

Die Rolle von p6* für den HI-viralen Replikationszyklus

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III –
Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg



vorgelegt von
Andreas Leiherer aus Essing
Oktober 2008

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen September 2003 und Oktober 2008 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 29.Oktober 2008

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Ralf Wagner

Prüfungsvorsitz:	Prof. Dr. C. Förster
Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. Dr. H.R. Kalbitzer
	Prof. Dr. R. Wagner
	Prof. Dr. R. Warth

Datum der mündlichen Prüfung: 19.Dezember 2008

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Andreas Leihener

A	Einleitung.....	1
A 1	Die Entdeckung von HIV	1
A 2	Epidemiologie und Systematik.....	1
A 3	Probleme der Medikamenten- und Impfstoffentwicklung.....	3
A 4	Die HIV-1 Replikation.....	4
A 4.1	Die Replikation von HIV-1 beginnt mit dem Eintritt des Virus in die Zielzelle. Dabei kommt es zur Fusion der viralen mit der zellulären Membran und der anschließenden Freisetzung des Viruscapsids in das Cytoplasma der Zelle.	4
A 4.2	Durch den Zerfall des Capsids und die reverse Transkription des RNA- Genoms in ein DNA-Genom entsteht der Präintegrationskomplex (<i>pre integration complex</i> , PIC), der in den Zellkern importiert wird. Dort katalysiert die IN die Insertion der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle.....	5
A 4.3	Die späte Phase des viralen Zyklus beginnt mit der Synthese von mRNA-Transkripten, die aus dem Zellkern transportiert und im Cytoplasma translatiert werden.....	7
A 4.4	Am rauen endoplasmatischen Retikulum und an cytosolischen Ribosomen findet die Translation der viralen Proteine statt, die dann zusammen mit den RNA-Genomen zur Plasmamembran transportiert werden. Dort assemblieren sie zu Viruspartikeln, die durch Knospung von der Plasmamembran freigesetzt werden.	9
A 4.5	Bei der Abknospung der Viruspartikel kommt es zu einem als Maturation bezeichneten Reifungsprozess. Dabei zerlegt die virale Protease die Polyproteinvorläufer in ihre Einzelkomponenten, wodurch es zu Umlagerungsprozessen des Viruspartikels kommt, die zu seiner Infektiosität führen.	13
A 5	Struktur und Funktion des p6*-Proteins	15
A 5.1	P6* ist ein <i>transframe</i> -Protein mit einer flexiblen Struktur.	15
A 5.2	P6* ist direkt an der Regulation der PR-Aktivität beteiligt.....	15
A 5.3	Die Bedeutung der internen und flankierenden PR-Spaltstellen von p6* für die HI-virale Replikation	16
A 5.4	Interaktion mit Nef.....	17
A 6	Die Bedeutung des Nef-Proteins für HIV-1	17
A 6.1	Nef ist verantwortlich für die hohe Virulenz und Pathogenität von HIV-1.....	17
A 6.2	Nef führt zur <i>downregulation</i> zahlreicher Oberflächenrezeptoren.	18
A 6.3	Nef interagiert mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex.	19
A 6.4	Nef beeinflusst die Apoptose.	19
A 6.5	Im Laufe des Infektionszyklus ändert sich mehrmals die Konformation und Lokalisation von Nef in der Zelle.	20
A 6.6	Nef interagiert mit Gag-Pol während der Virusreplikation.....	21
A 7	Sequenzvergleich unterschiedlicher HIV-Isolate	22
A 8	Zielsetzung der Arbeit	24

B	Zusammenfassung.....	25
C	Ergebnisse.....	28
C 1	Gesamtkonzept zur funktionellen Untersuchung von p6*	28
C 1.1	Das transframe-protein p6*	28
C 1.2	Mutationen der carboxylterminalen Spaltstelle von p6* beeinflussen die Prozessierung der Polyproteinvorläufer.	30
C 1.3	Mutationen der carboxylterminalen Spaltstelle von p6* führen bei den betroffenen Viren in Konkurrenz mit dem Wildtypvirus zu einem deutlichen Replikationsnachteil.....	31
C 2	Funktionelle Analyse des zentralen p6*-Bereichs	35
C 2.1	Der Hauptunterschied zwischen den Provirusklonen HX10 und NL4-3 ist eine 11 Aminosäuren lange Duplikation im zentralen Bereich von p6* und das Fehlen eines intakten nef-Leserahmens. Koexprimiertes Nef wird dennoch in HX10 Viruspartikel eingebaut.	35
C 2.2	Mutationen, die die zentrale Region von p6* abdecken, können so gestaltet werden, dass der überlagerte gag-Leserahmen nicht betroffen ist.	36
C 2.3	Die Effizienz des ribosomalen Leserastersprungs der Mutante a entspricht der des Wt.	38
C 2.4	Die Mutationen im zentralen p6*-Bereich haben keinen Einfluss auf die Partikelfreisetzung, die Prozessierung von Gag oder die Inkorporation von Nef in Viruspartikel.	40
C 2.5	Die Duplikation in p6* hat einen positiven Einfluss auf die Infektiosität von HIV-1.	41
C 2.6	Die Punktmutationen in der zentralen p6*-Region zeigten keinen, die Duplikation einen Zelltyp-spezifischen Einfluss auf die <i>in vitro</i> - Replikation von HIV-1.	43
C 2.7	In direkter Konkurrenz mit dem Wt-Virus repliziert die Mutante mit der 11 Aminosäuren langen Duplikation ineffizienter.	46
C 2.8	Der Einfluss der p6*-Duplikation auf die Virusreplikation ist Zelltyp- spezifisch.	48
C 2.9	Die Mutation des gesamten zentralen Bereichs von p6* beeinflusst weder die Partikelfreisetzung noch die Prozessierung des Gag- Vorläufers oder den Einbau von Nef in Viruspartikel.	49
C 2.10	Durch die Mutation des gesamten zentralen p6*-Bereichs wird die Infektiosität und Replikation von HIV-1 beeinträchtigt.....	51
C 2.11	Mutationen im zentralen p6*-Bereich haben keinen Einfluss auf die Aktivität der viralen PR.	53
C 2.12	Die Bindung von Nef an p6* liegt außerhalb des zentralen Bereichs.	55
C 3	Funktionelle Analyse des aminoterminalen Bereichs von p6*	57
C 3.1	Ein auf NL4-3 basierendes neu konstruiertes HIV-1 Provirus besitzt eine versetzte <i>frame shift</i> -Region und ein verlängertes Gag-Pol- Vorläuferprotein.....	57
C 3.2	AL besitzt eine neue <i>frame shift</i> -Region, die mit NL4-3-ähnlicher Effizienz einen Leserastersprung auslöst.....	60
C 3.3	AL ist im Stande, Polyproteinvorläufer zu exprimieren und sie zu prozessieren.....	62

C 3.4	AL kann Zellen infizieren und <i>in vitro</i> replizieren.	63
C 3.5	In AL kann der Aminoterminus von p6* substituiert und die zentrale Region deletiert werden, ohne auf RNA-Ebene die <i>frame shift</i> -Struktur zu zerstören.	64
C 3.6	Weder aminoterminaler Austausch noch Deletionen in p6* beeinflussen die Partikelfreisetzung, die Polyprotein-Prozessierung oder den Einbau von Nef in Viruspartikel.	67
C 3.7	P6* ist für die Infektiosität und Replikation von HIV-1 <i>in vitro</i> nicht essentiell.	68
C 3.8	Die Länge der zentralen p6*-Region ist für die Funktionalität des Virus limitierend.	71
C 3.9	Die Länge der p6* spacer Region ist kritisch für die virale Assemblierung, Maturation und Infektiosität.	74
D	Diskussion	78
D 1	Die Integrität des p6*-Carboxylterminus ist für die virale Fitness essentiell.	78
D 1.1	Eine blockierte p6*-PR-Spaltung löst schwere Prozessierungsdefekte aus.	78
D 1.2	Eine verzögerte Freisetzung der PR beeinträchtigt die virale Fitness.	78
D 2	Die zentrale p6*-Region ist für die Funktionalität des Virus verzichtbar.	80
D 2.1	Der zentrale Bereich von p6* ist hoch polymorph.	80
D 2.2	Die Duplikation SSEQTRANSPT in der zentralen p6*-Region erhöht oder erniedrigt die Virusreplikation abhängig vom verwendeten Zellsystem.	80
D 2.3	Zwischen der Duplikation SSEQTRANSPT in p6* und dem Nef- Genprodukt zeigt sich phänotypisch keine Interaktion.	81
D 2.4	Substitutionen in der zentralen p6*-Region werden von HIV-1 gut toleriert.	82
D 2.5	Eine Interaktion von Nef und der zentralen p6*-Region ist unwahrscheinlich.	83
D 3	Mit der Konzeption der Virusplattform AL steht ein neues Werkzeug zur Analyse der HIV-Replikationseigenschaften zur Verfügung.	85
D 3.1	Der Klon AL ist ein voll replikationsfähiger HI-Virus, der es erstmals erlaubt, gag- und pol-Genprodukte unabhängig voneinander zu analysieren.	85
D 3.2	Der aminoterminalen Region von p6* kommt im HI-viralen Replikationszyklus keine wichtige Funktion zu.	86
D 3.3	Die zentrale p6*-Region stellt einen <i>spacer</i> dar, der wahlweise deletiert oder substituiert werden kann.	87
D 3.4	Die Interaktion von Nef mit p6* scheint unwahrscheinlich.	88
D 4	AL bietet die Möglichkeit, Reportergene von begrenzter Größe in den p6*-Leserahmen einzubringen.	90
D 4.1	Die Länge des p6*- <i>spacer</i> scheint Einfluss auf die Geschwindigkeit der Virusreplikation zu haben.	90
D 4.2	Mit der Virusplattform AL kann die Prozessierung von Gag-Pol in einem natürlichen System belegt werden.	91
D 4.3	Die Länge des p6*- <i>spacer</i> ist für die Funktionalität des Virus begrenzend.	91
D 4.4	Die Extension des p6*- <i>spacer</i> könnte mit zunehmendem Maße die Dimerisierung und die Faltung der PR im Gag-Pol-Vorläuferprotein stören.	92

E	Ausblick	94
E 1	Funktionsanalyse von p1, p6 _{gag} und PR	94
E 2	<i>In vitro</i> Selektion hoch konservierter HIV-Domänen	95
E 3	Aufklärung der Interaktion zwischen Nef und Gag-Pol	96
E 4	Visualisierung des Gag/Gag-Pol- <i>trafficking</i>	97
F	Material und Methoden	98
F 1	Chemikalien, Puffer und Lösungen	98
F 2	Kommerzielle Assay- bzw. Kit-Systeme	100
F 3	Klonierungen und gentechnische Arbeiten	100
F 3.1	Bakterienstämme, Nährmedien und Plasmide	100
F 3.2	Amplifikation von DNA über die Polymerasekettenreaktion (PCR)	101
F 3.3	Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i>	102
F 3.4	Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Plasmid-DNA	103
F 3.5	Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren	103
F 3.6	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	103
F 3.7	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	104
F 3.8	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	104
F 3.9	Ligierung von DNA-Fragmenten	104
F 3.10	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	105
F 3.11	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	105
F 3.12	Gensynthese	105
F 3.13	Sequenzierung	106
F 3.14	Herstellung rekombinanter proviraler Plasmid-Konstrukte	106
F 3.15	Herstellung rekombinanter <i>frame shift</i> -Reporter-Konstrukte	108
F 3.16	Herstellung des Nef-Expressionsplasmids	108
F 4	Zellkulturtechniken	109
F 4.1	Zelllinien	109
F 4.2	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	110
F 4.3	Ernte der Transfektion	111
F 4.4	Anreicherung von Viruspartikeln über Ultrazentrifugation	111
F 5	Analyse der Genexpression, der viralen Infektiosität und Replikation	111
F 5.1	Bestimmung des Proteingehalts (Biorad-Protein-Assay)	111
F 5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	112
F 5.3	Immunochemische Detektion von Proteinen (Western Blot-Analyse)	112
F 5.4	Bestimmung der Expression des Reportergens <i>firefly</i> -Luciferase (Luciferase-Assay)	114
F 5.5	Quantifizierung des HIV-1 Capsidantigens (p24-ELISA)	114
F 5.6	Bestimmung der Aktivität der viralen Protease	115
F 5.7	Bestimmung der viralen Infektiosität	116
F 5.8	Replikations-Kompetitions-Test	116
F 5.9	Bestimmung der viralen Replikation	117

G	Abkürzungsverzeichnis	118
H	Literaturverzeichnis	122
I	Anhang	144
I 1	Die proviralen NL4-3-Mutanten Ma, Mb, Mc, Md, Me, Mf, Mdup und Mtot.....	144
I 1.1	Herstellung des Konstruktes pCRpNLp6*Cloneln bzw. pCRpNLp6*Cloneln-2.....	144
I 1.2	Synthetisch hergestellte Genfragmente.....	146
I 2	Die Luciferasereporterkonstrukte fs-NL, fs-NL-Ma, fs-luc, fs-inact., fs-AL, fs-ALn und fs-Aldel	149
I 3	Das Expressionsplasmid pcDNA-Nef _{NL4-3}	150
I 4	Das Provirus AL und die Mutanten Aln, Aldel und Aldel-myc.....	150
I 5	Herstellung der proviralen Mutanten ALdel-GFP und ALdel-3tetraCys.....	155
I 6	Sequenzen proviraler HIV-Klone	157
	Vorträge.....	167
	Publikationen.....	167
	Danksagung	168

A Einleitung

Laut Schätzungen der UNAIDS vom Dezember 2007 sind zurzeit etwa 33,2 Millionen Menschen weltweit mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert. An der durch dieses Virus ausgelösten Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) sind bisher etwa 25 Millionen Menschen gestorben. Damit forderte HIV bisher ähnlich viele Opfer wie die Spanische Grippe in den Jahren 1918 und 1919 mit geschätzten 25 bis 50 Millionen Todesopfern oder die Pest in Europa in den Jahren 1347 bis 1353.

A 1 Die Entdeckung von HIV

Unter der Führung von Luc Montagnier wurde im Jahre 1983 am Pasteur Institut in Paris in einem Patienten, der an Symptomen litt, die im Zusammenhang mit AIDS standen, ein neuartiges Retrovirus entdeckt und zunächst als Lymphadenopathie-Virus (LAV) bezeichnet (9). Zeitgleich wurde auch am Nationalen Krebsinstitut in Bethesda (USA) unter der Leitung von Robert Gallo ein humanes T-Zell-Leukämie-Virus in entsprechenden Patienten entdeckt und als Auslöser für AIDS diskutiert (70). Im April 1984 wurde von Seiten des US-Gesundheitsministeriums (*Health and Human Services*) dann offiziell bekannt gegeben, dass der mögliche Verursacher von AIDS gefunden sei. Im Anschluss daran erschienen von der Arbeitsgruppe um Robert Gallo zeitgleich mehrere Veröffentlichungen, die sich mit dem Nachweis der Isolation und Produktion dieses neu entdeckten Retrovirus beschäftigten. In diesen wurde es als Humanes T-Zell-lymphotropes Virus Typ-III (HTLV-III) bezeichnet (69;176;196;200). Später zeigte sich, dass LAV und HTLV-III identisch waren und man wählte HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) als neue Bezeichnung (35).

A 2 Epidemiologie und Systematik

Wie für die meisten Pandemien, ist die Entstehung von HIV/AIDS, bezüglich der genauen Zeit, der Art und Weise oder des Ortes, an dem die Übertragung von HIV auf den Menschen zum ersten Mal stattgefunden hat, nicht bekannt. Es gilt aber als

wahrscheinlich, dass der Ursprung von HIV-1 auf das Retrovirus SIV_{cpz} (*simian immunodeficiency virus*) der Schimpansen (*Pan troglodytes*, bzw. englisch *chimpanzees*) in West-Zentral-Afrika zurückzuführen ist. SIV_{cpz} seinerseits entstand, laut gegenwärtiger Meinung, durch Rekombination zweier Viren, die in Primaten der Familie der Meerkatzenverwandten (Cercopithecidae) vorkommen. Dies ist einerseits SIV_{rcm} der Rotscheitel-Mangaben (*Cercocebus torquatus*, *red-capped mangabeys*) und andererseits SIV_{gsn} der Großen Weißnasenmeerkatzen (*Cercopithecus nictitans*, *greater spot-nosed monkeys*). Da beide Arten zur Beute von Schimpansen zählen, kam es offensichtlich über die Jagd und den Verzehr von infizierten Tieren zu einer Infektion eines Schimpansen mit beiden Viren und im Anschluss daran zu Rekombinationsereignissen, die zur Bildung von SIV_{cpz} führten (7).

Der erste sicher belegte Fall einer HIV-Infektion war die eines männlichen Erwachsenen aus Leopoldville in Belgisch-Kongo, dem heutigen Kinshasa (Demokratische Republik Kongo). In einer aus diesem Patienten gewonnenen Blutprobe aus dem Jahre 1959 konnte das Virus 27 Jahre später eindeutig nachgewiesen werden (148). Phylogenetische Analysen zeigten später, dass sich dieses Isolat relativ nahe am Knotenpunkt der M-Hauptgruppe befindet (254). Als Auslöser für die weltweite Pandemie mit Viren dieser Hauptgruppe geht man von einem gemeinsamen Vorfahren aus, der um das Jahr 1908 (1884-1924) entstand, vermutlich während der Jagd oder der Zubereitung bzw. des Verzehrs von Schimpansenfleisch (244). Ob es noch früher zu Übertragungen von SIV_{cpz} auf den Menschen kam und welche Infektion schließlich die Pandemie auslöste, ist auf Grund fehlender Gewebeproben nur schwer zu beantworten. Phylogenetische Studien mit Proben unterschiedlicher Subtypen von HIV bzw. SIV deuten aber darauf hin, dass mindestens drei voneinander unabhängige Übertragungsereignisse auf den Menschen in Gebieten um Kamerun in West-Zentral-Afrika stattgefunden haben müssen (71).

Dieses Virus verbreitete sich dann über Afrika und gelangte, um das Jahr 1966, über eine einzelne infizierte Person aus Zentralafrika nach Haiti. Von dort erreichte es etwa drei Jahre später die USA, zirkulierte dort einige Zeit und verbreitete sich über die ganze Welt (74). Das klinische Syndrom AIDS wurde erstmals 1981 bei vier homosexuellen Männern wahrgenommen, die an *Pneumocystis carinii*-Pneumonie, einer mucosalen Candidiasis und multiplen Virusinfektionen litten (76).

Neben HIV-1 existiert noch eine zweite HIV-Spezies, HIV-2. Dieses etwas weniger virulente Virus (138) ist hauptsächlich auf West-Afrika als Verbreitungsgebiet begrenzt. Im Gegensatz zu HIV-1 stammt HIV-2 mit Sicherheit aus mit SIV_{sm} infizierten Rußmangaben (*Cercocebus atys*, *Sooty mangabey*), die hauptsächlich im

westlichen Afrika von Guinea bis Ghana beheimatet sind. Die phylogenetische Analyse von verschiedenen HIV-2 Stämmen zeigte, dass es sieben unabhängige Übertragungen von Rußmangaben auf Menschen gab, was zu den HIV-2-Subtypen A-G führte (185).

Bei HIV-1 unterscheidet man drei Hauptgruppen: M, O und N. Die Hauptgruppe M (*major group*) kommt weltweit am häufigsten vor. 90 % aller HIV-Infizierten tragen ein Virus dieses Typs. Diese Gruppe wird wiederum in neun Subtypen unterteilt, die mit A, B, C, D, F, G, H, J und K bezeichnet werden. Unter diesen ist Subtyp B geografisch am weitesten verbreitet. Man findet es vor allem in Nordamerika, Europa und Australien, während die Subtypen A und D vornehmlich in Ost-Afrika vorherrschen. Ebenfalls in Ost-Afrika sowie Süd-Afrika und Indien ist Subtyp C verbreitet, der gegenwärtig die meisten Neuinfektionen auslöst. Die Hauptgruppen O (*outlier group*) und N (*new group*) sind hauptsächlich auf das Gebiet von Kamerun beschränkt. Diese Vielfalt an Virusvarianten wird durch chimäre Viren, sogenannte Mosaikviren vergrößert, die durch gleichzeitige Infektion einer Zelle mit unterschiedlichen HIV-Typen entstehen und auch als *circulating recombinant forms* (CRFs) bezeichnet werden. Auch ihre Verbreitung nimmt ständig zu (156). Im Gegensatz dazu ist die Verbreitung von HIV-2 größtenteils auf West-Afrika beschränkt (zur Übersicht: 140).

A 3 Probleme der Medikamenten- und Impfstoffentwicklung

Seit mehreren Jahren steht eine medikamentöse Kombinationstherapie, die als HAART (*highly active antiretroviral therapy*) bezeichnet wird, zur Verfügung. Sie hemmt unterschiedliche Schritte im Replikationszyklus des Virus, weist jedoch beträchtliche Nebenwirkungen auf. Auf Grund der Kostenintensivität steht diese Behandlung oftmals nur Patienten in Industrieländern zur Verfügung. Auch wenn durch diese Therapie die Lebenserwartung erheblich gesteigert werden kann, scheint eine vollständige Heilung durch Eliminierung des Virus aus dem Organismus nicht möglich, da das Virus sein Genom in das langlebiger Zielzellen, etwa CD4-positiver Lymphozyten, integriert und dort persistiert (90).

Aus diesen Gründen wird seit Jahren die Entwicklung eines präventiv oder therapeutisch wirksamen Impfstoffes angestrebt, der aber nach wie vor nicht zur Verfügung steht. Das Problem, mit dem die Entwicklung von Impfstoffen und Medikamenten zu kämpfen hat, besteht vor allem in der hohen Variabilität des Virus. Verantwortlich dafür ist einerseits die virale Reverse Transkriptase (RT), welche die viralen RNA-Genome in provirale DNA umschreibt, und andererseits die zelluläre

RNA-Polymerase, die die RNA-Genome herstellt. Die hohe Fehlerrate bei der Polymerisation geht auf ein Fehlen eines so genannten *proof reading*-Mechanismus zurück, was jedoch im Falle der RT neueren Erkenntnissen nach, nicht zutreffen könnte (8). Dies und die hohe Vermehrungsrate von HIV (10^9 - 10^{10} Viruspartikel pro Tag), macht deutlich, dass sich in kürzester Zeit eine Vielzahl von Varianten und Quasi-Spezies entwickeln kann, die das Potential hat, der Immunantwort immer wieder zu entkommen (91).

A 4 Die HIV-1 Replikation

A 4.1 Die Replikation von HIV-1 beginnt mit dem Eintritt des Virus in die Zielzelle. Dabei kommt es zur Fusion der viralen mit der zellulären Membran und der anschließenden Freisetzung des Viruscapsids in das Cytoplasma der Zelle.

T-Lymphozyten, Langerhanszellen, Monocyten und Makrophagen sind die Zielzellen der HI-Viren. Bei der Infektion dieser Zellen spielt der zelluläre Oberflächenrezeptor CD4 eine entscheidende Rolle (44). CD4 ist Korezeptor des T-Zell-Rezeptors und rekrutiert die Tyrosinkinase *lck*, die essentiell für die Aktivierung zahlreicher Moleküle in der Signalkaskade aktivierter T-Zellen ist, wodurch das vom T-Zell-Rezeptor generierte Signal verstärkt wird. An CD4 bindet die konstante Domäne C3 des als Trimer vorliegenden, 120 kDa großen, externen Hüllproteins Env (gp120). Diese Bindung löst eine konformationelle Umlagerung von gp120 aus, die zur Exposition der variablen Domäne V3 von gp120 führt. V3 nimmt dadurch Kontakt zu einem weiteren zellulären Oberflächenrezeptor, dem Chemokinrezeptor CXCR4 bzw. CCR5, auf. CXCR4 ist ein sieben Transmembrandomänen-umspannender Rezeptor, der an ein G-Protein gekoppelt an der Zelloberfläche von verschiedenen Leukozyten wie Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten vorkommt. Sein natürlicher Ligand ist das Chemokin SDF-1 (*stromal cell-derived factor*). Im Unterschied dazu besitzen Makrophagen und dendritische Zellen, aber nur sehr wenige T-Zellen, den CCR5-Chemokinrezeptor. Seine Liganden sind MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES. Die V3-Domäne von gp120 ist somit ausschlaggebend für den Zelltropismus von HIV. Makrophagotrope Viren erkennen nur den CCR5-Rezeptor, T-Zelltrope nur den CXCR4-Rezeptor, weshalb sie auch als R5- bzw. R4-trop bezeichnet werden. Durch die Interaktion mit einem dieser Korezeptoren kommt es in Folge zu einer weiteren

konformationellen Umlagerung, diesmal in dem als gp41 bezeichneten transmembranen Anteil von Env. Dadurch fusioniert die virale mit der zellulären Membran. So gelangt das Capsid, welches zwei einzelsträngige RNA-Genome, einige virale (Vpr, Nef, Vif) und zelluläre Komponenten wie Cyclophilin A, Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und die Enzyme RT, Protease (PR) und Integrase (IN) enthält, in das Zytoplasma der Zielzelle (**Abbildung A1 A**, zur Übersicht: 215).

A 4.2 Durch den Zerfall des Capsids und die reverse Transkription des RNA-Genoms in ein DNA-Genom entsteht der Präintegrationskomplex (*pre integration complex*, PIC), der in den Zellkern importiert wird. Dort katalysiert die IN die Insertion der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle.

Nach dem Eintritt des Capsids folgt der noch wenig verstandene Vorgang des *uncoating*, bei dem das Capsid seinen Inhalt ins Zytoplasma entlässt und welcher für die Ausbildung des Reverse Transkriptase-Komplexes (*reverse transcription complex*, RTC) notwendig ist. Der RTC besteht bei HIV aus Matrixprotein (MA), PR, RT, Nukleocapsidprotein (NC), IN, einem als *virus protein rapid* (Vpr) bezeichneten akzessorischen Protein und dem Capsidprotein (CA) (21;104;141;144). Das diploide RNA-Genom wird durch die RT in doppelsträngige DNA umgeschrieben (**Abbildung A1 B**). Zur Initiation der Polymerasereaktion dient eine Lysin-tRNA, die bereits mit in das Viruspartikel verpackt wurde. In Folge kommt es zur Bildung eines RNA-DNA-Hybrids, zum Abbau des RNA-Anteils durch die RNase-H-Aktivität der RT und zu mehrfachen Matrizenwechseln, was schließlich zur Ausbildung flankierender LTR (*long terminal repeat*)-Regionen aus den U3-, R- und U5-Einheiten führt. Häufig kommt es während der Polymerasereaktion zum Einbau falsch gepaarter Basen, was zur hohen Mutationsrate von HIV beiträgt.

Einen zelleigenen Schutzmechanismus vor Retroviren stellt die Deaminase APOBEC3G dar, die mit in die Viruspartikel verpackt wird und Deaminierungen von Cytosinen zu Uracilen in der viralen cDNA während der reversen Transkription durchführt. Dadurch kommt es zur Degradation der viralen cDNA oder zur Bildung letaler Hypermutationen (251). Das Vif (*viral infectivity factor*)-Protein von HIV-1, das auch Bestandteil des Nukleoproteinkomplexes im Viruspartikel ist und mit der viralen RNA assoziiert vorliegt, induziert über die Bindung an APOBEC3G dessen Degradierung im Proteasom. Dies hat zur Folge, dass APOBEC3G nicht mehr in neu gebildete Virionen verpackt wird (136;137;203). Eine alternative Vorstellung liefert

Henriet und Kollegen: Indem Vif spezifisch und kooperativ an TAR und die poly(A)-stem loop-Struktur des viralen RNA-Genoms bindet, trägt es zur korrekten Faltung der RNA bei und schützt über die Bindung der RNA diese vor APOBEC3G (87).

Die Synthese des viralen DNA-Genoms im RTC und die Dissoziation von CA lässt den Präintegrationskomplex (*pre-integration complex*, PIC) entstehen, an den auch verschiedene zelluläre Proteine wie BAF (*barrier-to-autointegration factor*) und HMG (*high mobility group*) assoziiert vorliegen. Über das intrazelluläre Netzwerk des Cytoskeletts gelangt der PIC, vermutlich mit Hilfe der Motorproteine Kinesin und Dynein, zunächst über Mikrotubuli, die im MTOC (*microtubule-organizing center*) entspringen, später über Aktinstrukturen direkt an die Kernmembran (**Abbildung A1 C**). Mit einem Durchmesser von mehr als 50 nm ist der PIC größer als ein Ribosom (ca. 25 nm) und wesentlich größer als der Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC), durch den nur Moleküle mit einem Durchmesser von weniger als 9 nm diffundieren können. Aus diesem Grund kann ein Transport des PIC nur über einen energieabhängigen, aktiven Prozess erfolgen.

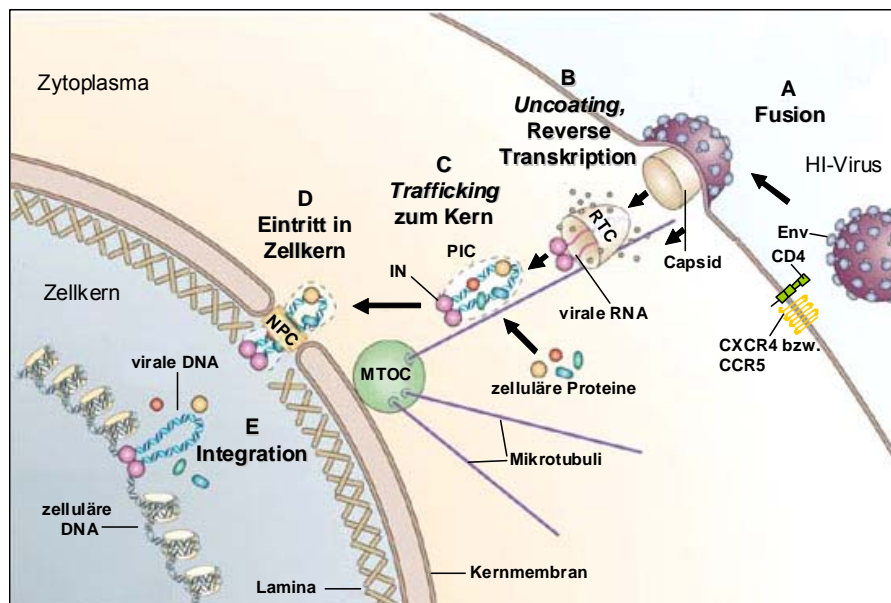


Abbildung A1 Der Weg des HI-Virus von der Fusion mit der Zielzelle bis zur Integration des Virusgenoms. Darstellung verändert nach Suzuki und Craigie (212).

Die meisten Retroviren infizieren ausschließlich teilende Zellen, da sie ihr Genom nur während der Mitose, wenn sich die Kernmembran auflöst, zur chromosomalen DNA ihrer Wirtszellen transportieren und es integrieren können. HIV und andere Lentiviren können aber auch nicht teilende Zellen infizieren. Spezielle karyophile Signalsequenzen auf dem PIC ermöglichen den Transport durch die intakte

Kernmembran über den NPC. Solche Sequenzbereiche wurden auf MA, Vpr, IN und in einer als *flap* bezeichneten kurzen Tripel-Strang-Region der viralen DNA gefunden. Ihre genaue Interaktion mit Importin und dem Kernporenkomplex ist jedoch noch nicht endgültig aufgeklärt (**Abbildung A1 D**). Im Kern angelangt, veranlasst die katalytische Aktivität der IN in Zusammenarbeit mit zellulären Proteinen, einschließlich LEDGF (*lens-epithelium-derived growth factor*), den Einbau der viralen DNA ins zelluläre Genom, bevorzugt in Transkriptions-aktive Bereiche (**Abbildung A1 E** und **A2 B**, zur Übersicht: 212).

A 4.3 Die späte Phase des viralen Zyklus beginnt mit der Synthese von mRNA-Transkripten, die aus dem Zellkern transportiert und im Cytoplasma translatiert werden.

Das jetzt als so genanntes Provirus vorliegende virale Genom verhält sich im Wesentlichen wie ein zelluläres Gen. Vom Promotor, der sich im 3'-Bereich des 5'LTR befindet, wird von der zellulären Transkriptionsmaschinerie (RNA-Polymerase II-Holoenzymkomplex) virale mRNA hergestellt, die für das regulatorische RNA-bindende Tat (*transcriptional transactivator*)-Protein kodiert. Durch die Expression von Tat und dessen Anwesenheit im Transkriptionskomplex wird die niedrige basale RNA-Syntheserate um das 50 bis 100-fache erhöht. Tat bindet dabei zusammen mit den zellulären Faktoren CycT und Cdk9 an die *stem loop*-Struktur TAR (*Tat activation region*), die sich am 5'-Terminus aller viralen mRNAs befindet. In Folge kommt es zur Hyperphosphorylierung und einer gesteigerten Prozessivität der RNA-Polymerase II, was zur Herstellung von Vollängen-mRNAs führt (101, zur Übersicht: 105).

Tat kann aber auch TAR-unabhängig die Transkription erhöhen (17). Es akkumuliert nicht nur im Zellkern der infizierten Zelle (192), sondern kann auch von infizierten Zellen sezerniert werden und an Membranproteine von uninfizierten Zellen binden. Dort kann es Signalkaskaden auslösen, endocytiert werden und in die zelluläre Genexpression eingreifen (55). So erhöht es beispielsweise die Expression von Bcl-2 (249) oder auch von HIV-1 Korezeptoren (202) und unterdrückt die Expression von MHC-I (26) und des Mannoserezeptors (22, zur Übersicht: 94;178;211).

Neben der reversen Transkription von RNA zu DNA durch die virale RT ist auch dieser Polymerisierungsschritt sehr fehlerbehaftet und für die hohe Variabilität von HIV-1 verantwortlich.

HIV benötigt für seine Replikation die Expression von ungespleißten, einfach gespleißten und vollständig gespleißten viralen mRNAs. Von ungespleißter RNA werden die Gag- und Gag-Pol-Polyproteine, von einfach gespleißter RNA Env, Vif, Vpu und Vpr, und von vollständig gespleißter RNA die RNA-bindenden Transaktivatorproteine Tat und Rev (*regulator of virion*) sowie Nef im Cytoplasma translatiert.

Zu Beginn des viralen Lebenszyklus werden nur vollständig gespleißte mRNA-Moleküle aus dem Zellkern exportiert und die entsprechenden Proteine exprimiert. Unvollständig gespleißte mRNAs werden, wie zelluläre prä-mRNAs, von so genannten *splicing commitment factors* am Verlassen des Zellkerns gehindert. Über die Bindung an das *Rev response element* (RRE), das im Kodierungsbereich für env (135) aller nicht vollständig gespleißter viraler Transkripte liegt, vermittelt das *shuttle*-Protein Rev in oligomerisierter Form den Export von ungespleißten und unvollständig gespleißten Transkripten in das Cytoplasma. Darüber hinaus interferiert es mit der zellulären Spleiß-Maschinerie, wodurch es einen bestimmten Anteil der viralen RNAs vor dem Spleißen schützt (99). Rev enthält ein Leucin-reiches Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES), durch das es direkt mit Exportin 1 (=Crm1), einem Mitglied der Importin- β (=Karyopherin- β)-Familie der Kern-Cytoplasma-Transportfaktoren, interagieren kann. Exportin 1 wechselwirkt mit Komponenten des Kernporen-Komplexes (*nuclear pore complex*, NPC) und exportiert auf diese Weise zelluläre mRNA, snRNA und rRNA (zur Übersicht: 42). In der mit HIV infizierten Zelle bindet Exportin 1 im Nukleus in Gegenwart von Ran-GTP den Komplex aus RRE-mRNA und Rev und gelangt durch die Kernpore ins Cytoplasma. Nach dem Kern-Export bewirkt die Hydrolyse von GTP zu GDP eine Konformationsänderung, wodurch sich Exportin 1 und Ran von Rev ablösen. Durch die Bindung seines argininreichen Kernimportsignals (*nuclear localizing sequence*, NLS) an Importin- β kehrt Rev dann wieder in den Zellkern zurück (zur Übersicht: 188). Von Wagner und Kollegen konnte gezeigt werden, dass durch die Anpassung von viralem auf humanen Kodongebrauch auch ungespleißte virale mRNA Rev-unabhängig aus dem Zellkern exportiert und translatiert werden kann (227). Die exportierte RNA kann jetzt entweder als Matritze für die Synthese viraler Proteine dienen oder, falls es sich um ein Volllängen-Transkript handelt, als neues Virusgenom in entstehende Viruspartikel verpackt werden (**Abbildung A2 A**, zur Übersicht: 54;174).

Ein weiteres in seiner genauen Funktion noch wenig untersuchtes regulatorisches Protein stellt Rev dar. Es enthält Sequenzbereiche von tat, env und rev, und verfügt über die gleiche Aktivität zur Transaktivierung wie Tat. Außerdem weist es eine, wenn auch geringe, Rev-Aktivität auf (14;194).

A 4.4 Am rauen endoplasmatischen Retikulum und an cytosolischen Ribosomen findet die Translation der viralen Proteine statt, die dann zusammen mit den RNA-Genomen zur Plasmamembran transportiert werden. Dort assemblieren sie zu Viruspartikeln, die durch Knospung von der Plasmamembran freigesetzt werden.

Am rauen endoplasmatischen Retikulum wird das Oberflächenprotein Env als Vorläuferprotein gp160 von der einfach gespleißten mRNA translatiert. An Asparagin erfolgt die Glykosylierung über Mannoseketten zum gp160-Glykoprotein. Daraufhin wird gp160 als Trimer zum Golgi-Apparat transportiert, wo es von einer zellulären Protease gespalten wird. Es wird vermutet, dass es sich dabei um Furin oder die pro-Protein Konvertase LPC/PC7, beides Mitglieder der Subtilisin-Familie, handelt (83). Zudem wurde aber auch die Beteiligung anderer zellulärer Proteasen beschrieben (245). So entsteht das reife Oberflächenglykoprotein gp120 und der mit ihm nicht-kovalent verknüpfte transmembrane gp41-Anteil. Anschließend wird das Glykoprotein gp120 mit der Anheftung von komplexen Zuckern im Golgi-Apparat weiter modifiziert. An der Zelloberfläche der infizierten Zelle kommt es dann zu einer Interaktion zwischen gp41 und dem Gag-Polyproteinvorläufer (Pr55), wobei der MA-Bereich des Polyproteins eine entscheidende Rolle spielt (247). Diese Interaktion und die Palmitoylierung von gp160 sind für den späteren Einbau des Env Glykoproteins in entstehende Viruspartikel und deren Infektiosität essentiell (191, zur Übersicht: 246).

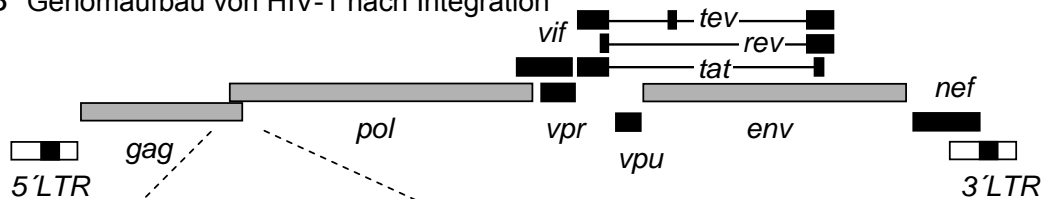
Die Translation aller anderen Virusproteine erfolgt an freien Ribosomen im Cytoplasma. Neben den kleineren regulatorischen und akzessorischen Proteinen sind dies die beiden großen Polyproteinvorläufer Gag und Gag-Pol, die von einer 9 kb großen ungespleißten RNA kodiert werden. Der 55 kDa große Gag-Vorläufer umfasst die Proteine MA (p17), CA (p24), NC (p7), das *linker*-Protein p6_{gag}, sowie die wenig charakterisierten Peptide p2 und p1 (86). Der 160 kDa große Gag-Pol-Vorläufer besteht ebenfalls aus MA, CA, p2 und NC. Anstelle von p1 und p6_{gag} befindet sich aber hier das sogenannte *transframe*-Protein p6*, die PR, die RT und die IN. Die Expression von zwei Polyproteinvorläufern von einer RNA wird durch eine Leserastersprung-Sequenz, die als *frame shift site* bezeichnet wird, gewährleistet (159). Diese *frame shift*-Region befindet sich im Kodierungsbereich für p1 und p6_{gag} im offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) von gag bzw. im Kodierungsbereich für p6* im pol-ORF, da die ORFs für gag and pol im Bereich von p1-p6_{gag} und p6*-PR überlagert sind (**Abbildung A2 B und C**). Diese *frame shift*-Region enthält zwei hoch konservierte RNA-Elemente, eine als *slippery site* bezeichnete Heptanukleotidfolge

(UUUUUUA), an welcher der Leserastersprung stattfindet und eine *stem loop*-Struktur (Abbildung A2 D).

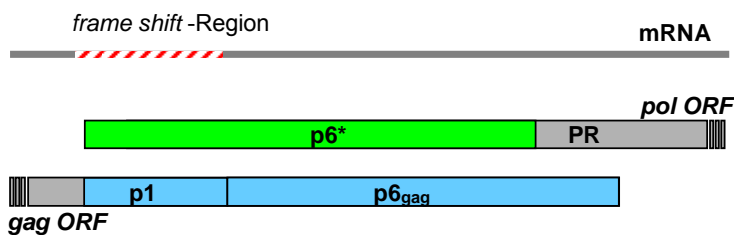
A ungespleißte 9.0-kb mRNA



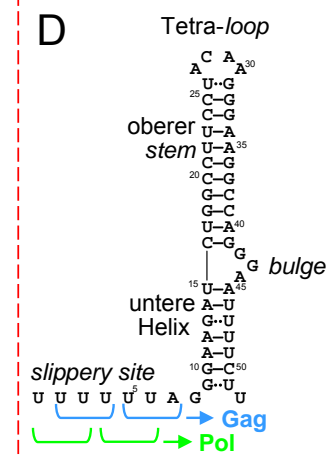
B Genomaufbau von HIV-1 nach Integration



C



D



E Gag und Gag-Pol Polyproteine



Abbildung A2 Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms. Die 9 kB große ungespleißte mRNA, wird nach dem Eintritt des Virus in eine Wirtszelle durch die RT in DNA umgeschrieben und ins Wirtsgenom integriert. (A) Das jetzt als Provirus bezeichnete Genom von HIV besteht aus mehreren, teilweise überlagerten offenen Leserahmen (ORFs) und ist an beiden Seiten von LTRs flankiert (B). Die gag und pol ORFs sind im Bereich von p1-p6_{gag} und p6*-PR überlagert. Dort bildet die Voll-längen-mRNA nach ihrer Transkription eine *frame shift*-Struktur aus (C). Diese *frame shift*-Struktur (Nukleotide 1-52) besteht aus einer *slippery site* (1-7), einer unteren Helix (9-15, 45-51) und einem oberen *stem* (16-26, 31-41), einem Tetra-loop (27-30) als Spitze des oberen *stem loops* (16-41) und einem *bulge* (42-44), der die beiden Helices voneinander trennt (207) (D). Im Bereich der *stem loop*-Struktur kommt es zu einer Verzögerung des Ribosoms und zu einem -1 Leserastersprung an der *slippery site* in 5-10% aller Translationsereignisse, wodurch die zwei unterschiedlich großen Polyproteine Gag und Gag-Pol entstehen (E).

Staple und Buther zeigten in NMR-Analysen, dass diese Struktur aus einem Tetra-loop (ACAA) und zwei Helices besteht, die durch eine, von drei Purinen gebildete Ausbuchtung (*bulge*) voneinander getrennt sind. Die obere Helix, bzw. der obere *stem* ($T_m > 90^\circ\text{C}$), bestehend aus 11 Watson-Crick Basenpaarungen, ist dabei deutlich stabiler als die untere ($T_m = 47^\circ\text{C}$), die bei der Ankunft des Ribosoms denaturieren muss, um es auf der *slippery site* zu positionieren (206;207). Dies führt zu einer Verzögerung des Ribosoms und in ca. 5-10% aller Translationsereignisse zu einem -1 Leserastersprung an der *slippery site*. Folglich ergibt sich dadurch ein Verhältnis der Gag- und Gag-Pol-Polyproteinvorläufer von 20:1 bzw. 10:1 (**Abbildung A2 E**, 27;98;107;113;159;186;239). Diese Stöchiometrie ist bei Retroviren hoch konserviert, eine Zunahme oder Abnahme der Effizienz des Leserastersprungs würde die Produktion und Effizienz der Viruspartikel signifikant reduzieren (95;158).

Noch während ihrer Synthese werden die Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine an ihrem MA-Anteil myristyliert (224) und gelangen auf noch unbekannte Weise an die Plasmamembran, wo die Morphogenese zu infektiösen Viruspartikeln stattfindet (56;63;77;224).

Gag interagiert über zwei als *late*-Assemblierungsdomänen bezeichnete Bindemotive in p6_{gag} mit der zellulären ESCRT (*endosomal complexes required for transport*)-Maschinerie. Über die Aminosäurefolge PTAP am Aminoterminal nimmt es Kontakt zu Tsg101 (*tumor susceptibility gene*), einer Komponente des ESCRT I Komplexes, auf (72) und über LYPLTSLRSL am Carboxylterminus mit dem *apoptosis-linked gene 2* (ALG-2)-interacting protein Alix bzw. AIP1, das den Kontakt zu ESCRT III herstellt (210, zur Übersicht: 67). Die ESCRT-Komplexe I, II und III dirigieren den Transport von mono-ubiquitylierten Membranproteinen, die vom *trans*-Golgi Netzwerk kommend, neu synthetisiert, oder von der Plasmamembran kommend, endozytiert wurden, in das Lumen des Endosoms. Die an der Endosomenmembran positionierten ESCRT-Komplexe lösen die Bildung von Vesikeln aus, wodurch das Endosom zu einem *multi vesicular body* (MVB) wird. In der Folge entstehen zelltypabhängig Lysosomen, Exosomen, lysosomale Granula, oder Melanosomen (zur Übersicht: 181). In mit HIV-1 infizierten T-Zellen rekrutiert Gag diese ESCRT-Maschinerie weg von der Endosomenmembran hin zur Plasmamembran, wo die als *budding* bezeichnete Abknosung der Viruspartikel von HIV stattfindet (177).

Man geht davon aus, dass das *budding* der Viruspartikel an *lipid rafts* stattfindet. Das sind Plasmamembran-Domänen, die reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind und eine Plattform zur Assemblierung der viralen Proteine und Proteinvorläufer darstellen (191). Über die Palmitoylierung und Myristylierung wird die Assoziation von Env bzw. von Gag/Gag-Pol zu den *lipid rafts* vermittelt. Auch das myristylierte Nef-

Protein ist an diesen Membran-Domänen assoziiert. Es fördert die Assemblierung an den *lipid rafts* und wird auch in Viruspartikel verpackt (230;253, zur Übersicht: 24).

Im Gegensatz zu den T-Zellen wird in Makrophagen die ESCRT-Maschinerie nicht von der Endosomenmembran entfernt, und das *budding* erfolgt nicht von der Cytoplasmamembran, sondern in die MVB hinein, von wo aus das Virus über Exosomen freigesetzt wird. Nguyen und Kollegen halten daher diesen als „Trojanische Exosomen-Hypothese“ (78) bezeichneten Weg über die MVBs, im Gegensatz zur eben beschriebenen *lipid raft*-Hypothese, für eine Alternative, wie retrovirales *budding* stattfinden könnte (151).

Neben den genannten Proteinen werden auch je zwei virale RNA-Genome in das Viruspartikel verpackt. Dieser Vorgang ist hoch spezifisch, da im Cytoplasma der Zelle nur 1% der gesamten RNA viralen Ursprungs ist, wohingegen der Anteil der viralen RNA in einem Viruspartikel mehr als 95% beträgt. Für diese Verpackung ist das Ψ -Element verantwortlich, eine aus mehreren *stem loops* bestehende Verpackungssequenz, die sich in der *leader*-Region zwischen dem U5-Bereich und dem Gag-ORF ungespleißter RNA-Spezies befindet. Daher findet man im Viruspartikel mehr als 95% ungespleißte virale mRNA, während im Cytoplasma der Zelle die Hälfte der viralen RNA-Transkripte als einfach und mehrfach gespleißte RNAs vorliegen. Der Einbau der Virusgenome in die entstehenden Viruspartikel erfolgt durch Bindung dieser Ψ -Elemente an zwei an Zinkfinger motive erinnernde Cystidin-Histidin-Boxen des NC-Anteils der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine (75;201).

Über die Interaktion mit dem viralen RNA-Genom wird auch Vif, als Bestandteil des viralen Nukleoprotein-Komplexes, in den Viruspartikel verpackt (106). Neben Vif und dem Virusgenom werden auch noch einige Lys-tRNA-Moleküle über eine Interaktion mit dem RT-Bereich in Gag-Pol und die für dessen Aminoacylierung verantwortliche Lysyl-tRNA-Synthetase zusammen mit den Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteinen verpackt (zur Übersicht: 110). Auch das akzessorische Protein Vpr (*viral protein rapid*) findet sich in HI-Viruspartikeln. Dorthin gelangt es über die direkte Bindung an den Carboxylterminus von p6_{gag} im Gag-Vorläufer (6;114). Vpr greift in zahlreiche zelluläre Abläufe ein. Beispielsweise interagiert es mit p21 (41) und p53 (197), induziert einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase (53) und erhöht als Transaktivator die frühe, Tat-unabhängige, 5'-LTR gesteuerte Gen-Expression von integrierter und nicht integrierter viraler DNA (36;175). Außerdem ist Vpr mit am Transport des PIC in den Zellkern beteiligt (68;85) und kann Apoptose induzieren (zur Übersicht: 147).

Über die Interaktion mit dem CA-Bereich des Gag-Vorläufers wird die für die HIV-1 Replikation essentielle Peptidyl-Prolyl-Isomerase Cyclophilin A in das HIV-1 Partikel eingebaut (66;219). Für eines der wichtigsten regulatorischen Proteine von HIV-1, den

Pathogenitätsfaktor Nef, sind die Mechanismen, die zu einer quantitativen Inkorporation führen, noch nicht vollständig verstanden.

A 4.5 Bei der Abknospung der Viruspartikel kommt es zu einem als Maturation bezeichneten Reifungsprozess. Dabei zerlegt die virale Protease die Polyproteinvorläufer in ihre Einzelkomponenten, wodurch es zu Umlagerungsprozessen des Viruspartikels kommt, die zu seiner Infektiosität führen.

Bei HIV-1 wird, wie in **Abschnitt A4.4** beschrieben, die virale Protease im ORF von pol kodiert. Sie ist essentiell für die Maturation der Viruspartikel. Die Prozessierung der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine zu Strukturproteinen, Enzymen und *spacer*-Peptiden beginnt bereits an der Membran der Wirtszelle noch vor dem Abknospen der Viren (102). Eine Verzögerung der Prozessierung bedingt daher auch eine Verzögerung der Virusfreisetzung. So werden die Gag- und Gag-Pol-Domänen von ihren Transportsignalen getrennt, wenn die PR zu früh aktiviert wird, was zu einer Verhinderung der Assemblierung und der Virusfreisetzung führt. Eine verhinderte Aktivierung resultiert in einem schweren Prozessierungsdefekt der Polyproteinvorläufer und folglich in einem kompletten Verlust der viralen Infektiosität. (102;103;118;119;134;142;158;218). Die korrekte Faltung der PR im dimerisierten Gag-Pol-Polyproteinvorläufer ist die Voraussetzung dafür, dass die PR eine Konformation annimmt, in der sie funktional aktiv ist (127;226). Mit zunehmender Akkumulation von Gag-Pol-Polyproteinvorläufern an der Cytoplasmamembran bei der Assemblierung des Virus nimmt auch der Dimerisierungsgrad der Gag-Pol-Polyproteine und der darin befindlichen viralen Proteasen, die nur als Homodimere aktiv sind, zu. So kommt es zur schrittweisen Autoprozessierung der PR und einer Spaltung der Polyproteinvorläufer in ihre Einzelkomponenten (102).

Die Reihenfolge der einzelnen Prozessierungsschritte der Gag- und Gag-Pol-Vorläufer sind weitgehend bekannt. Ihre Kinetik zeigt unterschiedliche Hydrolysierungsraten für die einzelnen Spaltstellen. Die Prozessierung von Gag beginnt am Carboxyterminus des *spacer*-Peptids p2. Dabei entstehen zwei Polyprotein-Intermediate, MA-CA-p2 und NC-p1-p6_{gag}. Daraufhin wird MA von MA-CA-p2 und p6_{gag} von NC-p1-p6_{gag} abgespalten. Die Kinetik dieser Spaltung ist um den Faktor 10 langsamer als die der Vorangegangenen. Die Prozessierung von Gag endet mit einem dritten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (Faktor 400), bei dem die beiden *spacer*-

Peptide p2 und p1 abgetrennt werden und CA und NC ihre endgültige Konformation einnehmen können (62;166;169;171;236).

Im Gegensatz zu Gag werden bei der Prozessierung von Gag-Pol die initialen Prozessierungen von der unreifen PR ausgeführt, die selbst noch Teil des Gag-Pol-Vorläuferproteins ist. Diese muss noch innerhalb des Polyproteins dimerisieren und aktiviert werden (115;124;130;172;149;243). Auch in Gag-Pol findet die initiale Spaltung zwischen p2 und NC statt und setzt die beiden Intermediate MA-CA-p2 und NC-p6*-PR-RT-IN frei. Aktuellere Arbeiten weisen darauf hin, dass in einem schnellen weiteren Schritt das *transframe*-Protein p6* intern nach der Aminosäure F₈ gespalten wird, wobei das 114 kDa große Intermediat p6*(L₉-F₆₈)-PR-RT-IN und ein carboxylterminal um acht Aminosäuren verlängertes NC entstehen (167). Für die weiteren Prozessierungsschritte existiert bisher noch kein allgemein akzeptiertes Modell. Wahrscheinlich kommt es durch die Hydrolisierung des Carboxylterminus der PR zur Freisetzung zweier weiterer Intermediate: RT-IN und p6*(L₉-F₆₈)-PR. Für die Stabilität des p6*(L₉-F₆₈)-PR-Intermediats liegen konträre Aussagen vor. Lindhofer und Kollegen konnten es nur in Anwesenheit von PR-Inhibitoren in Zellen nachweisen, was für ein sehr kurzlebiges Zwischenprodukt sprechen würde (126). Almog und Kollegen konnten es hingegen auch in Virionen detektieren (4). Ein alternatives Modell geht erst von einer Spaltung am Aminoterminal der PR und später am Carboxylterminus aus, worauf weitere Prozessierungsschritte von der jetzt freien PR katalysiert werden (216;243). Mit der Trennung der beiden Enzyme RT und IN ist die Prozessierung des Pol-Anteiles des Polyproteinvorläufers abgeschlossen (168).

HIV-1 benötigt in bestimmten humanen Zelltypen für eine effiziente Freisetzung der Partikel Vpu (*viral protein out*). In Abwesenheit von Vpu käme es zu einer Akkumulation der Viruspartikel in intrazellulären Vakuolen und an der Plasmamembran (111), was auf die Wirkungsweise des an der Cytoplasmamembran lokalisierten zellulären Proteins Tetherin zurückzuführen ist. Vpu wirkt dieser Funktion von Tetherin entgegen und erhöht somit die Viruspartikelfreisetzung (150). Darüber hinaus bindet Vpu an die cytoplasmatische Domäne von CD4-Molekülen und veranlasst deren Ubiquitinylierung und Degradation im Proteasom. Damit wird eine intrazelluläre Interaktion von Env mit CD4 verhindert, was den Transport von Env an die Plasmamembran erhöht, die Anzahl der CD4-Moleküle, die an die Zelloberfläche gelangen, aber verringert (237;238). Eine Interaktion von CD4 und Vpu auf der Zelloberfläche würde die positiven Eigenschaften von Vpu auf die Virusfreisetzung jedoch egalalisieren (19, zur Übersicht: 20).

A 5 Struktur und Funktion des p6*-Proteins

A 5.1 P6* ist ein *transframe*-Protein mit einer flexiblen Struktur.

