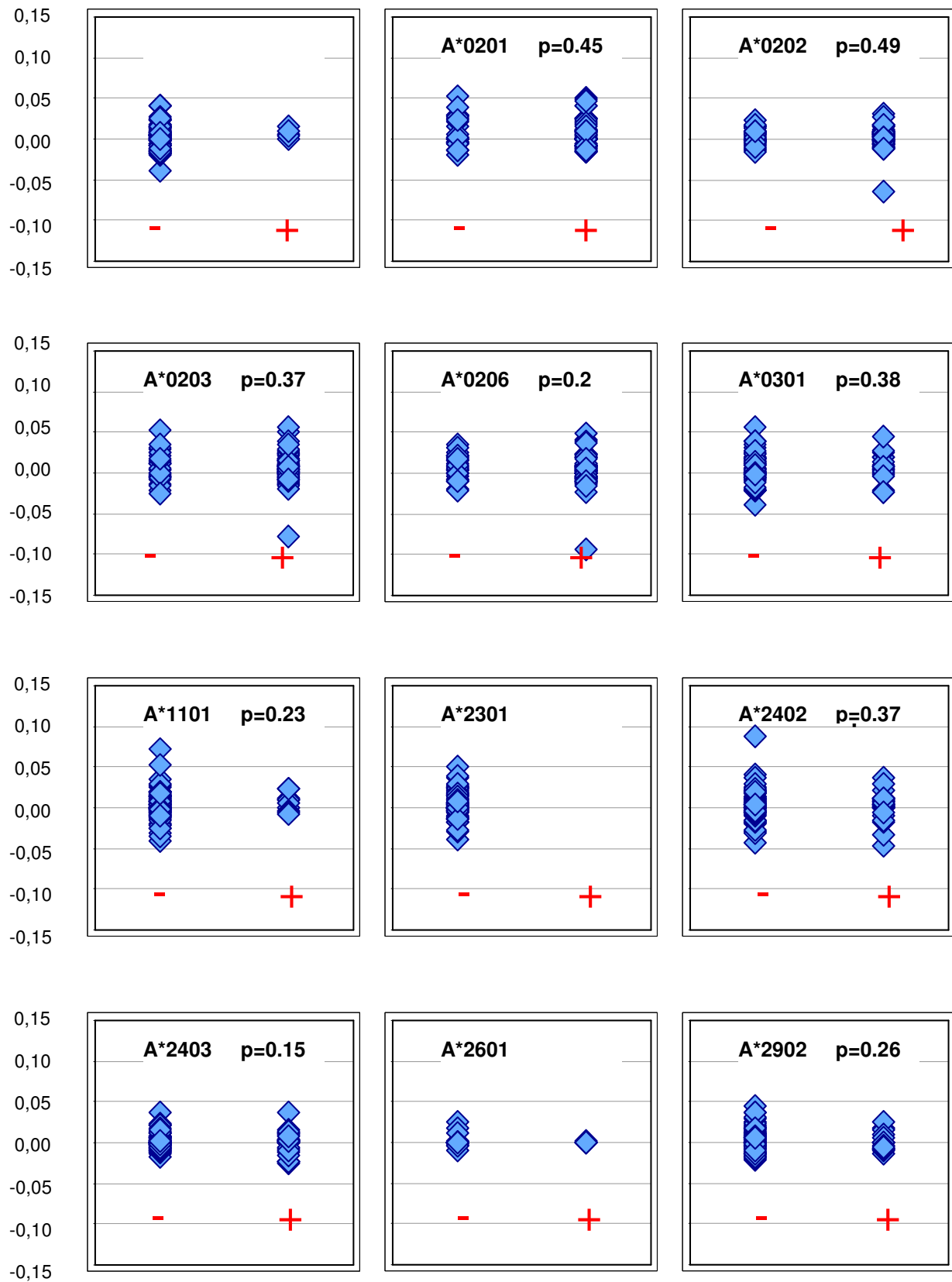


Abb. 53a: siehe Text zu Abb. 53c.

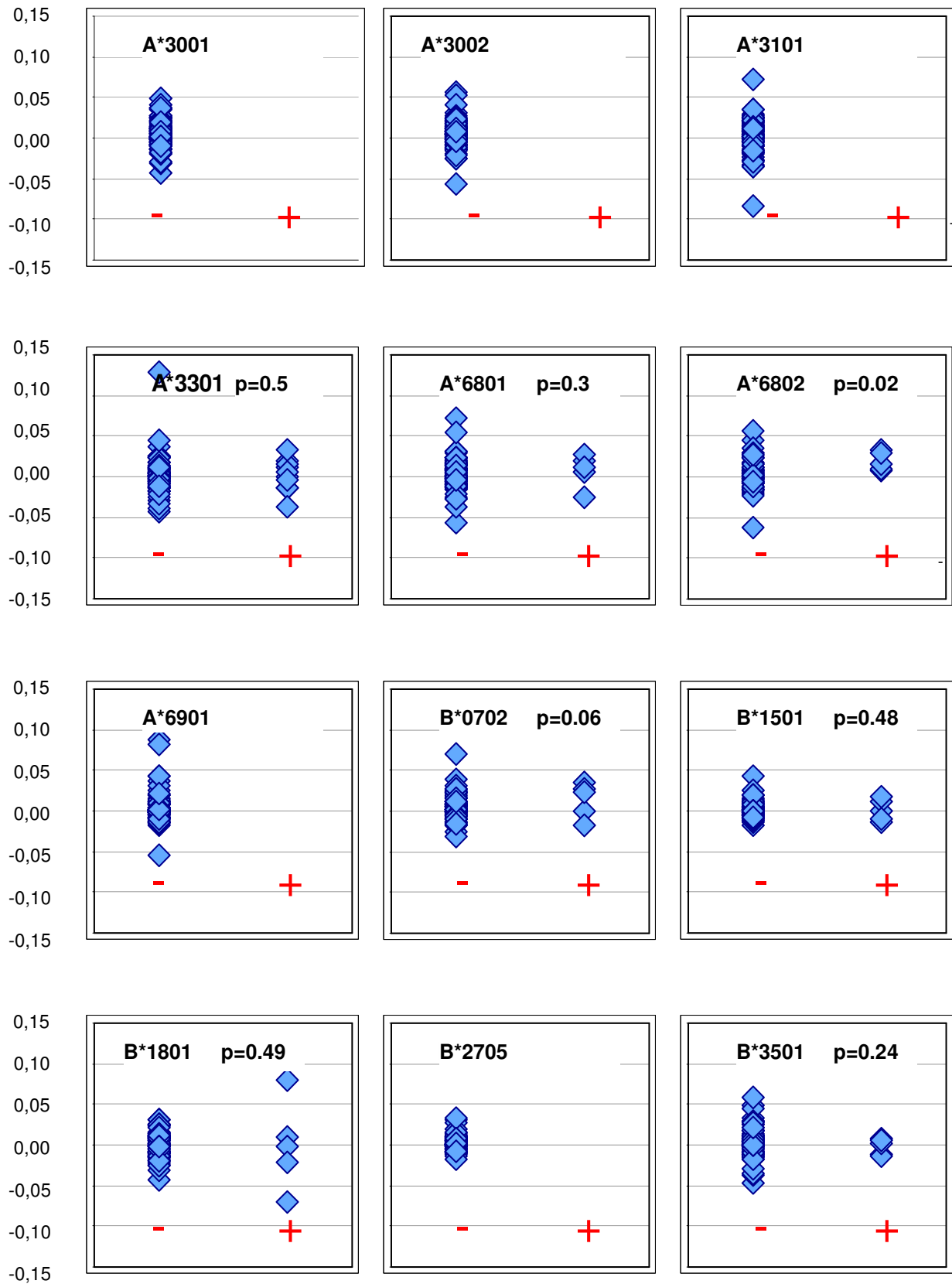


Abb. 53b: siehe Text Abb. 53c

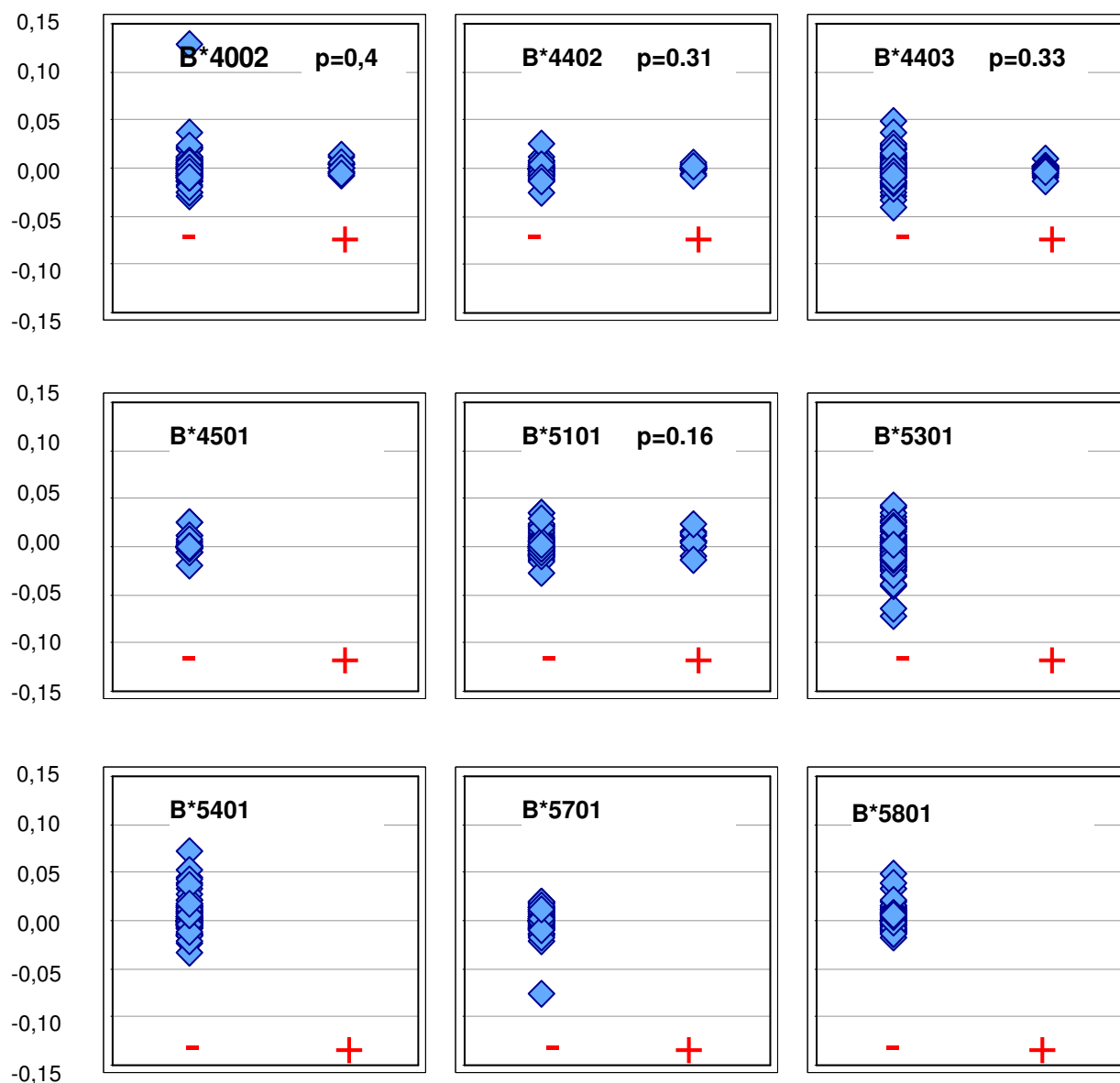


Abb. 53c: Graphische Darstellung der Variabilitätshäufigkeit innerhalb der CTL-Epitope in Abhängigkeit der HLA-Typen. Eine blaue Raute repräsentiert für jedes untersuchte Gen der einzelnen Patienten das Verhältnis von erwarteter zu tatsächlicher Variabilität innerhalb der HLA-definierten Epitope. Liegt die Raute auf der zentralen horizontalen Linie (0,00), entspricht die Variabilität innerhalb der Epitope einer zufälligen Verteilung. Liegt sie oberhalb davon, ist die Variabilität innerhalb der CTL-Epitope erhöht. + = Patienten, die das entsprechende MHC-Molekül tragen, - = Patienten, die das entsprechende MHC-Molekül nicht tragen. $p < 0,05$: es besteht eine signifikante Variabilitätshäufung innerhalb der berücksichtigten Epitope.