P6* wird vom 5' Ende des pol-Leserahmens kodiert, der in diesem Bereich mit dem gag-Leserahmen überlagert ist (**Abbildung A1 C**). Auf Grund dieser besonderen Lage wird es auch als *transframe*-Protein bezeichnet. Außerdem bildet der Kodierungsbereich für den Aminoterminal von p6* die beschriebene *frame shift site* auf RNA-Ebene aus. Die Aminosäuresequenzen einzelner HIV-1 Isolate divergieren im p6*-Bereich teilweise stark. Sequenzvergleiche von 19 p6*-Sequenzabschnitten, die mit dem FASTA-Programmpaket (164) erstellt wurden, zeigen für p6* eine Sequenzidentität von 31% bzw. 40%, wenn verwandte Aminosäuren auf Basis der Dayhoff-Matrix (48) berücksichtigt werden. Die amino- und carboxylterminalen Bereiche in p6* sind hochkonservierte Regionen (CR1 und CR2), ebenso wie die überlagerten Bereiche in p1 und p6_{gag} (**Abbildung C1.1**). Abhängig vom jeweiligen Isolat besteht p6* aus 55 bis 72 Aminosäuren. Zwei-dimensionale NMR-Analysen legen nahe, dass p6* keine definierte Tertiär- oder stabile Sekundärstruktur aufweist. Es ist jedoch eine Tendenz zur Ausbildung einer α -Helix im Aminoterminal zwischen den Aminosäuren R₃ und Q₁₀ und eines β -Stranges im Carboxylterminus zu erkennen. Durch die Interaktion mit der PR kommt es möglicherweise zu Konformationsänderungen in p6* (13;161).

A 5.2 P6* ist direkt an der Regulation der PR-Aktivität beteiligt.

Die Funktion von p6* war lange Zeit unklar. Man fand aber im carboxylterminalen Bereich von p6* Sequenzhomologien mit Propeptiden eukaryotischer Zymogene. Dies ließ für p6* einen Einfluss auf die virale PR vermuten, der dem des Propeptides von Pepsinogen ähnlich ist. Eine autokatalytische Abspaltung von p6* würde die PR aktivieren und die Polyprotein-Prozessierung auslösen (217). Ein weiteres Indiz hierfür war, dass die Deletion von p6* diese Prozessierung der Polyproteine erhöhte (129;160). In unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch gezeigt werden, dass Mutationen im Bereich dieser Sequenzhomologien im Kontext des Provirus HX10 keinen Einfluss auf die Prozessierung der Gag- und Gag-Pol-Vorläufer oder die Virusreplikation hatten. Die Funktionsweise der HIV-1 PR Regulation entspricht also nicht der von zellulären Zymogenen (163).

Weitere Analysen in unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass rekombinant hergestelltes p6*-Protein spezifisch und konzentrationsabhängig die PR-Aktivität inhibiert. Dafür sind die vier carboxylterminalen Aminosäurereste essentiell, wie Studien mit Deletionsmutanten zeigten. Offensichtlich blockieren diese Reste die Substratbindetasche der viralen PR (162). Die Tatsache, dass eine Carboxylterminus-Mutante, für die durch *molecular modelling* eine stärkere Bindung an diese PR-Domäne vorhergesagt wurde als für den Wt, auch eine stärkere Inhibition der PR Aktivität hervorrief, bestätigte diese Ergebnisse (133).

A 5.3 Die Bedeutung der internen und flankierenden PR-Spaltstellen von p6* für die HI-virale Replikation

Da p6* zwischen NC und PR im Gag-Pol-Polyproteinvorläufer lokalisiert ist, wird es während der Prozessierung aus dem Vorläufer freigesetzt. Neben den flankierenden Spaltstellen am Amino- und Carboxylterminus wurden des Weiteren auch eine konservierte interne und weitere kryptische PR Spaltstellen postuliert. Man vermutete, dass durch sukzessive Interaktion der kryptischen Spaltstellen mit der Substratbindetasche der PR deren Autoprozessierung verzögert wird (4;31;127;162;168;172;257). Es wurde gezeigt, dass Substitutionen des p6* Carboxylterminus in proviralen HIV-1-Mutanten zu drastischen Einbußen der Infektiosität und Replikationskompetenz *in vitro* führen können. Dies hängt davon ab, wie weit die Spaltkinetik der p6*-PR Spaltstelle betroffen ist. Mutationen, die die Spaltung blockieren, verhindern die Produktion infektiöser Viren, solche die die Spaltung verlangsamen, verringern die Infektiosität hingegen nicht (133). Die Mutation der aminoterminalen NC-p6*-Spaltstelle führte auch zur Zerstörung der *frame shift*-Struktur. Dies verhinderte die Produktion von Gag-Pol-Vorläuferproteinen und damit auch die Produktion infektiöser Viren. Eine Blockierung der internen p6*-Spaltstelle führte dazu, dass in flankierenden Bereichen mit einer deutlich reduzierten Hydrolyserate geschnitten wird. Die Prozessierung von Gag-Pol oder die Replikation des Virus waren dadurch aber nicht betroffen. Die Blockierung der kryptischen Spaltstellen hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Gag-Pol Prozessierung und die Virusreplikation (163).

A 5.4 Interaktion mit Nef

Neben seinem wichtigen Einfluss auf die Aktivierung der PR wurde für p6* noch eine Interaktion mit Nef, dem wichtigsten lentiviralen Pathogenitätsfaktor, postuliert (40) (siehe Abschnitt A6.6).

A 6 Die Bedeutung des Nef-Proteins für HIV-1

Das akzessorische Protein Nef stellt für die Replikation von Lentiviren eine optimale Umgebung in der Wirtszelle her. Es ist ein multifunktionales Adapterprotein und bewirkt die Internalisierung von verschiedenen Zelloberflächenmolekülen zum Schutz vor der Immunabwehr. Es greift in die Signaltransduktionswege der infizierten Zelle ein, aktiviert sie, verhindert aber gleichzeitig deren Apoptose, wodurch die Infektiosität und Replikation deutlich erhöht wird.

A 6.1 Nef ist verantwortlich für die hohe Virulenz und Pathogenität von HIV-1.

Wie die drei anderen akzessorischen Proteine Vif, Vpu und Vpr ist auch Nef für die *in vitro*-Replikation verzichtbar. *In vivo*-Daten zeigen jedoch, dass Nef als Virulenzfaktor kritisch für die Entwicklung von AIDS ist und den Verlauf bzw. die Schwere der Infektion dramatisch verändert. Entdeckt wurde nef als ein ORF, das teilweise mit dem 3'LTR von HIV-1 überlappt. Daraus ergab sich seine ursprüngliche Nomenklatur 3'ORF oder auch *negative factor*, da man zunächst einen negativen Effekt von Nef auf die Virusreplikation annahm (132). Dies stellte sich später jedoch als Fehlbezeichnung heraus. Bei Langzeit-HIV-1-Infizierten, so genannten *long term non progressors* (LTNPs), die erst sehr spät oder gar nicht das AIDS-Vollbild entwickeln, wurde häufig eine Deletion in nef oder auch ein defektes nef-Allel gefunden (49;109). Für die Infektiosität der Viruspartikel und die Replikation in Zellen ist es daher entscheidend, ob ein funktionell aktives Nef vorliegt oder nicht (33;247, zur Übersicht: 45).

Das nef-Gen ist hoch konserviert in allen Lentiviren der Primaten (HIV-1, HIV-2 und SIV) und die Nef-Proteine von SIV und HIV sind funktionell austauschbar. Im Gegensatz zu HIV-1 wird aber bei den meisten Lentiviren der Primaten und bei HIV-2 die T-Zell-Aktivierung und der damit verbundene T-Zell-abhängige Zelltod (AICD,

activation-induced cell death) durch Nef verhindert, indem der CD3-Anteil des T-Zell-Rezeptors (TCR) von der infizierten Zelle herunterreguliert wird (*downregulation*). Während der lentiviralen Evolution ist diese Nef-Funktion offenbar verloren gegangen, was die hohe Pathogenität von HIV-1 im Vergleich zu HIV-2 und den meisten SIVs erklärt (198).

A 6.2 Nef führt zur *downregulation* zahlreicher Oberflächenrezeptoren.

Um der Immunantwort zu entgehen und die HIV-Replikation zu beschleunigen, manipuliert Nef eine Reihe von Transport- und Signal-Prozessen in der infizierten Zelle. Im Falle des TCR-Korezeptors CD4 agiert Nef als Brücke zwischen einer konservierten Aminosäuresequenz im Carboxylterminus von CD4 und dem Adaptor-Protein AP-1 der Clathrin-Maschinerie. Dadurch kommt es zum Abtransport von CD4 von der Zelloberfläche in Endosomen und weiter zu Lysosomen, wo CD4 degradiert wird. Die CD4-Abnahme an der Zelloberfläche bringt für das Virus mehrere Vorteile mit sich. Zum einen wird die Partikelfreisetzung aus der infizierten Zelle erhöht, da bei der Knospung der Partikel eine Bindung von Env an der sich abschnürenden Virusmembran und CD4 auf der Wirtszellmembran unwahrscheinlicher wird (190) bzw. eine Interaktion von CD4 und Vpu auf der Wirtszelloberfläche verhindert wird. (19). Zum anderen erhöht sich auch die Infektiosität der Partikel, da weniger CD4 in die Membran der Viren eingebaut wird (39;122;125). Außerdem interagiert CD4 auch als Korezeptor des T-Zell-Rezeptors, mit dem MHC-Klasse II-Komplex Antigen-präsentierender Zellen. Mit der *downregulation* von CD4 greift Nef damit auch in die T-Zell-Signalkaskade ein (232). Der größte Vorteil liegt wahrscheinlich in der Verhinderung einer Superinfektion der Wirtszelle, was zu ihrem vorzeitigen Tod durch Apoptose führen könnte (15).

Einen wichtigen Schutz vor der zellulären Immunabwehr vermittelt Nef mit der *downregulation* von MHC-I. Nach der Synthese im ER verhindert Nef, dass MHC-I an die Zelloberfläche gelangt und dirigiert es stattdessen ins *trans*-Golgi-Netzwerk, wo es akkumuliert. Von dort wird es über Endosomen weiter ins Lysosom zur Degradation transportiert. Damit minimiert Nef die Chance, dass infizierte Zellen von zytotoxischen T-Zellen über auf MHC-I präsentierte virale Peptide erkannt und lysiert werden (37;213).

Anders als CD3 wird CD28, ein weiterer Kostimulator des TCR, von allen lentiviralen Nefs attackiert. Durch die von Nef ausgelöste CD28-Internalisierung verringert sich damit wiederum die T-Zell-Aktivierung und AICD (214).

Darüber hinaus vermittelt Nef auch die *downregulation* von MHC-II (199), CCR5 (143), des Mannose-Rezeptors (225), von CD80, CD86 (30), CD8 (209) und erhöht die Expression von TNF, LIGHT(123) und DC-SIGN (204).

A 6.3 Nef interagiert mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex.

Da ruhende T-Zellen weitgehend resistent gegenüber einer produktiven HIV-Infektion sind, ist die T-Zell-Aktivierung eine wichtige Voraussetzung für einen effizienten Infektionsverlauf *in vivo* (zur Übersicht: 208). Nef interagiert direkt mit dem TCR und den *lipid rafts* in der Cytoplasmamembran. Dorthin rekrutiert es zelluläre Signalproteine und verändert somit die Signalgebung der infizierten T-Zelle, was zu ihrer Aktivierung führt, die durch eine erhöhte Transkriptionsrate und IL-2-Ausschüttung messbar ist (120;230).

Nef bildet diesen Multiproteinkomplex, indem es die Bildung der *rafts* fördert und die Kinasen PAK2 (*p21-activated kinase 2*) und Lck (*leukocyte-specific protein tyrosine kinase*), den *guanine exchange factor* (GEF) Vav1 und die GTPasen Rac1 und Cdc42 dorthin rekrutiert (52;120;131;179;184;252). Dieses Signalosom am TCR induziert die gesteigerte HIV-Transkription, den Umbau des Aktincytoskeletts, verhindert Apoptose und erhöht die virale Infektiosität, wobei die genauen Abläufe noch im Dunkeln liegen (23;59;84;240;241). Ein aktuelles Modell schlägt vor, dass Nef intrazellulär und in Abwesenheit eines exogenen Stimulus TCR-Signale auslöst. Gleichzeitig schaltet es aber die Signalgebung über den TCR von außerhalb der Zelle ab, um eine Hyperaktivierung und AICD der infizierten Zelle zu verhindern (zur Übersicht: 57).

A 6.4 Nef beeinflusst die Apoptose.

Auch auf die Apoptose nimmt Nef auf zweierlei Arten Einfluss. Zum einen induziert Nef die Expression von Fas-Ligand (CD95L) auf infizierten T-Zellen, was bei Fas (CD95)-exprimierenden zytotoxischen *bystander*-T-Zellen zum Zelltod führt, wenn sie in Kontakt mit den infizierten Zielzellen kommen (248;250). Dies stellt einen weiteren Mechanismus dar, mit dem Nef die infizierte Zelle vor der zellulären Immunabwehr schützt. Gleichzeitig wird aber auch die Expression von Fas induziert. Über die Bindung an ASK-1 (*apoptosis signal regulating kinase 1*) und dessen Inaktivierung schützt Nef die infizierte Zelle aber gleichzeitig vor Fas- und TNF α -vermittelter Apoptose (73). Zum anderen werden interne Apoptose-auslösende Signale blockiert,

die durch die Infektion mit HIV induziert wurden. Zu diesen zählt die Expression von BAD, einem Mitglied der der Bcl-2-Proteinfamilie. Nef vermittelt die Phosphorylierung dieses pro-apoptotischen Moleküls und verhindert damit die durch Cytochrom C-Ausschüttung aus Mitochondrien hervorgerufene Apoptose (153, zur Übersicht: 82). Außerdem interagiert Nef mit dem Tumorsuppressormolekül p53, was zur Destabilisierung von p53 führt und die p53-vermittelte Apoptose in infizierten Zellen verhindert (80).

A 6.5 Im Laufe des Infektionszyklus ändert sich mehrmals die Konformation und Lokalisation von Nef in der Zelle.

Das Nef-Protein besitzt zahlreiche Bindemotive für zelluläre und virale Proteine und geht eine Vielzahl von Interaktionen ein. Einige dieser Interaktionen können jedoch nicht gleichzeitig geschehen, da die entsprechenden Bindestellen von Nef überlappen. Strukturanalysen zeigten, dass Nef flexible Regionen enthält, die es erlauben durch Veränderung seiner Struktur die Zugänglichkeit zu verschiedenen Bindestellen zu verändern. Dabei spielen die posttranslationalen Modifikationen der Myristylierung und Phosphorylierung eine große Rolle. Die Lokalisation von Nef variiert in der infizierten Zelle während der verschiedenen Replikations-Phasen. Daher wurde ein sogenannter Nef-Zyklus postuliert:

Nach seiner Translation liegt Nef in einer „geschlossenen“ Konformation im Cytoplasma vor, wodurch die meisten Bindemotive unzugänglich sind. Über einen noch unbekannten Mechanismus wird Nef zur Cytoplasmamembran transportiert und nimmt dort eine „halb-offene“ Konformation ein, bei der Bindestellen für Zelloberflächen-Rezeptoren wie CD4 oder MHC-I und Signalmoleküle wie Lck frei werden, die sich in den *lipid rafts* befinden. Über Bindung mit zahlreichen Proteinen und möglicherweise über Oligomerisierung induziert Nef dort die Aggregation von *lipid rafts* und die Ausbildung eines Signalkomplexes, um so Signalkaskaden in der T-Zelle auszulösen (Abschnitt A6.3). Daraufhin ändert es wieder seine Konformation und interagiert mit Proteinen der Endocytose-Maschinerie, um die gebundenen Oberflächen-Rezeptoren ins Lysosom zu dirigieren. Wahrscheinlich kommt es dadurch auch zur Degradation von Nef. Ob und in welchem Umfang Nef-Moleküle aus dem endocytotischen Transport wieder an die Cytoplasmamembran gelangen, bleibt in diesem Modell offen (5;50;93).

Fest steht, dass die Myristylierung und eine Gruppe basischer Aminosäuren am Aminotерminus von Nef die Assoziation mit der Cytoplasmamembran ermöglicht und

Voraussetzung für die Inkorporation von Nef in Viruspartikel ist (16;157;233). Man nimmt an, dass sich in jedem Partikel 10-100 Nef-Moleküle befinden. Ob allein der basische Charakter und die Myristylierung für die Inkorporation ausreichen sind, oder ob Interaktionen mit weiteren zellulären oder viralen Strukturen dazu nötig sind, ist unklar. Auch der Transportmechanismus in diesem offensichtlich genau regulierten Nef-Zyklus, der zur Inkorporation während des *buddings* führt, ist unbekannt. Sicher ist, dass Nef bei der Maturation durch die virale PR so prozessiert, dass ein 18-20 kDa großes Spaltprodukt entsteht (116;157;234). Die genaue Funktion dieser Spaltprodukte ist jedoch nicht bekannt.

Darüber hinaus wurde in infizierten Zellen neben dem 27 kDa Nef-Genprodukt auch eine 25 kDa große Isoform gefunden, die von einem alternativen Start-Kodon translatiert wird. Da dieses Nef aminoterminal um 18 Aminosäuren verkürzt ist und somit keine Myristylierungsstelle besitzt, ist es im Gegensatz zum 27 kDa großen Nef ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert (100).

Eine deutlich gestörte Lokalisation weist die dominant-negative Nef-Mutante Nef-F12 auf, die die Produktion von Viruspartikeln und die Infektiosität von HIV-1 stark beeinträchtigt (61;60;154). Verschiedene Mutationen in Nef-F12 verhindern die Prozessierung des Gag-Polyproteinvorläufers durch die PR und führen zu einer deutlich von Nef_{Wt} unterscheidbaren Lokalisation in der Zelle, in großen Vesikeln nahe des Zellkerns (43;58;60;61;154).

A 6.6 Nef interagiert mit Gag-Pol während der Virusreplikation.

Neben den oben beschriebenen Interaktionen konnten für Nef auch eine funktionelle Assoziation mit Gag-Pol nachgewiesen werden (155). Costa und Kollegen vermuteten daraufhin, dass der negative Effekt von Nef-F12 durch die Tatsache zu erklären ist, dass das Nef-Protein in der späten Phase der Virusreplikation an Gag-Pol bindet (40). Im Falle des „falsch“ lokalisierten Nef-F12 wird Gag-Pol dadurch dem Assemblierungsprozess an der Cytoplasmamembran entzogen, was die Virusproduktion stark beeinträchtigt. Darüber hinaus schlagen sie vor, dass durch diese Interaktion die Verpackung von Nef in Viruspartikel gewährleistet wird. Denkbar wäre auch, dass über die Rekrutierung von Gag-Pol an die Cytoplasmamembran *budding* und Partikelfreisetzung erleichtert wird. So konnten sie den Interaktionsbereich zu Gag-Pol auf einen *loop* im Nef-Carboxylterminus eingrenzen. Aus dem Ergebnis eines Ko-Immunpräzipitationsversuches schlagen sie vor, dass p6* der Bindepartner für Nef im Gag-Pol-Polyproteinvorläufer ist (40).

A 7 Sequenzvergleich unterschiedlicher HIV-Isolate

Bei Replikationsanalysen mit verschiedenen HIV-Klonen konnten Ono und Kollegen zeigen, dass der Klon NL4-3 (beschrieben in (1), *accession number* M19921) durch das Fehlen von Nef in seiner Replikation deutlich stärker beeinträchtigt wird als Klon LAI (beschrieben in (228), *accession number* K02013). Weitere Analysen mit chimären Viren zeigten eine funktionelle Assoziation zwischen Nef und einer Region in Gag-Pol zwischen NC und RT. Ein Sequenzvergleich beider Klone ergab, dass LAI in diesem Bereich einen Austausch von drei und eine Insertion von 12 Aminosäuren verglichen mit NL4-3 aufweist (155). Schon 1987 wurde von Ratner eine Duplikation einer 36 bp langen Sequenz im Überlappungsbereich der ORFs für gag und pol beschrieben, als man die Nukleotidsequenzen von frühen HTLV-III/LAV-Klonen bestimmte. Entdeckt wurde die Duplikation, als man die Klone BH10 (beschrieben in (183), *accession number* M15654) und HXB2 (beschrieben in (222), *accession number* K03455) miteinander verglich, wobei diese Duplikation nur in BH10 vorhanden war. Sie stellte den augenscheinlichsten Unterschied zwischen diesen beiden Klonen dar. Man hielt diese Duplikation für eine natürliche Varianz von HTLV-III/LAV-Sequenzen, die als Resultat von Sprüngen der RT während der Synthese von DNA-Intermediaten entstehen könnte (182). Tatsächlich ist diese Duplikation im zentralen Bereich von p6* lokalisiert und möglicherweise ein *hot spot* für fehleranfällige Polymerisation bei der Reversen Transkription (12). Man findet sie auch in dem aus BH10 generierten Klon HX10 (182), aber nicht in NL4-3. Ein *alignement* dieser Isolate im Bereich von p6* zeigt, dass es sich bei den von Ratner und Ono erwähnten Duplikationen bzw. Insertionen in BH10, HX10 und LAI um identische Sequenzen handelt (**Abbildung A3**).

Die Beobachtung, dass eine Nef-Deletion die Replikation von NL4-3 stärker behindert als den fast identischen, sich aber durch die Duplikation in p6* unterscheidenden Klon LAI, in Verbindung mit der postulierten Bindung zwischen Nef und p6*, deutet auf eine mögliche Kompensation von Nef durch die Duplikation in der zentralen p6*-Region hin.

```

HXB2      TTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCC
NL4-3     TTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCC
BH10      TTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCC
LAI       TTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCC
HX10      TTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCC

HXB2      AACAGCCCCACC.....AGAAGAGAGCTTCAGGTCTGG
NL4-3     AACAGCCCCACC.....AGAAGAGAGCTTCAGGT TGG
BH10      AACAGCCCCACCATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTCTGG
LAI       AACAGCCCCACCATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTCTGG
HX10      AACAGCCCCACCATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTCTGG

HXB2      GGTAGAGACAACAACCTCCCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAAGTGTATCCTTTAACTTCC
NL4-3     GGAGAGACAACAACCTCCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAAGTGTATCCTTTAACTTCC
BH10      GGTAGAGACAACAACCTCCCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAAGTGTATCCTTTAACTTCC
LAI       GGTAGAGACAACAACCTCCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAAGTGTATCCTTTAACTTCC
HX10      GGTAGAGACAACAACCTCCCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAAGTGTATCCTTTAACTTCC

```

Abbildung A3 *Alignement der p6*-Sequenzen verschiedener HIV-1-Isolate.* Der Ursprung der einzelnen Isolate ist im Text erklärt. Als Konsensus-Sequenz wurde HX10 festgelegt. Nicht konservative Austausche sind rot, konservative Austausche grau unterlegt.

A 8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von p6* für die virale Replikation weiter zu analysieren. In Ergänzung früherer Arbeiten sollte der Einfluss einer verzögerten Prozessierung der carboxylterminalen p6*-Spaltstelle für die Virusreplikation genauer untersucht werden. Im Focus dieser Arbeit stand, die Rolle der zentralen p6*-Region (*downstream* des Leserastersprungbereichs und *upstream* der Kodierungssequenz für die p6*-PR-Spaltstelle) für die Replikation Nef-exprimierender Viren aufzuklären. Ausgangspunkt hierfür war die postulierte Interaktion zwischen Nef und p6* (40). Nach der Beobachtung, dass eine Nef-Deletion die Virusreplikation weniger stark beeinträchtigt, wenn p6* eine Duplikation im zentralen Bereich aufweist (155), sollte eine mögliche Kompensation von Nef durch eine Duplikation in der zentralen p6*-Region überprüft werden.

B Zusammenfassung

Auf Grund der Genomorganisation von HIV-1 ist das *transframe*-Protein p6* Bestandteil des Gag-Pol-Polyproteinvorläufers und liegt dort zwischen dem vom gag-Gen kodierten Nukleocapsid-Protein (NC) und der vom pol-Gen kodierten Protease (PR). P6* selbst wird vom 5'Ende des pol-Gens kodiert. Die Translation zweier Polyproteinvorläufer, Gag und Gag-Pol, wird durch einen -1 ribosomalen Leserastersprung an einer *frame shift*-Region der RNA ausgelöst. Diese hoch konservierte Region liegt im Kodierungsbereich für den Aminoterminus von p6*. Darüber hinaus ist p6* und die ebenfalls pol-kodierte PR mit p1 und p6_{gag} des gag-Leserasters überlagert.

Abgesehen von seinem Aminoterminus ist auch der Carboxylterminus von p6* hoch konserviert. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass rekombinant hergestelltes p6* die PR konzentrationsabhängig hemmt. Für diesen Effekt ist hauptsächlich das carboxylterminale Tetrapeptid von p6* verantwortlich (162). Darüber hinaus stellt es den p6*-Anteil der p6*-PR-Spaltstelle dar, deren Prozessierung für die Freisetzung und vollständige Aktivierung der PR essenziell ist. Mutationen am p6*-Carboxylterminus führten entweder zu einer Verzögerung oder zu einer Blockade der Prozessierung, die im Provirus HX10 unterschiedlich schwere Prozessierungsdefekte hervorriefen. Jedoch konnte für Mutationen, die die Prozessierung verzögerten, bisher kein messbarer Einfluss auf die virale Replikation belegt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in einem sensitiveren Testsystem gezeigt, dass auch geringere Prozessierungsdefekte für die entsprechenden Virusmutanten zu einem Replikationsnachteil gegenüber dem Wildtyp (Wt) führen (134).

Um die Rolle der zentralen p6*-Region im Lebenszyklus von HIV-1 in Zusammenhang mit einer postulierten Interaktion von p6* und Nef während der Virusreplikation (40) aufzuklären, wurden in dieser Arbeit sequentielle Mutationen in die kodierende Region von p6* eingeführt. Die Mutationen in der zentralen p6*-Region wählte man so, dass sie die überlagerten p1- und p6_{gag}-Leserahmen unberührt ließen. Als Basis der Mutagenesestudien diente dabei das Nef-kodierende HIV-1-Isolat NL4-3. Es stellte sich heraus, dass die zentrale p6*-Region weder Einfluss auf den Leserastersprung noch auf die Produktion der Polyproteinvorläufer hat. Auch für die Aktivität der PR

oder für die Inkorporation von Nef in Viruspartikel spielt sie keine Rolle. Eine Interaktion mit Nef konnte für diesen Bereich von p6* ausgeschlossen werden. Jedoch bewirkte eine Substitution der gesamten zentralen p6*-Region einen Rückgang der viralen Infektiosität und Replikation *in vitro*.

Eine in einigen Isolaten beschriebene Allelvariation von p6* ist eine 11 Aminosäuren umfassende Duplikation im zentralen Bereich. Diese Duplikation wies einen Zelltyp-abhängigen Einfluss auf die Replikation auf.

Mutationen im p6*-Aminoterminus beeinflussen unausweichlich die *frame shift*-Region oder den überlagerten gag-Leserahmen. So zeigte sich in zurückliegenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass sich Substitutionen in dieser Region von p6* auf die Effizienz des ribosomalen Leserastersprunges und folglich negativ auf die Virusreplikation auswirken (163). Da eine spezifische Mutagenese des p6*-Aminoterminus nicht möglich ist, ohne dabei überlagerte Strukturen zu manipulieren, ist die Rolle dieser Region für die Virusreplikation von HIV-1 noch unbekannt. Daher wurde in dieser Arbeit ein neues HI-Provirus konstruiert, bei dem die *frame shift*-Region so versetzt wurde, dass die beiden Leserahmen gag und pol entkoppelt vorliegen. Für dieses Virus konnte gezeigt werden, dass die neu generierte *frame shift*-Region einen funktionellen Leserastersprung auslöst, der zur Translation der Gag und Gag-Pol-Polyproteinvorläufer führt. Deren Prozessierung sowie Infektiosität und Replikationsfähigkeit entsprachen annähernd dem des NL4-3-Isolats. Damit repräsentiert dieses Viruskonstrukt ein neues wertvolles Werkzeug für die Analyse der HIV-1 Replikation. Es erlaubt erstmalig die *frame shift*-Region p1 und p6_{gag}, sowie p6* und die PR unabhängig voneinander auch durch Deletions- oder Insertions-Mutagenese zu manipulieren.

Mutationsanalysen, die im Kontext dieses neuen Virus durchgeführt wurden, ergaben, dass auch der p6*-Aminoterminus für die *in vitro*-Infektiosität und -Replikation von HIV-1 nicht essenziell ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Deletion der gesamten zentralen p6*-Region *in vitro* keine erkennbaren Nachteile für den Replikationszyklus mit sich bringt. Im Gegenteil, die Virusreplikation wurde sogar beschleunigt. Weiterhin wurde festgestellt, dass Reportergene in den p6*-Leserahmen eingebracht werden können, die die zentrale p6*-Region ersetzen. Mit zunehmender Größe schränken diese Insertionen die Funktionalität des Virus jedoch ein. Daher wird vermutet, dass die Aktivität der PR vom Abstand zu ihren aminoterminal gelegenen Spaltstellen im Gag-Pol-Vorläufer abhängt und dass diese Insertionen in den p6*-

Leserahmen die Dimerisierung und die Faltung der PR im Gag-Pol-Vorläuferprotein stören.

Diese Arbeit kommt somit zu dem Ergebnis, dass der Carboxylterminus von p6* für die PR-Aktivität und damit für die Replikation des HI-Virus von entscheidender Bedeutung ist. Im Gegensatz dazu ist die Gestalt des Aminoterminus für die Funktionalität des Virus ebenso unerheblich wie die zentrale Region von p6*. Es wird daher angenommen, dass sie die Funktion eines *spacers* einnimmt, um *in vivo* dem Virus Raum für *escape*-Mutationen zu bieten.

C Ergebnisse

C 1 Gesamtkonzept zur funktionellen Untersuchung von p6*

C 1.1 Das transframe-protein p6*

Die aminoterminal Region

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktionalität des p6*-Proteins im proviralen Kontext analysiert werden. In **Abbildung C1.1** ist das 56 Aminosäuren große p6*-Protein des NL4-3-Isolats (1) mit seiner aminoterminalen, internen, carboxyl-terminalen und den beiden postulierten kryptischen Spaltstellen sowie seinen hoch konservierten Bereichen CR1 und CR2 dargestellt. Die Aminosäuren F₁ bis S₁₇ sind auf RNA-Ebene in einem Bereich kodiert, der die in Abschnitt A4.4 beschriebene *frame shift*-Struktur ausbildet. Dieser Bereich von p6* wird fortan als Aminoterminus bzw. als aminoterminal Region bezeichnet. Er ist Teil des hoch konservierten Bereichs CR1, der die Aminosäuren F₁ bis P₂₆ umfasst. Aus NMR Analysen ließ sich für die Region zwischen R₃ und Q₁₀ die Tendenz zur Ausbildung einer α -Helix ableiten (13). Mutationen im Aminoterminus führten im Kontext des Provirus HX10 bisher zu zweierlei Effekten: Entweder kam es zu einem Verlust der Integrität der *frame shift*-Struktur und in Folge zu einem replikationsinkompetenten Phänotyp (163) oder die Austausch im überlagerten gag-Leserahmen riefen Prozessierungsdefekte hervor (134).

Auf Grund der aminoterminalen Spaltstellen, der RNA-*frame shift*-Struktur, die im Aminoterminus von p6* kodiert ist und des überlagerten gag-Gens, konnte bisher diese p6*-Region nicht separat auf ihre Funktionalität für die HIV-Replikation untersucht werden.

Die zentrale Region

Die Aminosäuren S₁₈ bis V₅₂ umfassen einen Bereich, der auf RNA-Ebene außerhalb der *frame shift*-Region liegt. Für diesen Bereich von p6*, der im weiteren Verlauf der Arbeit als zentrale Region definiert wird, wurde die Existenz von kryptischen PR-Spaltstellen postuliert (256). Die zentrale p6*-Region hatte im Kontext des Nef-defizienten Proviruskonstruktes HX10 auf die Prozessierung und Replikation von HIV keinen Einfluss (18;163). Eine von Costa postulierte Bindung von Nef an p6* (40)

scheint, auf Grund der Größe dieser Region (35 von insgesamt 56 Aminosäuren) hier am wahrscheinlichsten. Neben der Überschneidung mit den hoch konservierten Regionen CR1 und CR2 findet sich hier auch die in einigen Isolaten auftretende 11 Aminosäuren lange Duplikation (bzw. 12 Aminosäuren-Insertion).

Die Rolle dieser Duplikation und die mögliche Interaktion mit Nef in dieser p6*-Region aufzuklären, war Ziel der vorliegenden Arbeit.

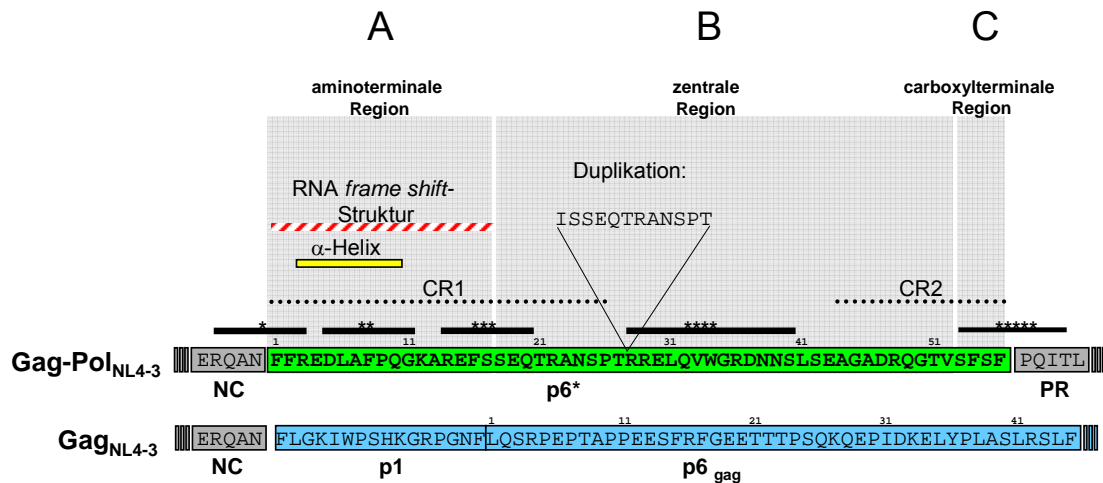


Abbildung C1.1 Strukturelle und funktionelle Unterteilung des p6*-Proteins. Gezeigt ist die aminoterminal (A), zentrale (B) und carboxyterminale p6*-Region des Gag-Pol-Proteins mit den hoch konservierten Bereichen (CR1, CR2), der NC-p6* (*), der internen (**), den beiden postulierten kryptischen (***, ****) und der p6*-PR-Spaltstelle (*****). Der Aminoterminus zeigt eine Tendenz zur Bildung einer α -Helix und ist auf RNA-Ebene mit der *frame shift*-Region überlagert. In einigen Isolaten, wie BH10 und LAI findet sich eine Insertion bzw. eine Duplikation in der zentralen Region. Der gesamte p6*- und der 5' Anteil des PR-ORFs des pol Gens überlappt mit den p1- und p6_{gag}-ORFs des gag-Gens.

Die carboxyterminale Region

Für das carboxyterminale Tetrapeptid von p6* (S₅₃-F₅₆) konnte in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits ein Einfluss auf die PR-Aktivität nachgewiesen und als p6*-PR-Spaltstelle identifiziert werden. Substitutionen in dieser mit dem hoch konservierten Bereich CR2 überlappenden Region, führten zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Prozessierungsdefekten (134).

Deren Charakter und Auswirkung auf die Replikation soll ebenfalls weiter aufgeklärt werden.

C 1.2 Mutationen der carboxylterminalen Spaltstelle von p6* beeinflussen die Prozessierung der Polyproteinvorläufer.

Der Einfluss des p6*-Carboxylterminus auf die PR-Aktivität und HIV-1 Replikation konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits näher charakterisiert werden (162;163). Mutationsanalysen im Proviruskontext ergaben, dass spezifische Punktmutationen im carboxylterminalen Tetrapeptid von p6* des infektiösen Provirusklons HX10 (**Abbildung C1.2 A**) die Prozessierung am p6*-Carboxylterminus beeinträchtigen können, was zu unterschiedlichen Auswirkungen auf die Prozessierung der Polyproteinvorläufer, die Infektiosität und die Replikation der entsprechenden Viren führt (134).

So blockierten die Austausche der vier carboxylterminalen p6*-Reste in csM4 und die sieben Austausche in csM7 die Prozessierung am p6*-Carboxylterminus und führten dazu, dass die 11 kDa große PR nicht mehr freigesetzt wurde. Stattdessen war ausschließlich ein ca. 17 kDa großes p6*-PR-Intermediat nachweisbar. Die Mutanten csM5 und csM6 zeigten hingegen die freie PR, und im Vergleich zu csM4 und csM7 nur Spuren des p6*-PR-Intermediats, was aus der Western Blot-Analyse in **Abbildung C1.2 B** deutlich hervorgeht (modifiziert nach Ludwig, Leiherer und Wagner (134)). Darüber hinaus wurden aber bei csM5 und csM6 keine weiteren Prozessierungsdefekte festgesellt. Die Infektiosität und Replikationskompetenz entsprach der des HX10 Wt-Virus (134).

Im Gegensatz dazu führten die Mutationen des p6*-Carboxylterminus in csM4 und csM7 in beiden Fällen gleichermaßen zu schweren Prozessierungsdefekten der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine. In Western Blot-Analysen der entsprechenden Viruspartikel beider Mutanten war weder CA, MA oder NC in prozessierter Form nachzuweisen. Dafür zeigten beide Mutanten ein 41 kDa großes Zwischenprodukt, das als MA-CA-p2-Intermediat identifiziert werden konnte, welches auch im Verlauf der natürlichen Prozessierung der Vorläuferproteine entsteht (Abschnitt A4.5). Die Zusammensetzung eines weiteren 48 kDa großen Produktes war bisher unklar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit einem NC-spezifischen Antikörper in Western Blot-Analysen gezeigt werden, dass die Prozessierung des Gag-Vorläufers zu einem unnatürlichen MA-CA-p2-NC/p1-Intermediat führt (**Abbildung C1.2 C**). Die schwache Doppelbande könnte dabei die unvollständige Abspaltung von p1 repräsentieren.

Diese Daten zeigen, dass Mutationen im Carboxylterminus von p6*, die die Freisetzung der PR verhindern, zu schweren Prozessierungsdefekten führen.

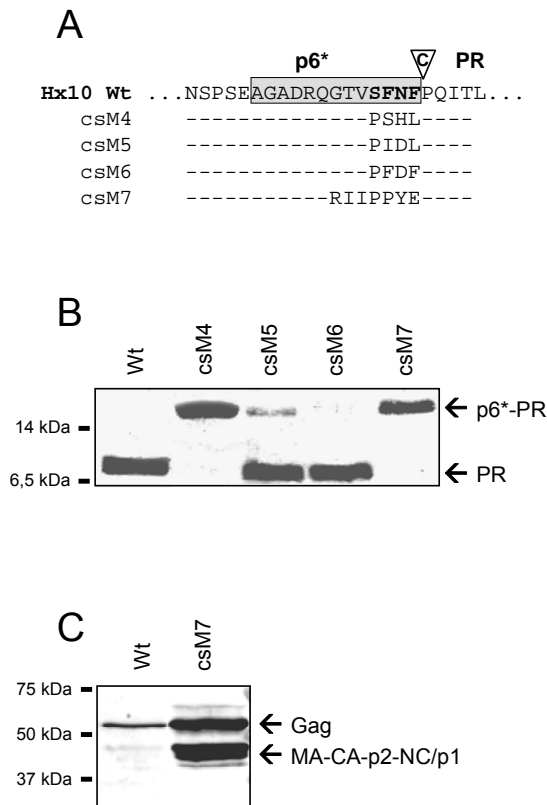


Abbildung C1.2 Die Aminosäuresequenzen der Mutanten csM4, csM5, csM6 und csM7 und ihre Prozessierungsdefekte. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des p6*_{Hx10} Wildtypproteins (HX10 Wt) und die Aminosäureaustausche in den Mutanten, die sich im Carboxylterminus von p6* befinden. Der Ort der Spaltung (c) zwischen dem p6* Carboxylterminus und dem PR-Aminotermius ist markiert. Grau unterlegt ist der hoch konservierte Bereich CR2. Waagrechte Striche in den Mutanten-Sequenzen repräsentieren unveränderte Aminosäuren (A). H1299-Zellen wurden mit den proviralen Plasmiden HX10 Wt, csM4, csM5, csM6 und csM7 transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurde der Überstand geerntet, die enthaltenen Viruspartikel über Ultrazentrifugation aufkonzentriert und die Proteine über ein denaturierendes Gel chromatographisch aufgetrennt. In einer Western Blot-Analyse erfolgte der Nachweis von PR-spezifischen Intermediaten mit Hilfe eines polyklonalen PR-Antiserums über Chemilumineszenz, modifiziert nach Ludwig, Leiherer und Wagner (134) (B). 293T-Zellen wurden mit den proviralen Plasmiden HX10 wt und csM7 transfiziert und ebenso behandelt wie unter B. Der Nachweis von NC-spezifischen Intermediaten erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen NC-spezifischen Antiserums (C). Die Positionen der Markerproteine sind angegeben.

C 1.3 Mutationen der carboxylterminalen Spaltstelle von p6* führen bei den betroffenen Viren in Konkurrenz mit dem Wildtypvirus zu einem deutlichen Replikationsnachteil.

In zurückliegenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnten keine Unterschiede in Replikationskinetiken zwischen HX10 Wt und den Mutanten csM5 und csM6 in MT4-Zellen festgestellt werden. Um die virale Fitness der Mutanten csM5 und csM6 exakter zu definieren, wurde ein Testsystem entwickelt, bei dem zwei unterschiedliche Viren gemeinsam über einen bestimmten Zeitraum in einem Ansatz replizieren und somit um die zu infizierenden Zellen konkurrieren. Dieses als Wettbewerbs-Replikations-

Test bezeichnete System ist bezüglich seiner Durchführung und Auswertung genauer in Abschnitt F5.8 beschrieben.

Zur Gewinnung der Infektionsinocula wurden 293T-Zellen, wie unter Abschnitt F4.2 erläutert, mit Konstrukten der entsprechenden Virusmutanten transfiziert. Nach drei Tagen wurden die zellfreien, virushaltigen Überstände abgenommen, die Menge des darin enthaltenen CA-Proteins (p24) über ELISA bestimmt (Abschnitt F5.5) und bezüglich ihres CA-Gehaltes normalisiert. Im Anschluss daran wurden CEM-Zellen mit gleichen Mengen des Wt-Virus und einer der beiden Virusmutanten bzw. mit einem vierfachen Überschuss der entsprechenden Mutante (1:4) oder des Wt-Virus (4:1), infiziert. In einem weiteren Kompetitions-Replikations-Ansatz wurde zu Kontrollzwecken die Mutante csM7 dem Wt gegenübergestellt, die auf Grund umfassender Prozessierungsdefekte replikationsinkompetent war (134 und Abschnitt C1.1). Die Ausbreitung der konkurrierenden Infektionen wurde in den Ansätzen über die Integration des viralen Genoms in das Genom der infizierten Zellen quantifiziert. Dazu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen aus den Ansätzen entnommen, ihre genomische DNA isoliert, die integrierten viralen Genome über PCR amplifiziert und sequenziert (**Abbildung C1.3 A, B und C**).

Die Höhe des jeweiligen Signals an den Nukleotidpositionen, an denen sich Wt und Mutante unterscheiden, gibt Auskunft über die Menge der integrierten wildtypischen oder mutierten viralen DNA in der Präparation. Daraus konnte das Verhältnis der Zellen berechnet werden, die vom Wt-Virus oder von der Mutante infiziert wurden, woraus die Menge der beiden Viren im jeweiligen Kompetitions-Replikations-Ansatz zu einem bestimmten Zeitpunkt abgeleitet werden konnte. Ein Wert bzw. Verhältnis größer als 1 bedeutet somit, dass der Wt in den Proben stärker vertreten ist als die Mutante. Ein Verhältnis kleiner als 1 zeigt an, dass die Mutante das effektivere Virus ist. Am Kurvenverlauf kann man erkennen, ob und mit welcher Geschwindigkeit der Wt eine Mutante verdrängte oder von ihr verdrängt wurde.

Um sicher zu stellen, dass die Verschiebungen der Signalhöhen auf Zu- bzw. Abnahme von verschiedenen Viren und nicht auf Spontanmutationen beruht, wurde über einen Zeitraum von sechs Wochen dieser Sequenzbereich in Kontrollansätzen mit nur einer Virusvariante untersucht. In allen Fällen blieb die Nukleotidsequenz unverändert.

Aus **Abbildung C1.3 D und G** geht hervor, dass die Mutante csM5 schon nach fünf Tagen dem Wt-Virus deutlich unterlegen war, da mehr als dreimal so viele Zellen vom Wt-Virus als von csM5 infiziert wurden. Um auszuschließen, dass sich ein Virus gegenüber einem anderen im Verlauf der Experimentdauer auf Grund von marginalen Unterschieden im Inokulationsvolumen durchsetzt, wurden Zellen am Tag 0 mit der

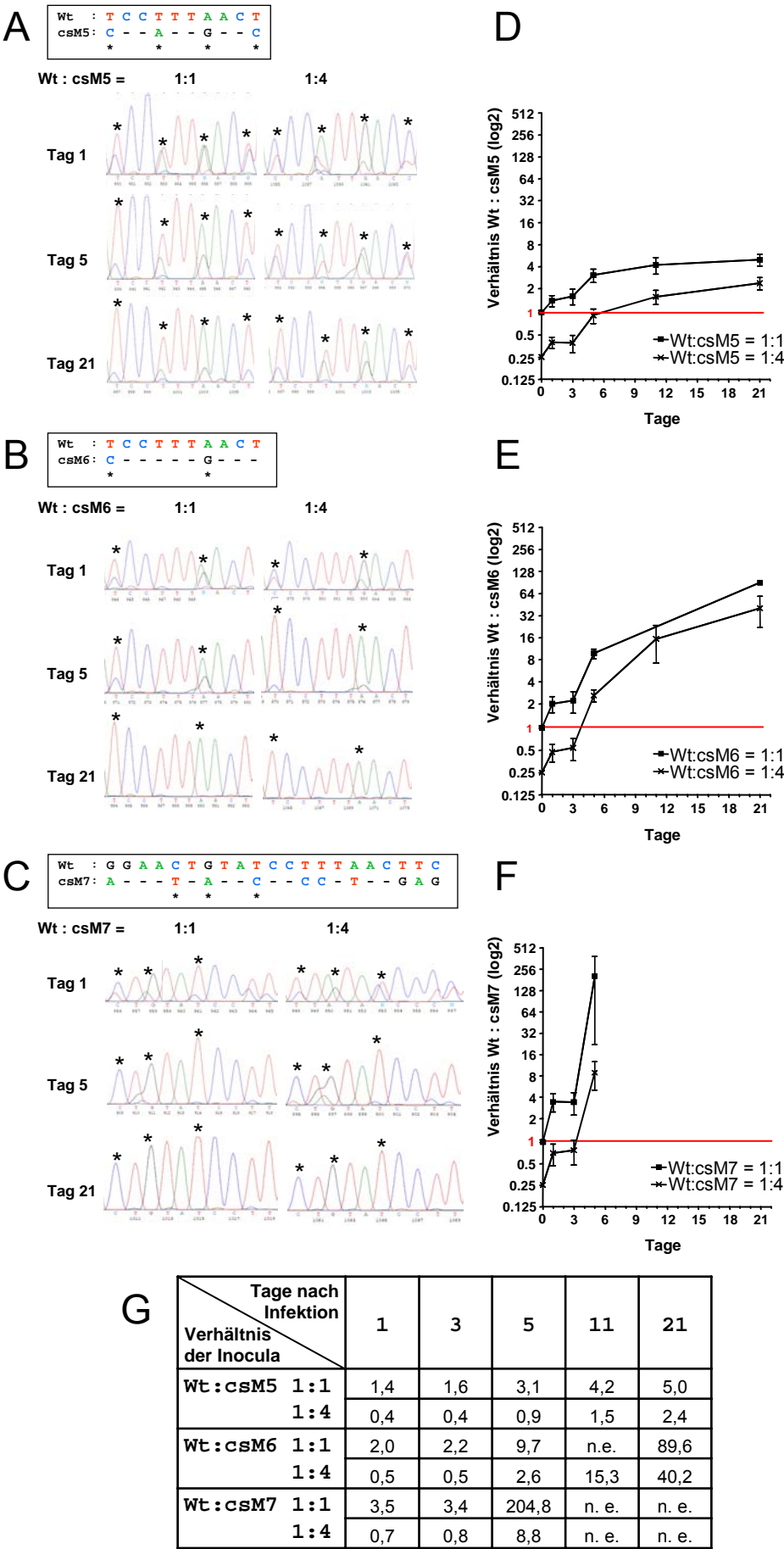


Abbildung C1.3 Kompetitions-Replikations-Test zwischen HX10 Wildtyp und den p6*_{HX10}-Mutanten csM5, csM6 und csM7. CEM-Zellen wurden entweder mit gleichen Mengen an Virus und Mutante (1:1) oder in einem zweiten Ansatz mit einem vierfachen Überschuss der Mutante inkubiert (1:4). 1, 3, 5, 11 und 21 Tage später wurden Zellproben aus den Ansätzen entnommen, die genomische DNA isoliert, mit spezifischen Primern integrierte virale DNA amplifiziert und sequenziert. Die Boxen zeigen die p6*-Regionen, in denen sich die Mutanten csM5, csM6 und csM7 in ihrer Nukleotidsequenz vom Wt unterscheiden. Die aus der Sequenzierung an den Tagen 1, 5 und 21 hervorgegangenen Chromatogramme lassen die überlagerten Signale beider viralen Genome im betreffenden p6*-Abschnitt erkennen (A-C). Die Verhältnisse der Signalhöhen von Wt:Mutante wurden für alle markierten Positionen (Sterne) bestimmt und ein Durchschnittswert für jeden Zeitpunkt ermittelt (G). Die Durchschnittswerte (n.e. = Wert nicht ermittelbar) beider Kompetitions-Replikations-Tests (1:1 und 1:4) wurden in einem binär logarithmischen Diagramm gegen die Zeit aufgetragen (D-F).

vierfachen Menge des mutierten im Vergleich zum wildtypischen Virus infiziert (wt:csM5 = 1:4). Wie der Kurvenverlauf zeigt, war in diesem Experiment das Verhältnis von mit Wt und Mutante infizierten Zellen bereits am Tag 6 wieder ausgeglichen. Am Tag 11 konnte man für das Verhältnis Wt:csM5 einen Wert von 4,2 bzw. 1,5 ermitteln, je nachdem ob die Zellen mit einem Wt:Mutante-Verhältnis von 1:1 oder 1:4 infiziert wurden.

Noch schneller konnte das Wt-Virus die Mutante csM6 verdrängen, wie sich aus dem Kurvenverlauf in **Abbildung C1.3 E** ergibt. Am Tag 5 lag das Verhältnis Wt:csM6 bei fast 10, bzw. bei 2,6, wenn die Zellen am Tag 0 mit der vierfachen Menge der Virusmutante infiziert wurden (**Abbildung C1.3 G**).

Am deutlichsten konnten sich Wt-Viren jedoch gegenüber der Kontrollmutante csM7 durchsetzen. Hier wurden nach fünf Tagen um den Faktor 200 mehr Zellen vom Wt als von der Mutante infiziert. Waren am Tag 0 noch viermal mehr csM7-Viren, verglichen mit dem Wt in den Ansätzen, so hatte das Wt-Virus fünf Tage später schon fast die neunfache Anzahl an Zellen infizieren können (**Abbildung C1.3 F und G**). Zu späteren Zeitpunkten waren die Signale, die von den mutierten Sequenzen stammten, bereits so schwach, dass sie teilweise nicht mehr quantifiziert werden konnten. Alle restlichen, zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelbaren Verhältnisse sind tabellarisch in **Abbildung C1.3 G** aufgeführt. Die Ergebnisse der Kompetitions-Replikations-Experimente, bei denen ein 4:1-Verhältnis für die Inocula von Wt:Mutante gewählt wurde, zeigten schon sehr früh im Replikationsverlauf fast ausschließlich Wt-Signale und sind daher nicht angegeben.

Mit Hilfe des Kompetitions-Replikationstests konnte erstmals gezeigt werden, dass es mit einer Veränderung der vier carboxylterminalen Aminosäuren von p6*, auch wenn sie die Prozessierung nur unwesentlich stören, dennoch zu einem deutlich messbaren Nachteil in der Virusreplikation kommt.

C 2 Funktionelle Analyse des zentralen p6*-Bereichs

Nachdem durch die oben beschriebenen Beobachtungen die Rolle des Carboxylterminus von p6* noch weiter aufgeklärt werden konnte, sollte im Folgenden der zentrale Bereich von p6* näher untersucht werden. Diese Region überlappt teilweise mit den hochkonservierten Bereichen CR1 und CR2, besitzt einige kryptische PR-Spaltstellen und könnte darüber hinaus die postulierte Bindestelle für das Nef-Protein beinhalten.

Der Bereich auf der RNA, der für die Aminosäuren F₁-S₁₇ von p6* kodiert, ist für die Ausbildung der Sekundärstruktur für den Leserastersprung verantwortlich (**Abbildung A2 D**). Eine veränderte Effizienz des Leserastersprungs würde sich unweigerlich auf ein verändertes Verhältnis der entstehenden Vorläuferproteine Gag und Gag-Pol auswirken, wie bereits unter Abschnitt A4.4 erwähnt. Daraus resultierende Effekte könnten von den Auswirkungen, die durch Aminosäuresubstitutionen in p6* hervorgerufen werden, nicht mehr unterschieden werden. Dieser Bereich wurde daher ebenso von Mutationen ausgenommen wie die vier carboxylterminalen Aminosäuren S₅₃F₅₄S₅₅F₅₆, die an der Proteaseaktivierung beteiligt sind. Der Bereich von p6*, der in der Folge näher betrachtet werden soll, befindet sich zwischen den Aminosäuren S₁₈-V₅₂ und wird fortan als zentrale Region von p6* definiert (**Abbildung C1.1**).

C 2.1 Der Hauptunterschied zwischen den Provirusklonen HX10 und NL4-3 ist eine 11 Aminosäuren lange Duplikation im zentralen Bereich von p6* und das Fehlen eines intakten nef-Leserahmens. Koexprimiertes Nef wird dennoch in HX10 Viruspartikel eingebaut.

Wie bereits unter Kapitel A7 beschrieben, ist die Duplikation eines 11 Aminosäure langen Abschnitts und eine Isoleucin-Insertion in der zentralen Region von p6* bei mehreren HIV-1-Isolaten zu finden (**Abbildung C1.1**). Neben dem Fehlen eines intakten nef-Leserahmens, ist dies der augenscheinlichste Unterschied zwischen den häufig verwendeten Laborstämmen NL4-3 und den auf dem Isolat BH10 basierenden Provirus HX10.

Ein Aspekt dieser Arbeit lag in der Charakterisierung der postulierten Interaktion zwischen Nef und p6* (40). Um zunächst zu klären, ob heterologe Nef-Proteine in Nef-defiziente HX10-Viren, die über die Duplikation in p6* verfügen, verpackt werden, wurden 293T-Zellen mit einem HX10 Provirus-Konstrukt und Nef-Expressionsplasmid

des NL4-3-Stammes ko-transfiziert. In einem Kontrollansatz wurde anstelle des Nef Konstruktes ein Leervektor verwendet. Die zellfreien Kulturüberstände wurden drei Tage nach Transfektion gesammelt, über einen Filter der Porengröße 0,45 µm gefiltert, die enthaltenen Viruspartikel durch Ultrazentrifugation über ein 20-prozentiges Saccharose-Kissen aufkonzentriert, die pelletierten Viren lysiert und einer Western Blot Analyse unterzogen. Mit einem spezifischen Antikörper konnte das 27 kDa große Nef-Protein nachgewiesen werden. Das Signal, das in beiden Ansätzen bei etwa 37 kDa zu sehen ist, kommt vermutlich auf Grund einer unspezifischen Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem zellulären Protein zu Stande (**Abbildung C2.1**). Es konnte somit gezeigt werden, dass die Duplikation im zentralen Bereich von p6*, wie sie bei HX10 bzw. BH10 oder LAI vorkommt, den Einbau von Nef in Viruspartikel nicht verhindert.

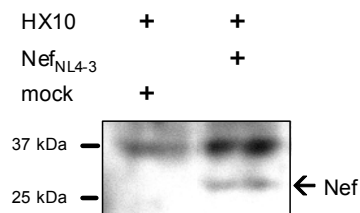


Abbildung C2.1 Nef Inkorporation in HIV_{HX10}-Viruspartikel. 293T-Zellen wurden mit dem proviralen Plasmid HX10 und pcDNA-Nef_{NL4-3} ko-transfiziert (oder zur Kontrolle mit pcDNA3). 72 Stunden nach der Transfektion wurde der Überstand geerntet, die Partikel über Ultrazentrifugation aufkonzentriert, die Proteine gel-chromatographisch aufgetrennt und Nef mit einem spezifischen Antikörper in einer Western Blot-Analyse über Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Positionen der Markerproteine sind angegeben.

Um die biologische Bedeutung dieser Duplikation für die virale Replikation in einem Nef-positiven Hintergrund zu charakterisieren, wurde sie in den entsprechenden Bereich von NL4-3 inseriert und die resultierende Mutante als „dup“ bezeichnet (**Abbildung C2.2**).

C 2.2 Mutationen, die die zentrale Region von p6* abdecken, können so gestaltet werden, dass der überlagerte gag-Leserahmen nicht betroffen ist.

Mutationen, die die Nef-p6*-Interaktion aufheben, sollten sich negativ auf die *in vitro*-Replikation auswirken. Daher wurden neben der Mutante dup zur funktionellen Analyse von p6* sechs weitere provirale Mutanten (Ma-f) auf der Basis des pNL4-3 Provirus-Plasmides hergestellt. Bei ihnen wurden schrittweise Mutationen in den zentralen Bereich von p6* eingeführt (**Abbildung C2.2**). Eine Ausnahme bildet die Mutante a, bei der Substitutionen im Aminoterminus von p6* F₈E, K₁₂S, E₁₅K, F₁₆L,

S₁₇L auch in den Bereich der *frame shift*-Region fallen. Eine Analyse, inwieweit sich dadurch auch die Effizienz des Leserastersprunges verändert wird, findet sich in Abschnitt C2.3. Die Positionen der Mutationen in NL4-3 wurden in Anlehnung an frühere Mutationsstudien in HX10 gewählt (161;163).

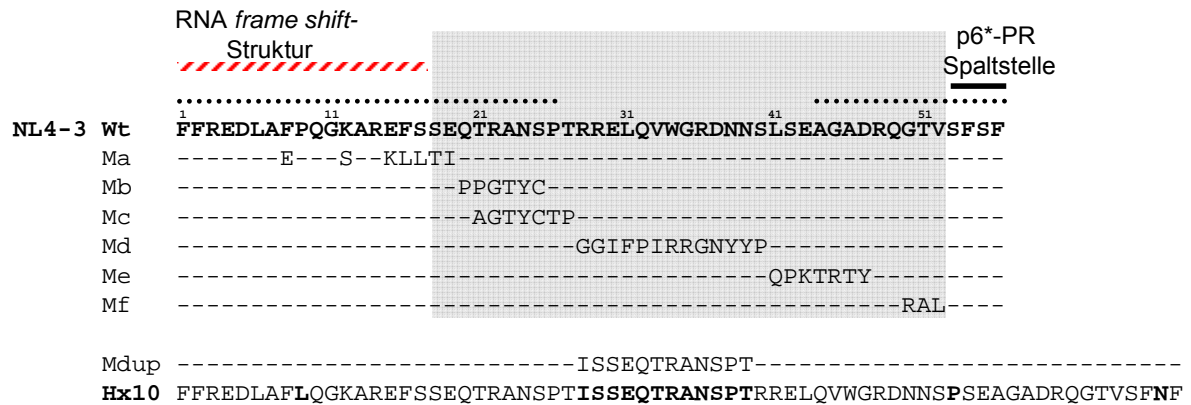


Abbildung C2.2 Schrittweise Mutation der zentralen p6*- Region von HIV-1_{NL4-3}. Die auf RNA-Ebene für die Ausbildung der *frame shift*-Struktur verantwortliche Region (rot-weiß schraffiert) und die Aminosäuren, die im Carboxylterminus zur p6*-PR Spaltstelle beitragen (schwarz), sind durch Linien markiert. Die zentrale p6*-Region ist grau unterlegt, die hoch konservierten Bereiche CR1 und CR2 sind punktiert. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen des p6*_{NL4-3} Wildtypproteins (NL4-3 Wt), der verschiedenen p6*_{NL4-3}-Mutanten (Ma-f und Mdup) und die Sequenz des p6*_{HX10} Wildtypproteins (HX10). Von NL4-3 abweichende Aminosäurereste sind fett markiert. Waagrechte Striche in den Mutanten-Sequenzen repräsentieren unveränderte Aminosäuren.

Bei den Provirusklonen wurden die Aminosäureaustausche in p6* dabei so vorgenommen, dass die überlagerten Aminosäuresequenzen von p1 und p6_{gag} unberührt blieben. Dazu wurde die Nukleotidsequenz so verändert, dass die Aminosäuren für p6* im pol-Leserahmen möglichst wenig konservativ substituiert wurden, gleichzeitig aber keine Austausche im gag-Leserahmen stattfanden (48). Die Aminosäuren R₄₈Q₄₉ konnten auf Grund der Beschaffenheit des degenerierten Codes nicht verändert werden, ohne Mutationen in p6_{gag} zu verursachen und blieben daher in der Mutagenese von p6* unberücksichtigt. Mit den Austauschen in der Nukleotidsequenz kam es auch zu einem veränderten Kodongebrauch. Wie aus der **Abbildung C2.2** deutlich hervorgeht, befinden sich die Mutationen a, b, c, e und f ganz oder teilweise in den hochkonservierten Regionen CR1 und CR2.

C 2.3 Die Effizienz des ribosomalen Leserastersprunges der Mutante a entspricht der des Wt.

Es wäre möglich, dass Nukleotidaustausche im Bereich der *frame shift*-Region die Effizienz des Leserastersprunges beeinträchtigen und so ein verändertes Verhältnis von Gag und Gag-Pol-Vorläuferproteinen in der Translation erzeugen könnten. Dies hätte auch für die Infektiosität und Replikationskinetik der betroffenen Virusmutante einen negativen Effekt. Der Bereich des HIV-1 Leserastersprunges wird von der sogenannten *slippery site* und der *double stem loop*-Struktur gebildet. Es ist durchaus möglich, dass die Integrität der *stem loop*-Struktur durch die markierten Austausche so weit verändert wird, dass der ribosomale Leserastersprung nachhaltig gestört wird. Daher wurden Leseraster-Reporterkonstrukte, basierend auf einem früher beschriebenen Reportersystem (163;186), entworfen. **Abbildung C2.3 A** zeigt die *frame shift*-Regionen des Wt-Virus und der Mutante a, die im -1 Raster vor eine *firefly*-Luciferase-Expressionskassette kloniert wurden, dass nur ein ribosomaler -1 Leserastersprung zur Expression von Luciferase führt. Eine Translation ohne Leserastersprung (0 Raster) verhindert daher die Expression von Luciferase und endet an einem Stopp-Kodon sechs Aminosäuren stromabwärts. Ein zusätzliches Konstrukt (fs-luc) wurde entworfen, bei dem die Zerstörung der *slippery site* und die Insertion eines zusätzlichen Nukleotides konstitutive Expression der Luciferase gewährleistet.

Die Stabilität und Gestalt der RNA-*frame shift*-Region von Wt und Ma ist in **Abbildung C2.3 B** wiedergegeben. Die Berechnung der Sekundärstrukturen und der zugehörigen freien Energie (ΔG) erfolgte nach Zuker und Walter (229;255) und weicht leicht von der von Staple und Butcher vorhergesagten Struktur ab (207) .

Um die Effizienz des Leserastersprunges in der Mutante a im Vergleich zum Wt zu testen, wurden 293T-Zellen mit den Reporterkonstrukten fs-NL, fs-NL-Ma, fs-luc oder mit einem pcDNA3-Leervektor (- Kontrolle) transfiziert. Die Expression der Luciferase wurde 48 Stunden nach der Transfektion durch Zugabe von Luciferin quantifiziert.

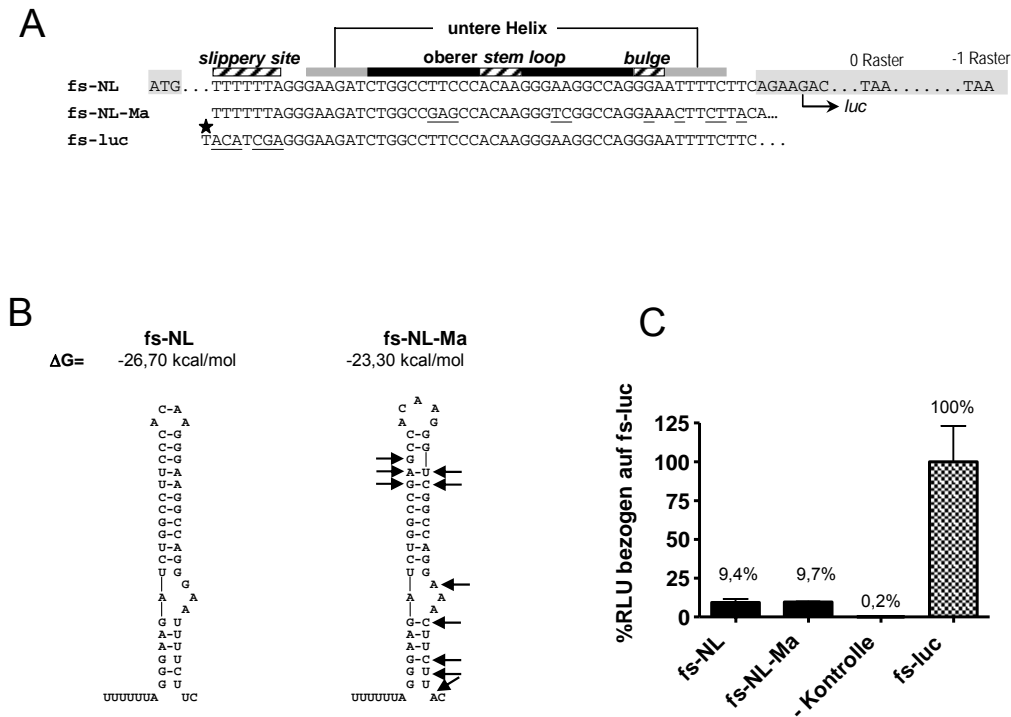


Abbildung C2.3 Funktionelle Analyse der frame shift-Region der NL4-3 Mutante a durch ein Luciferase-Reporter-Experiment. Die Sequenzen der Wt und Ma *frame shift*-Regionen wurden in den 5'-Bereich der *firefly*-Luciferase direkt hinter das entsprechende Start-Kodon kloniert. Nukleotidsubstitutionen in der *slippery site*, der oberen *stem loop*-Struktur, dem *bulge* und der unteren Helix von Ma verglichen mit NL4-3 Wt sind unterstrichen. Das als fs-luc angegebene Reporterkonstrukt besitzt eine durch Nukleotidsubstitutionen zerstörte *slippery site*, wodurch kein Leserastersprung stattfinden kann. Eine Insertion (Sternchen) führt zu konstitutiver Luciferase-Expression im -1 Raster. Die Positionen der Start- und Stopp-Signale im 0 Raster und im -1 Raster sind gekennzeichnet (A). Die Nukleotidsubstitutionen in den entsprechenden RNA-Sekundärstrukturen sind mit Pfeilen markiert (B). 293T-Zellen wurden mit den oben beschriebenen Reporterkonstrukten oder einem Leervektor (- Kontrolle) transfiziert und die Zell-assoziierte Luciferaseaktivität 48 Stunden später quantifiziert. Die Luciferaseaktivität ist angegeben als relative Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) bezogen auf fs-luc. Die Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die in Doppelansätzen durchgeführt wurden (C).

Wie in **Abbildung C2.3 C** dargestellt, wurde in allen Zellen, die mit einem der drei Reporterkonstrukte transfiziert worden waren, Luciferase exprimiert. Im Kontroll-Ansatz konnte hingegen kein Signal detektiert werden. Die Luciferase-Expression der Konstrukte fs-NL (9,4%) und fs-NL-Ma (9,7%) führte mit vergleichbarer Effizienz zum Leserastersprung. Dies deutet darauf hin, dass die entsprechenden Mutationen keinen Einfluss auf die *frame shift*-Funktion haben.

C 2.4 Die Mutationen im zentralen p6*-Bereich haben keinen Einfluss auf die Partikelfreisetzung, die Prozessierung von Gag oder die Inkorporation von Nef in Viruspartikel.

Zunächst sollte überprüft werden, inwieweit die aufgeführten Mutationen im zentralen Bereich von p6* die Viruspartikelproduktion, die Prozessierung und den Einbau von Nef in das Viruspartikel beeinflussen können. Zu diesem Zweck wurden 293T-Zellen mit der Wt- und der nef-deletierten-Variante von NL4-3 (Δ nef), den Mutanten a-f oder mit der Mutante dup und der nef-deletierten dup Mutante (dup Δ nef) transfiziert. Die zellfreien Kulturüberstände wurden drei Tage nach Transfektion gesammelt, darin enthaltene Viruspartikel über Ultrazentrifugation aufkonzentriert und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die Präsenz einer deutlichen Bande bei 55 kDa in allen Spuren zeigt, dass der Gag-Polyproteinvorläufer von den transfizierten Zellen produziert und Viruspartikel ins Medium freigesetzt wurden. Da in allen Spuren vergleichbare Mengen des Polyproteins detektierbar waren, scheinen die p6*-spezifischen Mutationen keinen Einfluss auf die Virusfreisetzung zu haben. Der Nachweis des vollständig prozessierten CA-Proteins in allen Spuren deutet weiter darauf hin, dass auch die von der viralen PR vollzogene Prozessierung des Gag (p55)-Vorläuferproteins zu CA (p24) durch die eingeführten Mutationen offensichtlich nicht beeinträchtigt wurde (**Abbildung C2.4** oben). Diese im NL4-3-Kontext gewonnenen Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen in HX10 (161).

Von Costa und Kollegen (40) wurde eine Interaktion zwischen Nef und p6* postuliert. Während die Bindestelle im carboxyterminalen Bereich von Nef bereits lokalisiert werden konnte, ist die verantwortliche Binderegion in p6* noch nicht bekannt. Sollte Nef im zentralen Bereich von p6* spezifisch binden, würde mindestens eine der sequentiell mutierten Regionen zum Verlust der Bindung führen. Dies könnte wiederum die vorgeschlagene Verpackung von Nef in Viruspartikel über die Interaktion mit p6* beeinträchtigen. Über die sequentiellen Mutationen in p6* sollte demnach eine Lokalisation der Bindestelle im zentralen Bereich von p6* möglich sein.

Der Nachweis von Nef und seiner von der PR hervorgerufenen Spaltprodukte (Abschnitt A6.5) gelang in allen mutierten Viren (**Abbildung C2.4** unten). Interessanterweise konnten hierbei beide Haupt-Abbauprodukte nachgewiesen werden, was auch schon Kotov und Kollegen zeigen konnten (116). Lediglich in den Nef-defizienten Virusvarianten konnten, wie erwartet, keine Nef-spezifischen Produkte detektiert werden (Spur 2 und 10). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mutationen im

zentralen Bereich von p6* weder die Partikelproduktion und Prozessierung von Gag durch die PR, noch den Einbau von Nef in Viruspartikel beeinträchtigen.

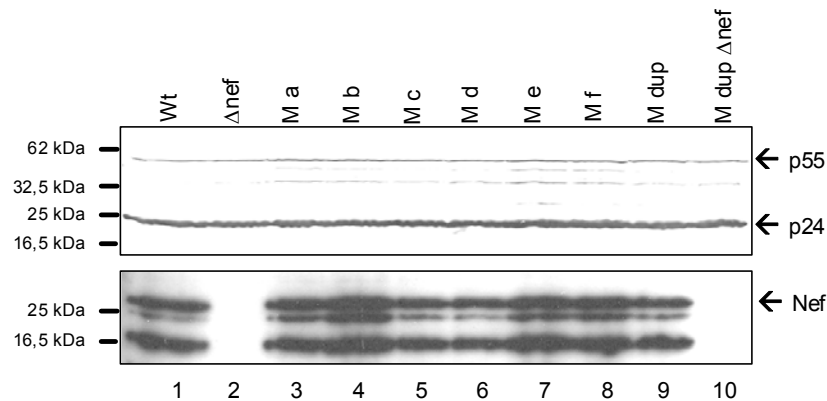


Abbildung C2.4 Einfluss der Mutationen in p6* auf die Viruspartikelfreisetzung, die Prozessierung der Polyproteinvorläufer und die Inkorporation von Nef. 293T-Zellen wurden mit den proviralen Plasmidkonstrukten NL4-3 Wt, Δ nef, M a-f, Mdup und Mdup Δ nef transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die gebildeten Viruspartikel mit dem Überstand geerntet, über Ultrazentrifugation aufkonzentriert und die Proteine über ein denaturierendes Gel chromatographisch aufgetrennt. Mit einem CA-spezifischen Antikörper wurden Gag-Polyproteinvorläufer und CA-haltige Prozessierungsintermediate über Chemilumineszenz nachgewiesen (oben). Der Nachweis Nef-spezifischer Produkte erfolgte entsprechend mit einem polyklonalen Antiserum (unten). Die Positionen der Markerproteine sind angegeben.

C 2.5 Die Duplikation in p6* hat einen positiven Einfluss auf die Infektiosität von HIV-1.

Nef ist als bedeutender und potenter Pathogenitätsfaktor bei HIV-1 bereits gut untersucht. Ein Fehlen von Nef zeigt sich in einem deutlichen Rückgang der Infektiosität und der Replikationskompetenz entsprechender Viren (Kapitel A6). Die Ergebnisse aus Abschnitt C2.4 zeigten, dass Nef unabhängig von den Mutationen in der zentralen p6*-Region in Viruspartikel inkorporiert wird. Es ist aber möglich, dass die beschriebenen sequentiellen Mutationen im zentralen p6*-Bereich die Infektiosität des Virus beeinträchtigen, wenn sie die Interaktion zwischen Nef und p6* zerstören. Welche Rolle in diesem Zusammenhang die beschriebene Duplikation spielt und ob sie wirklich einen positiven Effekt auf die Replikation Nef-defizienter Viren hat, sollte im Weiteren geklärt werden.

Daher wurden zunächst die Infektiosität der beschriebenen Virusmutanten in einem MAGI-Assay untersucht, der unter Abschnitt F5.7 beschrieben ist. Dazu wurden 293T-Zellen mit den entsprechenden proviralen Konstrukten transfiziert und drei Tage später der zellfreie, virushaltige Überstand abgenommen. Die Menge des darin

enthaltenen CA (p24)-Proteins wurde über ELISA bestimmt und normalisiert um anschließend CD4- exprimierende HeLa-Reporterzellen (MAGI-Zellen) mit gleichen Virusäquivalenten zu infizieren. Das Ergebnis dieser Studie zeigt **Abbildung C2.5**. Die Infektiosität gemessen an der Anzahl der infizierten Zellen wurde für den Wt auf 100% normiert. Wie vermutet, war die Infektiosität der Mutante, die eine Nef-Deletion (Δ nef) trägt, im Vergleich zum Wt, um mehr als 85% reduziert. Der gleiche Nef-spezifische Effekt ließ sich beim Vergleich der Mutante dup mit der Mutante dup Δ nef ableiten. Interessanterweise zeigten die Virusmutanten a-f eine dem Wt ähnliche Infektiosität, die Schwankungen lagen in einem Bereich von -10% bis + 35%. Lediglich die Mutante mit der Duplikation im zentralen p6*-Bereich wies, verglichen mit dem Wt-Virus, eine deutlich, etwa um 60% erhöhte Infektiosität auf. Des Weiteren war auch bei den Nef-defizienten Viren durch die Duplikation im zentralen p6*-Bereich eine auffällige Zunahme der Infektiosität um 200% festzustellen (vergleiche Δ nef mit Mdup Δ nef).

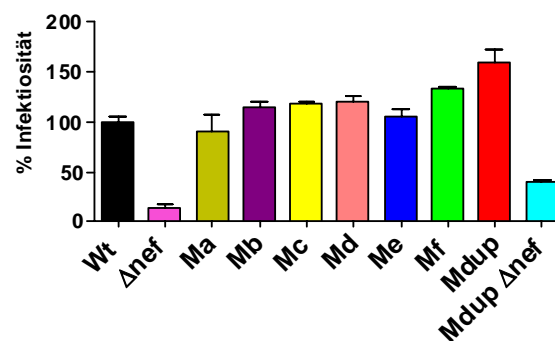


Abbildung C2.5 Einfluss der p6* Mutationen auf die Infektiosität der Viruspartikel. 293T-Zellen wurden mit den Konstrukten NL4-3 Wt, Δ nef, Ma-f, Mdup und Mdup Δ nef transfiziert und der virushaltige Überstand 72 Stunden nach Transfektion über einen p24-ELISA quantifiziert. Zur Bestimmung der Infektiosität wurden CD4-positive HeLa-Zellen, die einen LTR- β -Galaktosidase-Indikator enthalten (MAGI), jeweils mit gleichen Mengen an Viruspartikeln, die bezüglich ihres CA-Gehaltes normiert wurden, infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die Anzahl der infizierten (blauen) Zellen bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf die Wt-Infektiosität (=100%) bezogen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente und die Standardabweichung vom Mittelwert ist jeweils angegeben.

Diese Daten legen nahe, dass Mutationen im zentralen Bereich von p6* keinen wesentlichen Einfluss auf die Infektiosität der Viren haben. Allerdings führte die 11 Aminosäuren umspannende Duplikation in p6* in diesem Test zu einer erhöhten Infektiosität von Nef-exprimierenden als auch Nef-defizienten Viren, was darauf hindeutet, dass dieser Effekt Nef-unabhängig ist.

C 2.6 Die Punktmutationen in der zentralen p6*-Region zeigten keinen, die Duplikation einen Zelltyp-spezifischen Einfluss auf die *in vitro*-Replikation von HIV-1.

Da mit Hilfe des monozyklischen MAGI-Tests nur das frühe Stadium des HIV-1 Replikationszyklus abgebildet wird, wurden die Mutanten in verschiedenen permissiven Zellkultursystemen getestet, die einen vollständigen Replikationszyklus erlauben. Dazu wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von HIV-1 negativen Spendern und zwei T-lymphozytoide Krebszelllinien (CEM und MT4) mit normalisierten virushaltigen Überständen transfizierter 293T-Zellen infiziert. Die Gewinnung und Kultivierung dieser Zellen ist unter Abschnitt F4.1 dokumentiert. Das Replikationsverhalten der Virusmutanten wurde durch regelmäßige Bestimmung des CA-Gehaltes in den Zellkulturüberständen über einen Zeitraum von 19 Tagen beobachtet.

Abbildung C2.6 A zeigt den Replikationsverlauf des NL4-3 Wildtypvirus (Wt) und der Δ nef-Variante in PBMCs, sowie die Kinetiken der Mutanten a-f, der Mutante dup und der entsprechenden Variante mit Duplikation und Nef-Deletion (Mdup Δ nef). Man erkennt nach einem schnellen Anstieg der p24-Konzentration im Wt-Ansatz, dass die Virusmenge am Tag 5 nach Infektion ihren maximalen Wert erreicht hat. Dies trifft auch für die Mutanten a-f zu (Zur besseren Unterscheidung der Viruskonzentrationen in den einzelnen Replikationsansätzen wurden die p24-Mengen zu diesem Zeitpunkt in einem Balkendiagramm aufgetragen, wie in **Abbildung C2.6 D** gezeigt). Die Mutanten Δ nef und dup Δ nef wiesen hingegen einen wesentlich flacheren Anstieg der Replikationskurve auf. In diesen Ansätzen wurde die höchste p24-Konzentration erst am Tag 11 bzw. 13 erreicht.

Wie bei Infektion der MAGI-Reporterzelllinie, zeigte sich auch beim Replikationsverhalten von HIV-1_{NL4-3} in PBMCs eine deutliche Nef-Abhängigkeit. Am Tag 5, an dem der Wt-Replikationsansatz seine maximale Virusproduktion erreicht hatte, war die des Δ nef-Ansatzes um mehr als das 20-fache verringert, was aus **Abbildung C2.6 D** deutlich hervorgeht. Vergleicht man die Verläufe der Replikationskinetiken von Wt und Δ nef in **Abbildung C2.6 A**, so lässt sich die verringerte Replikationskompetenz von Δ nef an drei Faktoren festmachen: Erstens ist die Zunahme der p24-Konzentration deutlich verringert, was aus der geringeren Steigung der Kurve ersichtlich ist. Zweitens ist der maximale Virustiter geringer als beim Wt und drittens ist der Zeitpunkt, an dem der maximale Virustiter auftritt, deutlich verzögert. Für die Mutanten a-e konnte hingegen kein nennenswerter Unterschied im Replikationsverhalten bezogen auf den Wt festgestellt werden, da hier die Steigung der Replikationskurve,

der Zeitpunkt und die Höhe des maximalen Virustiters annähernd identisch waren. Jedoch lässt sich eine, im Vergleich zum Wt leicht erhöhte Viruskonzentration an Tag 5 bei Mutante f und Mutante dup erkennen. Vergleicht man die beiden Nef-defizienten Virusmutanten Δ nef und dup Δ nef miteinander, scheint auch hier die Duplikation in p6* einen positiven Einfluss auf die Replikation zu haben. Dieser positive Effekt auf die Replikation ist jedoch weit geringer als der, den Nef vermittelt. Ähnlich wie in der Infektionsstudie scheint die Duplikation auch die Replikation von Nef-defizienten und Nef-exprimierenden Viren gleichermaßen zu begünstigen.

Der Vergleich der beiden Zellkultursysteme PBMC und CEM zeigte, dass die Replikation in PBMCs rascher zu großen Mengen an neuen Viren führte. Mikroskopie und der Verlauf der Replikationskinetiken ergaben, dass der Zeitpunkt, zu dem alle Zellen eines Ansatzes infiziert waren, schneller erreicht wurde als in CEM-Zellen. Bei der Replikation von Wt-Viren in PBMCs wurde der maximale Virustiter bereits am Tag 5 mit einer CA-Konzentration von über 500 ng/ml erreicht. In CEM-Zellen lag sie zum selben Zeitpunkt bei unter 5 ng/ml, der maximale Virustiter trat erst 8 Tage später auf (vergleiche **Abbildung C2.6 A** mit **B**). Eine verzögerte Replikation führte in den Zellkulturen zu höheren Zellzahlen, da uninfizierte Zellen weiter proliferieren. Daher ist die ermittelte Menge an p24 zu späteren Zeitpunkten auch höher, weil mehr Zellen infiziert werden konnten. Zudem handelt es sich bei CEM um eine immortalisierte Zelllinie, deren Proliferation verglichen mit PBMCs, die nicht oder nur sehr begrenzt Zellteilungen eingehen, deutlich erhöht ist.

Betrachtet man die Verläufe der Replikationskinetiken von Wt und Δ nef in CEM-Zellen (**Abbildung C2.6 B**), erkennt man auch hier die starke Nef-Abhängigkeit der Replikation. Die Steigung der Δ nef-Replikationskurve zwischen Tag 7 und 11 ist deutlich geringer als die des Wt. Ab diesem Zeitpunkt entspricht die Steigung aber der des Wt zwischen Tag 9 und 13. Der maximale Virustiter wird im Δ nef-Ansatz an Tag 17 und im Wt-Ansatz an Tag 13 erreicht (**Abbildung C2.6 E**). Die Tatsache, dass die p24 Menge in den Δ nef-Ansätzen am Tag 17 höher ist als die des Wt an Tag 13, lässt sich wieder über die höhere Zellanzahl zu diesem Zeitpunkt erklären. Trotzdem beeinträchtigte ein Fehlen von Nef die Virusreplikation in CEM-Zellen nicht in dem Maße, wie es in PBMCs zu beobachten war (vergleiche **Abbildungen C2.6 A** und **D** mit **B** und **E**). Darüber hinaus zeigte sich, im Gegensatz zu den Ergebnissen mit PBMCs, bei Nef-exprimierenden Viren kein positiver Einfluss der Duplikation auf die Replikation. Bei Nef-defizienten Viren rief die Duplikation sogar einen deutlich negativen Effekt auf die Replikation hervor. Die Mutanten a-f zeigten dagegen Wt-ähnliches Replikationsverhalten.

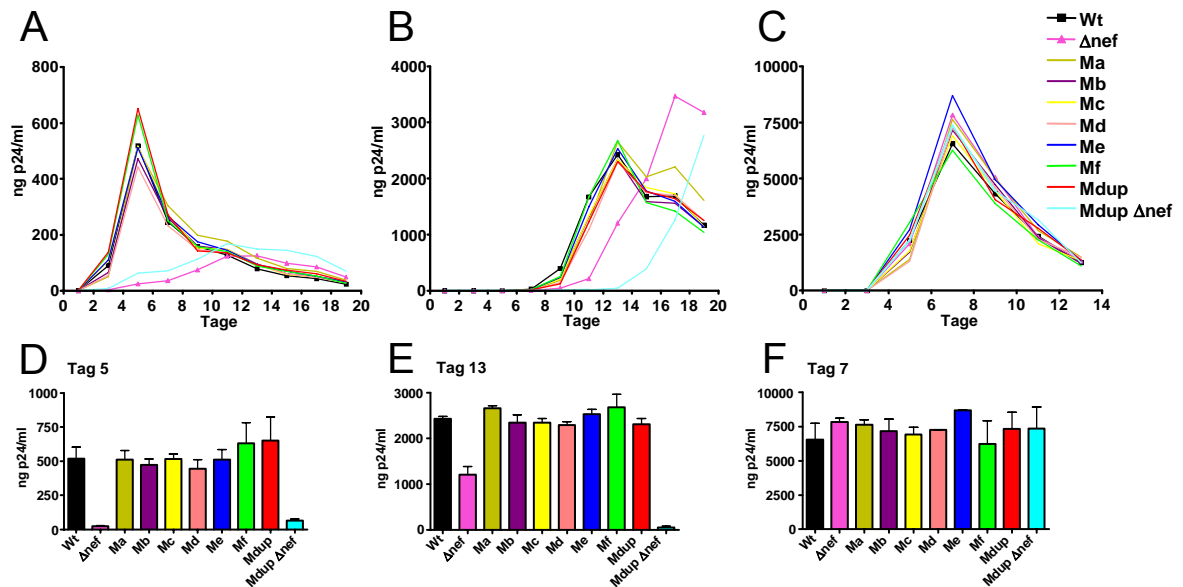


Abbildung C2.6 Einfluss der p6* Mutationen auf die virale Replikation. 293T-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und der CA (p24)-Gehalt in den virushaltigen Überständen 72 Stunden nach der Transfektion über einen p24-ELISA quantifiziert. Zur Bestimmung der Replikationskinetiken wurden 2×10^6 PBMCs, CEM und MT4-Zellen jeweils mit gleichen Mengen an Viruspartikeln (normiert über die quantifizierten p24-Mengen) in Doppelansätzen infiziert. Im Abstand von zwei Tagen wurden Proben der Überstände gewonnen und deren Viruskonzentration mit einem p24-ELISA bestimmt (A, B, C). Die Balkendiagramme (D, E, F) zeigen die p24-Menge in den Überständen der einzelnen Replikationsansätze zum Zeitpunkt des maximalen Wt-Virustiters. Die Kurvenpunkte der Replikationskinetiken entsprechen den Mittelwerten von Doppelansätzen. Die entsprechenden Standardabweichungen sind angegeben. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit unterschiedlichen Viruspräparationen.

MT4-Zellen sind permissive, besonders leicht infizierbare Zellen. Im Gegensatz zu CEM-Zellen replizieren Nef-exprimierende und Nef-defiziente HI-Viren in ihnen annähernd gleich gut (47). Dies geht auch hier aus dem Vergleich der Replikationskurven von Wt und Δ nef hervor (**Abbildung C2.6 C und F**). Deshalb wurde diese Zelllinie herangezogen, um mögliche Nef-unabhängige Effekte der p6*-Mutationen in replizierenden Viren zu quantifizieren. Wie dargestellt, zeigte keine der Mutanten einen deutlich vom Wt abweichenden Replikationsverlauf. Unabhängig von Nef konnte damit kein Einfluss der p6*-spezifischen Mutationen auf die virale Replikation in MT4-Zellen festgestellt werden.

Zusammengefasst zeigen diese Replikationsexperimente, dass die schrittweise Mutation der zentralen p6*-Region, realisiert in den Mutanten a-f, keinen signifikanten Einfluss auf die Kinetik der Virusreplikation in CEM- und MT4-Zelllinien hatte. In CEM-

Zellen wirkte sich die Duplikation im zentralen Bereich von p6* negativ auf die Replikation Nef-defizienter Viren aus. Auf Nef-exprimierenden Viren hatte sie keinen Einfluss. Im Gegensatz dazu begünstigte diese Duplikation unabhängig von Nef die Replikation in PBMCs, was am ehesten einer *in vivo*-Situation entspricht.

C 2.7 In direkter Konkurrenz mit dem Wt-Virus repliziert die Mutante mit der 11 Aminosäuren langen Duplikation ineffizienter.

Da in den oben beschriebenen Replikationsstudien keine Effekte auf Grund der Mutationen a-f in der zentralen Region von p6* festgestellt werden konnten, wurde die virale Fitness der Mutanten in einem sensitiveren System analysiert. Dazu wurde wiederum der in Abschnitt C1.3 beschriebene Konkurrenz-Replikations-Test herangezogen, bei dem Zellen gleichzeitig von zwei unterschiedlichen Viren infiziert werden.

Zu diesem Zweck wurden CEM-Zellen jeweils mit der gleichen Menge des Wt-Virus und einer Virusmutante (a, b, c, d, e, f oder dup) infiziert und die Ausbreitung der konkurrierenden Infektionen über die Integration der viralen Genome in das zelluläre Genom bestimmt. Auch in diesem sensitiven Nachweissystem führten die beschriebenen Mutationen im zentralen Bereich von p6* zu keinem Replikationsnachteil gegenüber den Wt-Viren. Das Verhältnis von Wt:Mutante blieb für alle Ansätze über die gesamte Zeit konstant (beispielhaft gezeigt für Wt:Mc, **Abbildung C2.7 A und C**). Im Unterschied dazu wurden Mdup-Viren allmählich von Wt-Viren verdrängt (**Abbildung C2.7 B und D**).

Ein Vergleich zwischen den an den Tagen 1 und 21 ermittelten Verhältnissen für alle Konkurrenz-Replikations-Experimente ist in **Abbildung C2.7 E** gezeigt. Für die Ansätze, in denen der Wt und Mutanten a, b, c, d, e und f konkurrierten, war keine nennenswerte Verschiebung des Verhältnisses zu beobachten. Die ermittelten Werte lagen im Bereich zwischen 0,8 und 1,3. Jedoch zeigte sich, dass die Mutante dup dem Wt unterlegen war, was zu einem Anstieg von Wt-Viren gegenüber Mdup in der Kultur um den Faktor 2,3 führte. Als Kontrolle diente die bereits in Abschnitt C1.3 beschriebene Mutante csM5, die durch eine Mutation in der p6*-PR Spaltstelle einen deutlichen Replikationsnachteil in Konkurrenz mit Wt_{HX10} aufwies.

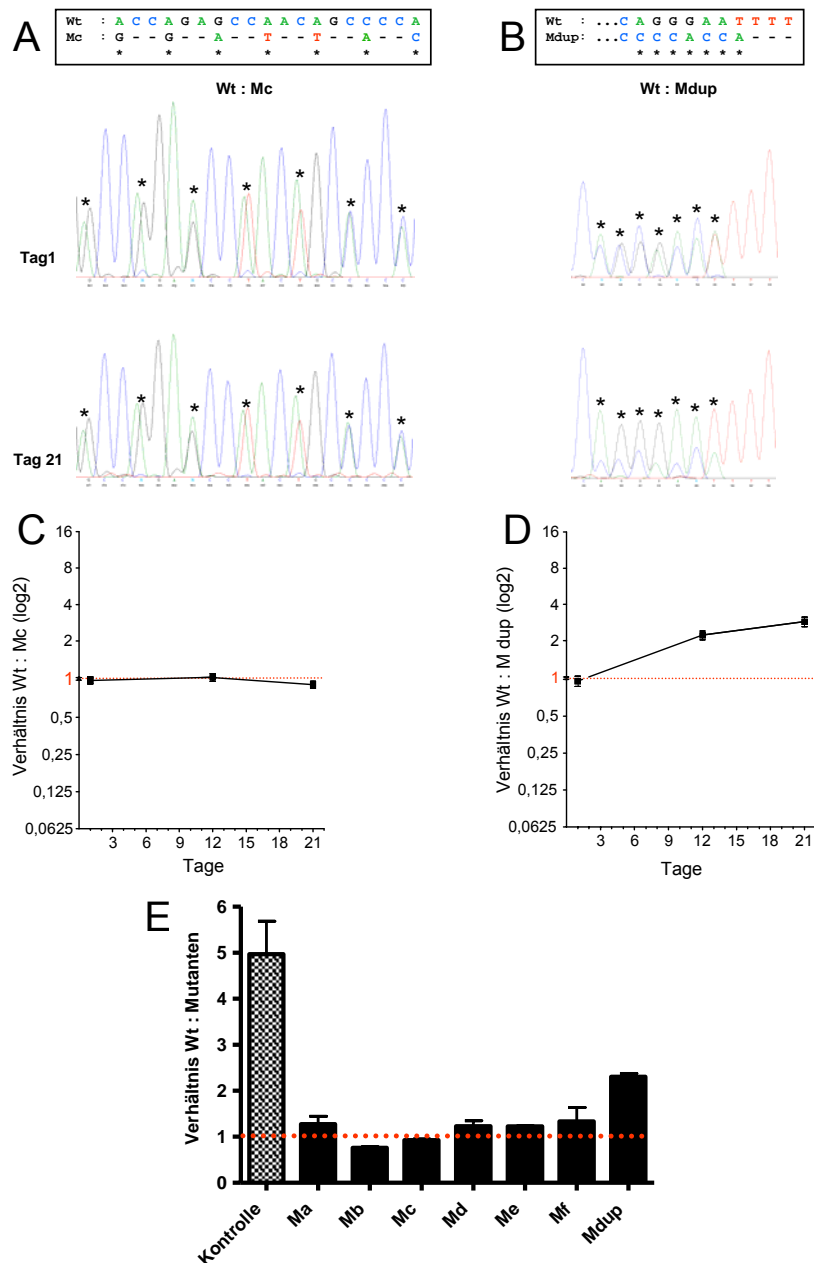


Abbildung C2.7 Kompetitions-Replikations-Test zwischen NL4-3 Wildtyp und den p6*-Mutanten a-f und dup. CEM-Zellen wurden mit gleichen Mengen an Wt-Virus und Mutante inkubiert. 1, 12 und 21 Tage später wurden Zellproben aus den Ansätzen entnommen, die genomische DNA isoliert, mit spezifischen Primern integrierte virale DNA amplifiziert und sequenziert. Die Boxen zeigen exemplarisch die p6*-Regionen für Mc und Mdup, in denen sich die Mutanten in ihrer Nukleotidsequenz vom Wt unterscheiden. Die entsprechenden Positionen sind mit Sternen markiert. Die aus der Sequenzierung an den Tagen 1 und 21 hervorgegangenen Chromatogramme lassen die überlagerten Signale beider viralen Genome im betreffenden p6*-Abschnitt erkennen (Sterne) (A, B). Die Verhältnisse der Signalhöhen von Wt:Mutante wurden für alle mit Sternen markierten Positionen bestimmt und ein Durchschnittswert für jeden Zeitpunkt ermittelt. Die Durchschnittswerte der Kompetitions-Replikations-Tests Wt:Mc und Wt:Mdup wurden exemplarisch in einem binär logarithmischen Diagramm gegen die Zeit aufgetragen (C, D). Die Änderung dieser Verhältnisse zwischen Tag 1 und 21 ist für alle Kompetitions-Replikations-Tests in einem Balkendiagramm dargestellt (E). Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist jeweils angegeben.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Virusmutanten a-f auch in einem Kompletions-Replikations-Test in ihrer Replikationskinetik mit dem Wt-Virus vergleichbar waren. Jedoch benachteiligte die 11 Aminosäuren lange Duplikation in p6* nicht nur Nef-defiziente Viren, wie in Abschnitt C2.6 beschrieben, sondern auch Nef-exprimierende Viren in ihrer Replikation in CEM-Zellen. Verglichen mit einer mutierten p6*-PR-Spaltstelle (Faktor 5) ist die Duplikation (Faktor 2,3) jedoch ein geringerer Nachteil.

C 2.8 Der Einfluss der p6*-Duplikation auf die Virusreplikation ist Zelltyp-spezifisch.

In einem direkten Vergleich Nef-defizienter Viren konnte beobachtet werden, dass in PBMCs die Replikationskinetik von HX10 diejenige von NL4-3 Δ nef übertrifft. Dies konnte unabhängig in Zellen von zwei unterschiedlichen Spendern nachgewiesen werden. Dagegen erreichte NL4-3 Δ nef in CEM-Zellen schneller höhere Virustiter als HX10 (**Abbildung C2.8**). Wie schon erwähnt, trägt der auf BH10 basierende

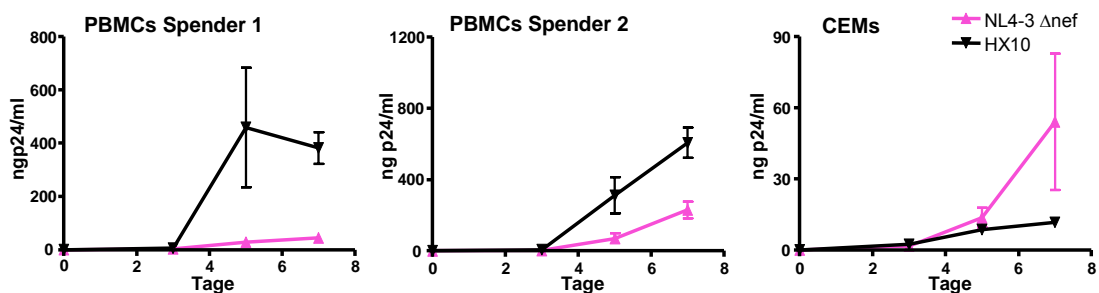


Abbildung C2.8 Vergleich der Replikationskinetik von HX10 und NL4-3 Δ nef in PBMCs und CEM-Zellen. 293T-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und der CA (p24)-Gehalt in den virushaltigen Überständen 72 Stunden nach der Transfektion über einen p24-ELISA quantifiziert. Zur Bestimmung der Replikationskinetiken wurden 2×10^6 PBMCs und CEM-Zellen jeweils mit gleichen Mengen an Viruspartikeln (normiert über die quantifizierten p24-Mengen) in Doppelansätzen infiziert. An verschiedenen Tagen wurden Proben der Überstände gewonnen und deren Viruskonzentration mit einem p24-ELISA bestimmt. Die Kurvenpunkte der Replikationskinetiken entsprechen den Mittelwerten von Doppelansätzen, die entsprechenden Standardabweichungen sind angegeben.

Provirusklon HX10, die 11 Aminosäuren umspannende Duplikation in p6*, NL4-3 hingegen nicht. Vergleiche der Aminosäuresequenzen von HX10 und NL4-3 Δ nef ergaben, dass die p6*-Duplikation den auffälligsten Unterschied zwischen den beiden Klonen darstellt (Kapitel A7).

Diese Ergebnisse deuten wiederum stark darauf hin, dass die Duplikation in p6* die Virusreplikation in Abhängigkeit des verwendeten Zellkultursystems unterschiedlich beeinflusst und dass dieser Effekt unabhängig von der Expression von Nef ist.

C 2.9 Die Mutation des gesamten zentralen Bereichs von p6* beeinflusst weder die Partikelfreisetzung noch die Prozessierung des Gag-Vorläufers oder den Einbau von Nef in Viruspartikel.

Die sequentielle Mutation des zentralen p6*-Bereichs hatte nicht zur Identifizierung einer möglichen Nef-Bindestelle geführt. Keine der Mutanten a-f wies einen Defekt der Partikelfreisetzung oder der Prozessierung der Vorläuferproteine auf. Auch ihr Replikationsverhalten war, mit Ausnahme von Mdup, unverändert. Aus diesem Grund wurde eine weitere Mutante entworfen, bei der die gesamte zentrale p6*-Region substituiert war. Mit dieser Mutante, die im Weiteren als Mtot bezeichnet wird, sollte ausgeschlossen werden, dass es zu einer Interaktion zwischen Nef und der zentralen p6*-Region kommt, die unter Umständen auf mehreren Bindestellen innerhalb der p6*-Sequenz beruht. Darüber hinaus sollte eine so weitreichende Mutation von p6* mögliche funktionelle Domänen im zentralen Bereich ausschalten. Für p6* ist zwar keine definierte Sekundär- oder Tertiär-Struktur festgestellt worden, jedoch wurde vorgeschlagen, dass durch die Interaktion mit der PR (oder anderen Proteinen) eine mögliche Konformationsänderung eintritt (13;161 und Abschnitt A5.1). Auch dies sollte bei Mtot auszuschließen sein.

Mutante tot umfasst alle sequentiellen Mutationen von a-f. Zusätzlich wurden die drei Wt- Aminosäuren Q₃₂, V₃₃ und L₄₁ nicht wie in Mutante d bzw. e gegen P₃₂, I₃₂ und Q₄₁, sondern gegen die noch weniger konservierten S₃₂, F₃₂ und E₄₁ ausgetauscht. In dieser Mutante war somit der gesamte zentrale p6*-Bereich (mit Ausnahme der Aminosäuren R₄₈Q₄₉) substituiert. Inklusive der auch in Mutante a eingeführten Austausche im Aminoterminus waren damit insgesamt 38 von 56 möglichen Aminosäuren in p6* substituiert (**Abbildung C2.9** und zum Vergleich **C2.2**). Der auf HIV-1 angewandte *codon adaptation index* (CAI) für p6* änderte sich dadurch von 0,683 (Wt) auf 0,571 (Mtot).

Um den Einfluss dieser Mutation auf die Produktion von Viruspartikeln, die Prozessierung der Polyproteine, sowie auf die Inkorporation von Nef in Viruspartikel zu analysieren, wurden 293T-Zellen mit NL4-3 Wt, NL4-3 Mtot und den entsprechenden nef-deletierten Varianten transfiziert. Drei Tage nach Transfektion wurden die zellfreien Kulturüberstände gesammelt und darin enthaltene Viruspartikel

über Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Das Ergebnis einer in **Abbildung C2.9 B** dargestellten Western Blot-Analyse mit einem CA-spezifischen Antikörper zeigt deutlich eine Gag-spezifischen Bande bei 55 kDa in allen vier Spuren. Ebenfalls konnte in allen Ansätzen die Prozessierung von Gag zu CA anhand der 24 kDa-Bande

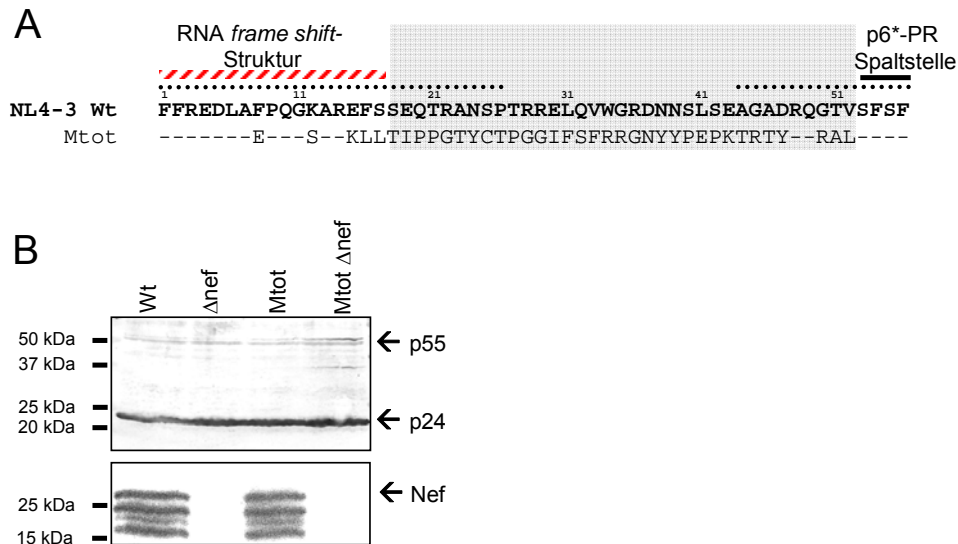


Abbildung C2.9 Einfluss der Mutation tot auf die Viruspartikelfreisetzung, Polyprotein-Prozessierung und Inkorporation von Nef in Viruspartikel. Die RNA-frame shift-Region (rot-weiß schraffiert) und die Aminosäuren, die im Carboxylterminus zur p6*-PR Spaltstelle beitragen (schwarz), sind durch Linien markiert. Die hoch konservierten Bereiche CR1 und CR2 sind punktiert, die zentrale p6*-Region grau unterlegt dargestellt. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen des p6*-NL4-3 Wildtypproteins (NL4-3 Wt) und der Mutante tot (Mtot). Waagrechte Striche repräsentieren unveränderte Aminosäuren (A). 293T-Zellen wurden mit den proviralen Plasmidkonstrukten NL4-3 Wt, Δ nef, Mtot und Mtot Δ nef transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden die gebildeten Viruspartikel mit dem Überstand geerntet, über Ultrazentrifugation aufkonzentriert und die Proteine über ein denaturierendes Gel chromatographisch aufgetrennt. Mit einem CA-spezifischen Antikörper wurden Gag-Polyproteinvorläufer und prozessiertes CA über Chemilumineszenz nachgewiesen (oben). Der Nachweis von Nef-spezifischen Produkten erfolgte entsprechend mit einem polyklonalen Antiserum (unten). Die Positionen der Markerproteine sind angegeben (B).

nachgewiesen werden. Dabei waren keine Unterschiede zwischen den vier verschiedenen Viren festzustellen. Dies deutet darauf hin, dass die Produktion von Viruspartikeln durch diese Mutation nicht gestört wurde.

Ein immunochemischer Nachweis ergab erwartungsgemäß in Lysaten von Δ nef- und Mtot Δ nef-Viren kein Nef-spezifisches Signal. Hingegen konnte sowohl in Wt- als auch in Mtot-Viruspartikeln das 27 kDa große Nef-Protein und dessen Spaltprodukte detektiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Mutation des gesamten

zentralen Bereichs von p6* weder die Partikelproduktion noch die Prozessierung des Gag-Vorläufers durch die PR beeinflusst. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Nef unabhängig vom zentralen p6*-Bereich in Viruspartikel verpackt wird.

C 2.10 Durch die Mutation des gesamten zentralen p6*-Bereichs wird die Infektiosität und Replikation von HIV-1 beeinträchtigt.

Nachdem in Abschnitt C2.9 ein Einfluss des zentralen Bereichs auf Partikelproduktion, Prozessierung und Nef-Inkorporation in Viruspartikel ausgeschlossen werden konnte, sollte auch die Infektiosität und Replikationskapazität von Mtot getestet werden. In Analogie zu der in Abschnitt C2.5 beschriebenen Infektionsstudie wurden MAGI-Reporterzellen mit Wt-, Δ nef-, Mtot- und Mtot Δ nef-Viren infiziert. Erwartungsgemäß wurde die Infektiosität der Viren durch die Absenz von Nef stark reduziert, was der Vergleich von Wt mit Δ nef in **Abbildung C2.10 A** zeigt. Interessant ist hingegen, dass die Mutation des gesamten zentralen Bereichs eine 50-prozentige Reduktion der Infektiosität hervorruft. Darüber hinaus verringerte diese Mutation gleichermaßen auch in Nef-defizienten Viren die Infektiosität um 57% (vergleiche Wt mit Mtot und Δ nef mit Mtot Δ nef).

Nachdem man beobachtete, dass die Infektiosität von Nef-exprimierenden und Nef-defizienten Viren gleichermaßen durch die tot-Mutation abnimmt, wurde auch das Replikationsverhalten dieser Mutante in verschiedenen Zellkultursystemen analysiert. Dazu wurden analog zu Abschnitt C2.6 wieder PBMCs, CEM- und MT4-Zellen infiziert. Im Gegensatz zu den sequentiellen Mutationen führte die komplette Substitution des zentralen p6*-Bereichs zu einer Verzögerung der Virus-Replikation von Nef-exprimierenden Viren in PBMCs (**Abbildung C2.10 B**). Die Steigung der Replikationskurve von Mtot war im Vergleich zum Wt bis Tag 5 geringer, wodurch der maximale Virustiter erst 2 Tage später erreicht wurde. Auch die Replikation des ohnehin schwächer replizierenden Nef-defizienten Virus wurde durch die tot-Mutation beeinträchtigt. Mtot Δ nef zeigte bis Tag 9 verglichen mit Δ nef eine geringere Steigung der Replikationskurve und einen insgesamt geringeren Virustiter. Der Vergleich der Virustiter an Tag 5 verdeutlicht diesen Effekt (**Abbildung C2.10 E**).

Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Replikationstests in CEM-Zellen gewonnen.

Auch hier hatte die Mutation tot einen deutlich negativen Effekt auf die Virusreplikation, was sich in einer geringeren Steigung der entsprechenden Replikationskurve bis Tag 13 zeigte (**Abbildung C2.10 C und F**). Überraschender-

weise kam die Virusreplikation in CEM-Zellen durch die Mutation tot und die Deletion von Nef (Mtot Δ nef) gänzlich zum Erliegen.