6.5.2 Gruppenpaar 2 und 3

HLA	p-Wert	
	Acute	Long term
A*0101	-	0,32
A*0201	0,28	0,40
A*0202	0,21	0,41
A*0203	0,09	0,19
A*0206	0,40	0,20
A*0301	0,38	0,33
A*1101	0,19	0,41
A*2301	-	-
A*2402	0,20	0,17
A*2403	0,36	0,05
A*2601	-	-
A*2902	0,27	-
A*3001	-	-
A*3002	-	-
A*3101	-	-
A*3301	0,40	-
A*6801	-	0,49
A*6802	-	0,08
A*6901	-	-
B*0702	-	0,12
B*0801	-	-
B*1501	-	0,43
B*1801	-	0,48
B*2705	-	-
B*3501	-	0,27
B*4002	0,39	0,32
B*4402	0,23	0,07
B*4403	0,29	0,43
B*4501	-	-
B*5101	0,08	-
B*5301	-	-
B*5401	-	-
B*5701	-	-
B*5801	-	-

Abb. 54: p -Werte des t-Tests des Gruppenpaars 2 (akut Serokonvertierte) und 3 (Langzeitinfizierte) (siehe 2.2.4). Acute = dt.: akut, long term = dt.: Langzeit.

6.5.3 Gruppenpaar 4

HLA	p-Wert				
	Rev	Tat	Vif	Vpr	Vpu
A*0101	-	-	-	-	-
A*0201	0,30	0,28	0,35	0,49	0,36
A*0202	0,20	0,45	0,14	0,33	0,28
A*0203	0,45	0,36	0,20	0,30	0,49
A*0206	0,44	0,16	0,24	0,41	0,13
A*0301	0,46	0,28	0,40	0,25	0,27
A*1101	-	0,23	0,19	0,13	0,28
A*2301	-	-	-	-	-
A*2402	0,45	0,27	0,31	0,13	0,25
A*2403	-	0,10	0,11	0,10	0,37
A*2601	-	-	-	-	-
A*2902	0,10	0,06	0,17	0,34	0,22
A*3001	-	-	-	-	-
A*3002	-	-	-	-	-
A*3101	-	-	-	-	-
A*3301	0,36	0,46	0,20	0,01	0,21
A*6801	-	-	-	-	-
A*6802	-	-	-	-	-
A*6901	-	-	-	-	-
B*0702	-	-	-	-	-
B*0801	-	-	-	-	-
B*1501	-	-	-	-	-
B*1801	-	-	-	-	-
B*2705	-	-	-	-	-
B*3501	-	-	-	-	-
B*4002	-	0,25	0,18	0,48	-
B*4402	-	-	0,41	-	0,09
B*4403	-	0,44	0,47	0,22	0,40
B*4501	-	-	-	-	-
B*5101	-	0,37	0,03	0,24	0,40
B*5301	-	-	-	-	-
B*5401	-	-	-	-	-
B*5701	-	-	-	-	-
B*5801	-	-	-	-	-

Abb. 55: p -Werte des t-Tests des Gruppenpaars 4 (siehe 2.2.4).

6.5.4 Gruppenpaar 5

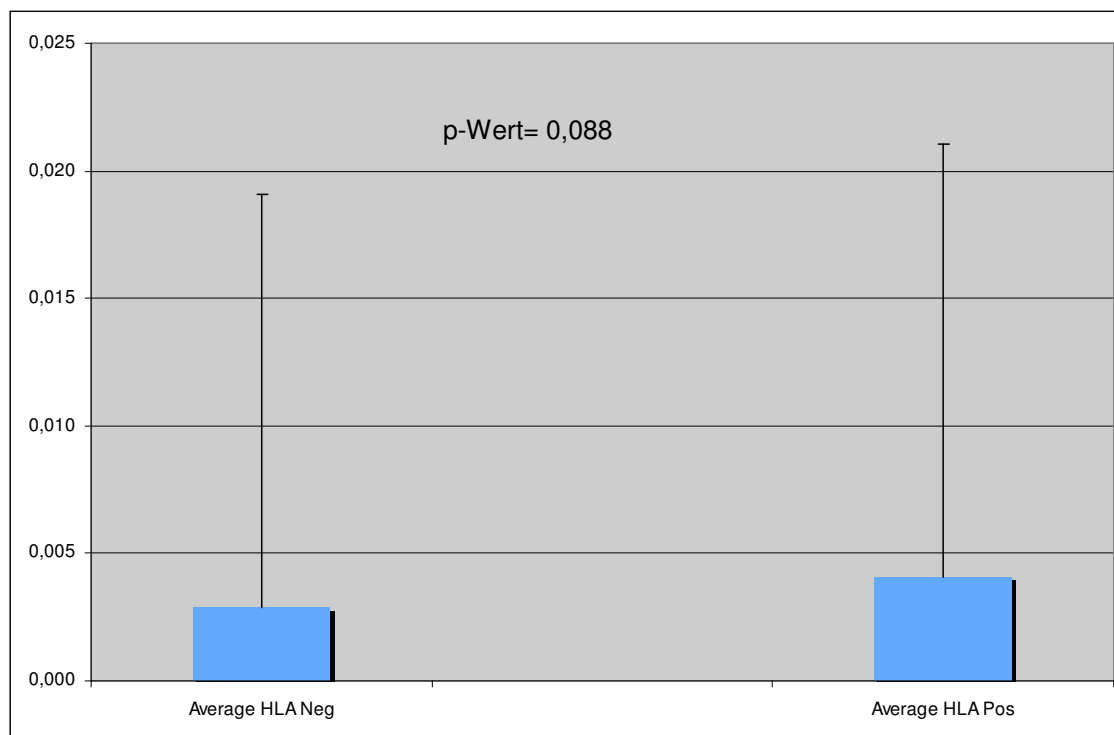


Abb. 56: Graphische Darstellung der Auswertung des Gruppenpaars 5 (siehe 2.2.4). Die blauen Balken zeigen den Durchschnittswert der CTLVarRatio-Werte von HLA-Positiven/HLA-negativen Patientenproben. Die schwarze Linie gibt die Standardabweichung an. Average = dt.: Durchschnitt, Neg = negativ, Pos = positiv.