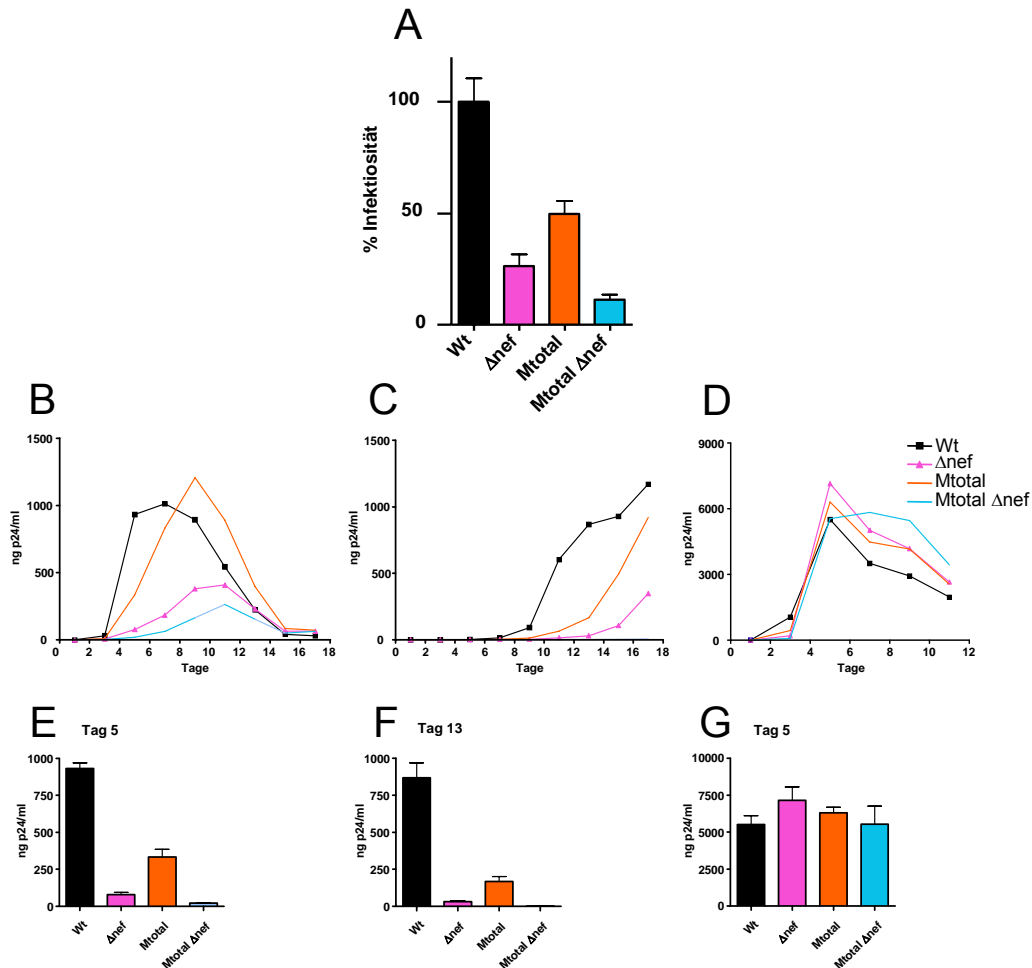


Abbildung C2.10 Einfluss der p6* Mutation tot auf die Infektiosität und Replikation der Viruspartikel. 293T-Zellen wurden mit den Konstrukten NL4-3 Wt, Δ nef, Mtot und Mtot Δ nef transfiziert und der virushaltige Überstand 72 Stunden nach Transfektion über einen p24-ELISA quantifiziert. Die Infektiosität bestimmte man mit Hilfe eines MAGI-Assays. Dazu infizierte man entsprechende Zellen jeweils mit gleichen Mengen Viruspartikeln, die bezüglich ihres CA-Gehaltes normiert wurden. 48 Stunden nach der Infektion wurde die Anzahl der infizierten (blauen) Zellen bestimmt und die erhaltenen Werte auf die Wt-Infektiosität (=100%) bezogen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente, die Standardabweichung vom Mittelwert ist jeweils angegeben (A). Zur Bestimmung der Replikationskinetiken wurden 2×10^6 PBMcs, CEM- und MT4-Zellen jeweils mit gleichen Mengen an Viruspartikeln (normiert über die quantifizierten p24-Mengen) in Doppelansätzen infiziert. Im Abstand von zwei Tagen konnten Proben der Überstände gewonnen und deren Viruskonzentration in PBMcs (B), CEM-Zellen (C) und MT4-Zellen (D) mit Hilfe eines p24-ELISAs bestimmt werden. Die Balkendiagramme (E, F, G) zeigen die Menge p24 der entsprechenden Zellen zum angegebenen Zeitpunkt an. Die Kurvenpunkte der Replikationskinetiken entsprechen den Mittelwerten von Doppelansätzen. Die entsprechenden Standardabweichungen sind jeweils angegeben. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit unterschiedlichen Viruspräparationen.

Im Einklang mit den Ergebnissen aus Abschnitt C2.6 zeigte sich für die Replikation in MT4-Zellen, dass es unerheblich ist, ob p6* Mutationen aufweist oder nicht. So hatte in diesem Zellkultursystem die tot-Mutation keinen negativen Einfluss auf die Replikation. Die Replikationskurven waren für alle Viren bis Tag 5 annähernd vergleichbar. Auch die Nef-Deletion hatte hier keinen Einfluss auf die Replikation (**Abbildung 2.10 D und G**).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Mutation der gesamten zentralen p6*-Region die Infektiosität und Replikation des Virus zellkulturabhängig negativ beeinflusst, wobei dieser Effekt wiederum unabhängig von Nef auftrat. Wie Ma, weist auch Mtot Nukleotidsubstitutionen in der *frame shift*-Region auf. In Abschnitt C2.3 wurde bereits die Leserastersprung-Effizienz von Ma überprüft. Da in beiden Mutanten exakt die gleichen Nukleotidaustausche in dieser Region vorliegen, kann somit eine veränderte Leserastersprung-Effizienz als Grund für den oben beschriebenen Effekt auf die Infektiosität und die Replikation ausgeschlossen werden.

C 2.11 Mutationen im zentralen p6*-Bereich haben keinen Einfluss auf die Aktivität der viralen PR.

Da p6* die Freisetzung der PR aus dem Gag-Pol-Polyproteinvorläufer beeinflusst, könnte sich die Mutation des zentralen p6*-Bereichs unter Umständen auf die PR-Aktivierung und nachfolgende Prozessierungsereignisse auswirken. Eine entsprechende PR-Defizienz war möglicherweise in vorangegangenen Western Blot-Analysen (**Abbildung C2.4 und C2.9**) nicht zu detektieren.

Aus diesem Grund wurde die Aktivität der viralen PR im Wt-Virus und in jeder proviralen Mutante (Ma, Mb, Mc, Md, Me, Mf, Mdup und Mtot) bestimmt. Als Kontrolle wurde wiederum die Virusmutante csM7, die auf Grund einer Mutation der p6*-PR-Spaltstelle einen erheblichen Prozessierungsdefekt aufweist (134 und Kapitel C1) in den Versuch miteinbezogen.

Zur Durchführung des PR-Aktivitäts-Tests wurden 293T-Zellen mit den entsprechenden proviralen Konstrukten transfiziert und drei Tage später die Überstände mit den darin enthaltenen Viruspartikeln gesammelt, aufkonzentriert und lysiert. Mit einem CA-spezifischen Antikörper, der an prozessiertes CA deutlich besser bindet als an unprozessiertes, Vorläufer-assoziiertes CA, konnte der CA-Proteingehalt in den Viruslysaten über einen ELISA bestimmt werden. Im Anschluss daran wurden dieselben Viruslysate mit einem Überschuss einer kommerziell erhältlichen

rekombinanten HIV-1 PR (rPR) behandelt. Damit sollten Gag und Gag-Pol-Vorläuferproteine, die von einer potentiell weniger aktiven viralen PR nicht oder nur unzureichend prozessiert wurden, vollständig zu den entsprechenden Peptiden und Proteinen, unter anderem CA, umgesetzt werden.

Nach dieser zusätzlichen Prozessierung wurde wiederum die Menge an CA in den entsprechenden Lysaten ermittelt. **Abbildung C2.11** zeigt den Unterschied der gemessenen CA-Mengen vor und nach der Prozessierung *in trans*. Wie erwartet, hatte sich die CA-Menge des Kontrollvirus-Ansatzes auf Grund der PR-Defizienz nach Inkubation mit rPR mehr als verfünffacht. Dies bestätigt, in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (134;163), die stark reduzierte PR-Aktivität dieser Mutante. Im Gegensatz dazu war weder für den Wt-Virus noch für Ma-f, Mdup oder Mtot ein Unterschied bezüglich der ermittelten CA-Menge vor und nach Prozessierung mit einer rPR festzustellen.

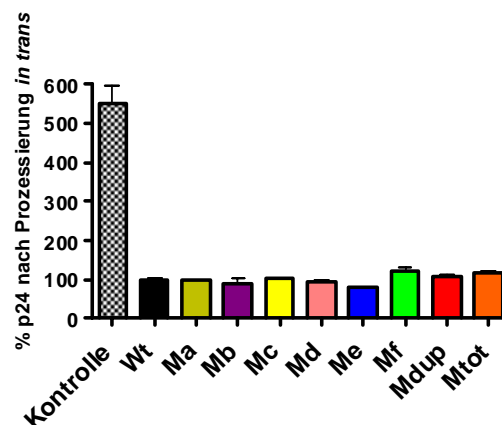


Abbildung C2.11 Test der PR-Aktivität der p6*-Mutanten. 293T-Zellen wurden mit den angegebenen proviralen Viruskonstrukten transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen und die darin enthaltenen Viren über Ultrazentrifugation aufkonzentriert, lysiert und der Gehalt an prozessiertem CA (p24) mit einem CA-spezifischen Antikörper in einem ELISA ermittelt. Danach inkubierte man die Proben mit einem Überschuss einer rekombinant hergestellten HIV-1 PR der Firma Bachem und bestimmte wiederum den CA-Gehalt. Das Balkendiagramm zeigt die prozentuale Veränderung des CA-Gehaltes nach der Prozessierung *in trans*. Die Experimente wurden in Vierfachansätzen durchgeführt, die Standardabweichungen vom Mittelwert sind angegeben.

Damit konnte bestätigt werden, dass eine vollständige Mutation der zentralen p6*-Region, im Gegensatz zu den vier carboxylterminalen Aminosäuren, keinen Einfluss auf die Aktivität der PR hat.

C 2.12 Die Bindung von Nef an p6* liegt außerhalb des zentralen Bereichs.

Die in Abschnitt C2.10 beschriebenen Versuche ergaben, dass die Mutation tot die Infektiosität und Replikationskapazität von HIV-1 reduzierte. Dies geschah aber unabhängig von Nef. Außerdem legen die Ergebnisse aus Abschnitt C2.4 und C2.9 nahe, dass die zentrale p6*-Region bzw. die in Mtot mutierten Bereiche, nicht bei der Verpackung von Nef in entstehende Viruspartikel beteiligt sind. Dies lässt vermuten, dass sich die postulierte Nef-Bindestelle nicht im zentralen Bereich von p6* befindet.

Um abschließend die Frage einer Interaktion von Nef mit der zentralen p6*-Region zu klären, wurden Koexpressionsexperimente mit dem interferierenden Nef-F12-Protein und verschiedenen NL4-3-Mutanten in 293T-Zellen durchgeführt. Nef-F12 ist, wie in Abschnitt A6.5 beschrieben, eine *trans*-dominant negative Nef-Variante, die subzellulär in Kernnähe und nicht wie Wt-Nef auch an der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Diese Fehl-Lokalisation von Nef-F12 und die postulierte Bindung an Gag-Pol führen dazu, dass Gag-Pol in der Assemblierungszone an der Cytoplasmamembran fehlt, was in einer drastisch verringerten Virusproduktion resultiert (40). Daher wurde geprüft, ob der Gag-Pol-Vorläufer durch die Mutation des gesamten zentralen p6*-Bereichs dem negativen Effekt, den Nef-F12 auf die Viruspartikelproduktion ausübt, entkommen kann. Würde eine Bindung zwischen Nef-F12 und Gag-Pol durch die p6* Mutation tot aufgehoben, so sollte auch der negative Effekt des Nef-F12-Proteins auf die Viruspartikel-Freisetzung unterbleiben. Liegt die funktionelle Nef-Bindestelle jedoch außerhalb der zentralen p6*-Region, so bliebe der negative Effekt von Nef-F12 erhalten und die Virusproduktion wäre auch in diesem Fall reduziert.

Um dies zu klären kotransfizierte man 293T-Zellen mit den proviralen NL4-3 Konstrukten Wt, Δ nef, Mtot, Mtot Δ nef und einem Nef-F12-Expressionsplasmid. Als Kontrolle diente der Leervektor pcDNA3. Die Überstände wurden 24 bzw. 48 Stunden nach Transfektion gesammelt und die Viruspartikelproduktion über den CA-Gehalt in den Überständen ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Virusproduktion nach der Expression von Δ nef, verglichen mit Wt, leicht zurückging. Dies gilt auch für die Expression von Mtot bzw. Mtot Δ nef (vergleiche Balkenpaare 1, 2, 4 und 5 in **Abbildung C2.12**). Erwartungsgemäß reduzierte die Expression von Nef-F12-Protein die Δ nef-Partikelproduktion um 50% bzw. 46% (Balkenpaar 3). Jedoch führte auch die Koexpression von Mtot Δ nef und Nef-F12 zu einer drastisch reduzierten Virusproduktion (Balkenpaar 6). Dies äußerte sich in einem deutlichen Rückgang der ermittelten CA-Menge um 55% (24 Stunden nach Transfektion) bzw. 64% (48 Stunden nach Transfektion, vergleiche Balkenpaar 5 mit 6).

Die Mutation tot konnte offensichtlich den negativen Einfluss von Nef-F12 auf die Virusproduktion nicht kompensieren.

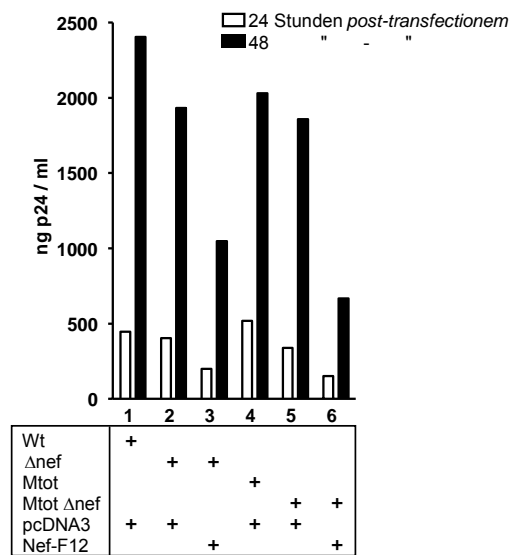


Abbildung C2.12 Quantifizierung der Viruspartikelproduktion nach Koexpression von Nef-F12. 293T-Zellen wurden mit den angegebenen proviralen Viruskonstrukten und einem Leervektor (pcDNA3) bzw. einem Nef-F12-Expressionsplasmid im Verhältnis 1:5 kotransfiziert. Die Ernte der virus-haltigen Überstände wurden 24 (weiße Balken) und 48 Stunden (schwarze Balken) nach Transfektion gesammelt und ihr CA-Gehalt in einem ELISA analysiert.

Dies spricht dafür, dass es zwischen dem zentralen p6*-Bereich und Nef zu keiner intrazellulären Interaktion kommt und dass die postulierte Bindung von Nef an Gag-Pol mit großer Wahrscheinlichkeit außerhalb des zentralen Bereichs von p6* liegt.

C 3 Funktionelle Analyse des aminoterminalen Bereichs von p6*

Wie in Kapitel C2 beschrieben, hatte die Substitution des zentralen p6*-Bereichs weder Einfluss auf die Aktivierung der PR noch konnte eine funktionelle Wechselwirkung mit Nef bestätigt werden. Infektiosität oder Replikation des HI-Virus wurden durch Aminosäuresubstitutionen in diesem Bereich zwar negativ beeinflusst, führten aber nicht zu einem Verlust der Virulenz. Eine funktionelle Analyse des p6*-Aminoterminus (F₁-S₁₇) war bisher nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich (Mutante a und tot). Wie erwähnt, bildet die für diesen Bereich kodierende mRNA die hochkonservierte *frame shift*-Sekundärstruktur, die für den ribosomalen Leserastersprung verantwortlich ist. Substitutionen im p6*-Aminoterminus können zwar so gestaltet werden, dass die Integrität des *stem loops* erhalten bleibt, resultieren aber dann unweigerlich in Mutationen der Aminosäuresequenz von p1 und p6_{gag} des überlagerten gag-ORFs. Ein Erhalt der wildtypischen p1- und p6_{gag}-Aminosäuresequenz und gleichzeitige Mutation des p6*-Aminoterminus kann wiederum nicht ohne Zerstörung der *frame shift*-Funktion erfolgen (163). Aus denselben Gründen konnte auch die Funktion der aminoterminalen p6*-Spaltstelle bisher nicht aufgeklärt werden. In dieser Arbeit wurde daher zur funktionellen Analyse des p6*-Aminoterminus ein Virus mit veränderter Genomorganisation entworfen, bei der p6*-PR und p1-p6_{gag} nicht mehr überlagert sind.

C 3.1 Ein auf NL4-3 basierendes neu konstruiertes HIV-1 Provirus besitzt eine versetzte *frame shift*-Region und ein verlängertes Gag-Pol-Vorläuferprotein.

Um umfassende Mutationsanalysen des p6*-Leserahmens im viralen Kontext zu ermöglichen, wurde ein neues aus dem Laborstamm NL4-3-abgeleitetes Virus mit veränderter Genomorganisation entworfen. Zu diesem Zweck versetzte man die *frame shift*-Region so, dass die gag- und pol-ORFs entkoppelt vorlagen. Dieses Virus, das fortan als altered NL4-3 (AL) bezeichnet wird, kodiert im Unterschied zu NL4-3 für ein um die Bereiche p1 und p6_{gag} verlängertes Gag-Pol-Polyprotein (**Abbildung C3.1 A**). In AL wurde die herkömmliche *frame shift*-Region von HIV-1_{NL4-3} durch Mutagenese funktionell zerstört und dafür an das Ende des gag ORF eine neue *frame shift*-Region angehängt. Dadurch kann es in diesem Virus erst nach der vollständigen Translation des Gag-Polyproteins zu einem ribosomalen Leserastersprung kommen. Die

Überlagerung von p6* und PR-Aminoterminus im pol-ORF mit p1 und p6_{gag} im gag-ORF ist damit aufgelöst (**Abbildung C3.1 B**).

Im Detail erreichte man dies, indem die homologe Basenfolge TTTTSTA (1296 Nukleotide *downstream* des gag-Start-Kodons) der *slippery site* durch drei Austausche (TTTCCTG) unterbrochen wurde. Die Integrität des an die *slippery site* anschließenden *stem loops* bei HIV_{NL4-3} stützt sich hauptsächlich auf 11 Watson-Crick Basenpaarungen in der oberen Helix (Abschnitt A4.4). Durch die eingeführten Nukleotidaustausche wurden davon acht aufgebrochen (**Abbildung C3.1 C** und **C3.2**). Zusätzlich wurden auch der Tetra-loop (ACAA), der die beiden *stems* trennende *bulge* (GGA), und die untere Helix verändert. Gleichzeitig achtete man darauf, dass es zu keinen Austauschen in der p1- und p6_{gag}-Aminosäuresequenz kam. Die *frame shift*-Struktur sollte dadurch funktionell zerstört worden sein, da deren Stabilität, bezogen auf ihre freie Energie, von ursprünglich -26,7 kcal/mol auf -13,5 kcal/mol stark abgenommen hat (berechnet nach Zuker und Walter: (229;255)).

210 Basenpaare stromabwärts dieser Stelle wurde direkt hinter dem letzten Kodon von p6_{gag} eine Sequenz generiert, die der *frame shift*-Region von NL4-3 annähernd identisch ist (**Abbildung C3.1 D**). Zusätzlich wurde die Umgebung der aminoterminalen p6*-Spaltstelle (QAN / FFR), die sich bei NL4-3 zwischen NC und p6* im Gag-Pol-Polypeptid befindet, dem p6_{gag}-Carboxylterminus von AL angehängt. Damit sollte gewährleistet werden, dass in AL die postulierte aminoterminalen p6*-Spaltstelle erhalten bleibt. Um eine korrekte Translationstermination des Gag-Polypeptids zu ermöglichen, wurde im Anschluss an die *slippery site* ein Stopp-Kodon eingebaut.

Der Einbau einer neuen *frame shift*-Region, einer neuen PR-Spaltstelle und eines Stopp-Kodons führte in AL zu einer carboxylterminalen Verlängerung des Gag-Polypeptids um fünf Aminosäuren (ANFLG). Beim Gag-Pol-Polypeptid kam es zu einer Aminosäuresubstitution in p6* (E₄V) und der oben beschriebenen Insertion von p1 und p6_{gag}.

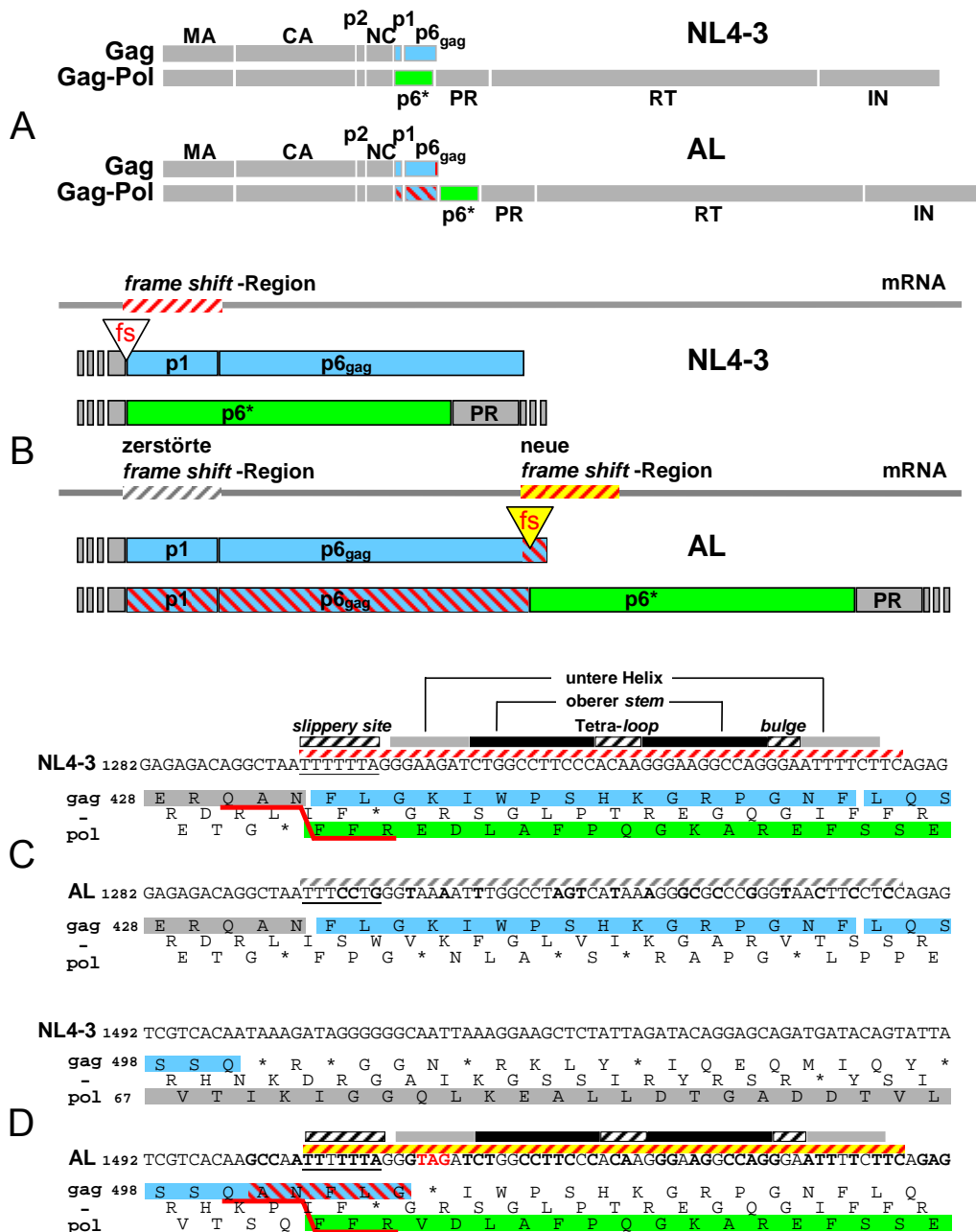


Abbildung C3.1 Generierung eines Virus mit versetzter *frame shift*-Region und neuer Genomstruktur: AL. Dargestellt sind Gag und Gag-Pol von NL4-3 und AL. P1, p6_{gag} (beide blau) und p6* (grün) sind jeweils farbig gekennzeichnet, die bei AL zusätzlich generierten Bereiche sind rot-blau schraffiert dargestellt (A). In AL wurde die ursprüngliche *frame shift*-Region (weißer Pfeil: fs; rot-weiß schraffiert) zerstört, und an das Ende des gag-ORFs eine neue (gelber Pfeil: fs; rot-gelb schraffiert) angehängt (B). Der Bereich der NL4-3 *frame shift*-Region (rot-weiß schraffiert, *slippery site* unterstrichen) wurde in AL durch Nukleotidaustausche (Fettbuchstaben) zerstört (grau-weiß schraffiert), die Aminosäuresequenz von NC (grau markiert), p1 und p6_{gag} (beide blau markiert) blieben dabei unverändert. Die Aminosäureumgebung der PR-Spaltstelle zwischen NC und p6* ist rot unterstrichen (C). Die Translation von Gag, generiert bei AL ein um fünf Aminosäuren (blau-rot schraffiert) verlängertes Gag. Die neu generierte *frame shift*-Struktur bei AL (rot-orange schraffiert) gewährleistet die Expression eines um p1 und p6_{gag} verlängerten Gag-Pol-Polypeptids, mit einer PR-Spaltstelle zwischen p6_{gag} und p6*, wie in Gag-Pol_{NL4-3} zwischen NC und p6* (rot unterstrichen) (D).

C 3.2 AL besitzt eine neue *frame shift*-Region, die mit NL4-3-ähnlicher Effizienz einen Leserastersprung auslöst.

Nach der Klonierung von AL sollte zunächst festgestellt werden, ob die neue *frame shift*-Region tatsächlich einen ribosomalen Leserastersprung während der Translation induzieren kann bzw., ob die beschriebenen Austausche die „ursprüngliche“ *frame shift*-Region funktionell zerstört haben. **Abbildung C3.2 A und B** zeigen die entsprechenden DNA-Sequenzen von NL4-3 und AL. Zusätzlich sind die nach Zuker und Walter berechneten RNA-Sekundärstrukturen mit ihren Stabilitäten, bezogen auf die freie Energie (ΔG), angegeben (229;255).

Da jede Substitution eines Nukleotides die Integrität und die Funktionalität der *slippery site* bzw. der *stem loop*-Struktur beeinflussen kann, wurden im nachfolgenden Test alle drei *frame shift*-Regionen (fs-NL, fs-inact., fs-AL) bezüglich ihrer Fähigkeit einen ribosomalen -1 Leserastersprung in der Translation auszulösen, verglichen. Zu diesem Zweck wurden analog zu Abschnitt C2.3 Reporterkonstrukte hergestellt.

Mit diesen Konstrukten wurden 293T-Zellen transfiziert und die Expression der Luciferase 48 Stunden später anhand der Biolumineszenz nach Luciferinzugabe bestimmt. Wie in **Abbildung C3.2 C** deutlich erkennbar, führten die oben beschriebenen Mutationen im Bereich der früheren *frame shift*-Struktur (fs-inact), zu einem totalen Funktionsverlust, da nach der Transfektion mit diesem Konstrukt keine Luciferaseaktivität (0,1%) in den Zellen gemessen werden konnte. Im Gegensatz dazu führte das Konstrukt mit der neu generierten *frame shift*-Region (fs-AL) mit vergleichbarer Effizienz zu einem ribosomalen Leserastersprung wie sie vom NL4-3 Wt-Konstrukt (fs-NL) ausgeht. Bezogen auf das Kontroll-Konstrukt fs-luc, lag die Effizienz von fs-NL und fs-AL bei 8,9% bzw. 6,0%.

Es konnte somit funktionell bewiesen werden, dass die Zerstörung der früheren und die Etablierung einer neuen *frame shift*-Region in AL erfolgreich waren.

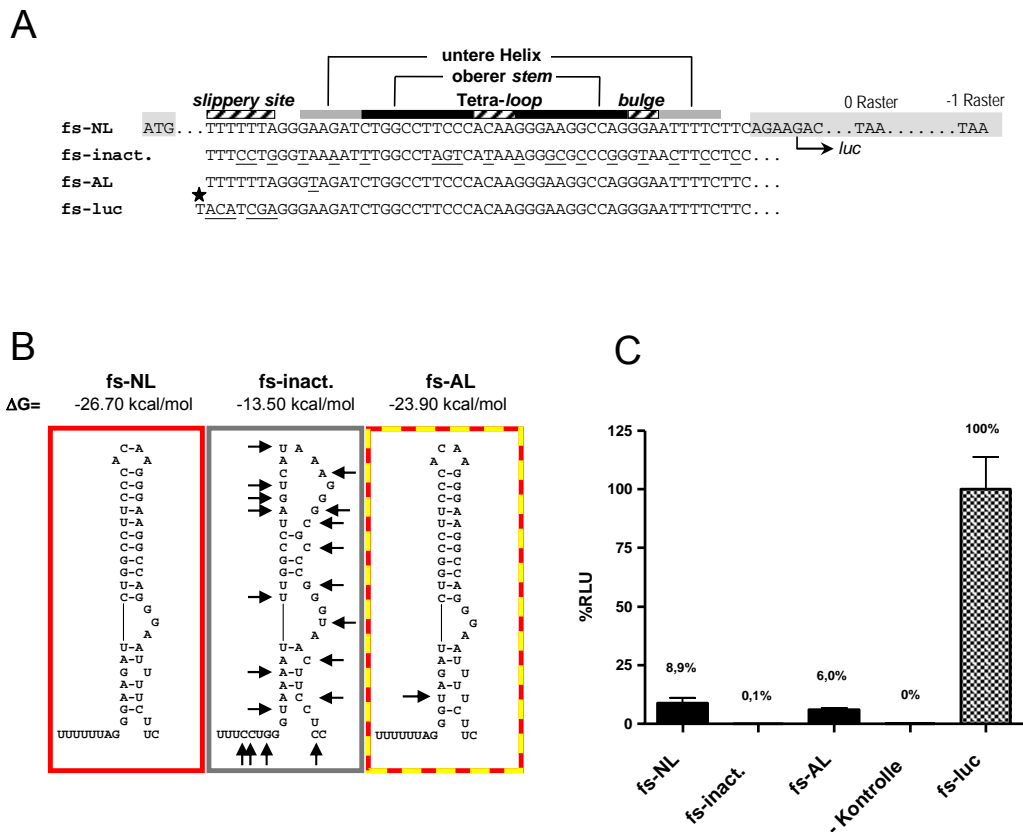


Abbildung C3.2 Funktionelle Analyse der zerstörten und neu generierten *frame shift*-Region in AL durch ein Luciferase-Reporter-Experiment. Die Sequenzen der drei beschriebenen *frame shift*-Regionen wurden in den 5'-Bereich der *firefly*-Luciferase direkt hinter das entsprechende Start-Kodon kloniert. Nukleotidsubstitutionen in der *slippery site*, der oberen *stem loop*-Struktur, dem *bulge* und der unteren Helix der zerstörten bzw. neu generierten *frame shift*-Regionen in AL, verglichen mit NL4-3 Wt, sind unterstrichen. Das als fs-luc angegebene Reporterkonstrukt besitzt eine durch Nukleotidsubstitutionen zerstörte *slippery site*, wodurch kein Leserastersprung stattfinden kann. Eine Insertion (Sternchen) führt zu einer konstitutiven Luciferase-Expression. Die Positionen der Start- und Stopp-Signale im 0 Raster und im -1 Raster sind hervorgehoben (A). Für die *frame shift*-Regionen sind die nach Zuker und Walter (255), (229) berechnete freie Energie (ΔG) und die zu erwartenden RNA-Sekundärstrukturen angegeben. Nukleotidsubstitutionen in den entsprechenden RNA-Sekundärstrukturen sind mit Pfeilen gekennzeichnet (B). 293T-Zellen wurden mit den oben beschriebenen Reporterkonstrukten oder einem Leervektor (- Kontrolle) transfiziert und die Zell-assoziierte Luciferaseaktivität 48 Stunden später quantifiziert. Die Luciferaseaktivität ist angegeben als relative Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) bezogen auf fs-luc. Die Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die in Doppelansätzen durchgeführt wurden (C).

C 3.3 AL ist im Stande, Polyproteinvorläufer zu exprimieren und sie zu prozessieren.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass bei AL die neue *frame shift*-Region funktionell ist, wurde im Folgenden analysiert, welchen Effekt die Versetzung des Leserastersprunges auf die Fähigkeit des Virus zur Produktion der zwei Polyproteinvorläufer Gag und Gag-Pol hat. Dazu wurden 293T-Zellen mit den proviralen Konstrukten NL4-3 und AL transfiziert, 72 Stunden später die Kulturüberstände gesammelt und die enthaltenen Viren über Ultrazentrifugation aufkonzentriert. So gewonnene Proben wurden mit einem CA-spezifischen Antikörper einer Western Blot-Analyse unterzogen. Wie aus **Abbildung C3.3 B** hervorgeht, wurden vergleichbare Mengen der Gag- (Pr55) und Gag-Pol- (Pr160) Polyproteinvorläufern in den Überständen von NL4-3- und AL-transfizierten Zellen nachgewiesen, was impliziert, dass die Versetzung der *frame shift*-Region und die weiteren beschriebenen Veränderungen in AL nicht zu einem Verlust oder zu einer Reduktion der Virusfreisetzung führte. Auch das Muster der Prozessierungs-Intermediate sowie die Menge an prozessiertem CA-Protein war für beide Viren annähernd identisch (**Abbildung C3.3 B** oben). Die Ergebnisse dieser Western Blot-Analyse deuten darauf hin, dass in AL die PR funktionell ist und die Prozessierung der Vorläuferproteine ungestört verläuft.

Interessanterweise lässt sich eine leichte Erhöhung der Gag-spezifischen Bande von AL, verglichen mit der von NL4-3, bei 55 kDa erkennen. Wie beschrieben, führt die Versetzung des Leserasters zu einer Verlängerung des Gag-Vorläufers um fünf Aminosäuren. Dies entspricht einer Massenzunahme von 0,5 kDa, wie in **Abbildung C3.3 A** skizziert. Die Analyse der Gag-Prozessierung mit einem p6_{gag}-spezifischen Antikörper zeigt eine vergleichbare Größenzunahme des Prozessierungs-Intermediates p7-p1-p6 (**Abbildung C3.3 B** unten). Die Insertion von p1 und p6_{gag} in den AL-Gag-Pol-Vorläufer erhöht dessen Masse um 7,8 kDa (**Abbildung C3.3 A**). Auch dies zeigt sich in einer Erhöhung der Gag-Pol-spezifischen Bande von AL, wenn man sie mit der von NL4-3 bei 160 kDa vergleicht.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass AL Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine mit verändertem molekularem Gewicht produziert, was den in Abschnitt C3.2 beschriebenen Größenunterschieden entspricht.

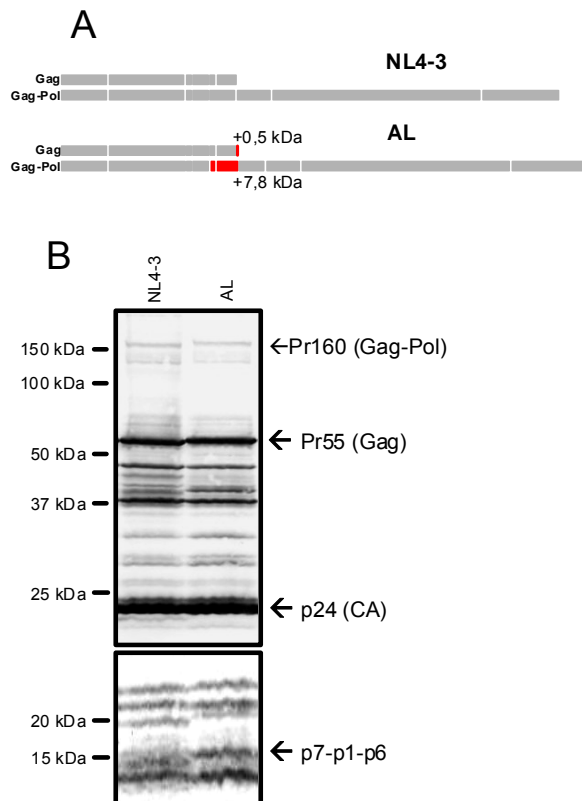


Abbildung C3.3 Analyse der Viruspartikel-freisetzung und Polyprotein-Prozessierung von AL. Die Polyproteine Gag und Gag-Pol von NL4-3 und AL sind schematisch dargestellt, Größenunterschiede in AL sind farblich markiert (A). 293T-Zellen wurden mit den proviralen Plasmidkonstrukten NL4-3 und AL transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden die gebildeten Viruspartikel mit dem Überstand geerntet, über Ultrazentrifugation aufkonzentriert und die Proteine über ein denaturierendes Gel chromatographisch aufgetrennt. Gag-Polyproteinvorläufer und Prozessierungsintermediate wurden mit CA-spezifischen Antikörper (oben) und mit einem p6_{gag}-spezifischen Antikörper (unten) über Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Positionen der Markerproteine sind angegeben. (B).

C 3.4 AL kann Zellen infizieren und *in vitro* replizieren.

Nachdem gezeigt wurde, dass AL Polyproteinvorläufer produziert und prozessiert, sollte im Anschluss daran überprüft werden, ob die freigesetzten Viruspartikel infektiös sind. Um die Funktionalität des neu konstruierten Virus zu quantifizieren, wurden die aus der Transfektion von 293T-Zellen mit AL hervorgegangenen Viruspartikel auf ihre Infektiosität getestet. Die Versuche wurden analog zu den unter Abschnitt C2.5 und C2.10 beschriebenen Experimenten durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass AL-Viruspartikel in der Lage waren MAGI-Zellen zu infizieren. Bezogen auf NL4-3 betrug die für AL ermittelte Infektiosität etwa 80% (**Abbildung C3.4 A**).

Um den Phänotyp dieses Virus in einer sich ausbreitenden Infektion zu beobachten, wurden PBMCs und MT4-Zellen mit normalisierten Überständen aus transfizierten 293T-Zellen infiziert. Erwartungsgemäß war AL in der Lage PBMCs zu infizieren und in ihnen zu replizieren, wenn auch der Zeitpunkt, an dem die maximale Viruskonzentration gemessen wurde im Vergleich zum Wt leicht verzögert und die Virusproduktion etwas verringert war (**Abbildung C3.3 B**). Im Gegensatz dazu waren die Replikationskinetiken dieser beiden Viren in MT4-Zellen annähernd gleich (**Abbildung C3.3 C**).

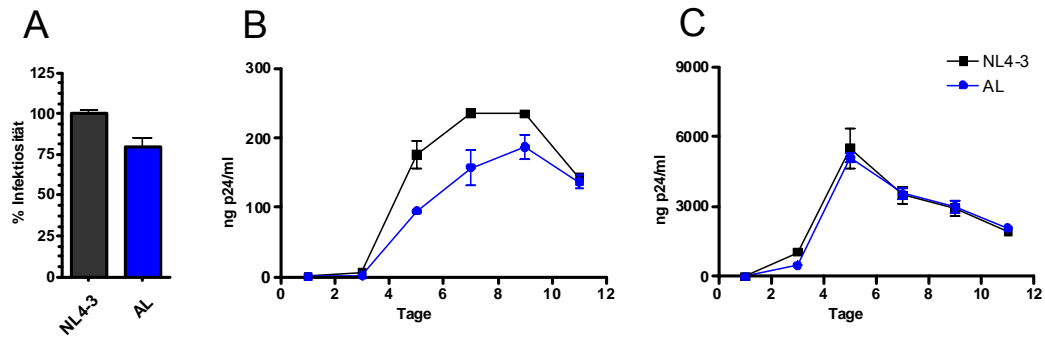


Abbildung C3.4 Infektiosität und Replikation von AL *in vitro*. 293T-Zellen wurden mit Konstrukten für NL4-3 Wt oder AL transfiziert und der virushaltige Überstand 72 Stunden nach der Transfektion über einen p24-ELISA quantifiziert. Die Infektiosität von AL, die in einem MAGI-Test bestimmt wurde, ist relativ zur NL4-3 Wt-Infektiosität (=100%) angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und die entsprechenden Standardabweichungen (A). Zur Bestimmung der Replikationskinetiken infizierte man PBMCs (B) und MT4-Zellen (C) jeweils mit gleichen Mengen an Viruspartikeln (bzw. gleichen Mengen p24) in Doppelansätzen. Im Abstand von zwei Tagen wurden Proben der Überstände gewonnen und die Viruskonzentration mit einem p24 ELISA ermittelt. Die Kurvenpunkte der Replikationskinetiken entsprechen Mittelwerten aus zwei unabhängigen Experimenten, die entsprechenden Standardabweichungen sind angegeben.

Zusammengefasst kann aus den bisherigen Ergebnissen abgeleitet werden, dass AL ein infektiöses Virus ist, das eine ähnliche *in vitro*-Replikationskinetik wie NL4-3 aufweist.

C 3.5 In AL kann der Aminoterminus von p6* substituiert und die zentrale Region deletiert werden, ohne auf RNA-Ebene die *frame shift*-Struktur zu zerstören.

Die unter Kapitel C2 beschriebenen Experimente waren auf die Rolle der zentralen p6*-Region fokussiert. So stellte sich heraus, dass eine komplette Mutagenese des zentralen Bereichs durch nicht-konservative Substitutionen, ohne Manipulation des überlagerten p6_{gag}-Leserahmens, die Infektiosität und Replikation *in vitro* nicht wesentlich beeinträchtigte. Eine vollständige Mutagenese von p6* war auf Grund der beschriebenen Überlagerung mehrerer funktioneller Bereiche im proviralen Kontext nicht möglich. Das neue Virus AL ermöglichte nun auch eine Deletionsmutagenese in p6*, ohne dass dabei Regionen im gag-Leserahmen verändert werden, da gag- und pol-Leserahmen zwischen p1-p6_{gag} und p6*-PR in AL entkoppelt vorliegen. Zum anderen wurde die *frame shift*-Region aus der Kodierungsregion für p1 und p6_{gag} des gag-Leserahmens entfernt und ist jetzt nur noch mit der Kodierungssequenz für den

aminoterminalen Teil von p6* überlagert. Dadurch kann der Aminoterminus von p6* ohne Rücksicht auf den p1- bzw. p6_{gag}-Bereich spezifisch mutiert werden. Die einzige Voraussetzung für die Substitutionen im Aminoterminus war, den überlagerten *frame shift*-Bereich funktionell intakt zu lassen.

Abbildung C3.5 A zeigt drei auf der Basis von AL entworfene Mutanten. In der Mutante ALn wurde der p6*-Aminoterminus im Bereich R₃-S₁₇ komplett substituiert. Die notwendigen Nukleotidaustausche gelangen, indem die linke und die rechte Seite des oberen *stem loops* und der unteren Helix gegeneinander ausgetauscht wurden. Dadurch blieb die Stabilität ($\Delta G = -23,2$ kcal/mol) der RNA-Sekundärstruktur, verglichen mit der von AL ($\Delta G = -23,9$ kcal/mol), weitgehend erhalten (**Abbildung C3.5 C**). Der CAI änderte sich von 0,670 (AL) auf 0,602 (ALn). In einer weiteren als ALdel bezeichneten Mutante wurde der gesamte zentrale Bereich von p6* (S₁₈-V₅₂) deletiert und zusätzlich S₁₇ zu T₁₇ mutiert. Nur die aminoterminalen Region (F₁-F₁₆) und die vier carboxylterminalen Aminosäuren S₅₃F₅₄S₅₅F₅₆, die Teil der p6*-PR Spaltstelle sind (163), blieben in dieser Mutante unverändert. Die Deletion umfasste insgesamt 35 von 56 Aminosäuren aus p6* und somit die gesamte zentrale p6*-Region. Da die ausgedehnte Deletion den Amino- und den Carboxylterminus von p6* in direkte Nachbarschaft brachte, wurde eine zusätzliche Mutante (ALdel-myc) entworfen, die an Stelle der 35 zentralen Aminosäurereste eine 14 Aminosäuren lange Sequenz mit einem zentralen myc-tag enthält. Somit sind in dieser Mutante 21 Aminosäuren deletiert und 14 Aminosäuren willkürlich substituiert worden.

Zusätzlich wurde von allen Mutanten auch eine nef-defiziente Variante generiert (ALn Δ nef, ALdel Δ nef und ALdel-myc Δ nef).

Da alle drei Mutanten Substitutionen im aminoterminalen Abschnitt von p6* zwischen F₁ und S₁₇ trugen, kam es bei allen zu Austausch in der *frame shift*-Region (**Abbildung C3.5 B**). Daher wurden diese Regionen auf ihre Fähigkeit, einen Leserastersprung auszulösen, mit Hilfe des etablierten Luciferase-Reporter-Tests (Abschnitt C2.3 und C3.2) untersucht. Da sich die Mutanten ALdel und ALdel-myc in der *frame shift*-Region nicht unterschieden, analysierte man im Folgenden nur ALdel. Mit den entsprechenden Reporterkonstrukten wurden 293T-Zellen transfiziert und die Expression der Luciferase 48 Stunden später quantifiziert. Die Analyse der *frame shift*-Raten ergab, dass fs-ALn (8,5%) und fs-ALdel (5,8%) mit einer AL-ähnlichen Effizienz (6,0%) einen ribosomalen Leserastersprung auslösten (**Abbildung C3.5 D**).

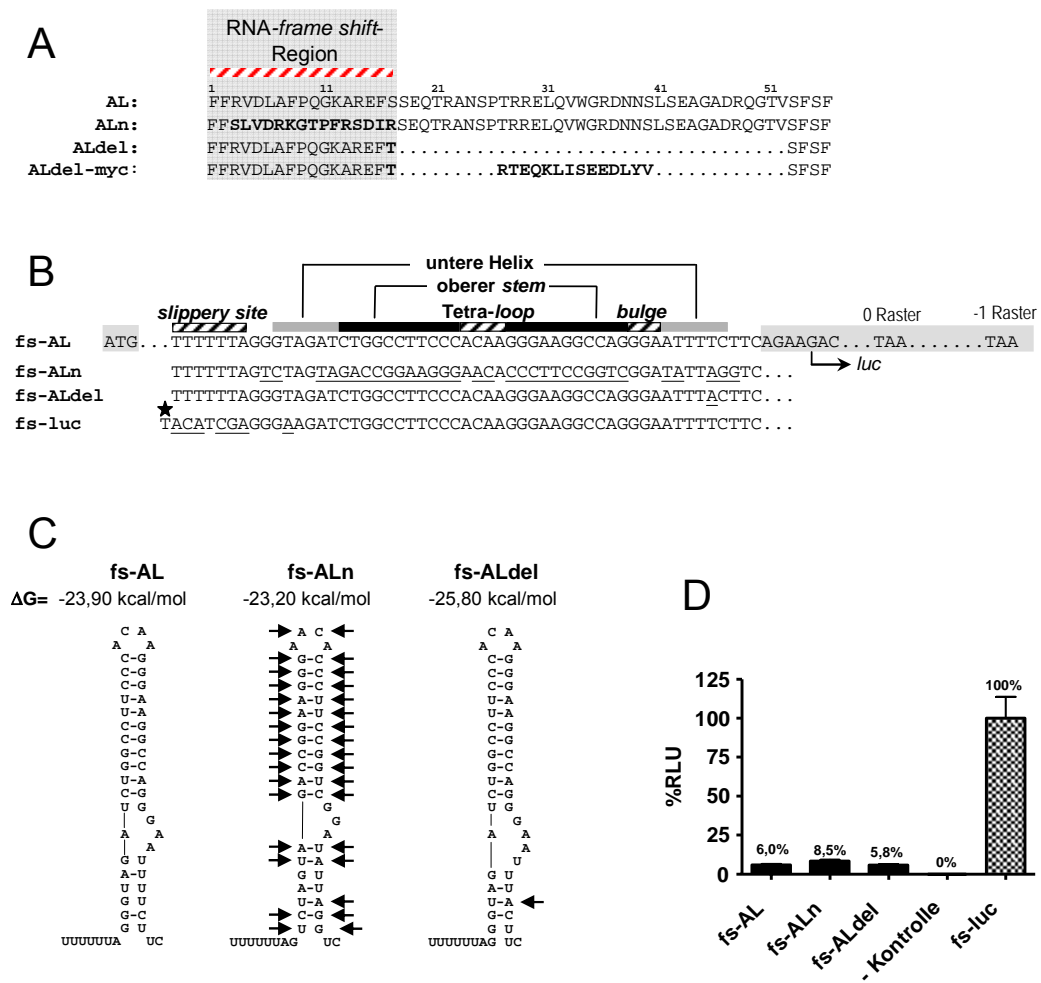


Abbildung C3.5 Funktionelle Analyse der *frame shift*-Regionen der Mutanten ALn und ALdel durch ein Luciferase-Reporter-Experiment. Die Substitutionen in ALn, ALdel und ALdel-myc sind durch Fettbuchstaben, Deletionen durch Punkte in den Aminosäuresequenzen angegeben. Die aminoterminalen p6*-Region ist grau unterlegt (A). Die Sequenzen der *frame shift*-Regionen von ALn und ALdel wurden in den 5'-Bereich der *firefly*-Luciferase direkt hinter das entsprechende Start-Kodon kloniert. Nukleotidsubstitutionen in den *frame shift*-Regionen der Mutanten, verglichen mit AL sind unterstrichen. Das als fs-luc angegebene Reporterkonstrukt besitzt eine durch Nukleotidsubstitutionen zerstörte *slippery site*, wodurch kein Leserastersprung stattfinden kann. Eine Insertion (Sternchen) führt zu konstitutiver Luciferase-Expression. Die Positionen der Start- und Stopp-Signale im 0 Raster und im -1 Raster sind hervorgehoben (B). Für die genannten *frame shift*-Regionen ist die RNA-Sekundärstruktur und ihre Stabilität bezogen auf ihre freie Energie, berechnet nach Zuker und Walter (255), (229) angegeben. Nukleotidsubstitutionen in den Strukturen sind durch Pfeile gekennzeichnet (C). 293T-Zellen wurden mit den oben beschriebenen Reporterkonstrukten oder einem Leervektor (- Kontrolle) transfiziert und die Zell-assoziierte Luciferaseaktivität 48 Stunden später quantifiziert. Die Luciferaseaktivität ist angegeben als relative Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) bezogen auf fs-luc. Die Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die in Doppelansätzen durchgeführt wurden (D).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass alle neuen Mutanten zu einer geregelten Produktion von Gag- und Gag-Pol-Polypeptiden auf Grund eines mit dem Wt vergleichbaren Leserastersprungs führen sollten.

C 3.6 Weder aminoterminaler Austausch noch Deletionen in p6* beeinflussen die Partikelfreisetzung, die Polyprotein-Prozessierung oder den Einbau von Nef in Viruspartikel.

Mit den Mutanten a-f und der Mutante tot wurde in Abschnitt C2.4 und C2.9 bereits gezeigt, dass Mutationen im zentralen Bereich von p6* keinen Einfluss auf die Inkorporation von Nef in Viruspartikel oder die Prozessierung der Polyproteinvorläufer haben. In der Mutante ALdel ist dieser zentrale Bereich deletiert, in ALdel-myc teilweise willkürlich substituiert. In der Mutante ALn hingegen ist die gesamte aminoterminaler Region von p6* substituiert. Im vorangegangenen Abschnitt konnte festgestellt werden, dass der ribosomale Leserastersprung in den Mutanten funktionell ist. Um potentielle Auswirkungen dieser Mutationen in p6* auf weitere Virusfunktionen zu evaluieren, sollte zunächst die Produktion von Gag- und Gag-Pol-Vorläufern sowie deren Prozessierung im Viruspartikel untersucht werden.

Zu diesem Zweck transfizierte man 293T-Zellen mit den proviralen Konstrukten AL, AL Δ nef, ALn, ALn Δ nef, ALdel, ALdel Δ nef, ALdel-myc und ALdel-myc Δ nef und sammelte drei Tage später den Zellkulturüberstand. Die darin enthaltenen Viruspartikel wurden über Ultrazentrifugation aufkonzentriert, lysiert und ihre Zusammensetzung in Western Blot-Analysen betrachtet. Wie erwartet, konnte in Spur AL und AL Δ nef wieder ein deutliches Signal bei etwa 55 kDa detektiert werden, das dem Gag-Vorläuferpolypeptid entspricht. Auch in den Spuren ALn, ALn Δ nef, ALdel, ALdel Δ nef, ALdel-myc und ALdel-myc Δ nef waren Gag-Vorläuferproteine nachweisbar. Weiter ist durch die Prozessierung des Vorläufers ein 50 kDa großes Spaltprodukt, das vermutlich einem MA-CA-p2-NC-p1-Nebenprodukt entspricht, das Intermediat Pr41 (MA-CA-p2), sowie eine CA-spezifische Bande bei 24 kDa in allen Spuren gleichermaßen zu erkennen (**Abbildung C3.6** oben). Darüber hinaus konnte das 27 kDa große Nef-Protein in allen Viruspartikeln, die keine Nef-Deletion aufwiesen, vergleichbar gut nachgewiesen werden (**Abbildung C3.6** Mitte). Die Detektion des 51 und 66 kDa großen Heterodimers RT mit einem RT-spezifischen Antikörper deutet darauf hin, dass auch Gag-Pol-Vorläufer bei allen Viren mit vergleichbarer Effizienz prozessiert werden (**Abbildung C3.6** unten).

Aus den Daten dieser Western Blot-Analysen kann geschlossen werden, dass p6*, abgesehen von der bereits bekannten Funktion des carboxyterminalen Tetrapeptides, weder die PR-Aktivierung, die Produktion und Prozessierung der Polyproteinvorläufer noch die Verpackung von Nef in Viruspartikel beeinflusst.

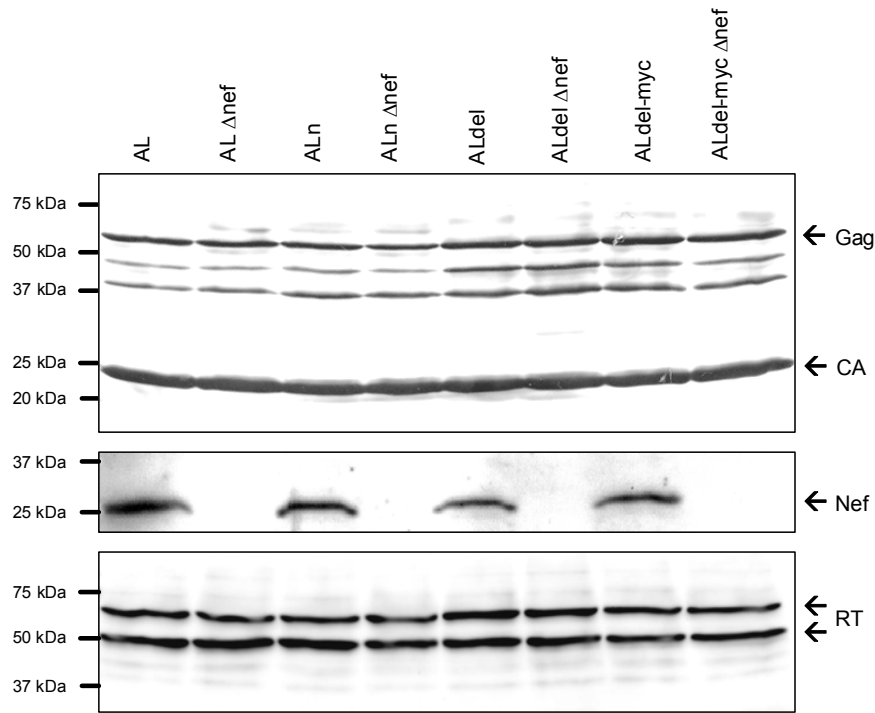


Abbildung C3.6 Analyse der Viruspartikelfreisetzung, Polyprotein-Prozessierung und Nef-Inkorporation bei den AL-Mutanten. 293T-Zellen wurden mit den angegebenen proviralen Plasmidkonstrukten (AL, Δ nef, ALn, ALn Δ nef, ALdel, ALdel Δ nef, ALdel-myc und ALdel-myc Δ nef) transfiziert. 72 Stunden nach Transfektion wurden die gebildeten Viruspartikel im Überstand geerntet, über Ultrazentrifugation aufkonzentriert und die Proteine über ein denaturierendes Gel chromatographisch aufgetrennt. Mit einem CA-spezifischen Antikörper wurden Gag-Polyproteinvorläufer und prozessiertes CA über Chemilumineszenz nachgewiesen (oben). Der Nachweis von Nef-spezifischen Produkten erfolgte entsprechend mit einem polyklonalen Antiserum (unten). Die Prozessierung des Gag-Pol-Polyproteinvorläufers wurde mit einem RT-spezifischen Antikörper analysiert. Die Positionen der Markerproteine sind angegeben.

C 3.7 P6* ist für die Infektiosität und Replikation von HIV-1 *in vitro* nicht essentiell.