7 Literaturverzeichnis

1. Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599):868-871 (1983).
2. Gallo R.C., Sarin P.S., Gelmann E.P. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599):865-867 (1983).
3. Clavel F., Guetard D., Brun-Vezinet F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233(4761):343-346 (1986).
4. Gottlieb M.S., Schroff R., Schanker H.M. et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305(24):1425-1431 (1981).
5. Santiago M.L., Range F., Keele B.F. et al. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Côte d'Ivoire: implications for origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* 79(19):12515-12527 (2005).
6. Bailes E., Gao F., Bibollet-Ruche F. et al. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* 300:1713 (2003).
7. Gao F., Bailes E., Robertson D.L. et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397:436-441 (1999).
8. Hahn B.H., Shaw G.M., De Cock K.M. et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287:607-614 (2000).
9. Zhu T., Korber B.T., Nahmias A.J. et al. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391:594-597 (1998).
10. Korber B., Muldoon M., Theiler J. et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288:1789-1796 (2000).
11. Lemey P., Pybus O.G., Wang B. et al. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6588-6592 (2003).
12. Letvin N.L. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nature* 6:930-939 (2006).
13. WHO Network for HIV Isolation and Characterization. HIV type 1 variation in World Health Organization - sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10(11):1327-1343 (1994).
14. Osmanov S., Pattou C., Walker N. et al. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the Year 2000. *J AIDS* 29:184-190 (2002).
15. Kirungi W.L., Musinguzi J., Madraa E. et al. Trends in antenatal HIV prevalence in urban Uganda associated with uptake of preventive sexual behaviour. *Sex Transm Inf* 82:36-41 (2006).
16. Khan M.A., Aberham C., Kao S. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol* 75(16):7252-7265 (2001).
17. Borman A.M., Quillent C., Charneau P. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vif mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *J Virol* 69(4):2058-2067 (1995).

18. Goncalves J., Korin Y., Zack J. et al. Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol* 70(12):8701-8709 (1996).
19. Sheehy A.M., Gaddis N.C., Choi J.D. et al. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418:646-650 (2002).
20. Wedekind J.E., Dance G.S.C., Sowden M.P. et al. Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends in Genetics* 19(4):207-216 (2003).
21. Yang Y., Sowden M.P., Smith H.C. Induction of cytidine to uridine editing on cytoplasmic apolipoprotein B mRNA by overexpressing APOBEC-1. *J Biol Chem* 275(30):22663-22669 (2000).
22. Yu Q., König R., Pillai S. et al. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nature Structural&Molecular Biology* 11(5):435-442 (2004).
23. Yu X., Yu Y., Liu B. et al. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302:1056-1060 (2003).
24. Zhang S., Pointer D., Singer G. et al. Direct binding to nucleic acids by Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* 212:157-166 (1998).
25. Hoch J., Lang S.M., Weeger M. et al. *vpr* deletion mutant of simian immunodeficiency virus induces AIDS in rhesus monkeys. *J Virol* 69(8):4807-4813 (1995).
26. Mahalingam S., Ayyavoo V., Patel M. et al. Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 71(9):6339-6347 (1997).
27. Mansky L.M., Preveral S., Selig L. et al. The interaction of Vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 in vivo mutation rate. *J Virol* 74(15):7039-7047 (2000).
28. Chen R., Le Rouzic E., Kearney J.A. et al. Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *J Biol Chem* 279(27):28419-28425 (2004).
29. Le Rouzic E., Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2:11 (2005).
30. McDonald D., Vodicka M.A., Lucero G. et al. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159(3):441-452 (2002).
31. He J., Choe S., Walker R. et al. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G₂ phase of the cell cycle by inhibiting p34^{cdc2} activity. *J Virol* 69(11):6705-6711 (1995).
32. Poon B., Grovit-Ferbas K., Stewart S.A. et al. Cell cycle arrest by Vpr in HIV-1 virions and insensitivity to antiretroviral agents. *Science* 281:266-269 (1998).
33. Goh W.C., Rogel M.E., Kinsey C.M. et al. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med* 4(1):65-71 (1998)
34. Stewart S.A., Poon B., Jowett J.B.M. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *J Virol* 71(7):5579-5592 (1997).
35. Ayyavoo V., Mahboubi A., Mahalingam S. et al. HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B. *Nat Med* 3(10):1117-1123 (1997).

36. Schubert U., Henklein P., Boldyreff B. et al. The human immunodeficiency virus type 1 encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase-2 (CK-2) at positions Ser52 and Ser56 within a predicted α -helix-turn- α -helix-motif. *J Mol Biol* 236:16-25 (1994).
37. Bour S., Strebel K. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes and Infection* 5:1029-1039 (2003).
38. Strebel K., Klimkait T., Martin M.A. A novel gene of HIV-1, *vpu*, and its 16-kilodalton product. *Science* 241(4870):1221-1223 (1988).
39. Ewart G.D., Sutherland T., Gage P.W. et al. The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J Virol* 70(10):7108-7115 (1996).
40. Margottin F., Bour S.P., Durand H. et al. A novel human WD protein, h- β TrCP, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1:565-574 (1998).
41. Bour S., Geleziunas R., Wainberg M.A. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiological Reviews* 59(1):63-93 (1995).
42. Jeang K.-T., Xiao H., Rich E.A. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* 274(41):28837-28840 (1999).
43. Ruben S., Perkins A., Purcell R. et al. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus *tat* protein. *J Virol* 63(1):1-8 (1989).
44. Wei P., Garber M.E., Fang S.-M. et al. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92:451-462 (1998).
45. Feinberg M.B., Baltimore D., Frankel A.D. The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4045-4049 (1991).
46. Gutheil W.G., Subramanyam M., Flentke G.R. et al. human immunodeficiency virus I Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6594-6598 (1994).
47. Brother M.B., Chang H.-K., Lisziewicz J. et al. Block of Tat-mediated transactivation of tumor necrosis factor β gene expression by polymeric-TAR decoys. *Virology* 222:252-256 (1996).
48. Rasty S., Thatikunta P., Gordon J. et al. Human immunodeficiency virus *tat* gene transfer to the murine central nervous system using a replication-defective herpes simplex virus vector stimulates transforming growth factor beta 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6073-6078 (1996).
49. Sastry K.J., Marin M.C., Nehete P.N. et al. Expression of human immunodeficiency virus type 1 *tat* results in down-regulation of *bcl-2* and induction of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene* 13(3):487-493 (1996).
50. Sharma V., Xu M., Ritter L.M. et al. HIV-1 *tat* induces the expression of a new hematopoietic cell-specific transcription factor and downregulates MIP-1 α gene expression in activated T-cells. *BBRC* 223:526-533 (1996).
51. Viscidi R.P., Mayur K., Lederman H.M. et al. Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by Tat protein from HIV-1. *Science* 246(4937):1606-1608 (1989).
52. Park J., Ryu J., Kim K.-A. et al. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *J Gen Virol* 83:1173-1181 (2002).