Bereits die Mutation tot in NL4-3 deutete an, dass der gesamten zentrale p6*-Bereich für die Infektiosität und Replikation des Virus verzichtbar sein könnte. Um den Einfluss von aminoterminalen p6*-Mutationen oder einer weitgehenden p6*-Deletion auf die Infektiosität und Replikationskompetenz der resultierenden Viren zu untersuchen, wurden 293T-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. Drei Tage

später wurden zum einen TZM-bl- und zum anderen MAGI-Zellen mit normalisierten Mengen des virushaltigen Überstandes infiziert. **Abbildung C3.7 A** stellt das Ergebniss der Infektionsstudie in TZM-bl-Zellen dar. Die Infektiosität der Mutante ALn ist trotz der Substitution des gesamten Aminoterminus von p6* (R₃-S₁₇) im Vergleich zu AL nicht reduziert. Sogar die Deletion des gesamten zentralen Bereichs in der Mutante ALdel führte zu keinem Verlust oder zu keiner Reduktion der Infektiosität. Auch die Substitution der zentralen p6*-Region durch ein myc-tag (ALdel-myc) zeigte in diesem Zellkultursystem keinen negativen Effekt auf die Infektiosität. Die Infektionsstudie in MAGI-Zellen lieferte vergleichbare Ergebnisse (nicht gezeigt).

Neben der Infektiosität wurde auch die Replikationskompetenz der p6*-Mutanten in PBMCs und in den T-Zelllinien CEM und MT4 untersucht. In Analogie zu Abschnitt C2.10 und C3.4 stellte man auch hier die Inocula für die Replikationsstudien durch die Transfektion von 293T-Zellen und Bestimmung des CA-Gehaltes her. Mit gleichen Virusmengen wurden dann die drei verschiedenen Zellkultursysteme infiziert. In den **Abbildungen C3.7 B, C und D** sind die Wachstumskinetiken von AL, AL Δ nef, ALn, ALn Δ nef, ALdel, ALdel Δ nef, ALdel-myc und ALdel-myc Δ nef in PBMCs, CEM- und MT4-Zellen dargestellt.

In PBMCs fällt keine der p6*-Mutanten durch einen drastisch beeinträchtigten Replikationsverlauf oder gar durch einen Verlust der Replikationsfähigkeit auf. Vielmehr scheint die Deletion des zentralen p6*-Bereichs in der Mutante ALdel die Replikation sogar zu fördern, was aus dem, im Vergleich zu AL, stärkeren Anstieg der Replikationskurve und der um 57% erhöhten Virusmenge an Tag 5 geschlossen werden kann (**Abbildung C3.7 E**). Auch die Substitution der zentralen p6*-Region durch das myc-tag begünstigte die Replikation, da der Anstieg der Replikationskurve von ALdel-myc im Vergleich zu AL erhöht war und der maximale Virustiter 23% höher lag. Die Substitution des p6*-Aminoterminus in ALn hatte im Gegensatz dazu einen leicht negativen Effekt auf die Replikation in PBMCs, der maximale Virustiter von ALn war um 17% niedriger als der von AL. Das Fehlen von Nef resultierte wiederum in einer signifikanten Reduktion der Replikationskompetenz. Tendenziell war aber auch bei den Nef-defizienten Virusmutanten ein neutraler oder positiver Effekt auf die Replikation zu erkennen, wenn sich im zentralen Bereich von p6* Deletionen befanden. Aminoterminale Substitutionen hatten auf die Virusproduktion hingegen einen neutralen bis leicht negativen Einfluss.

Wie **Abbildung C3.7 C** zeigt, konnten die Ergebnisse aus den Untersuchungen in PBMCs bestätigt werden. So replizierten die Mutante ALdel und ALdelmyc auch in CEM-Zellen besser als AL, der Unterschied ist sogar noch deutlicher als in PBMCs.

Besonders zeigt sich dies an Tag neun, an dem der Virustiter von Aldel um 115% und der von Aldel-myc um 60% höher lag als der von AL (**Abbildung C3.7 F**).

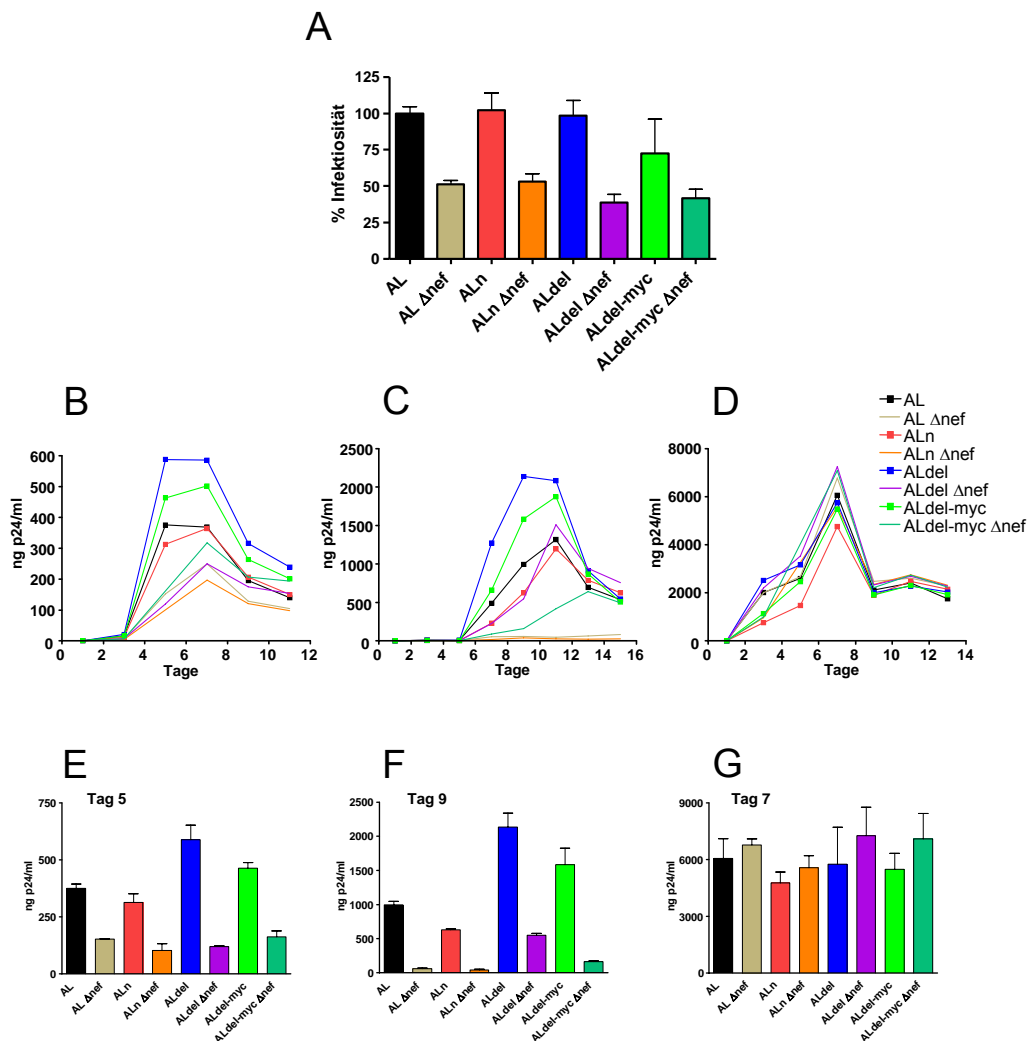


Abbildung C3.7 Einfluss der p6*-Mutationen in AL auf die Infektiosität und Replikation der Viruspartikel. 293T-Zellen wurden mit den Konstrukten AL, AL Δ nef, ALn, ALn Δ nef, ALdel, ALdel Δ nef, ALdel-myc und ALdel-myc Δ nef transfiziert und der virushaltige Überstand 72 Stunden nach Transfektion über einen p24-ELISA quantifiziert. Zur Bestimmung der Infektiosität wurden TZM-bl-Zellen jeweils mit gleichen Mengen an Viruspartikeln, die bezüglich ihres CA-Gehaltes normiert wurden, infiziert. 48 Stunden nach Infektion wurde die induzierte Luciferase-Expression bestimmt und die erhaltenen Werte auf die Wt-Infektiosität (=100%) bezogen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente, die Standardabweichung vom Mittelwert ist jeweils angegeben (A). Zur Bestimmung der Replikationskinetiken wurden 2×10^6 PBMCs, CEM- und MT4-Zellen jeweils mit gleichen Mengen an Viruspartikeln (normiert über die quantifizierten p24-Mengen) in Doppelansätzen infiziert. Im Abstand von zwei Tagen wurden Proben der Überstände gewonnen und deren Viruskonzentration in PBMCs (B), CEM-Zellen (C) und MT4-Zellen (D) mit Hilfe eines p24-ELISAs bestimmt. Die Balkendiagramme (E, F, G) zeigen die Menge p24 der entsprechenden Zellen zum angegebenen Zeitpunkt an. Die Kurvenpunkte der Replikationskinetiken entsprechen den Mittelwerten von Doppelansätzen. Die entsprechenden Standardabweichungen sind jeweils angegeben. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit unterschiedlichen Viruspräparationen.

ALn zeigte wiederum einen leichten Replikationsnachteil. Der Virustiter an Tag 9 war, verglichen mit AL, um 37% niedriger. Überraschend war, dass die Nef-defiziente Variante ALdel Δ nef eine ähnliche Wachstumskurve aufwies wie das Nef-exprimierende AL bzw. ALn. Zusätzlich zeigte sich, dass die Mutanten AL Δ nef und ALn Δ nef offensichtlich nicht fähig sind, in CEM-Zellen zu replizieren. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass es für weniger effizient replizierende Viren schwieriger ist in CEM-Zellen eine Infektion zu etablieren. Generell waren die Maxima der CA-Produktion in CEM-Zellen, im Vergleich zu PBMCs, um 4-6 Tage verzögert. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits in Abschnitt C2.6 beschrieben.

MT4-Zellen konnten hingegen von allen Virusmutanten vergleichbar produktiv und Nef-unabhängig infiziert werden (**Abbildung C3.7 D und G**).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass für die Aufrechterhaltung der Infektiosität und Replikationsfähigkeit von HIV-1 *in vitro* der Aminoterminus und die zentrale Region von p6* keine entscheidende Rolle spielen. Die gezeigten Daten deuten eher darauf hin, dass im Wt-HI-Virus die Länge und der Aminosäure-Kontext von p6* hauptsächlich durch den überlagerten gag-ORF und die *frame shift*-Region bestimmt wird.

C 3.8 Die Länge der zentralen p6*-Region ist für die Funktionalität des Virus limitierend.

Wie die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Abschnitt zeigten, war die Mutante ALdel-myc, bei der die zentrale p6*-Sequenz durch ein myc-tag ersetzt worden war, im Stande, infektiöse Viruspartikel zu bilden und in verschiedenen Zellkultursystemen zu replizieren. Im Folgenden sollte nun überprüft werden, ob in den p6*-ORF inserierte tags auch in Viruspartikeln verpackt werden und dort nachweisbar sind.

Dazu wurden 293T-Zellen mit den proviralen Konstrukten AL und ALdel-myc transfiziert und Zellkulturüberstand drei Tage nach der Transfektion gesammelt. Darin enthaltene Viruspartikel wurden analog zu Abschnitt C2.10 über Ultrazentrifugation aufkonzentriert und lysiert und mit einem myc-spezifischen Antikörper einer Western Blot-Analyse unterzogen. Durch die Prozessierung des Gag-Pol_{ALdel-myc}-Polyprotein-vorläufers (**Abbildung C3.8 B**) erwartete man ein nur 3,2 kDa kleines myc-Produkt, das durch die Spaltung an der internen und carboxylterminalen p6*-Spaltstelle hervorgehen sollte. Den Zellen wurde daher vier Stunden nach der Transfektion der PR-Inhibitor Saquinavir zugegeben, um die vollständige Prozessierung des Gag-Pol-

Vorläufers zu verhindern und den Nachweis von myc-spezifischen Produkten zu erleichtern. Wie **Abbildung C3.8 A** deutlich macht, konnten in der Tat mehrere myc-spezifische Signale in den ALdel-myc-Viruspartikeln detektiert werden, die zeigen, dass myc tatsächlich ein Teil des in Viruspartikeln inkorporierten Gag-Pol-Vorläufers ist. Darüber hinaus entsprachen die myc-spezifischen Proteinbanden (a-e) zwischen 60 und 170 kDa den errechneten Größen der Gag-Pol_{ALdel-myc}-Prozessierungsintermediate. Danach kommt es im 167,5 kDa großen Gag-Pol_{ALdel-myc}-Vorläufer zu einer ersten Spaltung zwischen p2 und NC, die ein 41 kDa großes MA-CA-p2 und ein 125,6 kDa großes NC-p1-p6_{gag}-p6*myc-PR-RT/RNaseH-IN-Intermediat hervorbringt. Im Anschluss daran liefert die Prozessierung der internen p6*-Spaltstelle zwischen den Aminosäuren F₈ und P₉, die auch bei ALdel-myc vorliegt, ein 110,5 kDa großes p6*P₉myc-PR-RT/RNaseH-IN-Produkt. Die Abtrennung der IN resultiert in einem 78,3 kDa p6*P₉myc-PR-RT/RNaseH-Intermediat, von dem schließlich die RNaseH-Domäne in einem letzten Schritt abgespalten wird. In Anwesenheit von Saquinavir stellte p6*P₉myc-PR-RT mit 65,3 kDa somit das letzte Prozessierungsintermediat dar. Dieses Prozessierungsschema ist weitgehend in Einklang mit früheren Berichten verschiedener Gruppen, die sich mit PR-vermittelter Polyprotein-Prozessierung bei HIV beschäftigt hatten (126;166;167) Offensichtlich verändert die Insertion von myc in den p6*-ORF die Prozessierung bzw. Maturation von Gag-Pol nicht.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es auf der Grundlage von AL möglich ist, Reporter-Sequenzen in den p6*-ORF zu inserieren, um Partikel-assoziierte Prozessierungsschritte aufzuklären.

Ausgehend von den vorliegenden Daten sollte nun ermittelt werden, wie sich die Insertion einer wesentlich größeren heterologen Sequenz in den p6*-ORF auswirkt. Dazu wurde das Gen für das 27 kDa große *green fluorescent protein* (GFP) in Analogie zu der in Abschnitt C3.5 beschriebenen Herstellung von ALdel-myc an Stelle der zentralen p6*-Region in Gag-Pol inseriert. Um festzustellen, ob GFP im p6*-ORF exprimiert und anschließend in Viruspartikel verpackt wird, transfizierte man 293T-Zellen mit dem als ALdel-GFP (**Abbildung C3.8 C**) bezeichneten Plasmidkonstrukt, mit AL oder einem Leervektor (- Kontrolle). Nach 72 Stunden wurden die Überstände filtriert und die enthaltenen Viruspartikel über Ultrazentrifugation aufkonzentriert, lysiert und einer Western Blot-Analyse mit einem GFP-spezifischen Antikörper unterzogen.

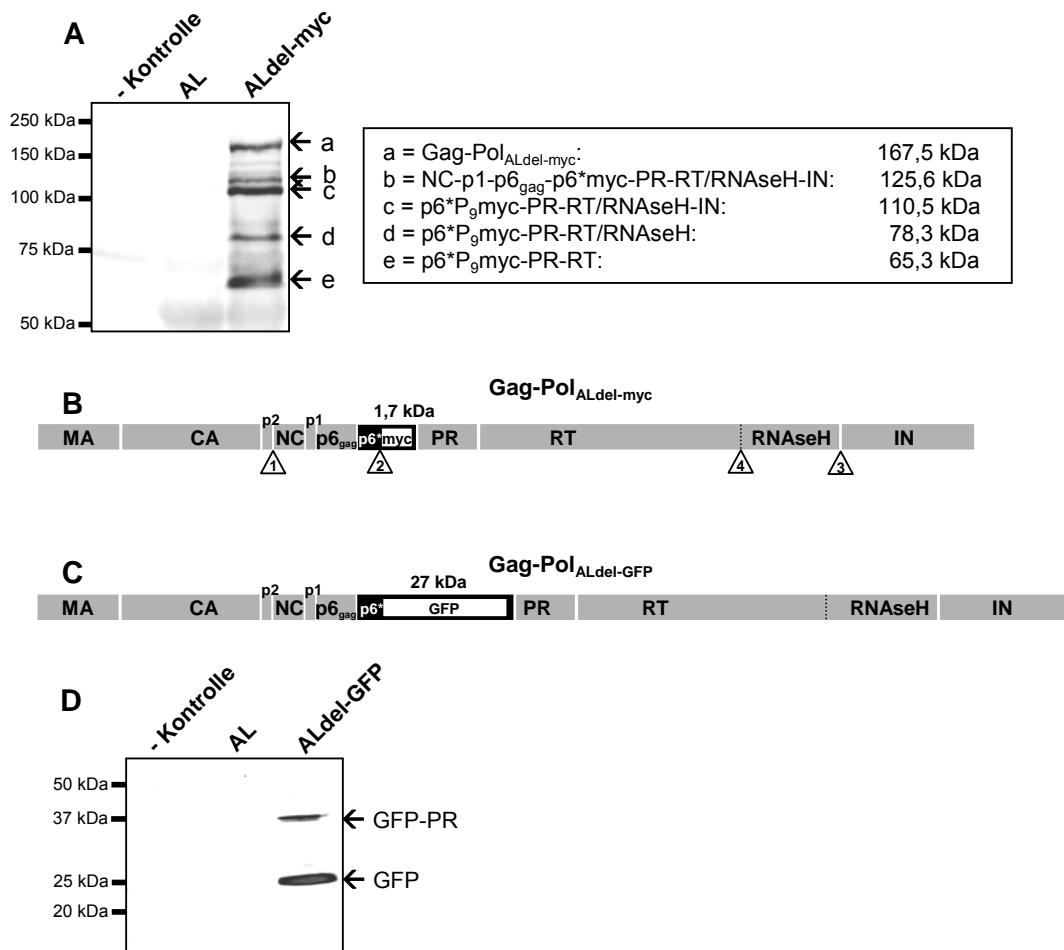


Abbildung C3.8 Inkorporation heterologer Sequenzen aus dem p6*-ORF in Viruspartikel.

293T-Zellen wurden mit AL- und ALdel-myc Provirus-Konstrukten und einem Leervektor in Gegenwart des PR-Inhibitors Saquinavir transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die gebildeten Viruspartikel im Überstand geerntet, über Ultrazentrifugation aufkonzentriert und die Proteine über ein denaturierendes Gel chromatographisch aufgetrennt. Die Detektion myc-spezifischer Prozessierungsintermediate erfolgte in einer Western Blot-Analyse mit myc-spezifischen-Antikörpern über Chemilumineszenz (A). Der Gag-Pol-Polypeptinvorläufer der Mutante ALdel-myc ist schematisch dargestellt. Die myc-Insertionen in den p6*-ORF (weiße Box) und die dem Prozessierungsmuster in A entsprechenden PR-Spaltstellen (Δ) sind hervorgehoben (B). Anstelle von myc wurde in ALdel-GFP die zentrale p6*-Region durch das GFP-Reportergen (weiße Box) ersetzt (C). 293T-Zellen wurden mit AL- und ALdel-GFP Provirus-Konstrukten und einem Leervektor transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die gebildeten Viruspartikel im Überstand geerntet, über Ultrazentrifugation aufkonzentriert und GFP analog zu A über Chemilumineszenz nachgewiesen (D). Die Positionen der Markerproteine sind angegeben.

Wie **Abbildung C3.8 D** zeigt, wurde ein GFP-spezifisches Produkt bei ungefähr 27 kDa in ALdel-GFP-Partikeln, aber nicht in AL-Partikeln nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass GFP bzw. p6* mit GFP als Substitution der zentralen Region (p6*P₉GFP) exprimiert und in Viruspartikel inkorporiert wurde. Darüber hinaus konnte ein zweites, etwa 39 kDa großes Produkt detektiert werden, bei dem es sich mit hoher

Wahrscheinlichkeit um ein GFP-PR bzw. p6*P₉GFP-PR-Intermediat handelt. Allem Anschein nach wurde das Partikel-assoziierte GFP nicht quantitativ aus dem Gag-Pol-Vorläufer freigesetzt.

Die obigen Daten zeigen, dass das Virus AL bzw. ALdel, welches für ein verkürztes p6* kodiert, als Plattform dient, um heterologe Peptide oder Proteine in Viruspartikel einzuführen.

C 3.9 Die Länge der p6* spacer Region ist kritisch für die virale Assemblierung, Maturation und Infektiosität.

Nachdem feststand, dass die deutlich unterschiedlich großen Genprodukte für myc (1,2 kDa) und gfp (26,8 kDa) beide im p6*-ORF exprimiert und in Viruspartikel verpackt werden, sollte nun geklärt werden inwieweit die Länge dieser p6*-Insertionen die Freisetzung und Aktivierung der viralen PR beeinflusst. Die Analyse der Viruspartikel-Präparationen mit einem PR-spezifischen Antikörper zeigte im Western Blot bei AL und ALdel-myc ein deutliches Signal, welches der reifen 11 kDa großen PR zuzuordnen war. Gleichzeitig konnten in den Viruspartikeln von ALdel-GFP nur äußerst geringe Mengen an PR detektiert werden (**Abbildung C3.9 A**). Die gleichen Präparationen wurden daraufhin mit einem CA-spezifischen Antikörper analysiert. Wie **Abbildung C3.9 B** deutlich macht, vollzog sich die Prozessierung des Gag-Polyproteinvorläufers zu CA bei AL und ALdel-myc mit vergleichbarer Effizienz. Im Gegensatz dazu ist die Prozessierung bei ALdel-GFP stark beeinträchtigt, was sich im überaus deutlich reduzierten CA-Gehalt widerspiegelt. Die Insertion einer Sequenz dieser Länge in den p6*-ORF scheint offenbar die PR an ihrer Autoprocessing aus dem Gag-Pol-Vorläufer und damit verbunden an ihrer Aktivierung zu hindern.

Die Detektion geringer Mengen des 51 und 66 kDa großen RT Heterodimers (**Abbildung C3.9 D**) deutet jedoch zusammen mit der Tatsache, dass GFP teilweise aus dem Gag-Pol-Vorläufer freigesetzt wurde (**Abbildung C3.8 D**) darauf hin, dass die PR zumindest flankierende Protein-Domänen in geringem Umfang prozessieren kann.

Um weiterhin auch die Effizienz der Verpackung der viralen Polyproteinvorläufer abschätzen zu können, wurden die relativen Mengen an gag- und pol-kodierten Proteinen bestimmt, die nach dem *budding* der Partikel in den transfizierten Zellen zurückgeblieben sind. Der Western Blot in **Abbildung C3.9 E** belegt, dass in mit AL transfizierten Zellen nach der Freisetzung der Viruspartikel nur noch Spuren von RT

nachweisbar waren, während in mit ALdel-GFP transfizierten Zellen große Mengen des RT-Produktes zurückgeblieben sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass pol-kodierte Proteine auf Grund der GFP-Insertion in p6* ineffizienter verpackt werden. Darüber hinaus könnte eine gestörte Dimerisierung der Gag-Pol-Polypoteine die Aktivierung der Zell-assoziierten PR verzögern. Dies würde den deutlich reduzierten Gehalt Gag-spezifischer Prozessierungsprodukte in Zell-Lysaten erklären, die mit ALdel-GFP an Stelle von AL transfiziert wurden (**Abbildung C3.9 F**).

Um zu klären, ob dieser Effekte in mit ALdel-GFP transfizierten Zellen auf eine reduzierte Expression der Polyproteinvorläufer zurückzuführen ist oder auf deren gestörte Prozessierung und Verpackung, wurden Zellen mit den beschriebenen Proviruskonstrukten in Gegenwart von Saquinavir transfiziert und die Gesamtmenge des unprozessierten Gag-Vorläufers in Zell-Lysaten verglichen. **Abbildung C3 9 C** zeigt, dass alle Provirus-Konstrukte vergleichbare Mengen an Pr55^{gag} produzierten und dass Insertionen in p6* offensichtlich keinen Einfluss auf die Expression der Gag-Vorläufer zu haben schienen.

Die beobachteten Effekte der GFP-Insertion auf den Proteingehalt der Viruspartikel deuten auf eine ineffektive Assemblierung der Zell-assoziierten viralen Vorläuferproteine hin, was sich auch in der verminderten Partikelfreisetzung widerspiegelte.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die CA-Proteinmengen in Zell-freien Überständen von Transfektionsansätzen im ELISA verglichen. Wie man in **Abbildung C3.9 G** erkennt, ist die CA-Menge im Überstand von ALdel-GFP signifikant reduziert und beträgt etwa 7% bezogen auf die AL-spezifische Partikelpräparation. Im Gegensatz dazu lieferten die Viren, die eine verkürzte p6*-Region besitzen mit AL vergleichbare CA-Mengen. Auf Grund der Tatsache, dass im ELISA primär prozessiertes CA detektiert wird, sollte auch der Anteil an Vorläufer-assoziiertem CA-Protein in den Überständen nachgewiesen werden, um den Grad der Maturation bzw. CA-Prozessierung in den Viruspartikeln zu ermitteln. Dazu inkubierte man die verschiedenen Viruspräparationen mit rekombinanter HIV-1 PR (rPR), um alle restlichen, unprozessierten Gag-Vorläuferproteine zu spalten. Die erzielten CA-Mengen wurden wiederum über ELISA quantifiziert und mit den Werten verglichen, die vor der Behandlung mit rPR ermittelt wurden. Während sich der CA-Gehalt aller übrigen Mutanten verglichen mit AL in Gegenwart von rPR nicht weiter erhöhte (was für einen hohen Grad der Maturation spricht), führte die Behandlung von ALdel-GFP Partikeln zu einer deutlichen Steigerung des CA-Gehaltes um das dreifache des Ausgangswertes. Jedoch war der ermittelte CA-Gehalt immer noch vier- bis fünfmal geringer als bei allen anderen Ansätzen.

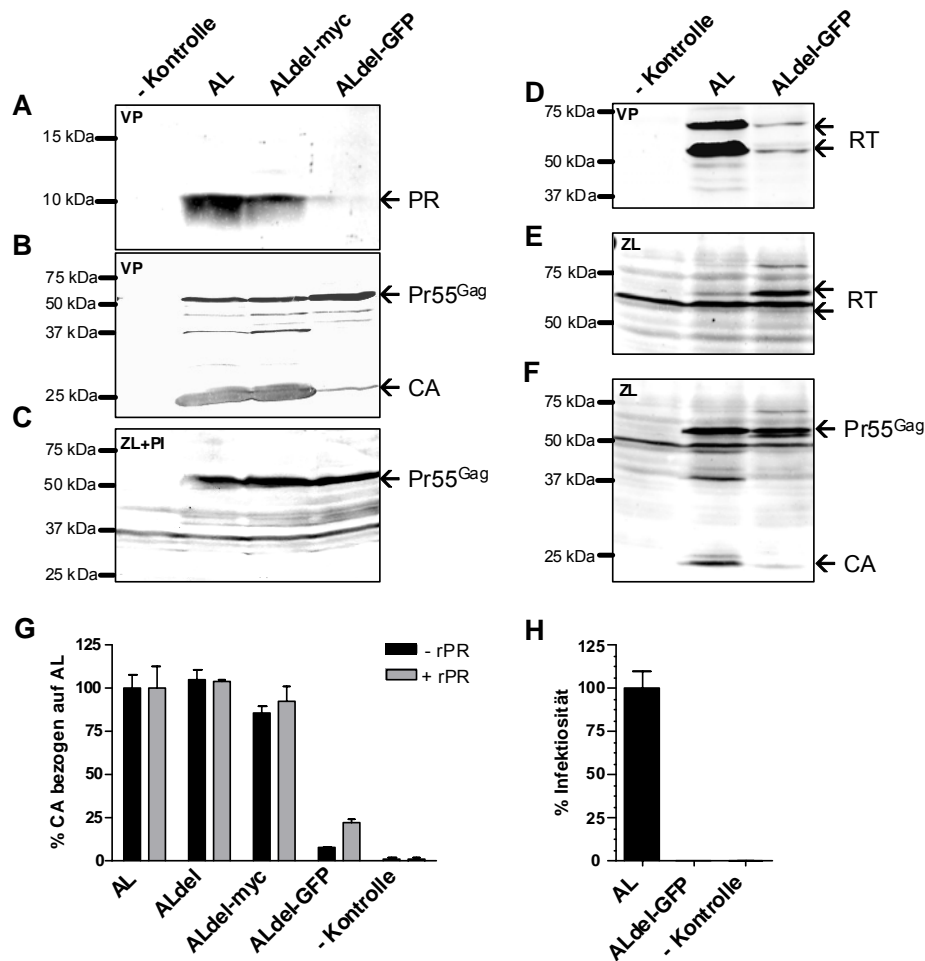


Abbildung C3.9 Einfluss des p6*-spacer auf die virale Maturation und Infektiosität. 293T-Zellen wurden mit den beschriebenen Proviruskonstrukten oder einem Leervektor transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet bzw. virushaltiger Überstand filtriert und die Viruspartikel über Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Die Lysate der Viruspartikel (VP) (A, B, D) bzw. der Zellen (ZL) (E, F) inkubierte man in Western Blot-Analysen mit PR-, CA-, GFP-, oder RT-spezifischen Antikörpern und wies die spezifischen Produkte über Chemilumineszenz nach. Alternativ fand die Transfektion in Gegenwart des PR-Inhibitors Saquinavir (PI) statt (C). Die Positionen der Markerproteine sind angegeben. Zur Bestimmung des CA-Gehalts im Überstand transfizierte man ebenfalls 293T-Zellen mit den angegebenen proviralen Viruskonstrukten. 72 Stunden nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen und die darin enthaltenen Viren über Ultrazentrifugation aufkonzentriert, lysiert und der Gehalt an prozessiertem CA (p24) mit einem CA-spezifischen Antikörper in einem ELISA ermittelt. Darauf folgte eine Inkubation der Proben mit einem Überschuss einer rekombinant hergestellten HIV-1 PR der Firma Bachem und eine erneute Messung des CA-Gehalts. Das Balkendiagramm zeigt den CA-Gehalt der betreffenden Mutanten vor und nach Prozessierung *in trans*, bezogen auf AL. Die Experimente wurden in Doppelansätzen durchgeführt, die Standardabweichungen vom Mittelwert sind angegeben (G). Die Infektiosität der entsprechenden Virusmutanten wurde über die Infektion von CD4-positiven TZM-bl Indikatorzellen ermittelt, die mit normierten Mengen (ermittelt in G) an Viruspartikeln infiziert wurden. 48 Stunden nach Infektion konnte die durch die Infektion induzierte Luciferase-Expression bestimmt und die erhaltenen Werte auf die AL-Infektiosität (=100%) bezogen werden (H). Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist jeweils angegeben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Insertion einer langen GFP-Reportersequenz zum einen mit der Assemblierung und der Partikelproduktion interferiert und zum anderen auch die quantitative Maturation des Gag-Vorläuferproteins behindert. Dies kam wahrscheinlich auf Grund eines veränderten Verhältnisses von Partikel-assoziierten Gag- und Gag-Pol-Vorläufern zu Stande.

Wie erwartet, führten diese Effekte bei ALdel-GFP Viren zu einem kompletten Verlust der viralen Infektiosität, die in einer TZM-bl Reporterzelllinie ermittelt wurde (**Abbildung C3.9 H**).

Zusammengefasst kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die Größe des p6*-*spacer* die Effizienz der Assemblierung der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine bestimmt, die sich an der Cytoplasmamembran vollzieht und Voraussetzung für die Freisetzung maturer und voll infektiöser Viren ist.

D Diskussion

D 1 Die Integrität des p6*-Carboxylterminus ist für die virale Fitness essentiell.

D 1.1 Eine blockierte p6*-PR-Spaltung löst schwere Prozessierungsdefekte aus.

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass rekombinant hergestelltes p6* spezifisch die Aktivität reifer PR inhibiert (162). Maßgeblich daran beteiligt ist das carboxylterminale Tetrapeptid von p6*, das sich vermutlich nach Prozessierung der p6*-PR-Spaltstelle in das aktive Zentrum der PR einlagert. Mutationen dieser Spaltstelle lösen unterschiedliche Effekte aus. In ihrer Dissertation konnte Christine Ludwig nachweisen, dass Substitutionen am p6*-Carboxylterminus bei proviralen HX10-Mutanten zu einer Verzögerung der Spaltung zwischen p6* und PR führen können. In einigen Fällen kam es sogar zur Blockierung dieser Spaltung, wodurch die vollständige Aktivierung der PR verhindert wurde. Solche Mutanten wiesen schwere Defekte bei der Prozessierung der Polyproteinvorläufer Gag und Gag-Pol auf, unter anderem eine unvollständige Spaltung des RT-IN-Intermediates. Auch die Prozessierung des Gag-Polyproteins zu freiem MA, CA oder NC war vollständig inhibiert (133). Wie die Ergebnisse aus Abschnitt C1.2 zeigen, kommt es dabei zu einem unnatürlichen MA-CA-p2-NC/p1-Intermediat. Diese schweren Prozessierungsdefekte verhinderten offenbar die Bildung infektiöser Viren, was in Infektiositäts- und Replikationsstudien belegt werden konnte (134).

D 1.2 Eine verzögerte Freisetzung der PR beeinträchtigt die virale Fitness.

Bei anderen Spaltstellen-Mutationen trat, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Effekten, nur eine verzögerte Freisetzung der PR ein. In Western Blot-Analysen waren daher neben der reifen 11 kDa großen PR auch Spuren einer 17 kDa Bande zu sehen. Diese entspricht einem Prozessierungsintermediat aus intern gespaltenem p6* und PR (p6*₉₋₆₈-PR) (4). Die Prozessierung von p6* beginnt zuerst an der internen Spaltstelle, da sie für die im Vorläufer eingebettete PR am besten zugänglich zu sein

scheint, bevor sie auf die flankierenden Spaltstellen übergreift (134;167;168) Weiterhin wiesen diese Mutanten aber keine schweren Prozessierungsdefekte auf. Sowohl ihre Infektiosität als auch ihre Replikation in MT4-Zellen entsprachen dem Wt-Niveau (134). Diese Ergebnisse waren im Einklang mit Rose und Kollegen, die vorschlugen, dass die Infektiosität des Virus nicht signifikant verändert wird, solange die Aktivität der PR nicht um den Faktor vier abnimmt (189).

Die vorliegende Arbeit konnte darüber hinaus in einer sensitiveren Analyse des Replikationsverhaltens dieser Spaltstellen-Mutanten zeigen, dass Mutationen der p6*-PR-Spaltstelle, die nicht direkt zu schweren Prozessierungsdefekten führen, trotzdem die virale Fitness beeinträchtigen. Es zeigte sich, dass diese Mutanten in Konkurrenz mit dem Wt-Virus bei der Replikation in CEM-Zellen deutlich benachteiligt waren (Abschnitt C1.3). Dies konnte erst durch die Etablierung eines Wettbewerbs-Replikations-Tests festgestellt werden. Der Vorteil dieses Systems liegt in der direkten Konkurrenz der betreffenden Viren um die zu infizierenden Zellen. Von Replikationszyklus zu Replikationszyklus wird das schwächere Virus vom Stärkeren immer mehr verdrängt, sodass sich auch kleine Infektiositäts-Unterschiede quantifizieren lassen. Diese Situation kommt der *in vivo* Situation deutlich näher als herkömmliche Replikations-Tests, bei denen nur jeweils ein Virustyp Zellen infiziert.

Interessanterweise replizierte die Spaltstellen-Mutante csM5 in diesem Test vergleichsweise besser als csM6, obwohl die aminoterminal Freisetzung der PR bei csM5 wesentlich langsamer stattfindet als in csM6, bei der sie kaum verzögert ist (133). Das lässt vermuten, dass die schwächere Replikation von csM6 im Wettbewerbs-Replikations-Test zum Teil durch sekundäre Effekte zu Stande kam, die vom csM6-spezifischen Tetrapeptid ausgehen. Tatsächlich konnten *in vitro* PR-Inhibitionstests mit gereinigten p6*-Proteinen bereits zeigen, dass der csM6-spezifische Carboxylterminus die PR besonders effektiv und stärker als das Wt-p6*-Protein inhibiert (133).

Zusammenfassung D1

Abschließend konnten die Ergebnisse dieser und vorangegangener Arbeiten zeigen, dass der Carboxylterminus von p6* bzw. die carboxylterminale p6*-PR-Spaltstelle und deren Spaltung essentiell für die vollständige Aktivierung der PR, die anschließende Prozessierung der Polyproteinvorläufer und die Virusreplikation ist.

D 2 Die zentrale p6*-Region ist für die Funktionalität des Virus verzichtbar.

D 2.1 Der zentrale Bereich von p6* ist hoch polymorph.

Abgesehen von seiner Rolle bei der PR-Regulation und der damit verbundenen viralen Replikation *in vitro* ist p6* essentiell für die Pathogenese von HIV-1 *in vivo*. Erst kürzlich wurde von Cao und Kollegen gezeigt, dass der zentrale Bereich von p6* ein von ihnen als NL8 bezeichnetes Epitop (NSPTRREL) für die Erkennung durch cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) trägt. Sie beobachteten, dass dieses Epitop in einem Patienten, der eine anti-retrovirale Therapie ablehnte, unter dem Druck der T-Zellantwort mutierte (25). Sequenzvergleiche zahlreicher Isolate zeigten, dass die zentrale p6*-Region wohl der Bereich im Gag-Pol-Polypoteinvorläufer ist, der die höchste Variabilität aufweist. Grund dafür sind entweder natürlich auftretende oder durch medikamentöse Therapie (HAART) hervorgerufene Polymorphismen, zu denen auch Insertionen und Deletionen zählen (3;10;18;92;96;112;165;205;223;235). Über die Entstehung des von Ratner in frühen HIV-1-Klonen entdeckten p6*-Polymorphismus, die Duplikation einer 36 bp-Sequenz, kann nur gemutmaßt werden. Wahrscheinlich ist aber, dass diese Region einen *hot spot* für fehlerhafte *Primer*-Anlagerung während der reversen Transkription darstellt (12 und Abschnitt A4.2).

D 2.2 Die Duplikation SSEQTRANSPT in der zentralen p6*-Region erhöht oder erniedrigt die Virusreplikation abhängig vom verwendeten Zellsystem.

Am häufigsten wird über Insertionen in die ersten 11 Aminosäuren von p6_{gag} (LQSRPEPTAPP) bzw. in die p6*-Domäne SSEQTRANSPT berichtet, durch welche es zu teilweisen Duplikationen dieser Aminosäuresequenz kommt. Während diese Domäne bei p6_{gag} das PTAP-Motiv enthält, das für die Bindung von Tsg101 (Abschnitt A4.4) verantwortlich ist, ist die Funktion der entsprechenden p6*-Domäne nicht bekannt.

Solche Duplikationen in der p6*-Region werden in unter Therapie stehenden, aber auch in unbehandelten HIV-1 positiven Patienten als natürliche Polymorphismen oder als Resultat der *viral evasion* unter dem Druck des Immunsystems beobachtet (10;25;96;165). In ihrer Arbeit berichteten Peters und Kollegen, dass nach der

Insertion der drei Aminosäuren langen Wiederholungssequenz SPT in den p6*- bzw. APP in den p6_{gag}-Bereich, eine höhere Resistenz gegenüber nukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) festgestellt werden konnte. Außerdem stellten sie für diese Mutante, im Vergleich zum NL4-3-Wt, eine erhöhte Infektiosität in Gegenwart oder Abwesenheit von NRTIs fest. Weiter zeigten sie, dass dieser Effekt in Abwesenheit von anti-retroviralen Medikamenten eine verringerte Virusfreisetzung in COS-7 Zellen mit sich brachte (165). Dies bestätigten teilweise die Ergebnisse mit der NL4-3 Mutante dup, die die 11 Aminosäuren lange, aus HX10 übernommene Duplikation trägt. Auch sie wiesen erhöhte Infektiosität und einen Zelltyp-abhängigen Einfluss auf die Replikation auf. In PBMCs wirkte sich die Duplikation in der zentralen p6*-Region positiv auf die Replikation aus, in CEM-Zellen leicht negativ (Abschnitt C2.6).

Zur weiteren Bestimmung der Replikationskompetenz wurde auch auf den bereits oben erwähnten sensitiveren Kompetitions-Replikations-Test zurückgegriffen. Hier zeigte sich in CEM-Zellen ein deutlicher Replikationsnachteil für die Duplikationsmutante, wenn sie in Konkurrenz zum Wt-Virus repliziert.

Die Tatsache, dass diese p6*-Duplikation, die in einem artifiziellen Zellsystem von Nachteil ist, in PBMCs die Replikation erhöht, deutet an, dass die Entstehung dieses Polymorphismus *in vivo* für den Virus von entscheidendem Vorteil sein muss. Grund dafür ist offensichtlich der Verlust des NL8-CTL-Epitops, der durch eine Duplikation zu Stande kommt (25).

D 2.3 Zwischen der Duplikation SSEQTRANSPT in p6* und dem Nef-Genprodukt zeigt sich phänotypisch keine Interaktion.

Von Ono und Kollegen wurde eine Interaktion von Nef und der Gag-Pol-Region im Bereich zwischen Apa I (Nukleotidposition 1217 *downstream* des Gag-Start-Kodons) und Bst 1107I (2138) vorgeschlagen. Sie beobachteten unterschiedliche Effekte von Nef auf die Virusreplikation bei den HIV-Klonen NL4-3 und LAI (155), die sich in diesem Bereich vor allem durch die 11 Aminosäure lange Duplikation in p6* unterscheiden. In Zusammenhang mit der von Costa vorgeschlagenen Nef-p6*-Interaktion (40) wurde eine biologisch relevante Interaktion zwischen Nef und der p6*-Duplikation vermutet.

Der oben beschriebene Zelltyp-abhängige Effekt der Duplikation zeigte sich in Replikationsstudien mit den Proviren NL4-3 Δ nef und HX10 in CEM-Zellen und PBMCs verschiedener Spender auch in Abwesenheit von Nef (Abschnitt C2.8).

Abgesehen davon sah man keinen Einfluss auf die PR-Aktivität (Abschnitt C2.11), die Viruspartikelproduktion oder die Polyprotein-Prozessierung, wenn p6* diese Duplikation trägt (Abschnitt C2.4).

Die ermittelten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Nef und die 11 Aminosäuren lange Verdopplungssequenz in p6* biologisch nicht miteinander verknüpft sind.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muß jedoch berücksichtigt werden, dass für den beschriebenen zelltypabhängigen Effekt auf die Virusreplikation gleichermaßen p6* wie p6_{gag} verantwortlich sein können. Wie oben erwähnt führt dieser Polymorphismus auch zu einer Verdopplung des PTAP-Motivs in p6_{gag}, welches die Bindung an Tsg 101 vermittelt. Dadurch wären die Rekrutierung der ESCRT-Maschinerie, die Assemblierung und Verpackung an der Cytoplasmamembran beeinflusst, was sich sicherlich auch auf die Replikationsgeschwindigkeit auswirken dürfte.

D 2.4 Substitutionen in der zentralen p6*-Region werden von HIV-1 gut toleriert.

Natürliche Polymorphismen wie Duplikationen oder Deletionen im Bereich von p6* betreffen, wegen der Überlagerung der Leserahmen gag und pol, auch immer p1 und p6_{gag}. Daher sollte in dieser Arbeit die Rolle von p6* für HIV-1 durch Aminosäuresubstitutionen in p6* aufgeklärt werden, der überlagerte gag-Leserahmen aber gleichzeitig unverändert bleiben. Die Vermutung lag nahe, dass p6* ein bisher unbekanntes Motiv enthält, das die Viruspartikelproduktion, die PR Regulation, die Vorläuferprozessierung, oder die Bindung von Nef beeinflusst und mit den Mutationen a-f identifiziert werden könnte.

Insgesamt wurde, mit Ausnahme von R₄₈Q₄₉, der gesamte zentrale Bereich von p6*(E₁₅-V₅₂) schrittweise mutiert. Die Bedeutung der p6*-PR Spaltstelle (S₅₃F₅₄S₅₅F₅₆) wurde bereits unter Kapitel D1 diskutiert.

Im Verlauf der Arbeit wurde deutlich, dass diese kleinen schrittweisen Mutationen in der zentralen Region von p6* die Virusreplikation nicht beeinflussen, die Substitution der gesamten zentralen Region (E₁₅ - V₅₂) bei der Mutante Mtot jedoch die Replikation verzögerte. Interessanterweise behinderte keine der genannten Mutationen die PR-Aktivität und die Prozessierung des Nef-Proteins oder der Polyproteinvorläufer, was in Übereinstimmung mit Daten aus HIV-infizierten Patienten mit Polymorphismen in p6* zu sehen ist, die von Bleiber und Kollegen analysiert wurden. Sie berichteten, dass kleinere Deletionen in p6* keine schweren Konsequenzen für die Virusreplikation *in vitro* und *in vivo* haben. Eine künstlich erzeugte 20 Aminosäuren umfassende

Deletion der p6*-(R₂₈-D₄₇) bzw. p6_{gag}-(S₁₄-I₃₁) Region führte hingegen zu einem drastischen Rückgang der Replikationskompetenz, den sie mit 75% angaben. Gleichzeitig konnten sie aber keine nennenswerte Verzögerung oder gar einen Defekt der Gag-Pol-Vorläuferprozessierung erkennen (18).

Außerdem berichteten sie, dass eine Deletion von E₁₂E₁₃ in p6_{gag}, bzw. eine Deletion von R₂₈R₂₉ in p6*, zu einem 50-prozentigen Rückgang der Replikation führte (18). Interessanterweise sah man bei Mutante d, bei der p6* in diesem Bereich eine Substitution der großen polaren Aminosäure Arginin gegen das kleine unpolare Glycin aufwies (R₂₈G, R₂₉G), p6_{gag} jedoch unverändert war, keinen Replikationsnachteil. Dies deutet darauf hin, dass die Deletion von E₁₂E₁₃ in p6_{gag} die Virusreplikation beeinträchtigte und die p6*-Reste R₂₈R₂₉ hingegen für den Virus verzichtbar sind. Ähnliches gilt für eine zwei Aminosäuren große Deletion in p6* (V₃₃W₃₄) bzw. p6_{gag} (F₁₇G₁₈), die in LTNP's gefunden wurde (3). Da auch diese Deletion durch Mutante d abgedeckt wird, beruht die verringerte Pathogenität des isolierten Virus vermutlich auf der p6_{gag}-Mutation.

Die Tatsache, dass die Substitution des gesamten zentralen p6*-Bereichs die Replikation nur verzögerte, aber nicht aufhob, legt nahe, dass dieser Region bei HIV-1 *in vitro* wohl keine unverzichtbare biologische Funktion zukommt. Aber auch *in vivo* scheint sie teilweise verzichtbar zu sein. Dafür spricht die Entdeckung einer 13 Aminosäuren umfassenden Deletion im Kodierungsbereich von p6* (S₄₀-V₅₂) / p6_{gag} (P₂₄-Y₃₆) in dem aus China stammenden HIV-1-Isolat CRF07_BC. Auch diese, bisher größte natürlich vorkommende p6*-Deletion, hatte keinen signifikanten Effekt auf die virale Fitness (205). Vermutlich stellt die Wt-Ausprägung des p6*-Zentrums aber die optimale sterische Konformation des Gag-Pol-Vorläufers dar. Zudem führten diese Substitutionen zur Verwendung von bei HIV-1 seltener gebrauchten Kodons, d.h. einer Verringerung des CAI.

Da diese sterischen Effekte und ein schlechterer CAI in der Mutante tot, im Gegensatz zu den Mutanten a-f mit kürzeren Substitutionsbereichen, akkumuliert vorliegen, zeigt die Mutante tot ein Replikationsdefizit, die Mutanten a-f hingegen nicht.

D 2.5 Eine Interaktion von Nef und der zentralen p6*-Region ist unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse aus Abschnitt C2.10 zeigten, dass die Substitution des gesamten zentralen Bereichs die Replikation Nef-exprimierender (Mt_{tot}) und Nef-defizienter Viren (Mt_{tot} Δ_{nef}) gleichermaßen verzögert. Darüber hinaus scheint sie gemäß Western

Blot-Analysen weder auf die Nef-Verpackung in Viruspartikel noch auf deren Produktion einen Einfluss zu haben. Sowohl in Wt- als auch Mtot-Partikeln konnte, wie bei Kotov und Kollegen, das unprozessierte Nef sowie zwei Spaltprodukte nachgewiesen werden (116). Dennoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es grundsätzlich zu einer Bindung zwischen Nef und p6* kommt. Wie unter Abschnitt A6.5 beschrieben, verzögert das Nef-Protein von HIV-1_{F12} die Partikelproduktion von transfizierten Zellen trotz der Synthese aller viralen Proteine (154). Diese Nef-Mutante hat einen dominant-negativen Effekt auf die Produktion und Infektiosität von HIV. Die Koexpression von NL4-3 Δ nef mit Nef-F12 ruft in 293T-Zellen eine signifikante Reduktion der Virusproduktion hervor, ein Phänotyp, der sich wegen der perinucleären Localisation des dominant-negativen Nef-Proteins entwickelt. Die Interaktion mit Gag-Pol, vermittelt über ein Bindemotiv im flexiblen *loop* des Nef-Carboxylterminus, ist in Nef-F12 jedoch funktionell unbeeinträchtigt (40;58).

Diese Abnahme der Partikelproduktion konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Jedoch wurde die Partikelproduktion gleichermaßen auch nach der Koexpression von Nef-F12 mit NL4-3 Mtot Δ nef verringert. Hätte die Mutation des zentralen p6*-Bereichs die Bindung von Nef an Gag-Pol aufgehoben, so wäre die Partikelproduktion jedoch nicht gestört worden.

In Zusammenhang mit der Tatsache, dass die virale Replikation durch diese p6*-Mutation unabhängig von Nef verzögert wird, lässt dies den Schluss zu, dass die Interaktion mit Nef irgendwo außerhalb des zentralen Bereichs von p6* lokalisiert ist. Interessanterweise wurde von Ciuffi und Kollegen eine Bindung von Nef an IN und RT nachgewiesen und daher eine alternative Nef-Gag-Pol-Interaktion vorgeschlagen (34).

Zusammenfassung D2

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass, abgesehen von seiner Rolle als RNA-Basis für den ribosomalen Leserastersprung und seiner Rolle als PR-Regulator, p6* für die Funktionalität von HIV-1 *in vitro* verzichtbar zu sein scheint, auch wenn es in seiner Wt-Konformation einen positiven Effekt auf die virale Infektiosität und Replikation hat. Wegen der hohen Variabilität und Mutationstoleranz wird für die zentrale p6*-Region eine Rolle als Platzhalter (*spacer*) vorgeschlagen.

D 3 Mit der Konzeption der Virusplattform AL steht ein neues Werkzeug zur Analyse der HIV-Replikationseigenschaften zur Verfügung.

D 3.1 Der Klon AL ist ein voll replikationsfähiger HI-Virus, der es erstmals erlaubt, gag- und pol-Genprodukte unabhängig voneinander zu analysieren.

Auf Grund seiner *transframe*-Position wurde p6* bisher hauptsächlich in *in vitro*-Studien untersucht, in denen entweder rekombinante Proteine oder verkürzte Gag-Pol-Vorläufer zum Einsatz kamen (127;128;129;160;256;257). Die Interpretation dieser Studien ist häufig schwierig, da die strukturellen und kinetischen Bedingungen hinsichtlich der Reifung der Polyproteinvorläufer je nach Versuchsaufbau variieren. Außerdem können Daten aus artifiziellen Systemen nicht uneingeschränkt mit Vorgängen in einem lebenden Virus verglichen werden. Um eine unabhängigere Mutagenese von p6* vornehmen zu können, ohne den viralen Kontext zu verlassen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Virusplattform konzipiert.

Auf Basis von NL4-3 wurde ein Virus generiert, bei dem die *frame shift*-Region an das Ende des gag-Leserahmen versetzt wurde, sodass die Überlappung der beiden Leserahmen gag und pol aufgehoben wurde. Es zeigte sich, dass die neu generierte *frame shift*-Region einen funktionellen Leserastersprung auslöst, der zur geregelten Translation der Gag und Gag-Pol-Polyproteinvorläufer führt. Deren Prozessierung sowie die Infektiosität und Replikationsfähigkeit von AL entsprach annähernd der von NL4-3. Die beschriebenen Veränderungen der Gag- (fünf zusätzliche Aminosäuren) und Gag-Pol-(Insertion von p1 und p6_{gag}) Polyproteine waren offensichtlich kein Ausschlusskriterium für den viralen Lebenszyklus:

Dem freien Carboxylterminus von Gag kommt offensichtlich bei der Replikation von HIV keine entscheidende Rolle zu, wie die Addition der Aminosäuren ANFLG an p6_{gag} von AL zeigt.

Das normalerweise nur im Gag-Kontext exprimierte p1 kennt man als kritischen Faktor für die Infektiosität von HIV-1, bei dem schon der Austausch von zwei Prolinen gegen Leucine die Infektiosität des Virus gänzlich aufhebt (88;89). Auch die zusätzliche Expression von p6_{gag}, das die für das *budding* wichtigen L (*late*)-Domänen trägt und für die Inkorporation von Vpr in Viruspartikel verantwortlich ist (114), im Gag-Pol-Polyprotein, schien die Funktionalität des Virus nicht zu stören. Der Einbau der NC-p6*-Spaltstelle (QAN-FFR) von NL4-3 zwischen p6_{gag} und p6* in AL, wie in

Abbildung C3.1 C und **D** hervorgehoben, führte zu einer PR-vermittelten Prozessierung zwischen $p6_{gag}$ und $p6^*$ im Gag-Pol-Vorläufer von AL. Der Vergleich der NL4-3 und AL-Prozessierungsmuster gab keinen Hinweis auf ein unprozessiertes $p6_{gag}$ - $p6^*$ -Intermediat, das bei ca. 12-13 kDa zu detektieren wäre (**Abbildung C3.3**).

Mit der Konstruktion dieses replizierenden HI-Provirus bei dem die beiden Leserahmen gag und pol entkoppelt vorliegen, besteht damit zum ersten Mal die Möglichkeit die *frame shift*-Region, p1 und $p6_{gag}$, sowie $p6^*$ und die PR unabhängig voneinander zu manipulieren, etwa durch Deletions- oder Insertions-Mutagenese. Damit repräsentiert dieses Viruskonstrukt ein neues wertvolles Werkzeug für die Analyse der HIV-1 Replikation. Basierend auf bereits veröffentlichten Ergebnissen (13;134;162;163) wurde dieses Virus genutzt, um die Rolle von $p6^*$ bei HIV-1 noch eingehender zu analysieren.

D 3.2 Der aminoterminalen Region von $p6^*$ kommt im HI-viralen Replikationszyklus keine wichtige Funktion zu.

Nachdem die Rolle des Carboxylterminus ($S_{53}F_{54}S_{55}F_{56}$) und des Zentrums von $p6^*$ weitgehend aufgeklärt war, war es von Interesse, tieferen Einblick in die Funktion des aminoterminalen Bereichs von $p6^*$ (F_1 - S_{17}) zu erlangen. Wie bereits erwähnt bildet die RNA, die für den Aminoterminus des Proteins kodiert, die beschriebene *frame shift*-Struktur, bestehend aus *slippery site* und die *stem loop*-Struktur. Mutationen in dieser konservierten Region von $p6^*$ wirken sich unweigerlich auf die Faltung der RNA aus, was den ribosomalen Leserastersprung beeinträchtigen könnte und die Produktion von Gag- und Gag-Pol-Vorläufern im richtigen Verhältnis stören würde. Somit können bei entsprechenden Virusmutanten beobachtete Effekte auf Prozessierung, Replikation, etc. nicht der Funktion des $p6^*$ -Proteins zugeschrieben werden. Außerdem befindet sich in diesem Bereich auch die aminoternale und interne $p6^*$ -Spaltstelle. Aus diesem Grund und wegen der überlappenden gag- und pol-Leserahmen, führen Mutationen im Aminoterminus von $p6^*$ entweder zu Austausch im gag-Leserahmen oder zur Zerstörung der *frame shift*-Struktur.

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass sich Substitutionen im $p6^*$ -Aminoterminus negativ auf die Effizienz des ribosomalen Leserastersprunges auswirken. Dadurch kam es zu Verzögerungen bzw. zum Verlust der Virusreplikation (163). Bereits die Veränderung der *slippery site* von UUUUUUA zu UUUUUUU führte im betroffenen Virus zu einem deutlich messbaren Rückgang der Infektiosität und Replikation (134). Die Substitutionen im Bereich des *stem loops*, die bei Mutante a zu

den Aminosäuresubstitutionen F₈E und K₁₂S führten, hatten hingegen keinen negativen Einfluss auf die *frame shift*-Effizienz. Des Weiteren zeigte Mutante a in allen Experimenten Wt-Eigenschaften. Somit blieb die Rolle des p6*-Aminoterminus, abgesehen von Position 8 und 12, für die Virusreplikation von HIV-1 unklar.