53. Sadaie M.R., Rappaport J., Benter T. et al. Missense mutations in an infectious human immunodeficiency viral genome: functional mapping of tat and identification of the rev splice acceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9224-9228 (1988).
54. Malim M.H., McCarn D.F., Tiley L.S. et al. Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J Virol* 65(8):4248-4254 (1991).
55. Ohno M. Importins and exportins: Receptors involved in nucleocytoplasmic transport of proteins and RNAs. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 43(9):1255-1264 (1998).
56. Askjaer P., Jensen T.H., Nilsson J. et al. The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* 273(50):33414-33422 (1998).
57. Pollard V.W., Malim M.H. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 52:491-532 (1998).
58. Meyer B.E., Malim M.H. The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev* 8(13):1538-1547 (1994).
59. Dalglish A.G., Beverley P.C., Clapham P.R. et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312(5996):763-767 (1984).
60. Klatzmann D., Champagne E., Chamaret S. et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312(5996):767-768 (1984).
61. Deng H., Liu R., Ellmeier W. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661-666 (1996).
62. Dragic T., Litwin V., Allaway G.P. et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381(6584):667-673 (1996).
63. Feng Y., Broder C.C., Kennedy P.E. et al. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272(5263):872-877 (1996).
64. Samson M., Libert F., Doranz B.J. et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722-725 (1996).
65. Dean M., Carrington M., Winkler C. et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia growth and development study, multicenter AIDS cohort study, multicenter hemophilia cohort study, San Francisco City cohort, ALIVE study. *Science* 273(5283):1856-1862 (1996).
66. Markosyan R.M., Cohen F.S., Melikyan G.B. HIV-1 envelope proteins complete their folding into six-helix bundles immediately after fusion pore formation. *Mol Biol Cell* 14:926-938 (2003).
67. Jamjian M.C., McNicholl I.R. Enfuvirtide: first fusion inhibitor for treatment of HIV infection. *Am J Health Syst Pharm* 61(12):1242-1247 (2004).
68. Turner B.G., Summers M.F. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285:1-32 (1999).
69. Tan W., Dong Z., Wilkinson T.A. et al. Human immunodeficiency virus type 1 incorporated with fusion proteins consisting of integrase and the designed polydactyl zinc finger protein E2C can bias integration of viral DNA into a predetermined chromosomal region in human cells. *J Virol* 80(4):1939-1948 (2006).
70. Chun T.-W., Carruth L., Finzi D. et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387:183-188 (1997).
71. Kohl N.E., Emini E.A., Schleif W.A. et al. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4686-4690 (1988).
72. Ho D.D., Neumann A.U., Perelson A.S. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4

- lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-126 (1995).
73. Burton D.R., Desrosiers R.C., Doms R.W. et al. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nature Immunology* 5(3):233-236 (2004).
74. Weiss R.A., Clapham P.R., Cheingsong-Popov R. et al. Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients. *Nature* 316(6023):69-72 (1985).
75. Ruprecht R.M., Ferrantelli F., Kitabwalla M. et al. Antibody protection: passive immunization of neonates against oral AIDS virus challenge. *Vaccine* 21:3370-3373 (2003).
76. Derdeyn C.A., Decker J.M., Bibollet-Ruche F. et al. Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* 303:2019-2022 (2004).
77. Wei X., Decker J.M., Wang S. et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422:307-312 (2003).
78. Schmitz J.E., Kuroda M.J., Santra S. et al. Effect of humoral immune responses on controlling viremia during primary infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J Virol* 77(3):2165-2173 (2003).
79. Harrer T., Harrer E., Kalams S.A. et al. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):585-592 (1996).
80. Füst G., Dierich M.P., Hidvégi T. Role of humoral factors in the progression of HIV disease. *Immunology Today* 16(4):167-169 (1995).
81. Clerici M., Barassi C., Devito C. et al. Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41. *AIDS* 16(13):1731-1741 (2002).
82. Mazzoli S., Trabattoni D., Lo Caputo S. et al. HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat Med* 3(11):1250-1257 (1997).
83. Carrington M., O'Brien S.J. The influence of HLA-genotype on AIDS. *Annu Rev Med* 54:535-551 (2003).
84. Carrington M., Nelson G.W., Martin M.P. et al. *HLA* and HIV-1: heterozygote advantage and *B*35-Cw*04* disadvantage. *Science* 283:1748-1752 (1999).
85. MacDonald K.S., Embree J., Njenga S. et al. Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis* 177(3):551-556 (1998).
86. Lockett S.F., Robertson J.R., Brettle R.P. et al. Mismatched human leukocyte antigen alleles protect against heterosexual HIV transmission. *J AIDS* 27(3):277-280 (2001).
87. Dorak M.T., Tang J., Penman-Aguilar A. et al. Transmission of HIV-1 and *HLA-B* allelesharing within serodiscordant heterosexual Zambian couples. *The Lancet* 363:2137-2139 (2004).
88. Altfeld M., Addo M.M., Rosenberg E.S. et al. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS* 17:2581-2591 (2003).
89. Welzel T.M., Gao X., Pfeiffer R.M. et al. *HLA-B Bw4* alleles and HIV-1 transmission in heterosexual couples. *AIDS* 21:225-229 (2007).
90. Flores-Villanueva P.O., Yunis E.J., Delgado J.C. et al. Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with *HLA-B Bw4* homozygosity. *Proc Natl Acad Sci USA*

98(9):5140-5145 (2001).

91. Bevan M.J. Helping the CD8⁺ T-cell response. *Nature Reviews Immunology* 4:595-602 (2004).

92. Wilson J.D.K., Ogg G.S., Allen R.L. et al. Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *AIDS* 14:225-233 (2000).

93. Cao J., McNevin J., Malhotra U. et al. Evolution of CD8⁺ T cell immunity and viral escape following acute HIV-1 infection. *J Immunol* 171:3837-3846 (2003).

94. Addo M.M., Altfeld M., Rosenberg E.S. et al. The HIV-1 regulatory proteins Tat and Rev are frequently targeted by cytotoxic T lymphocytes derived from HIV-1-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1781-1786 (2001).

95. Ogg G.S., Jin X., Bonhoeffer S. et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279:2103-2106 (1998).

96. Walker B.D., Chakrabarti S., Moss B. et al. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 328:345-348 (1987).

97. Borrow P., Lewicki H., Hahn B.H. et al. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68(9):6103-6110 (1994).

98. Schmitz J.E., Kuroda M.J., Santra S. et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science* 283:857-860 (1999).

99. Propato A., Schiaffella E., Vicenzi E. et al. Spreading of HIV-specific CD8⁺ T-cell repertoire in long-term nonprogressors and its role in the control of viral load and disease activity. *Hum Immunol* 62:561-576 (2001).

100. Jin X., Bauer D.E., Tuttleton S.E. et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8⁺ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 189(6):991-998 (1999).

101. Hay C.M., Ruhl D.J., Basgoz N.O. Lack of viral escape and defective in vivo activation of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes in rapidly progressive infection. *J Virol* 73(7):5509-5519 (1999).

102. Goulder P.J., Phillips R.E., Colbert R.A. et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 3(2):212-217 (1997).

103. Ali A., Lubong R., Ng H. et al. Impacts of epitope expression kinetics and class I downregulation on the antiviral activity of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 78(2):561-567 (2004).

104. Saha K., Zhang J., Gupta A. et al. Isolation of primary HIV-1 that target CD8⁺ T lymphocytes using CD8 as a receptor. *Nat Med* 7(1):65-72 (2001).

105. Douek D.C., Brenchley J.M., Betts M.R. et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature* 417:95-98 (2002).

106. Cocchi F., DeVico A.L., Garzino-Demo A. et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science* 270(5243):1811-1815 (1995).

107. Baier M., Werner A., Bannert N. et al. HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 378:563 (1995).

108. Pal R., Garzino-Demo A., Markham P.D. et al. Inhibition of HIV-1 infection by the β -chemokine MDC. *Science* 278:695-698 (1997).
109. McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410:980-987 (2001).
110. Goulder P.J.R., Watkins D.I. HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nature Reviews Immunology* 4:630-640 (2004).
111. O'Connor D.H., Allen T.M., Vogel T.U. et al. Acute phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection. *Nat Med* 8(5):493-499 (2002).
112. Borrow P., Lewicki H., Wei X. et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 3(2):205-211 (1997).
113. Allen T.M., Altfeld M., Geer S.C. et al. Selective escape from CD8⁺ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution. *J Virol* 79(21):13239-13249 (2005).
114. Barouch D.H., Kunstman J., Glowczwskie J. et al. Viral escape from dominant simian immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in DNA-vaccinated rhesus monkeys. *J Virol* 77(13):7367-7375 (2003).
115. Fernandez C.S., Stratov I., De Rose R. et al. Rapid viral escape at an immunodominant simian-human immunodeficiency virus cytotoxic T-lymphocyte epitope exacts a dramatic fitness cost. *J Virol* 79(9):5721-5731 (2005).
116. Friedrich T.C., Dodds E.J., Yant L.J. et al. Reversion of CTL escape-variant immunodeficiency viruses *in vivo*. *Nat Med* 10(3):275-281 (2004).
117. Leslie A.J., Pfafferoth K.J., Chetty P. et al. HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* 10(3):282-289 (2004).
118. Goulder P.J.R., Brander C., Tang Y. et al. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature* 412:334-338 (2001).
119. Feeney M.E., Tang Y., Roosevelt K.A. et al. Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term-nonprogressing child. *J Virol* 78(16):8927-8930 (2004).
120. Kelleher A.D., Long C., Holmes E.C. et al. Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 193(3):375-385 (2001).
121. Draenert R., Le Gall S., Pfafferoth K.J. et al. Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J Exp Med* 199(7):905-915 (2004).
122. Yokomaku Y., Miura H., Tomiyama H. et al. Impaired processing and presentation of cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 78(3):1324-1332 (2004).
123. Levy J.A. HIV Pathogenesis: Knowledge gained after two decades of research. *Adv Dent Res* 19:10-16 (2006).
124. Pantaleo G., Cohen O.J., Schacker T. et al. Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. *Nat Med* 4(3):341-345 (1998).

125. Graciosi C., Pantaleo G. Analysis of virologic and immunologic events in HIV infection. *Pathobiology* 66:123-127 (1998).
126. Mellors J.W., Rinaldo C.R.Jr., Gupta P. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272(5265):1167-1170 (1996).
127. Matano T., Shibata R., Siemon C. et al. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol* 72(1):164-169 (1998).
128. Pantaleo G., Fauci A.S. Tracking HIV during disease progression. *Curr Opin Immunol* 6(4):600-604 (1994).
129. Perelson A.S. Modelling viral and immune system dynamics. *Nature* 2:28-36 (2002).
130. Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 9(7):853-860 (2003).
131. Letvin N.L., Walker B.D. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med* 9(7):861-866 (2003).
132. Boshoff C., Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nature Reviews Cancer* 2:373-382 (2002).
133. Schwartländer B., Stover J., Walker N. et al. Resource needs for HIV/AIDS. *Science* 292(5526):2434-2436 (2001).
134. Hanke T., Blanchard T.J., Schneider J. et al. Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T-cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine* 16(5):439-445 (1998).
135. Haigwood N.L., Montefiori D.C., Sutton W.F. et al. Passive immunotherapy in simian immunodeficiency virus-infected macaques accelerates the development of neutralizing antibodies. *J Virol* 78(11):5983-5995 (2004).
136. Mascola J.R., Lewis M.G., Stiegler G. et al. Protection of macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol* 73(5):4009-4018 (1999).
137. Mascola J.R., Snyder S.W., Weislow O.S. et al. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J Infect Dis* 173(2):340-348 (1996).
138. Bures R., Gaitan A., Zhu T. et al. Immunization with recombinant canarypox vectors expressing membrane-anchored glycoprotein 120 followed by glycoprotein 160 boosting fails to generate antibodies that neutralize R5 primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16(18):2019-2035 (2000).
139. Chen B., Vogan E.M., Gong H. et al. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 433:834-841 (2005).
140. Bermann P.W., Gregory T.J., Riddle L. et al. Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp 160. *Nature* 345:622-625 (1990).
141. The rgp120 HIV Vaccine Study Group. Placebo-controlled phase 3 trial of recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* 191:654-665 (2005).
142. Goepfert P.A., Horton H., McElrath M.J. et al. High-dose recombinant canarypox vaccine expressing HIV-1 protein, in seronegative human subjects. *J Infect Dis* 192:1249-1259 (2005).