Mit Hilfe der Virusplattform AL konnten zum ersten Mal Mutationen in den p6*-Aminoterminus eingeführt werden, ohne gleichzeitig auch p1 oder p6_{gag} zu verändern. Eine Konservierung der *frame shift*-Struktur bei gleichzeitiger Substitution der Aminosäuren R₃-S₁₇ wurde erreicht, indem die linke und die rechte Seite des *stem loops* gegeneinander ausgetauscht wurden. Dadurch wurde auch der Großteil der hoch konservierten p6*-Region CR1, ein Teil der aminoterminalen und die gesamte interne p6*-Spaltstelle zerstört. Mit dieser Mutante (ALn) konnte erstmals die Rolle des p6*-Aminoterminus für den Replikationszyklus von HIV-1, unabhängig von Nebeneffekten durch Mutationen in überlagerten Strukturen, untersucht werden.

Obwohl der inverse *stem loop* der Mutante ALn mit vergleichbarer Effizienz wie AL einen ribosomalen Leserastersprung auslöste, war es dennoch überraschend, dass die umfassende Substitution des p6*-Aminoterminus keinen signifikanten Effekt auf die Partikelproduktion und die Inkorporation von Nef, auf die Polyprotein-Prozessierung und Maturation sowie auf die *in vitro*-Replikation und die Infektiosität des resultierenden Virus hatte (Beim Vergleich von AL und ALn zeigte sich, dass, bei gleicher Infektiosität, die Replikationskompetenz von ALn geringfügig verringert war. Ähnlich wie für die unter Abschnitt D2.4 diskutierten Ergebnisse für die zentrale p6*-Region, könnten auch im Aminoterminus von ALn ein schlechterer Kodongebrauch bzw. CAI oder sterische Effekte dafür verantwortlich sein).

Daraus kann geschlossen werden, dass neben den zentralen auch die aminoterminalen Aminosäuren von p6* keine spezifische Funktion im viralen Lebenszyklus einnehmen und hauptsächlich von der überlappenden p1-Domäne und der RNA-Sequenz der *frame shift*-Region definiert werden.

D 3.3 Die zentrale p6*-Region stellt einen *spacer* dar, der wahlweise deletiert oder substituiert werden kann.

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die zentrale p6*-Region keinen Einfluss auf die Partikelproduktion, die Nef-Inkorporation oder das Prozessieren der Vorläufer hatte. Bei der Frage, welche Bedeutung dem zentralen p6*-Bereich bei der Infektiosität und Replikation zukommt, zeigte sich, dass die Mutation tot die

Infektiosität und Replikation des Virus zwar beeinträchtigt, aber nicht aufhebt. Daher wurde unter Kapitel D2 für die zentrale p6*-Region eine Rolle als *spacer* vorgeschlagen. Die Genomorganisation von AL erlaubte diese Hypothese durch Deletions- und Insertions-Mutagenese zu verifizieren.

In der Mutante ALdel wurde neben einer Substitution (S₁₇T) die gesamte zentrale Region (S₁₈-V₅₂) deletiert, sodass p6* von ursprünglich 56 auf 21 Aminosäuren verkürzt wurde. Dies entspricht einer Deletions-Quote von 63% und stellt damit die größte bisher bekannte p6*-Deletion im viralen Kontext dar. Auf Grund der Erkenntnisse, die aus den oben beschriebenen Untersuchungen der p6*-Spaltstelle für die Aktivität der PR hervorgingen (Kapitel D1), blieb das carboxylterminale Tetrapeptid bei allen Mutationen unverändert. Gleiches galt für den Aminoterminal. Damit war zumindest eine effiziente Auto-Prozessierung der PR und ein funktioneller Leserastersprung gewährleistet (134).

Alternativ wurde eine weitere Mutante generiert, bei der die 35 Aminosäuren lange zentrale Region durch eine 14 Aminosäuren große völlig unverwandte Sequenz mit einem *myc-tag* im Zentrum ersetzt wurde (ALdel-myc).

Interessanterweise zeigte keine der beiden Mutanten Defekte betreffend der Produktion und Reifung der Partikel, der Infektiosität oder der Replikation. Die zentrale p6*-Region scheint tatsächlich für den *in vitro*-Replikationszyklus von HIV-1 funktionslos zu sein, da sie substituiert und ganz oder partiell deletiert werden kann. Dies würde wiederum für die *spacer*-Hypothese sprechen. Diese Annahme wird auch durch Chiu und Kollegen unterstützt, die Gag und p6*-deletiertes Gag-Pol koexprimierten. Eine fünf Aminosäuren große Deletionen in der zentralen p6*-Region (W₃₂-N₃₆) zeigte keinen Einfluss auf die Prozessierung und Infektiosität. Auch die Deletion beinahe aller (91%) p6*-spezifischen Aminosäuren hatte keinen Einfluss auf die Inkorporation von Gag-Pol in Viruspartikel. Da diese Deletion jedoch auch das carboxylterminale Tertapeptid betraf, bemerkten sie eine Beeinträchtigung der Gag-Prozessierung (32). Dies ist wiederum in Übereinstimmung mit den in Kapitel D1 diskutierten Ergebnissen.

D 3.4 Die Interaktion von Nef mit p6* scheint unwahrscheinlich.

Auf Grund der aktuellen Datenlage kann man mit Sicherheit davon ausgehen, dass die Interaktion von Nef und Gag-Pol zu einer effizienteren Virusreplikation bei HIV-1 führen sollte. Nachdem bereits eine Interaktion von Nef und der zentralen p6*-Region annähernd ausgeschlossen wurde, zeigten auch die beschriebenen Substitutionen

und Deletionen in p6* von AL keinen Einfluss auf die Verpackung des Nef-Proteins in Viruspartikel und dessen Prozessierung oder bewirkten eine beeinträchtigte Replikation. Dies wäre aber, auf Grund der Zerstörung beinahe aller möglichen Domänen, für eine Interaktion mit Nef durchaus zu erwarten gewesen. Daher sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit gegen eine Interaktion von Nef und p6*. Man kann aber nicht ausschließen, dass, auch wenn es unwahrscheinlich erscheint, über das verbleibende carboxyterminale Tetrapeptid, das in allen beschriebenen Mutanten erhalten blieb, eine Interaktion mit Nef stattfindet.

Zusammenfassung D3

Mit der Herstellung des Virus AL, bei dem die gag- und pol-Leserahmen entkoppelt vorliegen, war es erstmals möglich, HIV-Proteindomänen, die im natürlichen Viruskontext für Mutagenese nur schwer oder gar nicht erreichbar sind, zu analysieren. Dabei zeigte sich bemerkenswerterweise, dass die extensive Reorganisation von Gag- und Pol-Domänen die vitalen Funktionen des HI-Virus nicht störten.

Dies wurde für eine umfassende Analyse der p6*-Funktion genutzt, bei der, im Kontext eines replikationsfähigen Virus, spezifisch 50 der insgesamt 56 Aminosäuren mutiert wurden. Auf Grund der vorliegenden Daten wird ein Modell vorgeschlagen, indem das gesamte p6*-Protein, abgesehen von seinen vier carboxyterminalen Aminosäuren, keine *in vitro*-Funktion aufweist, sondern als Platzhalterprotein fungiert. Diese Möglichkeit wurde bereits früher auf Grund von Strukturanalysen in Betracht gezogen (13). *In vivo* könnte dieser *spacer* dem Virus Raum geben, um unter dem Druck des Immunsystems oder auf Grund von antiretroviraler Therapie *escape*-Mutationen einzubringen. Auch die Interaktion mit Nef scheint unwahrscheinlich. Weiterhin legen diese Ergebnisse nahe, dass allen bisher in der Literatur beschriebenen Defekten, die auf entsprechende Deletionen im p6*/p6_{gag}-Überlappungsbereich zurückzuführen sind, ein Funktionsverlust von p6_{gag} zu Grunde liegt.

D 4 AL bietet die Möglichkeit, Reportergene von begrenzter Größe in den p6*-Leserahmen einzubringen.

D 4.1 Die Länge des p6*-spacer scheint Einfluss auf die Geschwindigkeit der Virusreplikation zu haben.

Die Ergebnisse die mit den AL-Mutanten erzielt wurden, schließen einen Einfluss der aminoterminalen und zentralen p6*-Region auf die Partikelproduktion, die Nef-Inkorporation oder die Prozessierung der Polyproteinvorläufer aus. Darüber hinaus zeigte sich, dass alle Mutationen keinen nennenswerten Einfluss auf die RNA-Struktur und die Effizienz des Leserastersprunges hatten. Überraschenderweise war jedoch das Replikationsverhalten der Viren mit p6*-Deletionen in einigen Zellkultursystemen beschleunigt.

Dieser Effekt könnte durch einen verkürzten Translationsprozess zu Stande gekommen sein, bedingt durch die geringere Größe der betreffenden Gag-Pol-Vorläuferproteine.

Partin und Kollegen konnten in einem *in vitro*-Expressionsystem zeigen, dass die PR-vermittelte Gag-Pol-Prozessierung durch die Deletion von p6* deutlich effizienter verläuft (160). Aus diesem Grund erscheint es wahrscheinlicher, dass die schnellere *in vitro*-Replikation auf einer schnelleren Auto-Aktivierung der PR beruht, ausgelöst durch die (partielle) Deletion des p6*-spacer.

Die Ergebnisse der Replikationsstudien lassen vermuten, dass die Länge des p6*-spacer mit der Replikationsgeschwindigkeit korreliert: Die Mutante ALdel-myc mit einem 35 Aminosäure langen p6*-spacer replizierte schneller als AL mit dem Vollängen p6*-Protein (56 Aminosäuren), während ALdel mit einem nur 20 Aminosäure langen spacer am schnellsten replizierte.

In welchem Ausmaß die Deletion des zentralen p6*-Bereichs die Virusreplikation beeinflusst, zeigte sich am deutlichsten in CEM-Zellen. Dort wiesen das Nef-defiziente Virus mit p6*-Deletion (ALdel Δ nef) und die Nef-exprimierenden Viren ohne p6*-Deletionen (AL, ALn) vergleichbare Replikationskinetiken auf.

D 4.2 Mit der Virusplattform AL kann die Prozessierung von Gag-Pol in einem natürlichen System belegt werden.

Die Verzichtbarkeit eines großen Teils von p6* für den viralen Lebenszyklus ermöglichte es, in den p6*-Leserahmen heterologe Gensequenzen beliebig zu inserieren. Indem ein Teil der deletierten p6*-Domäne durch ein 10 Aminosäuren großes myc-tag ersetzt wurde, konnten initiale Prozessierungsschritte des Gag-Pol-Vorläufers beobachtet werden. Zunächst kommt es zur Spaltung zwischen p2 und NC, die ein MA-CA-p2-Intermediat freisetzt. Anschließend kommt es zur Prozessierung der internen Spaltstelle in p6*. Danach wird vom so verkürzten Gag-Pol-Vorläufer zuerst die IN, daraufhin der RNaseH-Anteil der RT abgespalten. Diese schrittweise Gag-Pol-Spaltung in den freigesetzten Viruspartikeln ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen früherer Studien, die jedoch aus artifiziellen Systemen gewonnen wurden (166;167;170).

D 4.3 Die Länge des p6*-spacer ist für die Funktionalität des Virus begrenzend.

Da eine Verkürzung von p6* einen positiven Effekt auf die *in vitro*-Replikation des Virus hatte, war nun von Interesse, inwieweit eine Verlängerung von p6* toleriert wird. Es zeigte sich, dass der GFP-Reporter trotz seiner Größe von 240 Aminosäuren vom p6*-Leserahmen exprimiert und noch in die Partikel des AL-Virus verpackt wird. Gleichwohl führte aber diese verhältnismäßig große Insertion zu einem dramatischen Rückgang der Viruspartikel-Freisetzung und zum Verlust der Infektiosität. Grund dafür war einerseits eine deutlich verringerte Verpackung der Pol-Proteine und andererseits eine Reduktion der PR-Aktivität. Im Gegensatz dazu zeigten Müller und Kollegen, dass eine Insertion, die zur Expression von GFP zwischen MA und CA im Gag-Vorläufer führt, vom Virus gut toleriert wird. Die Freisetzung von Viruspartikeln entsprach der des Wt und die Infektiosität war nur leicht beeinträchtigt (146). Offensichtlich werden vom Virus Insertionen in Gag besser toleriert als in Gag-Pol. Darüber hinaus weist AL im Gegensatz zu NL4-3 schon eine zusätzliche p1-p6_{gag}-Region in Gag-Pol auf, wodurch die Kapazität für weitere Insertionen in Gag-Pol geringer sein dürfte als in Gag.

Da die p6*-GFP-Fusionssequenz fünfmal größer als die wildtypische Volllängen-p6*-Sequenz ist, wurde eine alternative Reportersequenz in den verkürzten p6*-Leserahmen inseriert, die den p6*-spacer, verglichen mit der Wt-Sequenz nur um

12 Aminosäuren verlängerte und die Infektiosität des Virus nur geringfügig beeinträchtigte (Daten nicht gezeigt). Dabei handelte es sich um ein Cystein-basiertes Bindemotiv für arsenhaltige Fluorescein-Derivate, wie die kommerziellen Farbstoffe FIAsH und ReAsH, die wie GFP Biolumineszenz auslösen (2;81;139)

D 4.4 Die Extension des p6*-spacer könnte mit zunehmendem Maße die Dimerisierung und die Faltung der PR im Gag-Pol-Vorläuferprotein stören.

Wie bereits erwähnt ist die HIV-1-PR nur als Dimer aktiv. Zahlreiche Arbeiten haben gezeigt, dass die Sequenzumgebung der PR die Dimerisierungseffizienz der Gag-Pol-Vorläufer beeinflusst und zur richtige Faltung der im Vorläufer eingebetteten PR-Domäne und ihrer Autoprozessierung beiträgt (29;46;127;128;129;168;180;256). So konnten Pettit und Kollegen zeigen, dass der p6*-Bereich von Gag-Pol die Gag-Pol-Dimerisierung unterstützt und dass bei PR-Mutanten, die eine inaktivierte Dimerisierungsdomäne aufweisen, der Dimerisierungsdefekt erfolgreich kompensiert wird, wenn diese Mutanten als Teil des Gag-Pol-Vorläufers exprimiert werden (168). Darüber hinaus konnte p6* in einem bakteriellen *two-hybrid*-Assay die Funktionalität einer durch HAART resistent gewordenen, Dimerisierungs-inkompetenten und proteolytisch inaktiven PR-Variante wieder herstellen (46). Neben der unterstützenden Rolle, die p6* bei der Dimerisierung des Gag-Pol-Vorläufers einnimmt, scheint es als aminoterminaler Verlängerung der PR auch deren Faltungseigenschaften zu beeinflussen. Die Destabilisierung der gefalteten PR-Struktur bewirkt die für die korrekte Virus-Maturation notwendige Verzögerung der Auto-Prozessierung der PR (29;97;127). Die Deletion von p6* erhöht hingegen die Vorläufer-Prozessierung (160). Außerdem nimmt durch die Extension des *spacer* auch der Abstand der PR zu ihren aminoterminalen Spaltstellen im Gag-Pol-Vorläufer zu, was dessen Prozessierung sicherlich auch beeinträchtigt.

Das könnte erklären, warum ein Gag-Pol-Vorläufer mit einer verkürzten p6*-*spacer*-Domäne effizienter prozessiert wird und der entsprechende Virus schneller repliziert. Gleichzeitig führte eine Extension des p6*-*spacer* zu beeinträchtigter Dimerisierung und Faltung der PR, was mit zunehmendem Maße die Assemblierung stört und die Infektiosität des Virus hemmt.

Zusammenfassung D4

Die Auswertung der Daten aus den Deletions- und Substitutions-Analysen ergab, dass an Stelle der Wt-Sequenz beliebige Reportergene als *spacer* in den p6*-Leserahmen eingebaut werden können, ohne die Funktionalität von AL grundsätzlich zu stören. Jedoch ist die Länge des *spacer* begrenzt. Während eine Verkürzung die Geschwindigkeit der Virusreplikation erhöht, nimmt mit zunehmender Länge des *spacer* die virale Fitness ab.

E Ausblick

Mit AL wurde ein Virus generiert, das auf Grund seines Genomaufbaus (**Abbildung C3.1**) ein wertvolles Werkzeug für weitere Analysen der HIV-1 Replikation darstellt.

Im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen Isolaten oder daraus entstandenen Mutanten liegen hier die gag- und pol-Leserahmen im Bereich zwischen p1-p6_{gag} und p6*-PR entkoppelt vor. Damit ermöglicht es die gezielte Analyse von Bereichen des HIV-Genoms, die nicht mutiert werden konnten, ohne Nebeneffekte in überlagerten Regionen hervorzurufen. In der vorliegenden Arbeit wurde dies für die Untersuchung von p6* genutzt. Aber auch der Aminoterminus der PR und der Carboxylterminus von p6_{gag}, die bei allen HIV-Isolaten überlagert sind, können jetzt unabhängig voneinander Substitutionen, Deletionen oder Insertionen unterworfen werden.

E 1 Funktionsanalyse von p1, p6_{gag} und PR

Über die Funktion des nur 16 Aminosäuren umfassenden *spacer*-Peptides p1 ist bisher nur wenig bekannt. Dies liegt, wie bei p6*, in der Schwierigkeit spezifische Mutationen einzuführen. Dennoch konnten Hill und Kollegen p1 eine noch unbekannte aber essentielle Rolle für die virale Replikation zuordnen. Besonders zwei hoch konservierte Proline (an Position 7 und 13) scheinen dabei von Bedeutung zu sein. Diese für HIV-Proteine äußerst seltene Aminosäure, die durch ihre zyklische Struktur großen Einfluss auf die Protein-Konformation nimmt, findet sich auch gehäuft in p6_{gag} (64). Weitergehende Mutationen in p1 führten aber zu einem zunehmenden Stabilitätsverlust der überlagerten *frame shift*-Region, was die Produktion infektiöser Viren verhinderte (88). Eindeutige Aussagen über die Protein-basierte Funktion von p1 bleiben daher beschränkt. Eine umfassende Analyse der gesamten p1-Region in einem replizierenden Virus ist erstmalig mit der Virusplattform AL möglich.

Darüber hinaus ist p1 als Bestandteil des p15 (NC-p1-p6_{gag})-Vorläuferpeptides in dessen Prozessierung involviert. Während die Spaltung zwischen p1 und p6_{gag} für die Integration des Virusgenoms in das Genom der infizierten Zelle unerlässlich ist, scheint die Prozessierung des NC-p1-Intermediates für eine effiziente Virusreplikation verzichtbar zu sein. Man vermutet gegenwärtig, dass dieses Intermediat mit dem Prä-Integrationskomplex interagiert oder eine wichtige Funktion bei der Assemblierung

einnimmt (38). Auch die Ko-Existenz von NC und NC-p1 im Viruspartikel mit abweichenden Aufgaben bei der cDNA-Synthese und -Integration ins Genom wird diskutiert (8).

Im Gegensatz zu p1 existiert über die Funktionsweise von p6_{gag} ein relativ genaues Bild (siehe Abschnitt A4.4). Durch eine *late*-Assemblierungsdomäne am Amino-terminus interagiert es mit Tsg101. Mittels einer weiteren am Carboxylterminus wird über Alix der Kontakt zur ESCRT-Maschinerie hergestellt (72;210). In dieser Region von p6_{gag} findet auch die Bindung an Vpr statt (6;114). Weitere funktionelle p6_{gag}-Domänen sind bisher nicht bekannt und könnten mit Hilfe der AL-Virusplattform identifiziert werden.

Eine weitere Region in HIV, die im Überlappungsbereich der beiden Leserahmen gag und pol kodiert ist und daher mittels Mutagenese bisher nur schwer zu analysieren war, stellt der Aminoterminal der PR dar. Da die PR für die HIV-Replikation essentiell ist, kommt diesem Enzym beim Design antiviraler Medikamente große Bedeutung zu und ist daher im Fokus intensiver Forschung. Dies führte zur Entwicklung zahlreicher Inhibitoren des aktiven Zentrums, von denen bereits viele in der klinischen Behandlung als Therapeutika an AIDS-erkrankten Patienten etabliert sind.

Der PR-Aminoterminal, der unter den verschiedenen HIV-Subtypen und sogar zwischen HIV-1 und HIV-2 hoch konserviert vorliegt, ist zusammen mit dem Carboxylterminus für die Assemblierung des aktiven Homodimers verantwortlich (220). Durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers (bezeichnet als 1696) an ein Epitop im PR-Aminoterminal wird diese Dimerisierung aufgehoben und die PR inaktiv (187). Interessanterweise gilt dies auch für Varianten, die gegen aktuelle PR-Inhibitoren resistent sind (11). Mit Hilfe von AL ist eine genauere Analyse des PR-Aminoterminal möglich. Dessen Rolle bei der Funktionsweise der PR weiter aufzuklären und mögliche funktionell hoch konservierte Domänen zu identifizieren, kann einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapieansätze leisten.

E 2 *In vitro* Selektion hoch konservierter HIV-Domänen

Die hohe Mutationsrate bei HIV und die damit verbundene Resistenzbildung stellt für die Entwicklung von wirkungsvollen antiviralen Therapeutika oder Vakzinen gegenwärtig ein großes Problem dar. Aus diesem Grund wird die Identifizierung von

hoch konservierten Strukturen, beispielsweise Übergangskonformationen des Hüllproteins gp41, mit großem Einsatz vorangetrieben.

Im Bereich der Überlagerung der beiden Leserahmen gag und pol gelten CR1 und CR2 (in p6* bzw. p1-p6_{gag}) sowie der PR-Aminoterminus (bzw. p6_{gag}-Carboxylterminus) als hoch konservierte Regionen. Ein Hauptgrund für diese Konservierung ist die deutlich geringere Wahrscheinlichkeit, dass ein Basenaustausch, der hier Auswirkungen auf beide Leserahmen hat, toleriert wird.

Im Verlauf einer langjährigen HIV-Infektion können im Patienten unter Selektionsdruck jedoch auch vermeintlich konservierte Bereiche mutieren, da Sekundärmutationen an anderer Stelle die Funktionalität des Virus wieder herstellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass Substitutionen und Deletionen in p6*-CR1 und -CR2 vom Virus toleriert werden, da die Entkopplung der Leserahmen gag und pol in AL die Konservierung de facto aufhebt. Dies eröffnet die Möglichkeit, in einem *in vitro*-System oder Tiermodell unter Selektionsdruck (z.B. mit PR-Inhibitoren) Mutationen in diesen Regionen (z.B. im PR-Aminoterminus) zu induzieren, die in anderen HI-Klonen oder Isolaten auf Grund limitierter Variationsmöglichkeiten nicht entstehen. Somit können schneller mögliche Resistenzmutationen gegen neu entworfene oder aktuell verwendete Medikamente, aber auch funktionell hoch konservierte Domänen identifiziert werden. Dies könnte für die Konzeption neuer Therapeutika oder die Auswahl vakzinierungsrelevanter Antigene von großem Vorteil sein.

E 3 Aufklärung der Interaktion zwischen Nef und Gag-Pol

Die Myristilierung von Nef ist Grundvoraussetzung für die Lokalisation an der Cytoplasmamembran und somit für den Einbau in Viruspartikel (157). Auch wenn eine Interaktion mit p6* postuliert wurde (40), ist der Mechanismus, durch welchen Nef in Partikel transportiert wird, noch nicht geklärt .

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen gegen eine Interaktion von Nef und dem aminoterminalen und zentralen Bereich von p6*. Für den Carboxylterminus bleibt sie hingegen denkbar. Eine in Kapitel C1 beschriebene HX10-Provirus-Mutante war trotz einer vollständigen Substitution des carboxylterminalen Tetrapeptids noch replikationskompetent. Ein Transfer dieser Mutation in ein Nef-exprimierendes Virus könnte Aufschluss darüber geben, ob der Carboxylterminus für die Bindung von Nef eine Rolle spielt. Dies könnte über die Nef-Inkorporation in Viruspartikel und das

Replikationsverhalten quantifiziert werden. Aber auch andere Bereiche in Gag-Pol, wie, von Ciuffi und Kollegen vorgeschlagen, die IN und RT, oder auch die PR, kämen für eine Interaktion mit Nef in Frage (34), was über Deletionsmutagenese im pol-Leserahmen aufgeklärt werden könnte. Beide Hypothesen sind mit der Virusplattform AL deutlich einfacher zu verifizieren.

E 4 Visualisierung des Gag/Gag-Pol-*trafficking*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl eine auf tetra-Cystein-Motiven basierende Erkennungssequenz für das arsenhaltige Fluorescein-Derivat FIAsh (*fluorescein arsenical helix binder*) bzw. das Resorufin-Derivat ReAsH (*resorufin arsenical helix binder*) (2;81;139) sowie GFP in den p6*-Leserahmen inseriert. Im Gegensatz zur GFP-Insertion störte das tetra-Cystein-Motiv die Replikation kaum, der Nachweis der spezifischen Biolumineszenz war aber nicht eindeutig. Eine Kopplung des Marker an den im Vergleich zu Gag-Pol 20-fach höher exprimierten Gag-Vorläufer könnte hingegen eine Visualisierung des Gag-Transports ermöglichen. Die Tatsache, dass in AL das Gag-Polyprotein um fünf Aminosäuren verlängert werden kann, ohne die Replikationskapazität zu beeinträchtigen, lässt vermuten, dass noch längere Peptide an den Gag-Carboxylterminus fusioniert werden können. In diesem Zusammenhang wäre die kurze tetra-Cystein-Reportersequenz wohl ausreichend, um erstmals das *trafficking* der Polyproteinvorläufer in einer infizierten Zelle mittels eines voll replikationskompetenten Virus zu visualisieren.

Mit dem Verständnis über die Rolle von p6* zusammen mit den Perspektiven, die auf Grundlage dieser Arbeit entstanden, kann dazu beigetragen werden, die Mechanismen des HI-Virus und anderer gefährlicher Pathogene besser zu verstehen und neue antivirale Konzepte zu entwickeln.

F Material und Methoden

F 1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Alle angegebenen Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Fluka Chemie (Buchs, CH), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) in der Reinheitsstufe *pro analysis* bezogen. Fanden Reagenzien anderer Hersteller Verwendung, so wurde dies an entsprechender Stelle vermerkt.

Puffer / Lösungen	Anwendung	Zusammensetzung
AP-Färbelösung	WB-Detektion	100 mM Tris/HCl pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl
APS	SDS-PAGE	10% Ammoniumperoxidsulfat in H ₂ O
Coomassie-Färbelösung	SDS-Gelfärbung	0,1% Coomassie Brilliant Blue (w/v) 50% Methanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v)
Coomassie-Entfärbelösung	SDS-Gelfärbung	20% Methanol (v/v) 15% Essigsäure (v/v)
DNA-Probenpuffer (10x)	Agarose-Gelelektrophorese	25% Bromphenolblau (w/v) 25% Xylencyanol (w/v) 30% Glycerin (w/v)
Fixierlösung	MAGI-Assay	1% Formaldehyd 0,2% Glutaraldehyd in PBS
HeBs-Puffer (2x)	Transfektion	280 mM NaCl 10 mM Glukose 1 mM KCl 40 mM HEPES 1,1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0

Puffer / Lösungen	Anwendung	Zusammensetzung
PBS	diverse	7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄ 130 mM NaCl
PBS-T	diverse	PBS mit 0,5% Triton X-100
Ponceau-S-Lösung	Färben von WB-Membranen	2% Ponceaurot in 3% Trichloressigsäure (TCA)
Probenpuffer „Boiling Mix“ (5x)	SDS-PAGE	312,5 mM Tris/HCl pH 6,8 5% SDS (20%) 25% Glycerin (87%) 25% Mercaptoethanol (v/v) 2,5 mM EDTA (pH 8,0) 0,025% Bromphenolblau
RIPA-Puffer (Radioimmuno-precipitation analysis)	SDS-PAGE	50 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 0,1% SDS (w/v) 1% Nonidet P-40 (w/v) 0,5% Natriumdesoxycholat (w/v)
SDS-Laufpuffer (10x)	SDS-PAGE	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% SDS
TBE-Puffer (10x)	Agarose-Gelelektrophorese	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8,0
TBS	diverse	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 7,5
Transferpuffer	WB	25 mM Tris 150 mM Glycin 10% Methanol
Trypanblau-Lösung	lebend-tot-Färbung	0,5% Trypanblau
TTBS	diverse	0,05% Tween-20 in TBS

Puffer / Lösungen	Anwendung	Zusammensetzung
X-Gal-Färbelösung	MAGI-Assay	4 mM Ferricyanid 4 mM Ferrocyanid 2 mM MgCl ₂ 10% X-Gal (4 mg/ml in DMSO)

F 2 Kommerzielle Assay- bzw. Kit-Systeme

Bezeichnung	Anwendung	Bezugs- quelle
Biorad Protein-Assay	Quantifizierung von Gesamtprotein	Biorad
Luciferase-Assay System	Quantifizierung der Expression von <i>firefly</i> -Luciferase	Promega
QIAamp DNA Mini Kit	Isolierung von genomischer DNA	Qiagen
Qiagen Plasmid Midi / Maxi Kit	Isolierung von Plasmid-DNA	Qiagen
QIAquick Gel Extraction / PCR Purification Kit	Aufreinigung von DNA aus Agarose / PCR-Produkten	Qiagen

F 3 Klonierungen und gentechnische Arbeiten

F 3.1 Bakterienstämme, Nährmedien und Plasmide

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde standardmäßig der *Escherichia coli* (*E. coli*) K-12 Stamm DH5 α (Life Technologies, Karlsruhe) verwendet. Wegen seiner verminderten Rekombinationsaktivität wurde für die Amplifikation großer Plasmide (>7 kb), etwa provirale Plasmid-DNA, der *E. coli*-Stamm SURE (Stratagene, Heidelberg) herangezogen. Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien erfolgte nach der RbCl-Methode (siehe Abschnitt F3.10).

Die Anzucht dieser *E. coli* K12 Stämme erfolgte in Luria-Bertani-Flüssigmedium (1% NaCl; 1% Bacto-Trypton (Difco, Hamburg); 0,5% Hefeextrakt (Difco, Hamburg); pH 7,3) bzw. auf entsprechenden Kulturplatten bei 37°C.

Bakterienstamm	Bezugsquelle
DH5 α	Invitrogen Bestellnummer:18265-017
SURE	Stratagene Bestellnummer:200238

Zur Selektion von mit entsprechenden Plasmiden transformierten Bakterien wurde dem Medien Ampicillin (Amp) in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Medium bzw. Kanamycin in einer Endkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Zur Herstellung von Kulturplatten wurde dem Medium noch 1,5% Agar zugegeben.

Als Ausgangsquelle für die unten aufgeführten Klonierungstechniken dienten folgende Plasmide:

Plasmid	Bezugsquelle
pcDNA3.1 (+)	Invitrogen Bestellnummer: V790-20
pPCR-Script Amp	Stratagene Bestellnummer: 211188
pGL2-Control	Promega Bestellnummer: E1611
huGFP	(79)
pHX10	(182)
pNL4-3R71	(193)

F 3.2 Amplifikation von DNA über die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur DNA-Amplifikation wurde in einem sterilen 0,2 ml PCR-*Softtube* (Biozym) zu 50-100 ng *template*-DNA 1 μl dNTPs (10 mM), je 1 μl eines *forward* und *reverse* Oligonukleotids (10 μM), 5 μl 10xPCR-Puffer und 1 μl *Taq-Precision Plus* Polymerase (Stratagene) gegeben und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 μl gebracht. Die anschließende PCR fand im *iCycler* (Biorad, München) oder im *PCR Thermal Cycler GeneAmp* 2400 (PerkinElmer, Waltham, USA) nach folgendem Programm statt:

Zunächst wurde die DNA bei 95°C für fünf Minuten zum Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges denaturiert. Danach folgten 30-45 Amplifikationszyklen, die sich jeweils aus drei Phasen zusammensetzten. In der Denaturierungsphase wurde der Ansatz bei 95°C für 45 s. denaturiert, um gebundene Oligonukleotide von der DNA zu lösen und Doppelstränge aufzuschmelzen. In der *annealing*-Phase (45 s.) die bei 50-65°C stattfand, konnten die Oligonukleotide spezifisch an den DNA-Einzelstrang binden, an dem in der Elongations-Phase bei 72°C der komplementäre Strang durch enzymatische Polymerisierung entsteht. Die verwendete Polymerase *Taq-Precision Plus* besitzt eine 3'-5'Exonuklease-Aktivität (*proof reading*), was eine annähernd fehlerfreie Amplifikation gewährleisten soll. Für die Elongationszeit wurde pro Kilobasenpaar der erwarteten Fragmentgröße 60 s veranschlagt. Abschließend erfolgte noch eine siebenminütige Kettenverlängerung bei 72°C. Die amplifizierte DNA wurde stets durch Sequenzierung analysiert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

F 3.3 Plasmidpräparation aus *E.coli*

Die Gewinnung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dazu wurden 2 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in der *Centrifuge* 5417c (Eppendorf) mit 20800 x g für 5 min. bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und das entstandene Bakterienpellet in 200 µl des Resuspensionspuffers P1 (Qiagen) gelöst. Anschließend wurden 200 µl des Lysepuffers P2 (Qiagen) zugegeben. In der anschließenden fünfminütigen Inkubationsphase bei RT kommt es zur Lyse der Bakterienzellen. Durch Zugabe von 200 µl des Neutralisierungspuffers P3 (Qiagen) wurde die Lyse gestoppt. Nachdem der Ansatz 5 min. auf Eis inkubiert wurde, konnte nach Zentrifugation (20800 x g, 10 min, RT) der Überstand in ein neues Eppendorf-*tube* überführt und die DNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol und Zentrifugation (20800 x g, 30 min, 4°C) gefällt werden. Nach Waschen mit 70% Ethanol (1 ml) wurde das DNA-Pellet in 50 µl H₂O aufgenommen.

Die für präparative Zwecke notwendigen größeren Mengen an Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad wurden mittels des Qiagen Maxi-Kits nach Herstellerangaben isoliert.

F 3.4 Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Plasmid-DNA

Zur Ermittlung der Konzentration und Reinheit von Plasmid-DNA wurde diese 1:100 mit H₂O verdünnt und in einem Volumen von 100 µl in einem Zweistrahl-Spektrophotometer (Varian GmbH, Darmstadt) vermessen. Über den OD-Wert bei 260 nm und das Lambert-Beersche Gesetz $[(OD_{260 \text{ nm max}} - OD_{260 \text{ nm min}}) \times 47,5 \times (\text{Verdünnung})]$ konnte die Konzentration, über das Verhältnis $OD_{260 \text{ nm}} / OD_{280 \text{ nm}}$, die Reinheit der DNA bestimmt werden.

F 3.5 Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren

Zur Analyse von DNA-Plasmidpräparationen bzw. zur präparativen Weiterverarbeitung von DNA wurde diese mit Restriktionsendonukleasen enzymatisch verdaut. Für analytische Zwecke wurde 1 µg gereinigter Plasmid-DNA mit 10 U Restriktionsendonuklease (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) und 1/10 Volumen des entsprechenden Restriktionspuffers nach Herstellerangaben in einem Volumen von 20 µl für eine Stunde bei 37°C bzw. einer vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert (Ein U entspricht dabei der Enzymaktivität, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA in einer Stunde bei optimalen Temperatur-, Puffer- und pH-Bedingungen vollständig zu schneiden). Für präparative Zwecke wurden 2 µg bis 10 µg Plasmid-DNA mit je 20 U des entsprechenden Restriktionsenzym mit 1/10 Volumen Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl für zwei bis vier Stunden bei entsprechender Temperatur inkubiert.

F 3.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Aus der enzymatischen Spaltung hervorgegangene DNA-Fragmente, bei denen ein Ringschluss bei einer anschließenden Ligationsreaktion verhindert werden soll, wurde mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (CIP = *calf intestine phosphatase*; Roche, Mannheim) behandelt, um die Phosphat-Reste an den freien 5'-Enden der entsprechenden DNA zu entfernen. Nach Ende des Restriktionsverdaus wurden dem Ansatz daher zweimal je 1 U CIP zugegeben und dieser für jeweils 15 min. bei 37°C inkubiert.

F 3.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Um linearisierte DNA-Fragmente hinsichtlich ihrer Länge aufzutrennen, wurde diese mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 30% Glycerin) versetzt und zur Abschätzung der Fragmentgröße, zusammen mit einem entsprechenden DNA-Längen-Standard, auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Zur Herstellung des Gels wurden 0,5% und 3% Agarose (je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente) in TBE-Puffer (90 mM Tris/HCl pH 8,0; 90 mM Borat; 2 mM EDTA) eingewogen, unter Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (EtBr) in einer Endkonzentration von 50 ng/ml versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 5 V/cm. Die Detektion der mit EtBr markierten DNA erfolgte mit Hilfe eines UV-Durchlichtschirms (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm.

F 3.8 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Die über Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden für die anschließende Ligierung aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Um die Fragmente dann aus dem Agarosegel zu extrahieren, fand das kommerzielle QIAquick Gel Extraction-System (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben Verwendung. Die Funktionsweise beruht auf der selektiven Bindung der DNA an eine Silikat-Säulenmatrix unter Hochsalzbedingungen. Nach Reinigungsschritten konnte diese anschließend bei Niedrigsalzbedingungen mit 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) von der Säule eluiert werden.

F 3.9 Ligierung von DNA-Fragmenten

Zur Ligation zweier gereinigter DNA-Fragmente wurden diese in molaren Verhältnissen zwischen 1:1 und 1:4 in einen entsprechenden Ansatz eingesetzt. Die Standard-Ligierung wurde nach Herstellerangaben in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Er enthielt neben den DNA-Fragmenten 20 U T4-DNA Ligase (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) und 2 µl 1 x T4-Ligase-Puffer. Der Reaktionsansatz wurde daraufhin eine Stunde bei RT inkubiert. Die ligierte DNA wurde anschließend direkt zur Transformation kompetenter Bakterien (*E. coli*) eingesetzt.

F 3.10 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Für DNA-Transformation kompetente Bakterien (*E. coli*) wurden nach der RbCl-Methode hergestellt. Dazu wurden 200 ml SOC-Medium [*salt-optimised broth*, 2% Bacto-Trypton (Difco, Hamburg); 0,5% Hefeextrakt (Difco, Hamburg); 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glukose, pH 7,5] mit 2 ml einer ÜN-Bakterienkultur aus *E. coli* angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD von 0,3 bis 0,5 (Wellenlänge: 600 nm; „Smart Spec Plus“ Spektrophotometer, Biorad, München) erreicht wurde. Daraufhin wurde die Kultur bei 4°C mit 700 x g zentrifugiert und das erhaltene Bakterienpellet in 100 ml eiskaltem Transformationspuffer T1 (10 mM MOPS, pH 5,8; 0,3 M KOAc; 10 mM RbCl; 15% Glycerin) resuspendiert, für 10 min. auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 50 ml Transformationspuffer T2 (10 mM MOPS pH 6,5; 10 mM RbCl; 50 mM CaCl₂; 15% Glycerin) resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

F 3.11 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Bei -80°C gelagerte kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis 15 min. aufgetaut und mit 50 ng bis 1 µg DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 12 min. auf Eis, in der die DNA an die Zellen adsorbiert, wurden die Ansätze für 90 s auf 42°C erhitzt (Hitzeschock) und anschließend 5 min. auf Eis gestellt. Der Reaktionsansatz konnte dann wahlweise sofort auf geeignete Selektionsplatten ausgestrichen oder vorher mit LB-Medium eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert werden, um eine Expression des Antibiotika-Resistenzgens, das sich auf dem eingebrachten Plasmid befindet, zu ermöglichen. Anschließend wurden die Selektionsplatten ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag bestimmte man die Effizienz der Transformation über die Anzahl der gewachsenen Kolonien.

F 3.12 Gensynthese

Die synthetische Produktion von Gensequenzen verschiedenster Länge wurde von der Geneart AG (Regensburg) durchgeführt.

F 3.13 Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Geneart AG (Regensburg) nach dem Sanger-Verfahren durchgeführt. Die Proben wurden sequenzierfertig aufbereitet (Gesamtvolumen 8 µl: 300 ng Plasmid-DNA, davon 1 µl Sequenzieroligonukleotid) und nach der Sequenzierung mit dem Rechnerprogramm Chromas ausgewertet.

F 3.14 Herstellung rekombinanter proviraler Plasmid-Konstrukte

NL4-3-Mutanten

Zur Herstellung der proviralen Konstrukte NL4-3 Ma, NL4-3 Mb, NL4-3 Mc NL4-3 Md, NL4-3 Me, NL4-3 Mf, NL4-3 Mdup und NL4-3 Mtot (und der jeweiligen nef-defizienten Varianten NL4-3 Ma Δ nef - NL4-3 Mtot Δ nef), die im zentralen p6*-Bereich Mutationen aufweisen, wurde zunächst ein als pCRpNLp6* bezeichnetes Konstrukt erstellt. Dieses Konstrukt wurde über klassische Klonierungstechniken hergestellt, indem in die *multiple cloning site* von pCR Script ein 3737 Nukleotide langes Fragment des rekombinanten Virusklon NL4-3 (1, *accession number*: M19921) über die singulären Restriktionsschnittstellen Apa I (Nukleotidposition 1217 bezogen auf das gag-Start-Kodon in NL4-3) und Eco RI (4954) das auch die wildtypische Kodierungssequenz für p6* (1296 - 1463) trägt, eingebaut.

Über Apa I und Bcl I (1640) wurde dann aus pCRpNLp6* die Kodierungssequenz von p6* durch einen Sequenzabschnitt ersetzt, der folgendermaßen hergestellt wurde: Mit den Primerpaaren p6*Mfusion1 und p6*Mfusion2 sowie p6*Mfusion3 und p6*Mfusion4 wurden mittels PCR zwei sich überlappende Fragmente generiert, um in einer anschließenden Fusions-PCR (p6*Mfusion1 / p6*Mfusion4) ein 397 Nukleotide großes Fragment herzustellen, das von den Schnittstellen Apa I und Bcl I begrenzt ist. Der zentrale Bereich von p6* wurde in diesem Konstrukt durch zwei Erkennungssequenzen für das sekundäre Restriktionsenzym Bsm BI ersetzt. Diese Erkennungssequenzen waren so orientiert, dass sie nach Verdau mit Bsm BI verloren gingen und nur die Kodierungssequenzen für die amino- und carboxylterminale Region von p6* erhalten blieben. In dieses, als pCRpNLp6*CloneIn bezeichnete Konstrukt konnten somit verschiedenste Mutationen der zentralen Region von p6* eingebracht werden. Parallel wurde mit den Primerpaaren p6*Mfusion1 und p6*Mfusion5 sowie p6*Mfusion3 und p6*Mfusion4 das Konstrukt pCRpNLp6*CloneIn-2 hergestellt, das Nukleotidaustausche im aminoterminalen Bereich trägt. Durch Gensynthese wurden daraufhin acht kurze Fragmente (a, b, c, d,

e, f, dup und tot) hergestellt, die Sequenzmutationen der zentralen p6*-Region repräsentieren und jeweils von Erkennungsstellen für Bsm BI flankiert waren. Über den Verdau der synthetischen Fragmente und des Konstrukts pCRpNLCloneln / pCRpNLCloneln-2 mit Bsm BI und anschließender Ligation ersetzten diese acht Mutationen die zentrale p6*-Region aus NL4-3 Wt, ohne darüber hinaus noch andere Veränderungen der p6*-Sequenz oder im überlagerten gag-Leserahmen hervorzurufen. Die entstandenen Konstrukte wurden als pCRpNLp6*Ma, pCRpNLp6*Mb, pCRpNLp6*Mc, pCRpNLp6*Md, pCRpNLp6*Me, pCRpNLp6*Mf, pCRpNLp6*Mdup und pCRpNLp6*Mtot bezeichnet. Um nun im Provirus NL4-3 bzw. im nef-defizienten NL4-3 Δ nef diese p6*-Mutationen einzubringen, musste noch der NL4-3 Wt Bereich zwischen Apa I und Eco RI mit den entsprechenden Bereichen aus den Konstrukten pCRpNLp6*Ma-tot ersetzt werden. Die fertigen Konstrukte wurden durch Sequenzierung und Testverdau verifiziert.

AL und AL-Mutanten

Der Provirus AL und die Mutanten ALn, ALdel, ALdel-myc, ALdel-GFP und ALdel-tetraCys basieren ebenfalls auf Klon NL4-3. Im oben beschriebenen Konstrukt pCRpNLp6* wurde das Fragment zwischen Apa I (Nukleotidposition 1217 bezogen auf das gag-Start-Kodon in NL4-3) und Bcl I (1640) durch ein synthetisch hergestelltes 210 Nukleotide längeres Fragment ersetzt. In diesem Fragment ist die ursprüngliche *slippery site* UUUUUUA (an Position 1296) und die 3'-gelegene *stem loop*-Struktur durch Punktmutationen zerstört worden. Die inaktivierte *frame shift*-Region kann somit keinen Leserastersprung mehr auslösen. An Stelle dessen wurde der komplette funktionelle *frame shift*-Bereich (an Position 1501) direkt vor dem gag-Stopp-Kodon inseriert. Über Apa I und Eco RI (4954) wurde dieses Fragment in NL4-3 kloniert. Der resultierende Provirus AL hat, verglichen mit NL4-3, ein um 15 Nukleotide verlängertes gag-Gen und ein um 210 Nukleotide verlängertes pol-Gen.

Die Mutanten ALn, ALdel, ALdel-myc entstanden auf Basis von AL, indem über zwei in AL eingeführte Bst EII -Restriktionsschnittstellen (Nukleotidposition 1258 und 1703 bezogen auf das gag-Start-Kodon von AL) die entsprechenden Genfragmente ausgetauscht wurden.

Die Mutante ALdel-myc wurde so gestaltet, dass das myc-tag von den Restriktionsschnittstellen Rsr II und Sna BI flankiert war. So konnte dieses tag beliebig durch andere Reporter (ALdel-GFP) bzw. Erkennungssequenzen (ALdel-tetraCys) ausgetauscht werden.

Alle synthetischen Gen-Fragmente wurden von der Geneart AG (Regensburg) hergestellt. Die Bereiche Apa I - Bcl I wurden durch Sequenzierung, das gesamte Provirus-Konstrukt durch Testverdau verifiziert.

F 3.15 Herstellung rekombinanter *frame shift*-Reporter-Konstrukte

Zur Quantifizierung der *frame shift*-Effizienz der beschriebenen proviralen Konstrukte wurden Reporter-Konstrukte erstellt, bei denen ein Leserastersprung zur Expression von *firefly*-Luciferase führt, die über einen Luciferase-Assay (Promega, Mannheim) quantifiziert werden konnte.

Der *frame shift*-Bereich von NL4-3 Wt und NL4-3 Ma (zwischen Nukleotidposition 1296 und 1348 *downstream* des gag-Start-Kodons), der sich aus der *slippery site* und der anschließenden *stem loop*-Struktur zusammensetzt, wurde in den Expressionsvektor pGL2-Control (Promega, Mannheim) über Hind III und Xba I so vor die *firefly*-Luciferase-Genkassette kloniert, dass ein -1 Leserastersprung zur Expression der Luciferase führt. Analog wurde mit dem in AL inaktivierten und neu generierten *frame shift*-Bereich, sowie dem *frame shift*-Bereich der AL-Mutanten ALn und ALdel verfahren. Außerdem entstand ein zusätzliches Reporter-Konstrukt mit einer zerstörten *slippery site*, und einer Nukleotid-Insertion, wodurch es zur konstitutiven Expression der Luciferase kam. Die Synthese der *frame shift*-Bereiche wurde von der Geneart AG (Regensburg) durchgeführt. Die Reporterkonstrukte wurden als fs-NL, fs-NL-Ma, fs-inact., fs-AL, fs-ALn und fs-ALdel bezeichnet und durch Sequenzierung überprüft.

F 3.16 Herstellung des Nef-Expressionsplasmids

Zur Koexpression mit HX10 wurde ein Nef-Expressionsplasmid verwendet. Mit zwei spezifischen Oligonukleotiden wurde mit Hilfe einer PCR der Nef-ORF von NL4-3 amplifiziert und gleichzeitig am 5' und 3' Ende Erkennungssequenzen für die Restriktionsschnittstellen Bam HI und Eco RI angebracht. Das entstandene PCR-Fragment wurde über diese Restriktionsschnittstellen in pcDNA3.1(+) inkloniert und durch Sequenzierung verifiziert.

F 4 Zellkulturtechniken

Zur Transfektion und Infektion wurden unten beschriebene eukaryotische Zellkultursysteme verwendet, die bei 37°C und unter einer 5-prozentigen CO₂-Atmosphäre in speziellen Kulturgefäßen (BD Biosciences, Heidelberg) in kommerziellen Flüssignährmedien kultiviert wurden.

F 4.1 Zelllinien

Ausschließlich zur Transfektion wurde die humane Nierenepithelzellen 293T herangezogen. Die Aufzucht dieser adhärent wachsenden Zellen erfolgte in Dulbecco's Modifiziertem *Eagle* Medium (DMEM) der Firma Gibco (Karlsruhe), das L-Glutamin, D-Glucose und Natriumpyruvat enthält. Zusätzlich wurde dem Medium noch 10% inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS, PAN Biotech GmbH (Aidenbach) und eine Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S, 100 µg/ml) zugegeben.

Für Infektionsstudien fanden die ebenfalls adhärent wachsenden, CD4-positiven HeLa-Subklone MAGI und TZM-bl Verwendung. Die Kultivierung dieser HIV-1-Indikatorzelllinien erfolgte ebenfalls in DMEM mit FCS und P/S. MAGI-Zellkulturen, wurden zusätzlich noch 0,2 mg/ml Geneticin (Gibco) und 0,1 mg/ml Hygromycin B (Invitrogen) zugegeben.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden 293T, MAGI- und TZM-bl-Zellen im Verhältnis 1:10 subkultiviert.

Für Virusreplikationsstudien kamen die humanen, CD4-positiven T-Zellklone CEM und MT4 zum Einsatz, die sich durch ihre HIV-1-Permissivität auszeichnen. PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) wurden aus gesunden menschlichen Spendern durch Zentrifugation (950 x g, 30min.) von Gesamtblut über Pancoll (PAN) gewonnen. Die Kultivierung dieser Suspensions-Zellkultursysteme erfolgte in RPMI 1640 (PAN), indem ebenfalls bereits L-Glutamin enthalten war und zusätzlich FCS und P/S zugegeben wurde. Eine Subkultivierung im Verhältnis 1:2 erfolgte alle zwei Tage. Zur Stimulierung der PBMCs gab man dem Medium für zwei Tage 0,5 µl/ml Phytohemagglutinin (Roche), danach 20 U/ml Interleukin 2 zu.

Zelllinie	Beschreibung
293T	humane Ad5/SV40 (T) - transformierte Nierenepithelzellen (ATCC: CRL-11268) (152)
CEM	humane Lymphoblasten; exprimieren CD4 (65)
MAGI	HeLa-Subklon, HPV-18 transformierte Cervixkarzinomzellen; exprimieren CD4 und enthalten β -Galaktosidase-Gen unter Kontrolle des LTR-Promotors (108)
MT4	humane T-Zell Lymphoblasten; exprimieren CD4; enthalten HTLV-I; gewonnen durch Kokultivierung von Nabelschnur-Leukocyten und leukämischen Zellen aus Patienten mit adulter T-Zell Leukämie (117) (145)
TZM-bl	(=JC53-bl) HeLa-Subklon; exprimieren CD4, CXCR4, CCR5 und enthalten Gene für β -Galaktosidase und <i>firefly</i> -Luciferase unter Kontrolle des HIV-1 LTR-Promotors (51;173;231).

F 4.2 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

5×10^6 293T-Zellen wurden ca. 16 Stunden vor der Transfektion in Petrischalen (Fläche: 58,95 cm²) ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit 20 μ g des jeweiligen Expressionsplasmids und 50 μ l Polyethylenimin (PEI, PolySciences) nach Herstellerangaben. Vier Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Um bei Bedarf die Prozessierung von HI-viralen Polyproteinen zu verhindern, wurde dem Medium zu diesem Zeitpunkt der PR-Inhibitor Saquinavir (Roche Diagnostics) zugegeben (Endkonzentration 10 μ M). 48 oder wahlweise 72 Stunden nach der Transfektion konnten die Zellen geerntet und die Überstände über einen Filter der Porengröße 0,45 μ m gereinigt werden.

Alternativ kam das kommerzielle FugeneTM 6 *Transfection reagent* der Firma Boehringer (Mannheim) zum Einsatz.

F 4.3 Ernte der Transfektion

Während der Kulturüberstand transfizierter Zellen filtriert und vorübergehend bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde, konnten die Zellen zweimal mit kaltem PBS (10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) gewaschen werden. Anschließend wurden sie mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt, in 1 ml PBS aufgenommen und für 10 min. bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet resuspendierte man anschließend in 100-250 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% SDS (w/v); 1% Nonidet-40 (w/v); 0,5% Na-Deoxycholat (w/v)), der zuvor mit dem Proteaseinhibitor-Cocktail Complete (Roche, Mannheim) versetzt worden war. Dies führte zur Lyse der Zellen. Alternativ wurden die Pellets in PBS aufgenommen und die Zellen durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem N₂ und Auftauen im Wasserbad (50°C) aufgeschlossen.

Im Anschluss daran konnten durch Zentrifugation (20800 x g, 20 min., 4°C) unlösliche Zelltrümmer sedimentiert werden und das Zelllysate mit den löslichen Proteinen in ein neues 1,5 ml Eppendorf-*tube* überführt und bei -20°C gelagert werden.

F 4.4 Anreicherung von Viruspartikeln über Ultrazentrifugation

Die bei 4°C gelagerten Überstände wurden auf ein 20-prozentiges Saccharose-Kissen (20% Saccharose in PBS) in Ultrazentrifugenröhrchen aufgetragen. Anschließend konnten die im Überstand enthaltenen Viruspartikel über Ultrazentrifugation (SV-40 Rotor, Kontron) bei 28.000 rpm für 2,5 Stunden durch Sedimentation angereichert werden. Die so erhaltenen Pellets wurden vollständig in 100-200 µl RIPA-Lysepuffer mit Proteaseinhibitor oder wahlweise in PBS aufgenommen und bei -20°C gelagert.

F 5 Analyse der Genexpression, der viralen Infektiosität und Replikation

F 5.1 Bestimmung des Proteingehalts (Biorad-Protein-Assay)

Die Gesamtproteinmenge in Proben von lysierter Zellen und Kulturüberständen bzw. angereicherter und lysierter Viruspartikel wurde quantitativ mit dem Biorad-Protein-Assay (Biorad, München) nach Herstellerangaben bestimmt. Das Reagenz dieses

Testsystems unterliegt nach Bindung an Proteinen einer Farbänderung, die sich photometrisch in einer Absorptionszunahme bei einer Wellenlänge von 595 nm äußert. Die Gesamtproteinmenge lässt sich dann photometrisch aus dem Vergleich der gemessenen OD der entsprechenden Probe mit den Werten einer BSA-Eichkurve ermitteln.

F 5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen in einer SDS-PAGE erfolgte elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht (121). Das negativ-geladene SDS lagert sich in konstanten Gewichtsverhältnissen an Proteine an und kompensiert deren Eigenladungen. Somit wandern bei der Elektrophorese die Proteine entsprechend ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das SDS-Polyacrylamidgel zur Anode. Pro Ansatz wurden 50 µg bis 100 µg Protein mit 5-fach konzentriertem Auftragspuffer (125 mM Tris pH 6,8; 2% 2-Mercaptoethanol; 10% Glycerin; 1 mM EDTA; 0,005% Bromphenolblau) versetzt und 5 min. bei 95°C erhitzt. Als Molekulargewichtsstandard diente der *Precision Plus Protein Standard* bzw. der *Broad Range Protein Standard* (Biorad, München). Der Laufpuffer bestand aus 25 mM Tris pH 7,5; 190 mM Glycin; 0,1% SDS. Das Sammelgel wies eine 5-prozentige, das Trenngel eine 10-15-prozentige Polyacrylamid-Konzentration auf.