143. Shiver J.W., Fu T.-M., Chen L. et al. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency virus immunity. *Nature* 415:331-335 (2002).
144. Barouch D.H., Santra S., Schmitz J.E. et al. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA Vaccination. *Science* 290:486-492 (2000).
145. Amara R.R., Villinger F., Altman J.D. et al. Control of mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292(5514):69-74 (2001).
146. Lu W., Wu X., Lu Y. et al. Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS. *Nat Med* 9(1):27-32 (2003).
147. Gray R.H., Li X., Wawer M.J. et al. Stochastic simulation of the impact of antiretroviral therapy and HIV vaccines on HIV transmission; Rakai, Uganda. *AIDS* 17:1941-1951 (2003).
148. Mattapallil J.J., Douek D.C., Buckler-White A. et al. Vaccination preserves CD4 memory T cells during acute simian immunodeficiency virus challenge. *J Exp Med* 203(6):1533-1541 (2006).
149. Matano T., Kobayashi M., Igarashi H. et al. Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J Exp Med* 199(12):1709-1718 (2004).
150. van Baalen C.A., Guillon C., van Baalen M. et al. Impact of antigen expression kinetics on the effectiveness of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 32:2644-2652 (2002).
151. Gruters R.A., van Baalen C.A., Osterhaus A.D.M.E. The advantage of early recognition of HIV-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *Vaccine* 20:2011-2015 (2002).
152. van Baalen C.A., Pontesilli O., Huisman R.C. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol* 78:1913-1918 (1997).
153. Cafaro A., Caputo A., Fracasso C. et al. Control of SHIV-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine. *Nature* 5(6):643-650 (1999).
154. Chakrabarti B.K., Ling X., Yang Z.-Y. et al. Expanded breadth of virus neutralization after immunization with a multiclade envelope HIV vaccine candidate. *Vaccine* 23:3434-3445 (2005).
155. Rodriguez F., Harkins S., Slifka M.K. et al. Immunodominance in virus-induced CD8⁺ T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J Virol* 76(9):4251-4259 (2002).
156. Palmowski M.J., Choi E. M.-L., Hermans I.F. et al. Competition between CTL narrows the immune response induced by prime-boost vaccination protocols. *J Immunol* 168:4391-4398 (2002).
157. Altfeld M., Allen T.M., Yu X.G. et al. HIV-1 superinfection despite broad CD8⁺ T-cell responses containing replication of the primary virus. *Nature* 420(6914):434-439 (2002).
158. Addo M.M., Yu X.G., Rathod A. et al. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* 77(3):2081-2092 (2003).
159. Yang O.O., Sarkis P.T.N., Trocha A. et al. Impacts of avidity and specificity on the antiviral efficiency of HIV-1-specific CTL. *J Immunol* 171:3718-3724 (2003).
160. Letvin N.L. Progress toward an HIV Vaccine. *Annu Rev Med* 56:213-223 (2005).

161. Walker B.D., Korber B.T. Immune control of HIV: the obstacles of HLA and viral diversity. *Nature* 2(6):473-475 (2001).
162. McCutchan F.E., Hegerich P.A., Brennan T.P. et al. Genetic variants of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8(11):1887-1895 (1992).
163. Liitsola K., Tashkinova I., Laukkanen T. et al. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS* 12:1907-1919 (1998).
164. Addo M.M., Yu X.G., Rosenberg E.S. et al. Cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses directed against regulatory and accessory proteins in HIV-1 infection. *DNA Cell Biol* 21(9):671-678 (2002).
165. Prober J.M., Trainor G.L., Dam R.J. et al. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238(4825):336-341 (1987).
166. Tippmann H.-F. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Briefings in Bioinformatics* 5(1):82-87 (2004).
167. Müller C.R., Ehninger G., Goldmann S.F. Gene and haplotype frequencies for the loci HLA-A, HLA-B, and HLA-DR based on over 13,000 German blood donors. *Hum Immunol* 64:137-151 (2003).
168. Lum J.J., Cohen O.J., Nie Z. et al. *Vpr* R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J Clin Invest* 111(10):1547-1554 (2003).
169. Jian H., Zhao L.-J. Pro-apoptotic activity of HIV-1 auxiliary regulatory protein *Vpr* is subtype-dependent and potently enhanced by nonconservative changes of the leucine residue at position 64. *J Biol Chem* 278(45):44326-44330 (2003).
170. Korber B., Foley B., Leitner T. et al. *Human Retroviruses and AIDS*. Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory (1997).
171. Schubert U., Bour S., Willey R.L. et al. Regulation of virus release by the macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 AD8 isolate is redundant and can be controlled by either *Vpu* or *Env*. *J Virol* 73(2):887-896 (1999).
172. Garcia J.A., Harrich D., Pearson L. et al. Functional domains required for *tat*-induced transcriptional activation of the HIV-1 long terminal repeat. *EMBO J* 7(10):3143-3147 (1988).
173. Betti M., Voltan R., Marchisio M. et al. Characterization of HIV-1 Tat proteins mutated in the transactivation domain for prophylactic and therapeutic application. *Vaccine* 19:3408-3419 (2001).
174. Caselli E., Betti M., Grossi M.P. et al. DNA Immunization with HIV-1 *tat* mutated in the *trans* activation domain induces humoral and cellular immune responses against wild-type Tat. *J Immunol* 162:5631-5638 (1999).
175. Park J., Ryu J., Kim K.-A. et al. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *J Gen Virol* 83:1173-1181 (2002).
176. Fleischhauer K., Zino E., Mazzi B. et al. HLA-A*02 subtype distribution in Caucasians from northern Italy: identification of A*0220. *Tissue Antigens* 48(6):673-679 (1996).
177. Jones N.A., Wei X., Flower D.R. et al. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 escape from the primary CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* 200(10):1243-1256 (2004).
178. Friedrich T.C., Frye C.A., Yant L.J. et al. Extraepitopic compensatory substitutions partially

restore fitness to simian immunodeficiency virus variants that escape from an immunodominant cytotoxic-T-lymphocyte response. *J Virol* 78(5):2581-2585 (2004).

179. Altfeld M., Addo M.M., Eldridge R.L. et al. Vpr is preferentially targeted by CTL during HIV-1 infection. *J Immunol* 167:2743-2752 (2001).

180. Roberts J.D., Bebenek K., Kunkel T.A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242(4882):1171-1173 (1988).

181. Coffin J.M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267(5197):483-489 (1995).

182. Cao J., McNevin J., Holte S. et al. Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon-secreting CD8⁺ T cells in primary HIV-1 infection. *J Virol* 77(12):6867-6878 (2003).