F 5.3 Immunochemische Detektion von Proteinen (Western Blot-Analyse)

Über SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden nach Standardverfahren (195;221) unter Verwendung einer *SemiDry-Blotting-Apparatur* (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (0,1-0,45 µm) (Schleicher Schuell, Dassel) transferiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen auf der Membran inkubierte man diese über Nacht bei 4°C in einer 5-prozentigen Magermilch-Lösung in TTBS. Nach mehrmaligen kurzen Waschschritten mit TTBS wurde zur Detektion eines Proteins der jeweilige spezifische primäre Antikörper in entsprechender Verdünnungen (TTBS) zugegeben und für 1-2 Stunden bei RT inkubiert. Danach folgten weitere Waschschrritte mit TTBS, bevor die Membran mit einem für den primären Antikörper spezifischen sekundären Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert wurde. Die sekundären Antikörper besaßen entweder ein

horseradish peroxidase (HRP)- oder ein Alkalisches Phosphatase-Konjugat. So konnte, nach einigen Waschschritten, die Detektion der Antikörper-Antigen-Komplexe auf der Membran entweder mit Hilfe des Supersignal West-Femto-Substrates (Pierce) über ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Detektion im Geldokumentationssystem *Westernblot Imager ChemiLux Imager 2008* (Intas, Göttingen) oder über einen Niederschlag nach Zugabe von NBT/BCIP (Roche) in AP-Färbepuffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl) erfolgen.

Primäre Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle	Verdünnung	Beschreibung
anti-CA	(242)	1:250	Maus, monoklonal 13/5 (p24/55 _{III} B, aa 147-154)
anti-p6	(161)	1:50	Kaninchen, polyklonal (GST-p6)
anti-Nef	MRC	1:1000	Schaf, polyklonal ARP444 (GST-Nef)
anti-RT	(28)	1:500	Maus, monoklonal 4F8
anti-PR	MRC	1:250	Kaninchen, polyklonal MRC4105 in Kombination mit SA82
anti-myc	Roche Bestellnummer: 11667149001	1:222	Maus, monoklonal (c-myc, Klon 9E10, EQKLISEEDL)
anti-GFP	Clontech Bestellnummer: 632376	1:400	Kaninchen, polyklonal (GFP, EBFP, ECFP, EGFP, EYFP, AcGFP)

Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle	Verdünnung	Anwendung
anti-Maus-AP	Bio-Rad Bestellnummer: 170-6520	1:2000	AP
anti-Maus-HRP	Dako Bestellnummer: P0260	1:2000	HRP / ECL (FEMTO)
anti-Kaninchen- HRP	Pierce Bestellnummer: 31460	1:5000	HRP / ECL (FEMTO)
anti-Schaf-HRP	Dako Bestellnummer: P163	1:10000	HRP / ECL (FEMTO)

F 5.4 Bestimmung der Expression des Reportergens *firefly*-Luciferase (Luciferase-Assay)

Zur Bestimmung der Expression des *firefly*-Luciferase-Reporters in mit entsprechenden Konstrukten transfizierten 293T- oder mit HI-Viren infizierten TZM-bl-Zellen wurde das Luciferase-Assay-System der Firma Promega (Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden 48 Stunden *post transfectionem* bzw. *post infectionem* mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl 1 × CCLR Lyse-Puffer aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile wurden pelletiert (12000 × g, 2 min, 4°C) und der Gesamtproteingehalt des Zelllysates bestimmt (Bio-Rad Protein-Assay, München). Zu verschiedenen Verdünnungen des Lysates in einem Volumen von 20 µl wurden je 100 µl Luciferin gegeben, wodurch die Lichtreaktion startete. Die Messung der Lichtemission erfolgte über einen Zeitraum von 10 s im Luminometer *Lumat* 9501 (Berthold, Bad Wildbach) bzw. im 1420 *Multilabel Counter Victor*³ (PerkinElmer).

F 5.5 Quantifizierung des HIV-1 Capsidantigens (p24-ELISA)

Um die Menge des zu CA prozessierten Pr55_{gag} in Kulturüberständen zu quantifizieren, filtrierte man diese (Porengröße 0,45 µm) und setzte sie in

unterschiedlichen Verdünnungen im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ein. Dazu wurden 96-well *MaxiSorp*-ELISA-Platten (NUNC, Wiesbaden) bei 4°C über Nacht mit 100 µl einer 1:1000-Verdünnung des CA (p24)-spezifischen monoklonalen M01-Antikörpers (Polymun, Wien, A) in 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,5) inkubiert, was zur unspezifischen Bindung der Antikörper an die Plastikoberfläche des *well*s führte. Anschließend wusch man die Platten 3 x mit 100 µl Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS). Die unterschiedlichen Verdünnungen der Zelllysate wurden in dem Medium erstellt, das auch für die Kultivierung von 293T-Zellen Verwendung fand. Danach konnten je 100 µl der verdünnten Proben in je ein *well* gegeben werden. Nach Inkubation für eine Stunde bei 37°C, in der CA an den immobilisierten M01-Antikörper bindet, wurde 6 x mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend gab man pro *well* 100 µl des CA-spezifischen, biotinylierten, monoklonalen Antikörpers 37G12 (Polymun, Wien, A; Verdünnung 1:80.000 in PBS / 1% BSA) zu und inkubierte den Ansatz für eine Stunde bei RT. Nach 10 x Waschen mit Waschpuffer wurden 100 µl eines 0,05 U/ml Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*)-Konjugates (Roche, Mannheim; 500 U/ml, verdünnt 1:10.000 in PBS / 1% BSA) zu den Proben gegeben und für 30 min. bei RT inkubiert. Nach 10 x Waschen mit Waschpuffer wurden die Antikörperkonjugate mit 100 µl einer 1:1-Verdünnung der „OptEIA“ TMB (Tetramethylbenzidin)-Substratlösung (BD Biosciences, San Diego, USA) angefärbt und für 5-10 min. im Dunkeln inkubiert. Mit je 50 µl 1 N H₂SO₄ konnte die Farbreaktion gestoppt und die Absorption bei 450 nm im *Microplate Reader Mode* 680-Lesegerät (Biorad, München) mit dem zugehörigen Programm *Microplate Manager* 5.2 (Biorad laboratories, Hercules, USA) gemessen werden. Die CA-Konzentration ließ sich mit Hilfe einer Kalibrierungskurve unter Verwendung serieller Verdünnungen von gereinigtem CA (Polymun, Wien, A) errechnen.

F 5.6 Bestimmung der Aktivität der viralen Protease

Um die PR-Aktivität der beschriebenen Virusmutanten zu quantifizieren, wurden von den angereicherten und in PBS aufgenommenen Viruspartikeln der CA-Gehalt in einem ELISA bestimmt. Daraufhin resuspendierte man die Viruspartikel in Proteasepuffer (0,1M NaAc, pH 5,0; 0,5 M NaCl; 4 mM EDTA; 5 mM DTT; 0,1% Triton X-100 (w/v)) durch Vortexen und inkubierte sie mit einem Überschuss an rekombinanter HIV-1 Protease (Bachem, Weil am Rhein) für zwei Stunden bei 37°C. Im Anschluss daran konnte der p24-Gehalt erneut bestimmt werden.

F 5.7 Bestimmung der viralen Infektiosität

Die Bestimmung der Infektiosität von verschiedenen Virusmutanten wurde in einem MAGI-Test durchgeführt. Zur Bestimmung des Virustiters auf einer CD4-positiven Indikatorzelllinie, die β -Galaktosidase unter der Kontrolle des durch Tat aktivierbaren LTR-Promotors induzieren, wurden die Überstände transfizierter 293T-Zellen zunächst filtriert (Porengröße des Filters: 0,45 μ m) und die Gesamtmengen an Partikel-assoziiertem CA über ELISA bestimmt. $1,3 \times 10^4$ HeLa-CD4-LTR- β -Gal Zellen wurden in 96-well-Platten ausgesät und 12-24 Stunden später in Duplikaten mit unterschiedlichen Verdünnungen der virushaltigen Kulturüberstände infiziert. 48 Stunden *post infectionem* wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd in PBS fixiert, und nochmals gewaschen. Danach inkubierte man die Zellen 3-6 Stunden mit einer Färbelösung (PBS mit 4 mM K-Ferricyamid; 4 mM K-Ferrocyanid; 2 mM $MgCl_2$; 0,4 mg/ml X-Gal in DMSO) und zählte im Anschluss daran die blauen Zellkerne (108).

Alternativ erfolgte die Bestimmung der Infektiosität über die Infektion von TZM-bl-Zellen, die, wie MAGI-Zellen, ein Gen für β -Galaktosidase, aber zusätzlich noch *firefly*-Luciferase unter Kontrolle des LTR-Promotors haben. Die Infektion dieser Zellen bewirkt die Expression der Luciferase, die nach Zelllyse und Zugabe von Luciferin eine Lichtreaktion auslöst, die in einem kommerziellen Luciferase-Testsystem (Promega) quantifiziert werden kann.

F 5.8 Replikations-Kompetitions-Test

Virushaltiger Überstand, der aus der Transfektion von 293T-Zellen mit entsprechenden proviralen Plasmiden hervorging, wurde 48 Stunden *post transfectionem* nach CA über ELISA normalisiert. Gleiche Mengen CA (500 ng) von Wildtyp (Wt) und Mutanten-Viruspartikeln wurden in den Verhältnissen 1:1, 4:1 und 1:4 gemischt und damit 2×10^6 CEM-Zellen infiziert. Sechs Stunden später überführte man die infizierten Kulturen in Zellkulturflaschen und kultivierte sie für drei Wochen in einem Volumen von 4 ml. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden den Ansätzen Zellproben entnommen und die Hälfte der Kultur durch frische Zellen und Medium ersetzt. Die infizierten Zellen konnten durch Zentrifugation (300 x g, 10 min.) pelletiert und ihre genomische DNA mit Hilfe des *QIAamp DNA Mini Kits* (Qiagen) isoliert werden. Über PCR mit spezifischen Primern, die *upstream* und *downstream* der p6*-

Kodierungssequenz binden, wurde integrierte provirale DNA amplifiziert und die gereinigten PCR-Produkte sequenziert. Die Analyse der aus der Sequenzierung resultierenden Chromatogramme erfolgte mit der Software *Vector NTI* 10.3.0 (Invitrogen, Karlsruhe).

F 5.9 Bestimmung der viralen Replikation

Virushaltiger Überstand, der aus der Transfektion von 293T-Zellen mit proviralen Plasmiden hervorging, wurde über ELISA nach CA-Protein 48 Stunden *post transfectionem* normalisiert. Für die Infektion von PBMCs benötigte man 50, für CEM- und MT4-Zellen 250 ng CA-Äquivalente. Anschließend wurden je 1×10^6 Zellen pelletiert und in einem Volumen von 1 ml, bestehend aus Medium und virushaltigen Überständen für sechs Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach mussten die infizierten Zellen gewaschen werden, um überschüssige Viren zu entfernen. Schließlich resuspendierte man die Zellen wieder in 4 ml Medium und inkubierte sie weiter bei 37°C. Alle zwei Tage konnten dann Proben aus dem Kulturüberstand entnommen werden, um den darin enthaltenen CA-Gehalt über ELISA zu quantifizieren.

G Abkürzungsverzeichnis

A	
A	Alanin (Ala)
Abb.	Abbildung
AICD	<i>activation-induced cell death</i>
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
Amp	Ampicillin
B	
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	
C	Cystein (Cys)
ca.	zirka
CA	Capsid
CAI	<i>codon adaptation index</i>
cDNA	(zu RNA) komplementärer DNA-Strang
CRF	<i>circulating recombinant form</i>
CTL	Cytotoxischer T-Lymphozyt
D	
D	Aspartat (Asp)
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
E	
E	Glutamat (Glu)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal complexes required for transport</i>
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
F	
F	Phenylalanin (Phe)
f	<i>forward</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fetales Kälberserum
G	
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin (Gly)
gag	gruppenspezifisches Antigen
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
H	
H	Histidin (His)
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
I	
I	Isoleucin (Ile)
IL	Interleukin
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
K	
K	Lysin (Lys)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	
L	Leucin (Leu)
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidasegen
LB	Luria Bertani
Lck	<i>leukocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LTNP	<i>long term non progressor</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	
M	Methionin (Met) molar

MA	Matrix
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	
N	Asparagin (Asp) normal
NC	Nukleocapsid
nef	Negativ-Faktor
O	
OD _x	optische Dichte bei x nm Wellenlänge
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
P	
P	Prolin (Pro)
PAK	<i>p21-activated kinase</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
P/S	Penicillin-Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PR	Protease
Q	
Q	Glutamin (Gln)
R	
R	Arginin (Arg)
r, rev	rückwärts (<i>reverse</i>)
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur reverse Transkription Reverse Transkriptase
S	
S	Serin (Ser)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SIV	Simianes Immunodefizienz-Virus
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
ss	einzelsträngig

T	
T	Threonin (Thr)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tsg101	<i>tumor susceptibility gene 101</i>
U	
U	<i>Units</i>
UTR	nicht-translatierte Region
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	
V	Valin (Val)
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
W	
W	Tryptophan (Trp)
Wt	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
X	
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid
Y	
Y	Tyrosin (Tyr)
Z	
z.B.	zum Beispiel

H Literaturverzeichnis

1. Adachi,A., Gendelman,H.E., Koenig,S., Folks,T., Willey,R., Rabson,A. and Martin,M.A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J.Virol.*, **59**, 284-291.
2. Adams,S.R., Campbell,R.E., Gross,L.A., Martin,B.R., Walkup,G.K., Yao,Y., Llopis,J. and Tsien,R.Y. (2002) New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J.Am.Chem.Soc.*, **124**, 6063-6076.
3. Alexander,L., Weiskopf,E., Greenough,T.C., Gaddis,N.C., Auerbach,M.R., Malim,M.H., O'Brien,S.J., Walker,B.D., Sullivan,J.L. and Desrosiers,R.C. (2000) Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J.Virol.*, **74**, 4361-4376.
4. Almog,N., Roller,R., Arad,G., Passi-Even,L., Wainberg,M.A. and Kotler,M. (1996) A p6Pol-protease fusion protein is present in mature particles of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.*, **70**, 7228-7232.
5. Arold,S.T. and Baur,A.S. (2001) Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends Biochem.Sci.*, **26**, 356-363.
6. Bachand,F., Yao,X.J., Hrimech,M., Rougeau,N. and Cohen,E.A. (1999) Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. *J.Biol.Chem.*, **274**, 9083-9091.
7. Bailes,E., Gao,F., Bibollet-Ruche,F., Courgnaud,V., Peeters,M., Marx,P.A., Hahn,B.H. and Sharp,P.M. (2003) Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science*, **300**, 1713.
8. Bampi,C., Bibillo,A., Wendeler,M., Divita,G., Gorelick,R.J., Le Grice,S.F. and Darlix,J.L. (2006) Nucleotide excision repair and template-independent addition by HIV-1 reverse transcriptase in the presence of nucleocapsid protein. *J.Biol.Chem.*, **281**, 11736-11743.
9. Barre-Sinoussi,F., Chermann,J.C., Rey,F., Nugeyre,M.T., Chamaret,S., Gruest,J., Dauguet,C., Axler-Blin,C., Vezinet-Brun,F., Rouzioux,C. et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 868-871.

10. Barrie,K.A., Perez,E.E., Lamers,S.L., Farmerie,W.G., Dunn,B.M., Sleasman,J.W. and Goodenow,M.M. (1996) Natural variation in HIV-1 protease, Gag p7 and p6, and protease cleavage sites within gag/pol polyproteins: amino acid substitutions in the absence of protease inhibitors in mothers and children infected by human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, **219**, 407-416.
11. Bartonova,V., Kral,V., Sieglöva,I., Brynda,J., Fabry,M., Horejsi,M., Kozisek,M., Saskova,K.G., Konvalinka,J., Sedlacek,J. *et al.* (2008) Potent inhibition of drug-resistant HIV protease variants by monoclonal antibodies. *Antiviral Res.*, **78**, 275-277.
12. Bebenek,K., Abbotts,J., Wilson,S.H. and Kunkel,T.A. (1993) Error-prone polymerization by HIV-1 reverse transcriptase. Contribution of template-primer misalignment, miscoding, and termination probability to mutational hot spots. *J.Biol.Chem.*, **268**, 10324-10334.
13. Beissinger,M., Paulus,C., Bayer,P., Wolf,H., Rosch,P. and Wagner,R. (1996) Sequence-specific resonance assignments of the ¹H-NMR spectra and structural characterization in solution of the HIV-1 transframe protein p6. *Eur.J.Biochem.*, **237**, 383-392.
14. Benko,D.M., Schwartz,S., Pavlakis,G.N. and Felber,B.K. (1990) A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env, and rev proteins. *J.Virol.*, **64**, 2505-2518.
15. Benson,R.E., Sanfridson,A., Ottinger,J.S., Doyle,C. and Cullen,B.R. (1993) Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J.Exp.Med.*, **177**, 1561-1566.
16. Bentham,M., Mazaleyrat,S. and Harris,M. (2006) Role of myristoylation and N-terminal basic residues in membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein. *J.Gen.Virol.*, **87**, 563-571.
17. Berkhout,B., Gatignol,A., Rabson,A.B. and Jeang,K.T. (1990) TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter. *Cell*, **62**, 757-767.
18. Bleiber,G., Peters,S., Martinez,R., Cmarko,D., Meylan,P. and Telenti,A. (2004) The central region of human immunodeficiency virus type 1 p6 protein (Gag residues S14-I31) is dispensable for the virus in vitro. *J.Gen.Virol.*, **85**, 921-927.
19. Bour,S., Perrin,C. and Strebel,K. (1999) Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *J.Biol.Chem.*, **274**, 33800-33806.
20. Bour,S. and Strebel,K. (2003) The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes.Infect.*, **5**, 1029-1039.
21. Bukrinsky,M.I., Sharova,N., McDonald,T.L., Pushkarskaya,T., Tarpley,W.G. and Stevenson,M. (1993) Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **90**, 6125-6129.

22. Caldwell,R.L., Egan,B.S. and Shepherd,V.L. (2000) HIV-1 Tat represses transcription from the mannose receptor promoter. *J.Immunol.*, **165**, 7035-7041.
23. Campbell,E.M., Nunez,R. and Hope,T.J. (2004) Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J.Virol.*, **78**, 5745-5755.
24. Campbell,S.M., Crowe,S.M. and Mak,J. (2001) Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J.Clin.Virol.*, **22**, 217-227.
25. Cao,J., McNevin,J., McSweyn,M., Liu,Y., Mullins,J.I. and McElrath,M.J. (2007) Novel CTL Escape by a Three Amino Acid Insertion in HIV-1 p6Pol and p6Gag Late Domain Associated with Drug Resistance. *J.Virol.*
26. Carroll,I.R., Wang,J., Howcroft,T.K. and Singer,D.S. (1998) HIV Tat represses transcription of the beta 2-microglobulin promoter. *Mol.Immunol.*, **35**, 1171-1178.
27. Cassan,M., Delaunay,N., Vaquero,C. and Rousset,J.P. (1994) Translational frameshifting at the gag-pol junction of human immunodeficiency virus type 1 is not increased in infected T-lymphoid cells. *J.Virol.*, **68**, 1501-1508.
28. Chandra,A., Gerber,T., Kaul,S., Wolf,C., Demirhan,I. and Chandra,P. (1986) Serological relationship between reverse transcriptases from human T-cell lymphotropic viruses defined by monoclonal antibodies. Evidence for two forms of reverse transcriptases in the AIDS-associated virus, HTLV-III/LAV. *FEBS Lett.*, **200**, 327-332.
29. Chatterjee,A., Mridula,P., Mishra,R.K., Mittal,R. and Hosur,R.V. (2005) Folding regulates autoprocessing of HIV-1 protease precursor. *J.Biol.Chem.*, **280**, 11369-11378.
30. Chaudhry,A., Das,S.R., Hussain,A., Mayor,S., George,A., Bal,V., Jameel,S. and Rath,S. (2005) The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *J.Immunol.*, **175**, 4566-4574.
31. Chen,N., Morag,A., Almog,N., Blumenzweig,I., Dreazin,O. and Kotler,M. (2001) Extended nucleocapsid protein is cleaved from the Gag-Pol precursor of human immunodeficiency virus type 1. *J.Gen.Virol.*, **82**, 581-590.
32. Chiu,H.C., Wang,F.D., Chen,Y.M. and Wang,C.T. (2006) Effects of human immunodeficiency virus type 1 transframe protein p6* mutations on viral protease-mediated Gag processing. *J.Gen.Virol.*, **87**, 2041-2046.
33. Chowers,M.Y., Spina,C.A., Kwok,T.J., Fitch,N.J., Richman,D.D. and Guatelli,J.C. (1994) Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J.Virol.*, **68**, 2906-2914.
34. Ciuffi,A., Munoz,M., Bleiber,G., Favre,M., Stutz,F., Telenti,A. and Meylan,P.R. (2004) Interactions of processed Nef (58-206) with virion proteins of HIV type 1. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, **20**, 399-407.

35. Coffin,J., Haase,A., Levy,J.A., Montagnier,L., Oroszlan,S., Teich,N., Temin,H., Toyoshima,K., Varmus,H., Vogt,P. *et al.* (1986) What to call the AIDS virus? *Nature*, **321**, 10.
36. Cohen,E.A., Terwilliger,E.F., Jalinoos,Y., Proulx,J., Sodroski,J.G. and Haseltine,W.A. (1990) Identification of HIV-1 vpr product and function. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.*, **3**, 11-18.
37. Collins,K.L., Chen,B.K., Kalams,S.A., Walker,B.D. and Baltimore,D. (1998) HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, **391**, 397-401.
38. Coren,L.V., Thomas,J.A., Chertova,E., Sowder,R.C., Gagliardi,T.D., Gorelick,R.J. and Ott,D.E. (2007) Mutational analysis of the C-terminal gag cleavage sites in human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.*, **81**, 10047-10054.
39. Cortes,M.J., Wong-Staal,F. and Lama,J. (2002) Cell surface CD4 interferes with the infectivity of HIV-1 particles released from T cells. *J.Biol.Chem.*, **277**, 1770-1779.
40. Costa,L.J., Zheng,Y.H., Sabotic,J., Mak,J., Fackler,O.T. and Peterlin,B.M. (2004) Nef binds p6* in GagPol during replication of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.*, **78**, 5311-5323.
41. Cui,J., Tungaturthi,P.K., Ayyavoo,V., Ghafouri,M., Ariga,H., Khalili,K., Srinivasan,A., Amini,S. and Sawaya,B.E. (2006) The role of Vpr in the regulation of HIV-1 gene expression. *Cell Cycle*, **5**, 2626-2638.
42. Cullen,B.R. (2003) Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem.Sci.*, **28**, 419-424.
43. D'Aloja,P., Olivetta,E., Bona,R., Nappi,F., Pedacchia,D., Pugliese,K., Ferrari,G., Verani,P. and Federico,M. (1998) gag, vif, and nef genes contribute to the homologous viral interference induced by a nonproducer human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variant: identification of novel HIV-1-inhibiting viral protein mutants. *J.Virol.*, **72**, 4308-4319.
44. Dalgleish,A.G., Beverley,P.C., Clapham,P.R., Crawford,D.H., Greaves,M.F. and Weiss,R.A. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, **312**, 763-767.
45. Das,S.R. and Jameel,S. (2005) Biology of the HIV Nef protein. *Indian J.Med.Res.*, **121**, 315-332.
46. Dautin,N., Karimova,G. and Ladant,D. (2003) Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transframe protein can restore activity to a dimerization-deficient HIV protease variant. *J.Virol.*, **77**, 8216-8226.

47. Day,J.R., Munk,C. and Guatelli,J.C. (2004) The membrane-proximal tyrosine-based sorting signal of human immunodeficiency virus type 1 gp41 is required for optimal viral infectivity. *J.Virol.*, **78**, 1069-1079.
48. Dayhoff,M.O., von Eck,R. and Park,C.M. (1972) A model for evolutionary change in proteins. *Atlas of protein sequence and structure*, **5**, 89-99.
49. Deacon,N.J., Tsykin,A., Solomon,A., Smith,K., Ludford-Menting,M., Hooker,D.J., McPhee,D.A., Greenway,A.L., Ellett,A., Chatfield,C. *et al.* (1995) Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science*, **270**, 988-991.
50. Dennis,C.A., Baron,A., Grossmann,J.G., Mazaleyra,S., Harris,M. and Jaeger,J. (2005) Co-translational myristoylation alters the quaternary structure of HIV-1 Nef in solution. *Proteins*, **60**, 658-669.
51. Derdeyn,C.A., Decker,J.M., Sfakianos,J.N., Wu,X., O'Brien,W.A., Ratner,L., Kappes,J.C., Shaw,G.M. and Hunter,E. (2000) Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J.Virol.*, **74**, 8358-8367.
52. Djordjevic,J.T., Schibeci,S.D., Stewart,G.J. and Williamson,P. (2004) HIV type 1 Nef increases the association of T cell receptor (TCR)-signaling molecules with T cell rafts and promotes activation-induced raft fusion. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, **20**, 547-555.
53. Emerman,M. (1996) HIV-1, Vpr and the cell cycle. *Curr.Biol.*, **6**, 1096-1103.
54. Emerman,M. and Malim,M.H. (1998) HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*, **280**, 1880-1884.
55. Ensoli,B., Barillari,G., Salahuddin,S.Z., Gallo,R.C. and Wong-Staal,F. (1990) Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature*, **345**, 84-86.
56. Facke,M., Janetzko,A., Shoeman,R.L. and Krausslich,H.G. (1993) A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J.Virol.*, **67**, 4972-4980.
57. Fackler,O.T., Alcover,A. and Schwartz,O. (2007) Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis? *Nat.Rev.Immunol.*, **7**, 310-317.
58. Fackler,O.T., D'Aloja,P., Baur,A.S., Federico,M. and Peterlin,B.M. (2001) Nef from human immunodeficiency virus type 1(F12) inhibits viral production and infectivity. *J.Virol.*, **75**, 6601-6608.
59. Fackler,O.T., Luo,W., Geyer,M., Alberts,A.S. and Peterlin,B.M. (1999) Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. *Mol.Cell*, **3**, 729-739.

60. Federico,M., Bona,R., D'Aloja,P., Baiocchi,M., Pugliese,K., Nappi,F., Chelucci,C., Mavilio,F. and Verani,P. (1996) Anti-HIV viral interference induced by retroviral vectors expressing a nonproducer HIV-1 variant. *Acta Haematol.*, **95**, 199-203.
61. Federico,M., Nappi,F., Ferrari,G., Chelucci,C., Mavilio,F. and Verani,P. (1995) A nonproducer, interfering human immunodeficiency virus (HIV) type 1 provirus can be transduced through a murine leukemia virus-based retroviral vector: recovery of an anti-HIV mouse/human pseudotype retrovirus. *J. Virol.*, **69**, 6618-6626.
62. Feher,A., Weber,I.T., Bagossi,P., Boross,P., Mahalingam,B., Louis,J.M., Copeland,T.D., Torshin,I.Y., Harrison,R.W. and Tozser,J. (2002) Effect of sequence polymorphism and drug resistance on two HIV-1 Gag processing sites. *Eur.J.Biochem.*, **269**, 4114-4120.
63. Finzi,A., Orthwein,A., Mercier,J. and Cohen,E.A. (2007) Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane. *J.Virol.*, **81**, 7476-7490.
64. Fitzgerald,D.J., Bronson,E.C. and Anderson,J.N. (1996) Compositional similarities between the human immunodeficiency virus and surface antigens of pathogens. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, **12**, 99-106.
65. Foley,G.E., Lazarus,H., Farber,S., Uzman,B.G., Boone,B.A. and McCarthy,R.E. (1965) Continous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer*, **18**, 522-529.
66. Franke,E.K., Yuan,H.E. and Luban,J. (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*, **372**, 359-362.
67. Fujii,K., Hurley,J.H. and Freed,E.O. (2007) Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. *Nat.Rev.Microbiol.*, **5**, 912-916.
68. Gallay,P., Stitt,V., Mundy,C., Oettinger,M. and Trono,D. (1996) Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J. Virol.*, **70**, 1027-1032.
69. Gallo,R.C., Salahuddin,S.Z., Popovic,M., Shearer,G.M., Kaplan,M., Haynes,B.F., Palker,T.J., Redfield,R., Oleske,J., Safai,B. *et al.* (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, **224**, 500-503.
70. Gallo,R.C., Sarin,P.S., Gelmann,E.P., Robert-Guroff,M., Richardson,E., Kalyanaraman,V.S., Mann,D., Sidhu,G.D., Stahl,R.E., Zolla-Pazner,S. *et al.* (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**, 865-867.
71. Gao,F., Bailes,E., Robertson,D.L., Chen,Y., Rodenburg,C.M., Michael,S.F., Cummins,L.B., Arthur,L.O., Peeters,M., Shaw,G.M. *et al.* (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*, **397**, 436-441.

72. Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L. *et al.* (2001) Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, **107**, 55-65.
73. Geleziunas, R., Xu, W., Takeda, K., Ichijo, H. and Greene, W.C. (2001) HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature*, **410**, 834-838.
74. Gilbert, M.T., Rambaut, A., Wlasiuk, G., Spira, T.J., Pitchenik, A.E. and Worobey, M. (2007) The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 18566-18570.
75. Gorelick, R.J., Nigida, S.M., Jr., Bess, J.W., Jr., Arthur, L.O., Henderson, L.E. and Rein, A. (1990) Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J. Virol.*, **64**, 3207-3211.
76. Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A. and Saxon, A. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.*, **305**, 1425-1431.
77. Gottlinger, H.G., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. (1989) Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 5781-5785.
78. Gould, S.J., Booth, A.M. and Hildreth, J.E. (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 10592-10597.
79. Graf, M., Ludwig, C., Kehlenbeck, S., Jungert, K. and Wagner, R. (2006) A quasi-lentiviral green fluorescent protein reporter exhibits nuclear export features of late human immunodeficiency virus type 1 transcripts. *Virology*, **352**, 295-305.
80. Greenway, A.L., McPhee, D.A., Allen, K., Johnstone, R., Holloway, G., Mills, J., Azad, A., Sankovich, S. and Lambert, P. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *J. Virol.*, **76**, 2692-2702.
81. Griffin, B.A., Adams, S.R. and Tsien, R.Y. (1998) Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science*, **281**, 269-272.
82. Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, **13**, 1899-1911.
83. Hallenberger, S., Moulard, M., Sordel, M., Klenk, H.D. and Garten, W. (1997) The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J. Virol.*, **71**, 1036-1045.

84. Haller,C., Rauch,S., Michel,N., Hannemann,S., Lehmann,M.J., Keppler,O.T. and Fackler,O.T. (2006) The HIV-1 pathogenicity factor Nef interferes with maturation of stimulatory T-lymphocyte contacts by modulation of N-Wasp activity. *J.Biol.Chem.*, **281**, 19618-19630.
85. Heinzinger,N.K., Bukinsky,M.I., Haggerty,S.A., Ragland,A.M., Kewalramani,V., Lee,M.A., Gendelman,H.E., Ratner,L., Stevenson,M. and Emerman,M. (1994) The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 7311-7315.
86. Henderson,L.E., Bowers,M.A., Sowder,R.C., Serabyn,S.A., Johnson,D.G., Bess,J.W., Jr., Arthur,L.O., Bryant,D.K. and Fenselau,C. (1992) Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *J.Virol.*, **66**, 1856-1865.
87. Henriet,S., Richer,D., Bernacchi,S., Decroly,E., Vigne,R., Ehresmann,B., Ehresmann,C., Paillart,J.C. and Marquet,R. (2005) Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J.Mol.Biol.*, **354**, 55-72.
88. Hill,M.K., Bellamy-McIntyre,A., Vella,L.J., Campbell,S.M., Marshall,J.A., Tachedjian,G. and Mak,J. (2007) Alteration of the proline at position 7 of the HIV-1 spacer peptide p1 suppresses viral infectivity in a strain dependent manner. *Curr.HIV.Res.*, **5**, 69-78.
89. Hill,M.K., Shehu-Xhilaga,M., Crowe,S.M. and Mak,J. (2002) Proline residues within spacer peptide p1 are important for human immunodeficiency virus type 1 infectivity, protein processing, and genomic RNA dimer stability. *J.Virol.*, **76**, 11245-11253.
90. Ho,D.D. (1998) Toward HIV eradication or remission: the tasks ahead. *Science*, **280**, 1866-1867.
91. Ho,D.D., Neumann,A.U., Perelson,A.S., Chen,W., Leonard,J.M. and Markowitz,M. (1995) Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, **373**, 123-126.
92. Ho,S.K., Coman,R.M., Bunger,J.C., Rose,S.L., O'Brien,P., Munoz,I., Dunn,B.M., Sleasman,J.W. and Goodenow,M.M. (2008) Drug-associated changes in amino acid residues in Gag p2, p7(NC), and p6(Gag)/p6(Pol) in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) display a dominant effect on replicative fitness and drug response. *Virology*.
93. Hoffmann,S., Jonas,E., Konig,S., Preusser-Kunze,A. and Willbold,D. (2007) Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 binds its own myristoylated N-terminus. *Biol.Chem.*, **388**, 181-183.
94. Huigen,M.C., Kamp,W. and Nottet,H.S. (2004) Multiple effects of HIV-1 trans-activator protein on the pathogenesis of HIV-1 infection. *Eur.J.Clin.Invest*, **34**, 57-66.

95. Hung,M., Patel,P., Davis,S. and Green,S.R. (1998) Importance of ribosomal frameshifting for human immunodeficiency virus type 1 particle assembly and replication. *J.Virol.*, **72**, 4819-4824.
96. Ibe,S., Shibata,N., Utsumi,M. and Kaneda,T. (2003) Selection of human immunodeficiency virus type 1 variants with an insertion mutation in the p6(gag) and p6(pol) genes under highly active antiretroviral therapy. *Microbiol.Immunol.*, **47**, 71-79.
97. Ishima,R., Torchia,D.A. and Louis,J.M. (2007) Mutational and structural studies aimed at characterizing the monomer of HIV-1 protease and its precursor. *J.Biol.Chem.*, **282**, 17190-17199.
98. Jacks,T., Power,M.D., Masiarz,F.R., Luciw,P.A., Barr,P.J. and Varmus,H.E. (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, **331**, 280-283.
99. Kalland,K.H., Szilvay,A.M., Brokstad,K.A., Saetrevik,W. and Haukenes,G. (1994) The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein shuttles between the cytoplasm and nuclear compartments. *Mol.Cell Biol.*, **14**, 7436-7444.
100. Kaminchik,J., Bashan,N., Itach,A., Sarver,N., Gorecki,M. and Panet,A. (1991) Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 nef gene products translated in vitro and expressed in mammalian cells. *J.Virol.*, **65**, 583-588.
101. Kao,S.Y., Calman,A.F., Luciw,P.A. and Peterlin,B.M. (1987) Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, **330**, 489-493.
102. Kaplan,A.H., Manchester,M. and Swanstrom,R. (1994) The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J.Virol.*, **68**, 6782-6786.
103. Karacostas,V., Wolffe,E.J., Nagashima,K., Gonda,M.A. and Moss,B. (1993) Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles. *Virology*, **193**, 661-671.
104. Karageorgos,L., Li,P. and Burrell,C. (1993) Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, **9**, 817-823.
105. Karn,J. (1999) Tackling Tat. *J.Mol.Biol.*, **293**, 235-254.
106. Khan,M.A., Aberham,C., Kao,S., Akari,H., Gorelick,R., Bour,S. and Strebel,K. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J.Virol.*, **75**, 7252-7265.

107. Kim,Y.G., Maas,S. and Rich,A. (2001) Comparative mutational analysis of cis-acting RNA signals for translational frameshifting in HIV-1 and HTLV-2. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1125-1131.
108. Kimpton,J. and Emerman,M. (1992) Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J.Virol.*, **66**, 2232-2239.
109. Kirchhoff,F., Greenough,T.C., Brettler,D.B., Sullivan,J.L. and Desrosiers,R.C. (1995) Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N.Engl.J.Med.*, **332**, 228-232.
110. Kleiman,L. and Cen,S. (2004) The tRNALys packaging complex in HIV-1. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **36**, 1776-1786.
111. Klimkait,T., Strebel,K., Hoggan,M.D., Martin,M.A. and Orenstein,J.M. (1990) The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J.Virol.*, **64**, 621-629.
112. Kolli,M., Lastere,S. and Schiffer,C.A. (2006) Co-evolution of nelfinavir-resistant HIV-1 protease and the p1-p6 substrate. *Virology*, **347**, 405-409.
113. Kollmus,H., Honigman,A., Panet,A. and Hauser,H. (1994) The sequences of and distance between two cis-acting signals determine the efficiency of ribosomal frameshifting in human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell leukemia virus type II in vivo. *J.Virol.*, **68**, 6087-6091.
114. Kondo,E., Mammano,F., Cohen,E.A. and Gottlinger,H.G. (1995) The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J.Virol.*, **69**, 2759-2764.
115. Kotler,M., Arad,G. and Hughes,S.H. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 gag-protease fusion proteins are enzymatically active. *J.Virol.*, **66**, 6781-6783.
116. Kotov,A., Zhou,J., Flicker,P. and Aiken,C. (1999) Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J.Virol.*, **73**, 8824-8830.
117. Koyanagi,Y., Hinuma,Y., Schneider,J., Chosa,T., Hunsmann,G., Kobayashi,N., Hatanaka,M. and Yamamoto,N. (1984) Expression of HTLV-specific polypeptides in various human T-cell lines. *Med.Microbiol.Immunol.*, **173**, 127-140.
118. Kräusslich,H.G. (1991) Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **88**, 3213-3217.
119. Kräusslich,H.G. (1992) Specific inhibitor of human immunodeficiency virus proteinase prevents the cytotoxic effects of a single-chain proteinase dimer and restores particle formation. *J.Virol.*, **66**, 567-572.

120. Krautkramer,E., Giese,S.I., Gasteier,J.E., Muranyi,W. and Fackler,O.T. (2004) Human immunodeficiency virus type 1 Nef activates p21-activated kinase via recruitment into lipid rafts. *J. Virol.*, **78**, 4085-4097.
121. Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
122. Lama,J., Mangasarian,A. and Trono,D. (1999) Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr.Biol.*, **9**, 622-631.
123. Lama,J. and Ware,C.F. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Nef mediates sustained membrane expression of tumor necrosis factor and the related cytokine LIGHT on activated T cells. *J. Virol.*, **74**, 9396-9402.
124. Lapatto,R., Blundell,T., Hemmings,A., Overington,J., Wilderspin,A., Wood,S., Merson,J.R., Whittle,P.J., Danley,D.E., Geoghegan,K.F. *et al.* (1989) X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes. *Nature*, **342**, 299-302.
125. Levesque,K., Zhao,Y.S. and Cohen,E.A. (2003) Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J.Biol.Chem.*, **278**, 28346-28353.
126. Lindhofer,H., von der,H.K. and Nitschko,H. (1995) In vivo processing of Pr160gag-pol from human immunodeficiency virus type 1 (HIV) in acutely infected, cultured human T-lymphocytes. *Virology*, **214**, 624-627.
127. Louis,J.M., Clore,G.M. and Gronenborn,A.M. (1999) Autoprocessing of HIV-1 protease is tightly coupled to protein folding. *Nat.Struct.Biol.*, **6**, 868-875.
128. Louis,J.M., Dyda,F., Nashed,N.T., Kimmel,A.R. and Davies,D.R. (1998) Hydrophilic peptides derived from the transframe region of Gag-Pol inhibit the HIV-1 protease. *Biochemistry*, **37**, 2105-2110.
129. Louis,J.M., Nashed,N.T., Parris,K.D., Kimmel,A.R. and Jerina,D.M. (1994) Kinetics and mechanism of autoprocessing of human immunodeficiency virus type 1 protease from an analog of the Gag-Pol polyprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 7970-7974.
130. Louis,J.M., Nashed,N.T., Parris,K.D., Kimmel,A.R. and Jerina,D.M. (1994) Kinetics and mechanism of autoprocessing of human immunodeficiency virus type 1 protease from an analog of the Gag-Pol polyprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 7970-7974.
131. Lu,X., Wu,X., Plemenitas,A., Yu,H., Sawai,E.T., Abo,A. and Peterlin,B.M. (1996) CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1. *Curr.Biol.*, **6**, 1677-1684.

132. Luciw,P.A., Cheng-Mayer,C. and Levy,J.A. (1987) Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **84**, 1434-1438.
133. Ludwig,C. (2003) Funktionelle Untersuchungen zur Rolle des „transframe“-Proteins p6* bei der Replikation von HIV-1: Bedeutung der Proteasespaltstellen von p6* für die virale Maturation und Infektiosität . *Naturwissenschaftliche Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin - der Universität Regensburg*.
134. Ludwig,C., Leiherer,A. and Wagner,R. (2008) Importance of protease cleavage sites within and flanking HIV-1 transframe protein p6* for spatiotemporal regulation of protease activation. *J.Virol.*
135. Malim,M.H., Hauber,J., Le,S.Y., Maizel,J.V. and Cullen,B.R. (1989) The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, **338**, 254-257.
136. Mariani,R., Chen,D., Schrofelbauer,B., Navarro,F., Konig,R., Bollman,B., Munk,C., Nymark-McMahon,H. and Landau,N.R. (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*, **114**, 21-31.
137. Marin,M., Rose,K.M., Kozak,S.L. and Kabat,D. (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat.Med.*, **9**, 1398-1403.
138. Marlink,R., Kanki,P., Thior,I., Travers,K., Eisen,G., Siby,T., Traore,I., Hsieh,C.C., Dia,M.C., Gueye,E.H. *et al.* (1994) Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science*, **265**, 1587-1590.
139. Martin,B.R., Giepmans,B.N., Adams,S.R. and Tsien,R.Y. (2005) Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat.Biotechnol.*, **23**, 1308-1314.
140. McCutchan,F.E. (2006) Global epidemiology of HIV. *J.Med.Virol.*, **78 Suppl 1**, S7-S12.
141. McDonald,D., Vodicka,M.A., Lucero,G., Svitkina,T.M., Borisy,G.G., Emerman,M. and Hope,T.J. (2002) Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J.Cell Biol.*, **159**, 441-452.
142. Mergener,K., Facke,M., Welker,R., Brinkmann,V., Gelderblom,H.R. and Krausslich,H.G. (1992) Analysis of HIV particle formation using transient expression of subviral constructs in mammalian cells. *Virology*, **186**, 25-39.
143. Michel,N., Allespach,I., Venzke,S., Fackler,O.T. and Keppler,O.T. (2005) The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr.Biol.*, **15**, 714-723.
144. Miller,M.D., Farnet,C.M. and Bushman,F.D. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J.Virol.*, **71**, 5382-5390.

145. Miyoshi,I., Kubonishi,I., Yoshimoto,S., Akagi,T., Ohtsuki,Y., Shiraishi,Y., Nagata,K. and Hinuma,Y. (1981) Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature*, **294**, 770-771.
146. Muller,B., Daecke,J., Fackler,O.T., Dittmar,M.T., Zentgraf,H. and Krausslich,H.G. (2004) Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. *J.Virol.*, **78**, 10803-10813.
147. Muthumani,K., Choo,A.Y., Premkumar,A., Hwang,D.S., Thieu,K.P., Desai,B.M. and Weiner,D.B. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr-regulated cell death: insights into mechanism. *Cell Death.Differ.*, **12 Suppl 1**, 962-970.
148. Nahmias,A.J., Weiss,J., Yao,X., Lee,F., Kodosi,R., Schanfield,M., Matthews,T., Bolognesi,D., Durack,D., Motulsky,A. *et al.* (1986) Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959. *Lancet*, **1**, 1279-1280.
149. Navia,M.A., Fitzgerald,P.M., McKeever,B.M., Leu,C.T., Heimbach,J.C., Herber,W.K., Sigal,I.S., Darke,P.L. and Springer,J.P. (1989) Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature*, **337**, 615-620.
150. Neil,S.J., Zang,T. and Bieniasz,P.D. (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, **451**, 425-430.
151. Nguyen,D.G., Booth,A., Gould,S.J. and Hildreth,J.E. (2003) Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J.Biol.Chem.*, **278**, 52347-52354.
152. Numa,F., Hirabayashi,K., Tsunaga,N., Kato,H., O'Rourke,K., Shao,H., Stechmann-Lebakken,C., Varani,J., Rapraeger,A. and Dixit,V.M. (1995) Elevated levels of syndecan-1 expression confer potent serum-dependent growth in human 293T cells. *Cancer Res.*, **55**, 4676-4680.
153. Olivetta,E. and Federico,M. (2006) HIV-1 Nef protects human-monocyte-derived macrophages from HIV-1-induced apoptosis. *Exp.Cell Res.*, **312**, 890-900.
154. Olivetta,E., Pugliese,K., Bona,R., D'Aloja,P., Ferrantelli,F., Santarcangelo,A.C., Mattia,G., Verani,P. and Federico,M. (2000) cis expression of the F12 human immunodeficiency virus (HIV) Nef allele transforms the highly productive NL4-3 HIV type 1 to a replication-defective strain: involvement of both Env gp41 and CD4 intracytoplasmic tails. *J.Virol.*, **74**, 483-492.
155. Ono,T., Iwatani,Y., Nishimura,A., Ishimoto,A. and Sakai,H. (2000) Functional association between the nef gene product and gag-pol region of HIV-1. *FEBS Lett.*, **466**, 233-238.
156. Osmanov,S., Pattou,C., Walker,N., Schwardlander,B. and Esparza,J. (2002) Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.*, **29**, 184-190.

157. Pandori, M.W., Fitch, N.J., Craig, H.M., Richman, D.D., Spina, C.A. and Guatelli, J.C. (1996) Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J. Virol.*, **70**, 4283-4290.
158. Park, J. and Morrow, C.D. (1991) Overexpression of the gag-pol precursor from human immunodeficiency virus type 1 proviral genomes results in efficient proteolytic processing in the absence of virion production. *J. Virol.*, **65**, 5111-5117.
159. Parkin, N.T., Chamorro, M. and Varmus, H.E. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J. Virol.*, **66**, 5147-5151.
160. Partin, K., Zybarth, G., Ehrlich, L., DeCrombrughe, M., Wimmer, E. and Carter, C. (1991) Deletion of sequences upstream of the proteinase improves the proteolytic processing of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 4776-4780.
161. Paulus, C. (1999) Untersuchungen zur Struktur und Funktion der HIV-1 Gag-Pol-Domäne p6*. Naturwissenschaftliche Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin - der Universität Regensburg.
162. Paulus, C., Hellebrand, S., Tessmer, U., Wolf, H., Krausslich, H.G. and Wagner, R. (1999) Competitive inhibition of human immunodeficiency virus type-1 protease by the Gag-Pol transframe protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21539-21543.
163. Paulus, C., Ludwig, C. and Wagner, R. (2004) Contribution of the Gag-Pol transframe domain p6* and its coding sequence to morphogenesis and replication of human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, **330**, 271-283.
164. Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 2444-2448.
165. Peters, S., Munoz, M., Yerly, S., Sanchez-Merino, V., Lopez-Galindez, C., Perrin, L., Larder, B., Cmarko, D., Fakan, S., Meylan, P. *et al.* (2001) Resistance to nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors mediated by human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *J. Virol.*, **75**, 9644-9653.
166. Pettit, S.C., Clemente, J.C., Jeung, J.A., Dunn, B.M. and Kaplan, A.H. (2005) Ordered processing of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor is influenced by the context of the embedded viral protease. *J. Virol.*, **79**, 10601-10607.
167. Pettit, S.C., Everitt, L.E., Choudhury, S., Dunn, B.M. and Kaplan, A.H. (2004) Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism. *J. Virol.*, **78**, 8477-8485.
168. Pettit, S.C., Gulnik, S., Everitt, L. and Kaplan, A.H. (2003) The dimer interfaces of protease and extra-protease domains influence the activation of protease and the specificity of GagPol cleavage. *J. Virol.*, **77**, 366-374.

169. Pettit,S.C., Henderson,G.J., Schiffer,C.A. and Swanstrom,R. (2002) Replacement of the P1 amino acid of human immunodeficiency virus type 1 Gag processing sites can inhibit or enhance the rate of cleavage by the viral protease. *J.Virol.*, **76**, 10226-10233.
170. Pettit,S.C., Lindquist,J.N., Kaplan,A.H. and Swanstrom,R. (2005) Processing sites in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates. *Retrovirology.*, **2**, 66.
171. Pettit,S.C., Moody,M.D., Wehbie,R.S., Kaplan,A.H., Nantermet,P.V., Klein,C.A. and Swanstrom,R. (1994) The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J.Virol.*, **68**, 8017-8027.
172. Phylip,L.H., Mills,J.S., Parten,B.F., Dunn,B.M. and Kay,J. (1992) Intrinsic activity of precursor forms of HIV-1 proteinase. *FEBS Lett.*, **314**, 449-454.
173. Platt,E.J., Wehrly,K., Kuhmann,S.E., Chesebro,B. and Kabat,D. (1998) Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.*, **72**, 2855-2864.
174. Pollard,V.W. and Malim,M.H. (1998) The HIV-1 Rev protein. *Annu.Rev.Microbiol.*, **52**, 491-532.
175. Poon,B. and Chen,I.S. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr enhances expression from unintegrated HIV-1 DNA. *J.Virol.*, **77**, 3962-3972.
176. Popovic,M., Sarngadharan,M.G., Read,E. and Gallo,R.C. (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, **224**, 497-500.
177. Pornillos,O., Higginson,D.S., Stray,K.M., Fisher,R.D., Garrus,J.E., Payne,M., He,G.P., Wang,H.E., Morham,S.G. and Sundquist,W.I. (2003) HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J.Cell Biol.*, **162**, 425-434.
178. Pugliese,A., Vidotto,V., Beltramo,T., Petrini,S. and Torre,D. (2005) A review of HIV-1 Tat protein biological effects. *Cell Biochem.Funct.*, **23**, 223-227.
179. Pulkkinen,K., Renkema,G.H., Kirchhoff,F. and Saksela,K. (2004) Nef associates with p21-activated kinase 2 in a p21-GTPase-dependent dynamic activation complex within lipid rafts. *J.Virol.*, **78**, 12773-12780.
180. Quillent,C., Borman,A.M., Paulous,S., Dauguet,C. and Clavel,F. (1996) Extensive regions of pol are required for efficient human immunodeficiency virus polyprotein processing and particle maturation. *Virology*, **219**, 29-36.
181. Raiborg,C., Rusten,T.E. and Stenmark,H. (2003) Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **15**, 446-455.

182. Ratner,L., Fisher,A., Jagodzinski,L.L., Mitsuya,H., Liou,R.S., Gallo,R.C. and Wong-Staal,F. (1987) Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, **3**, 57-69.
183. Ratner,L., Haseltine,W., Patarca,R., Livak,K.J., Starcich,B., Josephs,S.F., Doran,E.R., Rafalski,J.A., Whitehorn,E.A., Baumeister,K. *et al.* (1985) Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*, **313**, 277-284.
184. Rauch,S., Pulkkinen,K., Saksela,K. and Fackler,O.T. (2008) Human immunodeficiency virus type 1 Nef recruits the guanine exchange factor Vav1 via an unexpected interface into plasma membrane microdomains for association with p21-activated kinase 2 activity. *J.Virol.*, **82**, 2918-2929.
185. Reeves,J.D. and Doms,R.W. (2002) Human immunodeficiency virus type 2. *J.Gen.Virol.*, **83**, 1253-1265.
186. Reil,H., Kollmus,H., Weidle,U.H. and Hauser,H. (1993) A heptanucleotide sequence mediates ribosomal frameshifting in mammalian cells. *J.Virol.*, **67**, 5579-5584.
187. Rezacova,P., Lescar,J., Brynda,J., Fabry,M., Horejsi,M., Sedlacek,J. and Bentley,G.A. (2001) Structural basis of HIV-1 and HIV-2 protease inhibition by a monoclonal antibody. *Structure.*, **9**, 887-895.
188. Rodriguez,M.S., Dargemont,C. and Stutz,F. (2004) Nuclear export of RNA. *Biol.Cell*, **96**, 639-655.
189. Rose,J.R., Babe,L.M. and Craik,C.S. (1995) Defining the level of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease activity required for HIV-1 particle maturation and infectivity. *J.Virol.*, **69**, 2751-2758.
190. Ross,T.M., Oran,A.E. and Cullen,B.R. (1999) Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr.Biol.*, **9**, 613-621.
191. Rousso,I., Mixon,M.B., Chen,B.K. and Kim,P.S. (2000) Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 13523-13525.
192. Ruben,S., Perkins,A., Purcell,R., Joung,K., Sia,R., Burghoff,R., Haseltine,W.A. and Rosen,C.A. (1989) Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J.Virol.*, **63**, 1-8.
193. Saksela,K., Cheng,G. and Baltimore,D. (1995) Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J.*, **14**, 484-491.
194. Salfeld,J., Gottlinger,H.G., Sia,R.A., Park,R.E., Sodroski,J.G. and Haseltine,W.A. (1990) A tripartite HIV-1 tat-env-rev fusion protein. *EMBO J.*, **9**, 965-970.

195. Sambrook,J.F.E.F.a.M.T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual.Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, New York.
196. Sarngadharan,M.G., Popovic,M., Bruch,L., Schupbach,J. and Gallo,R.C. (1984) Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science*, **224**, 506-508.
197. Sawaya,B.E., Khalili,K., Mercer,W.E., Denisova,L. and Amini,S. (1998) Cooperative actions of HIV-1 Vpr and p53 modulate viral gene transcription. *J.Biol.Chem.*, **273**, 20052-20057.
198. Schindler,M., Munch,J., Kutsch,O., Li,H., Santiago,M.L., Bibollet-Ruche,F., Muller-Trutwin,M.C., Novembre,F.J., Peeters,M., Courgnaud,V. *et al.* (2006) Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell*, **125**, 1055-1067.
199. Schindler,M., Wurfl,S., Benaroch,P., Greenough,T.C., Daniels,R., Easterbrook,P., Brenner,M., Munch,J. and Kirchhoff,F. (2003) Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J.Virol.*, **77**, 10548-10556.
200. Schupbach,J., Popovic,M., Gilden,R.V., Gonda,M.A., Sarngadharan,M.G. and Gallo,R.C. (1984) Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science*, **224**, 503-505.
201. Schwartz,M.D., Fiore,D. and Panganiban,A.T. (1997) Distinct functions and requirements for the Cys-His boxes of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein during RNA encapsidation and replication. *J.Virol.*, **71**, 9295-9305.
202. Secchiero,P., Zella,D., Capitani,S., Gallo,R.C. and Zauli,G. (1999) Extracellular HIV-1 tat protein up-regulates the expression of surface CXC-chemokine receptor 4 in resting CD4+ T cells. *J.Immunol.*, **162**, 2427-2431.
203. Sheehy,A.M., Gaddis,N.C., Choi,J.D. and Malim,M.H. (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, **418**, 646-650.
204. Sol-Foulon,N., Moris,A., Nobile,C., Boccaccio,C., Engering,A., Abastado,J.P., Heard,J.M., van Kooyk,Y. and Schwartz,O. (2002) HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity.*, **16**, 145-155.
205. Song,Y.H., Meng,Z.F., Xing,H., Ruan,Y.H., Li,X.P., Xin,R.L., Ma,P.F., Peng,H. and Shao,Y. (2007) Analysis of HIV-1 CRF07_BC gag p6 sequences indicating novel deletions in the central region of p6. *Arch.Virol.*, **152**, 1553-1558.