183. Altfeld M., Allen T.M., Kalife E.T. et al. The majority of currently circulating human immunodeficiency virus type 1 clade B viruses fail to prime cytotoxic T-lymphocyte responses against an otherwise immunodominant HLA-A2-restricted epitope: implications for vaccine design. *J Virol* 79(8):5000-5005 (2005).

184. De Groot A.S., Jesdale B., Martin W. et al. Mapping cross-clade HIV-1 vaccine epitopes using a bioinformatics approach. *Vaccine* 21:4486-4504 (2003).

185. Allen T.M., Yu X.G., Kalife E.T. et al. De novo generation of escape variant-specific CD8⁺ T-cell responses following cytotoxic T-lymphocyte escape in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 79(20):12952-12960 (2005).

186. Kusk P., Lindhardt B.O., Bugge T.H. et al. Mapping of a new immunodominant human linear B-cell epitope on the vpu protein of the human immunodeficiency virus type 1. *J AIDS* 6(4):334-338 (1993).

187. Schneider T., Hildebrandt P., Ronspeck W. et al. The antibody response to the HIV-1 specific "out" (vpu) protein: identification of an immunodominant epitope and correlation of antibody detectability to clinical stages. *AIDS* 6(7):943-950 (1990).

188. Addo M.M., Altfeld M., Almas R. et al. HIV-1 Vpu represents a minor target for cytotoxic T lymphocytes in HIV-1-infection. *AIDS* 16(7):1071-1073 (2002).

189. Yusim K., Kesmir C., Gaschen B. et al. Clustering patterns of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in human immunodeficiency virus typ 1 (HIV-1) proteins reveal imprints of immune evasion on HIV-1 global variation. *J Virol* 76(17):8757-8768 (2002).

190. Zinkernagel R.M., Doherty P.C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248(450):701-702 (1974).

191. Carrington M., O'Brien S.J. The influence of *HLA* genotype on AIDS. *Annu Rev Med* 54:535-551 (2003).

192. Kiepiela P., Ngumbela K., Thobakgale C. et al. CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* 13(1):46-53 (2007).

193. Moore C.B., John M., James I.R. et al. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science* 296:1439-1443 (2002).

194. Korber B., Gaschen B., Yusim K. et al. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* 58:19-42 (2001).

195. Brander C., Walker B.D. Gradual adaptation of HIV to human host populations: good or bad news? *Nat Med* 9(11):1359-1362 (2003).

196. Leslie A., Kavanagh D., Honeyborne I. et al. Transmission and accumulation of CTL escape variants drive negative associations between HIV polymorphisms and HLA. *J Exp Med* 201(6):891-902 (2005).
197. Kiepiela P., Leslie A.J., Honeyborne I. et al. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* 432:769-774 (2004).
198. Liang C., Rong L., Laughrea M. et al. Compensatory point mutations in the human immunodeficiency virus type 1 Gag region that are distal from deletion mutations in the dimerization initiation site can restore viral replication. *J Virol* 72(8):6629-6636 (1998).
199. Rong L., Russell R.S., Hu J. et al. Deletion of stem-loop 3 is compensated by second-site mutations within the Gag protein of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 314:221-228 (2003).
200. Russell R.S., Roldan A., Detorio M. et al. Effects of a single amino acid substitution within the p2 region of human immunodeficiency virus type 1 on packaging of spliced viral RNA. *J Virol* 77(24):12986-12995 (2003).
201. Goulder P.J.R., Altfeld M.A., Rosenberg E.S. et al. Substantial differences in specificity of HIV-specific cytotoxic T cells in acute and chronic HIV infection. *J Exp Med* 193(2):181-193 (2001).
202. Altfeld M., Rosenberg E.S., Shankarappa R. et al. Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med* 193(2):169-180 (2001).
203. Novitzky V., Smith U.R., Gilbert P. et al. Human immunodeficiency virus type 1 subtype C molecular phylogeny: consensus sequence for an AIDS vaccine design? *J Virol* 76(11):5435-5451 (2002).
204. Betts M.R., Exley B., Price D.A. et al. Characterization of functional and phenotypic changes in anti-Gag vaccine-induced T cell responses and their role in protection after HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci* 102(12):4512-4517 (2005).
205. Bhattacharya T., Daniels M., Heckermann D. et al. Founder effects in the assessment of HIV polymorphisms and HLA allele associations. *Science* 315(5818):1583-1586 (2007).

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Herzlichen Dank an alle, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren. Besonders möchte ich mich bedanken bei:

Prof. Dr. R. Kurth für die Bereitstellung der Mittel und des Arbeitsplatzes zur Durchführung der Arbeit.

Dr. Steve Norley, in dessen Arbeitsgruppe „AIDS-Immunpathogenese und Impfstoff-Entwicklung“ ich diese Arbeit durchführen durfte, für die Themenvergabe und seine Betreuung, Denkanstöße und Unterstützung.

Dr. D. Schürmann und seinen Mitarbeitern an der Charité, Klinikum Virchow für die Rekrutierung der Patientenkohorte und Organisation der Blutentnahmen.

Dr. C. Kücherer und Stefan Loschen für die Bereitstellung der Serumproben aus der Serokonverter Studie und die gute Kooperation.

Dr. Julia Richardt für die Einführung in die Materie und die Methoden.

Ich danke auch herzlich der gesamten Arbeitsgruppe P12, die mich als Medizinerin sehr herzlich und mit einem offenen Ohr für alle Fragen aufgenommen hat. Insbesondere Oliver Hohn (Fox) für viele interessante Anregungen und Diskussionen, Mathias Knauf für die zahlreichen fachlichen Ratschläge und die Durchsicht meiner Arbeit, Christine Siegismund für ihre guten Tipps, Christiane Bug und Franziska Bollmann für die labortechnische Unterstützung. Außerdem vielen Dank für das angenehme Arbeitsklima und den Spass an Nadine Beimforde, Bachtijor Asomuddinov, Sandra Kühne, Nicky Norley, Jutta Masopust, Maria Pack, Marion Haag.

An dieser Stelle bedanke ich mich auch herzlich bei meinen Eltern für ihre moralische und finanzielle Unterstützung. Auch möchte ich mich bei Philipp de Bary bedanken für sein Vertrauen und seine endlose Geduld.

Erklärung

„Ich, Barbara Stauber, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *HIV-1 – Variabilität als Antwort auf den Selektionsdruck durch zytotoxische Lymphozyten: Eine Genanalyse.* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 08.01.08

Barbara Stauber