-
206. Staple,D.W. and Butcher,S.E. (2003) Solution structure of the HIV-1 frameshift inducing stem-loop RNA. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4326-4331.
207. Staple,D.W. and Butcher,S.E. (2005) Solution structure and thermodynamic investigation of the HIV-1 frameshift inducing element. *J.Mol.Biol.*, **349**, 1011-1023.
208. Stevenson,M. (2003) HIV-1 pathogenesis. *Nat.Med.*, **9**, 853-860.
209. Stove,V., Van,d.W., I, Naessens,E., Coene,E., Stove,C., Plum,J. and Verhasselt,B. (2005) Human immunodeficiency virus Nef induces rapid internalization of the T-cell coreceptor CD8alphabeta. *J.Virol.*, **79**, 11422-11433.
210. Strack,B., Calistri,A., Craig,S., Popova,E. and Gottlinger,H.G. (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, **114**, 689-699.
211. Strebel,K. (2003) Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS*, **17 Suppl 4**, S25-S34.
212. Suzuki,Y. and Craigie,R. (2007) The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat.Rev.Microbiol.*, **5**, 187-196.
213. Swann,S.A., Williams,M., Story,C.M., Bobbitt,K.R., Fleis,R. and Collins,K.L. (2001) HIV-1 Nef blocks transport of MHC class I molecules to the cell surface via a PI 3-kinase-dependent pathway. *Virology*, **282**, 267-277.
214. Swigut,T., Shohdy,N. and Skowronski,J. (2001) Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J.*, **20**, 1593-1604.
215. Tang,H., Kuhen,K.L. and Wong-Staal,F. (1999) Lentivirus replication and regulation. *Annu.Rev.Genet.*, **33**, 133-170.
216. Tang,J. and Hartsuck,J.A. (1995) A kinetic model for comparing proteolytic processing activity and inhibitor resistance potential of mutant HIV-1 proteases. *FEBS Lett.*, **367**, 112-116.
217. Tang,J. and Wong,R.N. (1987) Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J.Cell Biochem.*, **33**, 53-63.
218. Tessmer,U. and Krausslich,H.G. (1998) Cleavage of human immunodeficiency virus type 1 proteinase from the N-terminally adjacent p6* protein is essential for efficient Gag polyprotein processing and viral infectivity. *J.Virol.*, **72**, 3459-3463.
219. Thali,M., Bukovsky,A., Kondo,E., Rosenwirth,B., Walsh,C.T., Sodroski,J. and Gottlinger,H.G. (1994) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature*, **372**, 363-365.
220. Todd,M.J., Semo,N. and Freire,E. (1998) The structural stability of the HIV-1 protease. *J.Mol.Biol.*, **283**, 475-488.

-
221. Towbin,H., Staehelin,T. and Gordon,J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **76**, 4350-4354.
222. van Beveren,C.P.C.J.a.H.S. (2008) Appendix B: HTLV-3/LAV genome. Weiss,R.L., Teich,N., Varmus,H.and Coffin,J.(Eds.); RNA TUMOR VIRUSES, SECOND EDITION, 2, Vol.2: 1102-1123; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1985).
223. Verheyen,J., Litau,E., Sing,T., Daumer,M., Balduin,M., Oette,M., Fatkenheuer,G., Rockstroh,J.K., Schuldenzucker,U., Hoffmann,D. *et al.* (2006) Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6-gag in therapy-naive and therapy-experienced patients. *Antivir. Ther.*, **11**, 879-887.
224. Veronese,F.D., Copeland,T.D., Oroszlan,S., Gallo,R.C. and Sarngadharan,M.G. (1988) Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24. *J.Virol.*, **62**, 795-801.
225. Vigerust,D.J., Egan,B.S. and Shepherd,V.L. (2005) HIV-1 Nef mediates post-translational down-regulation and redistribution of the mannose receptor. *J.Leukoc.Biol.*, **77**, 522-534.
226. Wagner,R., Fliessbach,H., Wanner,G., Motz,M., Niedrig,M., Deby,G., von Brunn,A. and Wolf,H. (1992) Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch.Virol.*, **127**, 117-137.
227. Wagner,R., Graf,M., Bieler,K., Wolf,H., Grunwald,T., Foley,P. and Uberla,K. (2000) Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors. *Hum.Gene Ther.*, **11**, 2403-2413.
228. Wain-Hobson,S., Sonigo,P., Danos,O., Cole,S. and Alizon,M. (1985) Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell*, **40**, 9-17.
229. Walter,A.E., Turner,D.H., Kim,J., Lyttle,M.H., Muller,P., Mathews,D.H. and Zuker,M. (1994) Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 9218-9222.
230. Wang,J.K., Kiyokawa,E., Verdin,E. and Trono,D. (2000) The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 394-399.
231. Wei,X., Decker,J.M., Liu,H., Zhang,Z., Arani,R.B., Kilby,J.M., Saag,M.S., Wu,X., Shaw,G.M. and Kappes,J.C. (2002) Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob.Agents Chemother.*, **46**, 1896-1905.
232. Weiss,A. and Littman,D.R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, **76**, 263-274.

-
233. Welker,R., Harris,M., Cardel,B. and Krausslich,H.G. (1998) Virion incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Nef is mediated by a bipartite membrane-targeting signal: analysis of its role in enhancement of viral infectivity. *J. Virol.*, **72**, 8833-8840.
234. Welker,R., Kottler,H., Kalbitzer,H.R. and Krausslich,H.G. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology*, **219**, 228-236.
235. Whitehurst,N., Chappey,C., Petropoulos,C., Parkin,N. and Gamarnik,A. (2003) Polymorphisms in p1-p6/p6* of HIV type 1 can delay protease autoprocessing and increase drug susceptibility. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, **19**, 779-784.
236. Wieggers,K., Rutter,G., Kottler,H., Tessmer,U., Hohenberg,H. and Krausslich,H.G. (1998) Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J. Virol.*, **72**, 2846-2854.
237. Willey,R.L., Maldarelli,F., Martin,M.A. and Strebel,K. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.*, **66**, 7193-7200.
238. Willey,R.L., Maldarelli,F., Martin,M.A. and Strebel,K. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.*, **66**, 226-234.
239. Wilson,W., Braddock,M., Adams,S.E., Rathjen,P.D., Kingsman,S.M. and Kingsman,A.J. (1988) HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell*, **55**, 1159-1169.
240. Wiskerchen,M. and Cheng-Mayer,C. (1996) HIV-1 Nef association with cellular serine kinase correlates with enhanced virion infectivity and efficient proviral DNA synthesis. *Virology*, **224**, 292-301.
241. Wolf,D., Witte,V., Laffert,B., Blume,K., Stromer,E., Trapp,S., D'Aloja,P., Schurmann,A. and Baur,A.S. (2001) HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals. *Nat.Med.*, **7**, 1217-1224.
242. Wolf,H., Modrow,S., Soutschek,M., Motz,M., Grunow,R., Döbl,H. and von Baehr,R. (1990) Production, mapping and biological characterization of monoclonal antibodies against core protein (p24) of the human immunodeficiency virus. *AIDS-Forsch.*, **1**, 16-18.
243. Wondrak,E.M., Nashed,N.T., Haber,M.T., Jerina,D.M. and Louis,J.M. (1996) A transient precursor of the HIV-1 protease. Isolation, characterization, and kinetics of maturation. *J.Biol.Chem.*, **271**, 4477-4481.
244. Worobey,M., Gemmel,M., Teuwen,D.E., Haselkorn,T., Kunstman,K., Bunce,M., Muyembe,J.-J., Kabongo J-M., Kalengayi,R., Van Marck,E. *et al.* (2008) Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*, **455**, 661-664.

-
245. Wouters,S., Decroly,E., Vandenbranden,M., Shober,D., Fuchs,R., Morel,V., Leruth,M., Seidah,N.G., Courtoy,P.J. and Ruyschaert,J.M. (1999) Occurrence of an HIV-1 gp160 endoproteolytic activity in low-density vesicles and evidence for a distinct density distribution from endogenously expressed furin and PC7/LPC convertases. *FEBS Lett.*, **456**, 97-102.
246. Wyatt,R. and Sodroski,J. (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, **280**, 1884-1888.
247. Wyma,D.J., Kotov,A. and Aiken,C. (2000) Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J.Virol.*, **74**, 9381-9387.
248. Xu,X.N., Laffert,B., Screaton,G.R., Kraft,M., Wolf,D., Kolanus,W., Mongkolsapay,J., McMichael,A.J. and Baur,A.S. (1999) Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J.Exp.Med.*, **189**, 1489-1496.
249. Zauli,G., Gibellini,D., Caputo,A., Bassini,A., Negrini,M., Monne,M., Mazzoni,M. and Capitani,S. (1995) The human immunodeficiency virus type-1 Tat protein upregulates Bcl-2 gene expression in Jurkat T-cell lines and primary peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, **86**, 3823-3834.
250. Zauli,G., Gibellini,D., Secchiero,P., Dutartre,H., Olive,D., Capitani,S. and Collette,Y. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4(+) T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway. *Blood*, **93**, 1000-1010.
251. Zhang,H., Yang,B., Pomerantz,R.J., Zhang,C., Arunachalam,S.C. and Gao,L. (2003) The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*, **424**, 94-98.
252. Zheng,Y.H., Plemenitas,A., Fielding,C.J. and Peterlin,B.M. (2003) Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **100**, 8460-8465.
253. Zheng,Y.H., Plemenitas,A., Linnemann,T., Fackler,O.T. and Peterlin,B.M. (2001) Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr.Biol.*, **11**, 875-879.
254. Zhu,T., Korber,B.T., Nahmias,A.J., Hooper,E., Sharp,P.M. and Ho,D.D. (1998) An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*, **391**, 594-597.
255. Zuker,M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3406-3415.
256. Zybarth,G. and Carter,C. (1995) Domains upstream of the protease (PR) in human immunodeficiency virus type 1 Gag-Pol influence PR autoprocessing. *J.Virol.*, **69**, 3878-3884.

-
257. Zybarth,G., Krausslich,H.G., Partin,K. and Carter,C. (1994) Proteolytic activity of novel human immunodeficiency virus type 1 proteinase proteins from a precursor with a blocking mutation at the N terminus of the PR domain. *J.Virol.*, **68**, 240-250.

I Anhang

I 1 Die proviralen NL4-3-Mutanten Ma, Mb, Mc, Md, Me, Mf, Mdup und Mtot

I 1.1 Herstellung des Konstruktes pCRpNLp6*Cloneln bzw. pCRpNLp6*Cloneln-2

Oligonukleotide für PCR von *template* NL4-3:

Sämtliche Oligonukleotidsequenzen sind in 5'→3'-Orientierung angegeben. Die Bindungspositionen in den unten aufgeführten Sequenzen sind durch Unterstreichung gekennzeichnet.

1 p6*Mfusion1 (f)

GCAAAGAAGG GCACATAGC

2 p6*Mfusion2 (r)

Xho I Bsm BI
CGGGACTCGA GCTTCGTCTC CTGGCCTTCC CTTGTGG

3 p6*Mfusion3 (f)

Xho I Bsm BI
CGAAGCTCGA GTCCGTCTC ATCCTTTAGC TTCCCTCAG

4 p6*Mfusion4 (r)

Bam HI
TCTGGATCCG CAGATTCTA TGAG

5 p6*Mfusion5 (r)

Xho I Bsm BI
GGACTCGAGC TTCGTCTCCT GGCCGACCCT TGTGGCTCGG CCAGATCTTC

Fusions-PCR-Produkt pCRpNLp6*Cloneln

Apa I
1 GCAAAGAAGGGCACATAGC CAAAAAATTGCAGGGCCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAAT
1 A K K G T * P K I A G P L G K R A V G N
1 Q R R A H S Q K L Q G P * E K G L L E M
1 K E G H I A K N C R A P R K K G C W K

61 GTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGA
21 V E R K D T K * K I V L R D R L I F * G
21 W K G R T P N E R L Y * E T G * F F R E
20 C G K E G H Q M K D C T E R Q A N F L G

121 AGATCTGGCCTTCCCACAAGGGAAGGCCAGGAGACGAAGCTCGAGTCCCGTCTCATCCTT
Bsm BI Xho I Bsm BI
41 R S G L P T R E G Q E T K L E S R L I L
41 D L A F P Q G K A R R R S S S P V S S F
40 K I W P S H K G R P G D E A R V P S H P

181 TAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTCGTCACAATAAAGATAGGGGGGCA
61 * L P S D H S L A A T P R H N K D R G A
61 S F P Q I T L W Q R P L V T I K I G G Q
60 L A S L R S L F G S D P S S Q * R * G G

241 ATTAAAGGAAGCTCTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAATGAATTT
81 I K G S S I R Y R S R * Y S I R R N E F
81 L K E A L L D T G A D D T V L E E M N L
80 N * R K L Y * I Q E Q M I Q Y * K K * I

301 GCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAGGACA
101 A R K M E T K N D R G N W R F Y Q S R T
101 P G R W K P K M I G G I G G F I K V G Q
100 C Q E D G N Q K * * G E L E V L S K * D

361 GTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGATCCAGA
Bcl I Bam HI
121 V * S D T H R N L R I Q
121 Y D Q I L I E I C G S R
120 S M I R Y S * K S A D P

p6*
p1

p6_{gag}

PR

Fusions-PCR-Produkt pCRpNLp6*Cloneln-2

1 GCAAAGAAGGGCACATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAAT
Apa I
1 A K K G T * P K I A G P L G K R A V G N
1 Q R R A H S Q K L Q G P * E K G L L E M
1 K E G H I A K N C R A P R K K G C W K

61 GTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGA
21 V E R K D T K * K I V L R D R L I F * G
21 W K G R T P N E R L Y * E T G * F F R E
20 C G K E G H Q M K D C T E R Q A N F L G

121 AGATCTGGCCCAGGCCACAAGGGTCGGCCAGGAGACGAAGCTCGAGTCCCGTCTCATCCTT
Bsm BI Xho I Bsm BI
41 R S G R A T R V G Q E T K L E S R L I L
41 D L A E P Q G S A R R R S S S P V S S F
40 K I W P S H K G R P G D E A R V P S H P

```

181      TAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTCGTCACAATAAAGATAGGGGGGCA
61      *  L  P  S  D  H  S  L  A  A  T  P  R  H  N  K  D  R  G  A
61      S  F  P  Q  I  T  L  W  Q  R  P  L  V  T  I  K  I  G  G  Q
60      L  A  S  L  R  S  L  F  G  S  D  P  S  S  Q  *  R  *  G  G

241      ATTAAAGGAAGCTCTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAATGAATTT
81      I  K  G  S  S  I  R  Y  R  S  R  *  Y  S  I  R  R  N  E  F
81      L  K  E  A  L  L  D  T  G  A  D  D  T  V  L  E  E  M  N  L
80      N  *  R  K  L  Y  *  I  Q  E  Q  M  I  Q  Y  *  K  K  *  I

301      GCCAGGAAGATGGAACCAAAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAGGACA
101     A  R  K  M  E  T  K  N  D  R  G  N  W  R  F  Y  Q  S  R  T
101     P  G  R  W  K  P  K  M  I  G  G  I  G  G  F  I  K  V  G  Q
100     C  Q  E  D  G  N  Q  K  *  *  G  E  L  E  V  L  S  K  *  D

          Bcl I                      Bam HI
361      GTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGATCCAGA
121      V  *  S  D  T  H  R  N  L  R  I  Q
121      Y  D  Q  I  L  I  E  I  C  G  S  R
120      S  M  I  R  Y  S  *  K  S  A  D  P

```

I 1.2 Synthetisch hergestellte Genfragmente

Folgende Fragmente wurden über Bsm BI in pCRpNLp6*Cloneln bzw. pCRpNLp6*Cloneln-2 einkloniert:

Fragment a

```

          Bsm BI
1      CGTCTCGGCCAGGAAACTTCTTACAATCCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGA
1      R  L  G  Q  E  T  S  Y  N  P  D  Q  S  Q  Q  P  H  Q  K  R
1      V  S  A  R  K  L  L  T  I  Q  T  R  A  N  S  P  T  R  R  E
1      S  R  P  G  N  F  L  Q  S  R  P  E  P  T  A  P  P  E  E

61      GCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGG
21      A  S  G  L  G  K  R  Q  Q  L  P  L  R  S  R  S  R  *  T  R
21      L  Q  V  W  G  R  D  N  N  S  L  S  E  A  G  A  D  R  Q  G
20      S  F  R  F  G  E  E  T  T  T  P  S  Q  K  Q  E  P  I  D  K

          Bsm BI
121     AACTGTATCCTTGAGACG
41      N  C  I  L  E  T
41      T  V  S  L  R
40      E  L  Y  P  *  D

```

Fragment b

1 CGTCTCGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCCGCCCGGAACCTACTGCCCCACCAGAAGAGA
1 R L G Q G I F F R A A R N L L P H Q K R
1 V S A R E F S S E P P G T Y C P T R R E
1 S R P G N F L Q S R P E P T A P P E E

61 GCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGG
21 A S G L G K R Q Q L P L R S R S R * T R
21 L Q V W G R D N N S L S E A G A D R Q G
20 S F R F G E E T T T P S Q K Q E P I D K

121 AACTGTATCCTTGAGACG
41 N C I L E T
41 T V S L R
40 E L Y P * D

Fragment c

1 CGTCTCGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGGCCCGGAACCTACTGCAACCCCAAGAGA
1 R L G Q G I F F R A G R N L L H P Q K R
1 V S A R E F S S E Q A G T Y C T P R R E
1 S R P G N F L Q S R P E P T A P P E E

61 GCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGG
21 A S G L G K R Q Q L P L R S R S R * T R
21 L Q V W G R D N N S L S E A G A D R Q G
20 S F R F G E E T T T P S Q K Q E P I D K

121 AACTGTATCCTTGAGACG
41 N C I L E T
41 T V S L R
40 E L Y P * D

Fragment d

1 CGTCTCGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCGGAGGAAT
1 R L G Q G I F F R A D Q S Q Q P H R R N
1 V S A R E F S S E Q T R A N S P T G G I
1 S R P G N F L Q S R P E P T A P P E E

61 CTTTCCGATTCCGCGAGGAACTACTACCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGG
21 L S D S A R K L L P P L R S R S R * T R
21 F P I R R G N Y Y P L S E A G A D R Q G
20 S F R F G E E T T T P S Q K Q E P I D K

121 AACTGTATCCTTGAGACG
41 N C I L E T
41 T V S L R
40 E L Y P * D

Fragment e

1 CGTCTCGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGA
1 R L G Q G I F F R A D Q S Q Q P H Q K R
1 V S A R E F S S E Q T R A N S P T R R E
1 S R P G N F L Q S R P E P T A P P E E

61 GCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCAGCCAACCAAGAACCTATAGACAAGG
21 A S G L G K R Q Q L P A K N K N L * T R
21 L Q V W G R D N N S Q P K T R T Y R Q G
20 S F R F G E E T T T P S Q K Q E P I D K

121 AACTGTATCCTTGAGACG
41 N C I L E T
41 T V S L R
40 E L Y P * D

Fragment f

1 CGTCTCGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGA
1 R L G Q G I F F R A D Q S Q Q P H Q K R
1 V S A R E F S S E Q T R A N S P T R R E
1 S R P G N F L Q S R P E P T A P P E E

61 GCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAAG
21 A S G L G K R Q Q L P L R S R S R * T K
21 L Q V W G R D N N S L S E A G A D R Q R
20 S F R F G E E T T T P S Q K Q E P I D K

121 AGCTTTATCCTTGAGACG
41 S F I L E T
41 A L S L R
40 E L Y P * D

Fragment dup

1 CGTCTCGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCATTCTTCTC
1 R L G Q G I F F R A D Q S Q Q P H H F F
1 V S A R E F S S E Q T R A N S P T I S S
1 S R P G N F L Q S R P E P T A P P F L
61 AGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAA
21 R A D Q S Q Q P H Q K R A S G L G K R Q
21 E Q T R A N S P T R R E L Q V W G R D N
20 Q S R P E P T A P P E E S F R F G E E T

121 CAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACCTGTATCCTTGAGACG
41 Q L P L R S R S R * T R N C I L E T
41 N S L S E A G A D R Q G T V S L R
40 T T P S Q K Q E P I D K E L Y P * D

Fragment tot

```

1      CGTCTCGGCCAGGAAAACTTTCTTACAATCCCGCCCCGGAACCTACTGCACCCCCGGAGGAAT
1      R L G Q E T S Y N P A R N L L H P R R N
1      V S A R K L L T I P P G T Y C T P G G I
1      S R P G N F L Q S R P E P T A P P E E

61     CTTTTCGTTTCGGCGAGGAACTACTACCCCGAGCCAAAAACAAGAACCTATAGACAAAG
21     L F V S A R K L L P R A K N K N L * T K
21     F S F R R G N Y Y P E P K T R T Y R Q R
20     S F R F G E E T T T P S Q K Q E P I D K

121    AGCTTTATCCTTGAGACG
41     S F I L E T
41     A L S L R
40     E L Y P * D

```

I 2 Die Luciferasereporterkonstrukte fs-NL, fs-NL-Ma, fs-luc, fs-inact., fs-AL, fs-ALn und fs-Aldel

Synthetisch hergestellte Genfragmente

Folgende Fragmente wurden über Hind III und Xba I in pGL2-Control einkloniert:

Fragment NL: 130 bp;

```

Hind III
1      AAGCTTACCA TGGAGAGACA GGCTAATTTT TTAGGGAAGA TCTGGCCTTC CCACAAGGGA
61     AGGCCAGGGA ATTTTCTTCA GAAGACGCCA AAAACATAAA GAAAGGCCCG GCGCCATTCT

Xba I
121    ATCCTCTAGA

```

Fragment NL-Ma: 130 bp;

```

1      AAGCTTACCA TGGAGAGACA GGCTAATTTT TTAGGGAAGA TCTGGCCGAG CCACAAGGGT
61     CGGCCAGGAA ACTTCTTACA GAAGACGCCA AAAACATAAA GAAAGGCCCG GCGCCATTCT
121    ATCCTCTAGA

```

Fragment luc (mit -1 *frame shift*): 131 bp;

```

1      AAGCTTACCA TGGAGAGACA GGCTAATACA TCGAGGGAAG ATCTGGCCTT CCCACAAGGG
61     AAGGCCAGGG AATTTTCTTC AGAAGACGCC AAAACATAAA AGAAAGGCCCG GCGCCATTCT
121    TATCCTCTAG A

```

Fragment inact.: 130 bp;

```

1      AAGCTTACCA TGGAGAGACA GGCTAATTTT CTGGGTAAAA TTTGGCCTAG TCATAAAGGG
61     CGCCCGGGTA ACTTCCTCCA GAAGACGCCA AAAACATAAA GAAAGGCCCG GCGCCATTCT
121    ATCCTCTAGA

```

Fragment AL: 130 bp;

```
1      AAGCTTACCA TGGAGAGACA AGCCAATTTT TTAGGGTAGA TCTGGCCTTC CCACAAGGGA
61     AGGCCAGGGA ATTTTCTTCA GAAGACGCCA AAAACATAAA GAAAGGCCCG GCGCCATTCT
121    ATCCTCTAGA
```

Fragment ALn: 130 bp;

```
1      AAGCTTACCA TGGAGAGACA AGCCAATTTT TTAGTCTAGT AGACCGGAAG GGAACACCCT
61     TCCGGTCGGA TATTAGGTCA GAAGACGCCA AAAACATAAA GAAAGGCCCG GCGCCATTCT
121    ATCCTCTAGA
```

Fragment ALdel: 130 bp;

```
1      AAGCTTACCA TGGAGAGACA AGCCAATTTT TTAGGGTAGA TCTGGCCTTC CCACAAGGGA
61     AGGCCAGGGA ATTTACTTCA GAAGACGCCA AAAACATAAA GAAAGGCCCG GCGCCATTCT
121    ATCCTCTAGA
```

I 3 Das Expressionsplasmid pcDNA-Nef_{NL4-3}

Oligonukleotide für PCR von *template* NL4-3

1 NefStart (f)

Bam HI

GAAGGATCCA TGGGTGGCAA GTGGTCAAAA AG

2 NefStop (r)

Eco RI

CTAGAATTCA GCAGTTCTTG AAGTACTCCG

Einklonierung über Bam HI und Eco RI in pcDNA3.1(+)

I 4 Das Provirus AL und die Mutanten ALn, Aldel und Aldel-myc

Translation von AL im Bereich zwischen Apa I und Bcl I

```

      Apa I                                     Bst EII
1      GGGCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGTCACCAAATGAAAGATT
1      G P L G K R A V G N V E R K V T K * K I
1      G P * E K G L L E M W K G R S P N E R L
1      A P R K K G C W K C G K E G H Q M K D
61     GTACTGAGAGACAGGCTAATTTCTGGGTAAAATTTGGCCTAGTCATAAAGGGCGCCCCG
21     V L R D R L I S W V K F G L V I K G A R
21     Y * E T G * F P G * N L A * S * R A P G
20     C T E R Q A N F L G K I W P S H K G R P
```

NC

p1

121 GTAACTTCCTCCAGAGTAGACCTGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTTAGGTTTG
41 V T S S R V D L S Q Q P H Q K R A L G L
41 * L P P E * T * A N S P T R R E L * V W
40 G N F L Q S R P E P T A P P E E S F R F

Cla I

181 GGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATCGATAAAGAATTGTATCCTT
61 G K R Q Q L P L R S R S R S I K N C I L
61 G R D N N S L S E A G A D R * R I V S F
60 G E E T T T P S Q K Q E P I D K E L Y P

241 TAGCTTCCCTAAGAAGCCTCTTTGGGAGCGACCCCTCGTCACAAGCCAATTTTTTAGGGT
81 * L P * E A S L G A T P R H K P I F * G
81 S F P K K P L W E R P L V T S Q F F R V
80 L A S L R S L F G S D P S S Q A N F L G

301 AGATCTGGCCTTCCCACAAGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAA
101 R S G L P T R E G Q G I F F R A D Q S Q
101 D L A F P Q G K A R E F S S E Q T R A N
100 * I W P S H K G R P G N F L Q S R P E P

361 CAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGC
121 Q P H Q K R A S G L G K R Q Q L P L R S
121 S P T R R E L Q V W G R D N N S L S E A
120 T A P P E E S F R F G E E T T T P S Q K

421 AGGAGCCGATAGACAAGGAACGTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAGCG
141 R S R * T R N C I L * L P S D H S L A A
141 G A D R Q G T V S F S F P Q I T L W Q R
140 Q E P I D K E L Y P L A S L R S L F G S

Bst EII

481 ACCCCTGGTCACCATAAAGATAGGGGGCAATTAAAGGAAGCTCTATTAGATACAGGAGC
161 T P G H H K D R G A I K G S S I R Y R S
161 P L V T I K I G G Q L K E A L L D T G A
160 D P W S P * R * G G N * R K L Y * I Q E

541 AGATGATACAGTATTAGAAGAAATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGG
181 R * Y S I R R N E F A R K M E T K N D R
181 D D T V L E E M N L P G R W K P K M I G
180 Q M I Q Y * K K * I C Q E D G N Q K * *

Bcl I

601 GGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCA
201 G N W R F Y Q S K T V * S
201 G I G G F I K V R Q Y D
200 G E L E V L S K * D S M I

p6_{gag}

p6*

PR

Translation von ALn im Bereich zwischen beiden Restriktionsschnittstellen für Bst EII

Bst EII

```

1      GGTACCGGTCACCAAAATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTCCTGGGTAAAATT
1      G T G H Q M K D C T E R Q A N F L G K I
1      V P V T K * K I V L R D R L I S W V K F
1      Y R S P N E R L Y * E T G * F P G * N

61     TGGCCTAGTCATAAAGGGCGCCCGGGTAACTTCCTCCAGAGTAGACCTGAGCCAACAGCC
21     W P S H K G R P G N F L Q S R P E P T A
21     G L V I K G A R V T S S R V D L S Q Q P
20     L A * S * R A P G * L P P E * T * A N S

121    CCACCAGAAGAGAGCTTTAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAG
41     P P E E S F R F G E E T T T P S Q K Q E
41     H Q K R A L G L G K R Q Q L P L R S R S
40     P T R R E L * V W G R D N N S L S E A G

181    CCGATCGATAAAGAATTGTATCCTTTAGCTTCCCTAAGAAGCCTCTTTGGGAGCGACCCC
61     P I D K E L Y P L A S L R S L F G S D P
61     R S I K N C I L * L P * E A S L G A T P
60     A D R * R I V S F S F P K K P L W E R P

241    TCGTCACAAGCCAATTTTTTAGTCTAGTAGACCGGAAGGGAACACCCTTCCGGTCGGATA
81     S S Q A N F L V * * T G R E H P S G R I
81     R H K P I F * S S R P E G N T L P V G Y
80     L V T S Q F F S L V D R K G T P F R S D

301    TTAGGTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAA
101    L G Q S R P E P T A P P E E S F R F G E
101    * V R A D Q S Q Q P H Q K R A S G L G K
100    I R S E Q T R A N S P T R R E L Q V W G

361    GAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACCTGTATCCTTTAGCT
121    E T T T P S Q K Q E P I D K E L Y P L A
121    R Q Q L P L R S R S R * T R N C I L * L
120    R D N N S L S E A G A D R Q G T V S F S

                                     Bst EII
421    TCCCTCAGATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTGGTCACCGAGCTC
141    S L R S L F G S D P W S P S
141    P S D H S L A A T P G H R A
140    F P Q I T L W Q R P L V T E L

```


Translation von ALdel im Bereich zwischen beiden Restriktionsschnittstellen für Bst EII

Bst EII

```

1      GGTACCGGTCACCAAAATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTCCTGGGTAAAATT
1      G T G H Q M K D C T E R Q A N F L G K I
1      V P V T K * K I V L R D R L I S W V K F
1      Y R S P N E R L Y * E T G * F P G * N

61     TGGCCTAGTCATAAAGGGCGCCCGGGTAACTTCCTCCAGAGTAGACCTGAGCCAACAGCC
21     W P S H K G R P G N F L Q S R P E P T A
21     G L V I K G A R V T S S S R V D L S Q Q P
20     L A * S * R A P G * L P P E * T * A N S

121    CCACCAGAAGAGAGCTTTAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAG
41     P P E E S F R F G E E T T T P S Q K Q E
41     H Q K R A L G L G K R Q Q L P L R S R S
40     P T R R E L * V W G R D N N S L S E A G

181    CCGATCGATAAAGAATTGTATCCTTTAGCTTCCCTAAGAAGCCTCTTTGGGAGCGACCCC
61     P I D K E L Y P L A S L R S L F G S D P
61     R S I K N C I L * L P * E A S L G A T P
60     A D R * R I V S F S F P K K P L W E R P

241    TCGTCACAAGCCAATTTTTTAGGGTAGATCTGGCCTTCCCACAAGGGAAGGCCAGGGAAT
81     S S Q A N F L G * I W P S H K G R P G N
81     R H K P I F * G R S G L P T R E G Q G I
80     L V T S Q F F R V D L A F P Q G K A R E

                                           Bst EII
301    TTACTTCATTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTGGTCACCGAGCTC
101    L L H L A S L R S L F G S D P W S P S
101    Y F I * L P S D H S L A A T P G H R A
100    F T S F S E P Q I T L W Q R P L V T E L
  
```

1 GGTACC**GGTCACCA**AAATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTCTGGGTAAAATT

1 G T G H Q M K D C T E R Q A N **F L G K I**

1 V P V T K * K I V L R D R L I S W V K F

1 Y R S P N E R L Y * E T G * F P G * N

61 TGGCCTAGTCATAAAGGGCGCCCGGGTAACCTCCTCCAGAGTAGACCTGAGCCAACAGCC

21 **W P S H K G R P G N F** **L Q S R P E P T A**

21 G L V I K G A R V T S S R V D L S Q Q P

20 L A * S * R A P G * L P P E * T * A N S

121 CCACCAGAAGAGAGCTTTAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAG

41 **P P E E S F R F G E E T T T P S Q K Q E**

41 H Q K R A L G L G K R Q Q L P L R S R S

40 P T R R E L * V W G R D N N S L S E A G

Cla I

181 CCG**ATCGAT**AAAGAATTGTATCCTTTAGCTTCCCTAAGAAGCCTCTTTGGGAGCGACCCC

61 **P I D K E L Y P L A S L R S L F G S D P**

61 R S I K N C I L * L P * E A S L G A T P

60 A D R * R I V S F S F P K K P L W E R P

241 TCGTCACAAGCCAATTTTTTAGGGTAGATCTGGCCTTCCACAAGGGAAGGCCAGGGAAT

81 **S S Q A N F L G** * I W P S H K G R P G N

81 R H K P I F * G R S G L P T R E G Q G I

80 L V T S Q **F F R V D L A F P Q G K A R E**

Rsr II Sna BI

301 TTACT**CGGACCG**AGCAGAAACTGATCTCTGAAGAAGATCTC**TACGTAT**CATTTAGCTTCC

101 L L G P S R N * S L K K I S T Y H L A S

101 Y S D R A E T D L * R R S L R I I * L P

100 **F T R T** **E Q K L I S E E D L** Y V **S F S F**

Bst EII

361 CTCAGATCACTCTTTGGCAGCGACCCCT**GGTCACCG**GAGCTC

121 L R S L F G S D P W S P S

121 S D H S L A A T P G H R A

120 P Q I T L W Q R P L V T E L

I 5 Herstellung der proviralen Mutanten ALdel-GFP und ALdel-3tetraCys

Oligonukleotide zur PCR von *template* huGFP

1 fsGFP-up (f)

RsrII
GAATAACCGGA CCGTGAGCAA GGGC

2 fsGFP-down (r)

Sna BI
CGCCGCTACG TACTTGTACA GCTC

Translation von ALdel-GFP im Bereich zwischen den Restriktionsschnittstellen Rsr II und Sna BI

Rsr II
1 CCGACCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTG
1 R T V S K G E E L F T G V V P I L V E L
1 G P * A R A R S C S P G W C P S W S S W
1 D R E Q G R G A V H R G G A H P G R A

61 GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC
21 D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T
21 T A T * T A T S S A C P A R A R A M P P
20 G R R R K R P Q V Q R V R R G R G R C H

121 TACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCC
41 Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W P
41 T A S * P * S S S A P P A S C P C P G P
40 L R Q A D P E V H L H H R Q A A R A L A

181 ACCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGAGTGCTTCAGCCGCTACCCGACCACATG
61 T L V T T F T Y G V Q C F S R Y P D H M
61 P S * P P S P T A C S A S A A T P T T *
60 H P R D H L H L R R A V L Q P L P R P H

241 AAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
81 K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I
81 S S T T S S S P P C P K A T S R S A P S
80 E A A R L L Q V R H A R R L R P G A H H

301 TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC
101 F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T
101 S S R T T A T T R P A P R * S S R A T P
100 L L Q G R R Q L Q D P R R G E V R G R H

```

361      CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG
121      L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G
121      W * T A S S * R A S T S R R T A T S W G
120      P G E P H R A E G H R L Q G G R Q H P G

421      CACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
141      H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K
141      T S W S T T T A T T S I S W P T S R R
140      A Q A G V Q L Q Q P Q R L Y H G R Q A E

481      AACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTC
161      N G I K V N F K I R H N I E D G S V Q L
161      T A S R * T S R S A T T S R T A A C S S
160      E R H Q G E L Q D P P Q H R G R Q R A A

541      GCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCACAAC
181      A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N
181      P T T T S R T P P S A T A P C C C P T T
180      R R P L P A E H P H R R R P R A A A R Q

601      CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATG
201      H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M
201      T T * A P S P P * A K T P T R S A I T W
200      P L P E H P V R P E Q R P Q R E A R S H

661      GTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
221      V L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K
221      S C W S S * P P P G S L S A W T S C T S
220      G P A G V R D R R R D H S R H G R A V Q

Sna BI
721      TACGTA
241      Y V
241      T
240      V R

```

Translation von Aldel-3tetraCys im Bereich zwischen den Restriktions-schnittstellen Rsr II und Sna BI

```

Rsr II
1      CGGACCGCATTTCTAAACTGTTGTCCAGGATGTTGTATGGAACCAGGAGGAGGATTTTTA
1      R T A F L N C C P G C C M E P G G G F L
1      G P H F * T V V Q D V V W N Q E E D F *
1      D R I S K L L S R M L Y G T R R R I F

61     AATTGTTGTCTTGGGTGTTGTATGGAACCAGGAGGGGATTTTAAATTGTTGTCCAGGA
21     N C C P G C C M E P G G G F L N C C P G
21     I V V L G V V W N Q E G D F * I V V Q D
20     K L L S W V L Y G T R R G I F K L L S R

```

121 TGTGTATGGAGCCTTACGTA Sna BI
41 C C M E P Y V
41 V V W S L T
40 M L Y G A L R

I 6 Sequenzen proviraler HIV-Klone

Oligonukleotide zur Sequenzierung von pHX10

1 RF190 (f)

GGAAATGTGG AAAGGAAGGA CACC

2 RF191 (r)

CTGTCTTACT TTGATAAAAC CTCC

Nukleotidsequenz von HX10

1	TGGAAGGGCT	AATTCACTCC	CAACGAAGAC	AAGATATCCT	TGATCTGTGG	ATCTACCACA
61	CACAAGGCTA	CTTCCCTGAT	TAGCAGAACT	ACACACCAGG	GCCAGGGATC	AGATATCCAC
121	TGACCTTTGG	ATGGTGCTAC	AAGCTAGTAC	CAGTTGAGCC	AGAGAAGTTA	GAAGAAGCCA
181	ACAAAGGAGA	GAACACCAGC	TTGTTACACC	CTGTGAGCCT	GCATGGAATG	GATGACCCGG
241	AGAGAGAAGT	GTTAGAGTGG	AGGTTTGACA	GCCGCCTAGC	ATTTCATCAC	ATGGCCCGAG
301	AGCTGCATCC	GGAGTACTTC	AAGAACTGCT	GACATCGAGC	TTGCTACAAG	GGACTTTCCG
361	CTGGGGACTT	TCCAGGGAGG	CGTGGCCTGG	GCGGGACTGG	GGAGTGGCGA	GCCCTCAGAT
421	CCTGCATATA	AGCAGCTGCT	TTTTGCCTGT	ACTGGGTCTC	TCTGGTTAGA	CCAGATCTGA
481	GCCTGGGAGC	TCTCTGGCTA	ACTAGGGAAC	CCACTGCTTA	AGCCTCAATA	AAGCTTGCCT
541	TGAGTGCTTC	AAGTAGTGTG	TGCCCGTCTG	TTGTGTGACT	CTGGTAACTA	GAGATCCCTC
601	AGACCCTTTT	AGTCAGTGTG	GAAAATCTCT	AGCAGTGGCG	CCCGAACAGG	GACCTGAAAG
661	CGAAAGGGAA	ACCAGAGGAG	CTCTCTCGAC	GCAGGACTCG	GCTTGCTGAA	GCGCGCACGG
721	CAAGAGGCGA	GGGGCGGCGA	CTGGTGAGTA	CGCCAAAAAT	TTTGACTION	GGAGGCTAGA
781	AGGAGAGAGA	TGGGTGCGAG	AGCGTCAGTA	TTAAGCGGGG	GAGAATTAGA	TCGATGGGAA
841	AAAATTCGGT	TAAGGCCAGG	GGGAAAGAAA	AAATATAAAT	TAAAACATAT	AGTATGGGCA
901	AGCAGGGAGC	TAGAACGATT	CGCAGTTAAT	CCTGGCCTGT	TAGAAACATC	AGAAGGCTGT
961	AGACAAATAC	TGGGACAGCT	ACAACCATCC	CTTCAGACAG	GATCAGAAGA	ACTTAGATCA
1021	TTATATAATA	CAGTAGCAAC	CCTCTATTGT	GTGCATCAAA	GGATAGAGAT	AAAAGACACC
1081	AAGGAAGCTT	TAGACAAGAT	AGAGGAAGAG	CAAAACAAAA	GTAAGAAAAA	AGCACAGCAA
1141	GCAGCAGCTG	ACACAGGACA	CAGCAGTCAG	GTCAGCCAAA	ATTACCCTAT	AGTGCAGAAC
1201	ATCCAGGGGC	AAATGGTACA	TCAGGCCATA	TCACCTAGAA	CTTTAAATGC	ATGGGTAAAA
1261	GTAGTAGAAG	AGAAGGCTTT	CAGCCCAGAA	GTAATACCCA	TGTTTTTCAGC	ATTATCAGAA
1321	GGAGCCACCC	CACAAGATTT	AAACACCATG	CTAAACACAG	TGGGGGGACA	TCAAGCAGCC

Gag-Start-
Kodon

1381	ATGCAAATGT	TAAAAGAGAC	CATCAATGAG	GAAGCTGCAG	AATGGGATAG	AGTACATCCA
1441	GTGCATGCAG	GGCCTATTGC	ACCAGGCCAG	ATGAGAGAAC	CAAGGGGAAG	TGCATAGCA
1501	GGAACTACTA	GTACCCTTCA	GGAACAAATA	GGATGGATGA	CAAATAATCC	ACCTATCCCA
1561	GTAGGAGAAA	TTTATAAAAG	ATGGATAATC	CTGGGATTAA	ATAAAATAGT	AAGAATGTAT
1621	AGCCCTACCA	GCATTCTGGA	CATAAGACAA	GGACCAAAAAG	AACCTTTTtag	AGACTATGTA
1681	GACCGGTTCT	ATAAAACCTCT	AAGAGCCGAG	CAAGCTTCAC	AGGAGGTAAA	AAATTGGATG
1741	ACAGAAACCT	TGTTGGTCCA	AAATGCGAAC	CCAGATTGTA	AGACTATTTT	AAAAGCATTG
1801	GGACCAGCGG	CTACACTAGA	AGAAATGATG	ACAGCATGTC	AGGGAGTAGG	AGGACCCGGC
1861	CATAAGGCAA	GAGTTTTGGC	TGAAGCAATG	AGCCAAGTAA	CAAATACAGC	TACCATAATG
1921	ATGCAGAGAG	GCAATTTTtag	GAACCAAAGA	AAGATGGTTA	AGTGTTTTCAA	TTGTGGCAAA
1981	GAAGGGCACA	CAGCCAGAAA	TTGCAGGGCC	CCTAGGAAAA	AGGGCTGTTG	<u>GAAATGTGGA</u>
2041	<u>AAGGAAGGAC</u>	ACCAAATGAA	AGATTGTACT	GAGAGACAGG	CTAATTTTTT	AGGGAAGATC
2101	TGGCCTTCCT	ACAAGGGAAG	GCCAGGGAAT	TTTCTTCAGA	GCAGACCAGA	GCCAACAGCC
2161	CCACCATTTC	TTCAGAGCAG	ACCAGAGCCA	ACAGCCCCAC	CAGAAGAGAG	CTTCAGGTCT
2221	GGGGTAGAGA	CAACAACCTC	CCCTCAGAAG	CAGGAGCCGA	TAGACAAGGA	ACTGTATCCT
2281	TTAACTTCCC	TCAGATCACT	CTTTGGCAAC	GACCCCTCGT	CACAATAAAG	ATAGGGGGGC
2341	AACTAAAGGA	AGCTCTATTA	GATACAGGAG	CAGATGATAC	AGTATTAGAA	GAAATGAGTT
2401	TGCCAGGAAG	ATGGAAACCA	AAAATGATAG	GGGGAATTGG	<u>AGGTTTTATC</u>	<u>AAAAGTAAGAC</u>
2461	<u>AGTATGATCA</u>	GATACTCATA	GAAATCTGTG	GACATAAAGC	TATAGGTACA	GTATTAGTAG
2521	GACCTACACC	TGTCAACATA	ATTGGAAGAA	ATCTGTTGAC	TCAGATTGGT	TGCACTTTAA
2581	ATTTTCCCAT	TAGCCCTATT	GAGACTGTAC	CAGTAAAATT	AAAGCCAGGA	ATGGATGGCC
2641	CAAAAGTTAA	ACAATGGCCA	TTGACAGAAG	AAAAAATAAA	AGCATTAGTA	GAAATTTGTA
2701	CAGAAATGGA	AAAGGAAGGG	AAAATTTCAA	AAATTGGGCC	TGAGAATCCA	TACAATACTC
2761	CAGTATTTGC	CATAAAGAAA	AAAGACAGTA	CTAAATGGAG	AAAATTAGTA	GATTTTCAGAG
2821	AACTTAATAA	GAGAACTCAA	GACTTCTGGG	AAGTTCAATT	AGGAATACCA	CATCCCGCAG
2881	GGTTAAAAAA	GAAAAAATCA	GTAACAGTAC	TGGATGTGGG	TGATGCATAT	TTTTCAGTTC
2941	CCTTAGATGA	AGACTTCAGG	AAGTATACTG	CATTTACCAT	ACCTAGTATA	AACAATGAGA
3001	CACCAGGGAT	TAGATATCAG	TACAATGTGC	TTCCACAGGG	ATGGAAAGGA	TCACCAGCAA
3061	TATTCCAAAG	TAGCATGACA	AAAATCTTAG	AGCCTTTTAA	AAAACAAAAT	CCAGACATAG
3121	TTATCTATCA	ATACATGGAT	GATTTGTATG	TAGGATCTGA	CTTAGAAATA	GGGCAGCATA
3181	GAACAAAAAT	AGAGGAGCTG	AGACAACATC	TGTTGAGGTG	GGGACTTACC	ACACCAGACA
3241	AAAAACATCA	GAAAGAACCT	CCATTCTTTT	GGATGGGTTA	TGAACTCCAT	CCTGATAAAT
3301	GGACAGTACA	GCCTATAGTG	CTGCCAGAAA	AAGACAGCTG	GACTGTCAAT	GACATACAGA
3361	AGTTAGTGGG	GAAATTGAAT	TGGGCAAGTC	AGATTTACCC	AGGGATTAAA	GTAAGGCAAT
3421	TATGTAAACT	CCTTAGAGGA	ACCAAAGCAC	TAACAGAAGT	AATACCACTA	ACAGAAGAAG
3481	CAGAGCTAGA	ACTGGCAGAA	AACAGAGAGA	TTCTAAAAGA	ACCAGTACAT	GGAGTGTATT
3541	ATGACCCATC	AAAAGACTTA	ATAGCAGAAA	TACAGAAGCA	GGGGCAAGGC	CAATGGACAT
3601	ATCAAATTTA	TCAAGAGCCA	TTTAAAAATC	TGAAAAACAGG	AAAATATGCA	AGAATGAGGG
3661	GTGCCCACAC	TAATGATGTA	AAACAATTAA	CAGAGGCAGT	GCAAAAAATA	ACCACAGAAA
3721	GCATAGTAAT	ATGGGGAAAG	ACTCCTAAAT	TTAAACTACC	CATACAAAAG	GAAACATGGG
3781	AAACATGGTG	GACAGAGTAT	TGGCAAGCCA	CCTGGATTCC	TGAGTGGGAG	TTTGTTAATA
3841	CCCCTCCTTT	AGTGAAATTA	TGGTACCAGT	TAGAGAAAAGA	ACCCATAGTA	GGAGCAGAAA
3901	CCTTCTATGT	AGATGGGGCA	GCTAACAGGG	AGACTAAATT	AGGAAAAGCA	GGATATGTTA
3961	CTAACAAAGG	AAGACAAAAG	GTTGTCCCCC	TAACATAACAC	AACAAATCAG	AAAACAGAGT
4021	TACAAGCAAT	TTATCTAGCT	TTGCAGGATT	CAGGATTAGA	AGTAAACATA	GTAACAGACT
4081	CACAATATGC	ATTAGGAATC	ATTCAAGCAC	AACCAGATAA	AAGTGAATCA	GAGTTAGTCA

4141	ATCAAATAAT	AGAGCAGTTA	ATAAAAAAGG	AAAAGGTCTA	TCTGGCATGG	GTACCAGCAC
4201	ACAAAGGAAT	TGGAGGAAAT	GAACAAGTAG	ATAAATTAGT	CAGTGCTGGA	ATCAGGAAAA
4261	TACTATTTTT	AGATGGAATA	GATAAGGCC	AAGATGAACA	TGAGAAATAT	CACAGTAATT
4321	GGAGAGCAAT	GGCTAGTGAT	TTTAACCTGC	CACCTGTAGT	AGCAAAAGAA	ATAGTAGCCA
4381	GCTGTGATAA	ATGTCAGCTA	AAAGGAGAAG	CCATGCATGG	ACAAGTAGAC	TGTAGTCCAG
4441	GAATATGGCA	ACTAGATTGT	ACACATTTAG	AAGGAAAAGT	TATCCTGGTA	GCAGTTCATG
4501	TAGCCAGTGG	ATATATAGAA	GCAGAAGTTA	TTCCAGCAGA	AACAGGGCAG	GAAACAGCAT
4561	ATTTTCTTTT	AAAATTAGCA	GGAAGATGGC	CAGTAAAAAC	AATACATACA	GACAATGGCA
4621	GCAATTTTAC	CAGTGCTACG	GTTAAGGCCG	CCTGTTGGTG	GGCGGGAATC	AAGCAGGAAT
4681	TTGGAATTCC	CTACAATCCC	CAAAGTCAAG	GAGTAGTAGA	ATCTATGAAT	AAAGAATTAA
4741	AGAAAATTAT	AGGACAGGTA	AGAGATCAGG	CTGAACATCT	TAAGACAGCA	GTACAAATGG
4801	CAGTATTCAT	CCACAATTTT	AAAAGAAAAG	GGGGGATTGG	GGGGTACAGT	GCAGGGGAAA
4861	GAATAGTAGA	CATAATAGCA	ACAGACATAC	AAACTAAAGA	ATTACAAAAA	CAAATTACAA
4921	AAATTCAAAA	TTTTCGGGTT	TATTACAGGG	ACAGCAGAAA	TCCACTTTGG	AAAGGACCAG
4981	CAAAGCTCCT	CTGGAAGGT	GAAGGGGCAG	TAGTAATACA	AGATAATAGT	GACATAAAAG
5041	TAGTGCCAAG	AAGAAAAGCA	AAGATCATT	GGGATTATGG	AAAACAGATG	GCAGGTGATG
5101	ATTGTGTGGC	AAGTAGACAG	GATGAGGATT	AGAACATGGA	AAAGTTTAGT	AAAACACCAT
5161	ATGTATGTTT	CAGGGAAAGC	TAGGGGATGG	TTTTATAGAC	ATCACTATGA	AAGCCCTCAT
5221	CCAAGAATAA	GTTCAGAAGT	ACACATCCCA	CTAGGGGATG	CTAGATTGGT	AATAACAACA
5281	TATTGGGGTC	TGCATACAGG	AGAAAGAGAC	TGGCATTTGG	GTCAGGGAGT	CTCCATAGAA
5341	TGGAGGAAAA	AGAGATATAG	CACACAAGTA	GACCCTGAAC	TAGCAGACCA	ACTAATTCAT
5401	CTGTATTACT	TTGACTGTTT	TTCAAGACTCT	GCTATAAGAA	AGGCCTTATT	AGGACACATA
5461	GTTAGCCCTA	GGTGTGAATA	TCAAGCAGGA	CATAACAAGG	TAGGATCTCT	ACAATACTTG
5521	GCACTAGCAG	CATTAATAAC	ACCAAAAAAG	ATAAAGCCAC	CTTTCCTAG	TGTTACGAAA
5581	CTGACAGAGG	ATAGATGGAA	CAAGCCCCAG	AAGACCAAGG	GCCACAGAGG	GAGCCACACA
5641	ATGAATGGAC	ACTAGAGCTT	TTAGAGGAGC	TTAAGAATGA	AGCTGTTAGA	CATTTTCCTA
5701	GGATTTGGCT	CCATGGCTTA	GGGCAACATA	TCTATGAAAC	TTATGGGGAT	ACTTGGGCAG
5761	GAGTGGAAGC	CATAATAAGA	ATTCTGCAAC	AACTGCTGTT	TATCCATTTT	CAGAATTGGG
5821	TGTCGACATA	GCAGAATAGG	CGTTACTCGA	CAGAGGAGAG	CAAGAAATGG	AGCCAGTAGA
5881	TCCTAGACTA	GAGCCCTGGA	AGCATCCAGG	AAGTCAGCCT	AAAACCTGCTT	GTACCAATTG
5941	CTATTGTAAA	AAGTGTGGCT	TTCAATGCCA	AGTTTGTTTC	ATAACAAAAG	CCTTAGGCAT
6001	CTCCTATGGC	AGGAAGAAGC	GGAGACAGCG	ACGAAGACCT	CCTCAAGGCA	GTCAGACTCA
6061	TCAAGTTTCT	CTATCAAAGC	AGTAAGTAGT	ACATGTAATG	CAACCTATAC	AAATAGCAAT
6121	AGTAGCATT	GATAGTAGCA	TAATAATAGC	AATAGTTGTG	TGGTCCATAG	TAATCATAGA
6181	ATATAGGAAA	ATATTAAGAC	AAAGAAAAAT	AGACAGGTTA	ATTGATAGAC	TAATAGAAAG
6241	AGCAGAAGAC	AGTGGCAATG	AGAGTGAAGG	AGAAATATCA	GCACTTGTGG	AGATGGGGGT
6301	GGAGATGGGG	CACCATGCTC	CTTGGGATGT	TGATGATCTG	TAGTGCTACA	GAAAAATTGT
6361	GGGTACAGT	CTATTATGGG	GTACCTGTGT	GGAAGGAAGC	AACCACCACT	CTATTTTGTG
6421	CATCAGATGC	TAAAGCATAT	GATACAGAGG	TACATAATGT	TTGGGCCACA	CATGCCTGTG
6481	TACCCACAGA	CCCCAACCCA	CAAGAAGTAG	TATTGGTAAA	TGTGACAGAA	AATTTTAACA
6541	TGTGGAAAAA	TGACATGGTA	GAACAGATGC	ATGAGGATAT	AATCAGTTTA	TGGGATCAAA
6601	GCCTAAAGCC	ATGTGTAAAA	TTAACCCAC	TCTGTGTTAG	TTTAAAGTGC	ACTGATTTGA
6661	AGAATGATAC	TAATACCAAT	AGTAGTAGCG	GGAGAATGAT	AATGGAGAAA	GGAGAGATAA
6721	AAAACCTGCTC	TTTCAATATC	AGCACAAGCA	TAAGAGGTAA	GGTGCAGAAA	GAATATGCAT
6781	TTTTTTATAA	ACTTGATATA	ATACCAATAG	ATAATGATAC	TACCAGCTAT	ACGTTGACAA
6841	GTTGTAACAC	CTCAGTCATT	ACACAGGCCT	GTCCAAAGGT	ATCCTTTGAG	CCAATTCCCA

6901	TACATTATTG	TGCCCCGGCT	GGTTTTGCGA	TTCTAAAATG	TAATAATAAG	ACGTTCAATG
6961	GAACAGGACC	ATGTACAAAT	GTCAGCACAG	TACAATGTAC	ACATGGAATT	AGGCCAGTAG
7021	TATCAACTCA	ACTGCTGTTA	AATGGCAGTC	TGGCAGAAGA	AGAGGTAGTA	ATTAGATCTG
7081	CCAATTTTAC	AGACAATGCT	AAAACCATAA	TAGTACAGCT	GAACCAATCT	GTAAGAAATTA
7141	ATTGTACAAG	ACCCAACAAC	AATACAAGAA	AAAGTATCCG	TATCCAGAGA	GGACCAGGGA
7201	GAGCATTTGT	TACAATAGGA	AAAATAGGAA	ATATGAGACA	AGCACATTGT	AACATTAGTA
7261	GAGCAAAATG	GAATAACACT	TTAAAACAGA	TAGATAGCAA	ATTAAGAGAA	CAATTTGGAA
7321	ATAATAAAAC	AATAATCTTT	AAGCAGTCCT	CAGGAGGGGA	CCCAGAAATT	GTAACGCACA
7381	GTTTTAATTG	TGGAGGGGAA	TTTTTCTACT	GTAATTCAAC	ACAACTGTTT	AATAGTACTT
7441	GGTTTAATAG	TACTTGGAGT	ACTAAAGGGT	CAAATAACAC	TGAAGGAAGT	GACACAATCA
7501	CCCTCCCATG	CAGAATAAAA	CAAATTATAA	ACATGTGGCA	GGAAGTAGGA	AAAGCAATGT
7561	ATGCCCCTCC	CATCAGTGGA	CAAATTAGAT	GTTTCATCAA	TATTACAGGG	CTGCTATTAA
7621	CAAGAGATGG	TGGTAATAGC	AACAATGAGT	CCGAGATCTT	CAGACCTGGA	GGAGGAGATA
7681	TGAGGGACAA	TTGGAGAAGT	GAATTATATA	AATATAAAGT	AGTAAAAATT	GAACCATTAG
7741	GAGTAGCACC	CACCAAGGCA	AAGAGAAGAG	TGGTGCAGAG	AGAAAAAAGA	GCAGTGGGAA
7801	TAGGAGCTTT	GTCCTTGGG	TTCTTGGGAG	CAGCAGGAAG	CACTATGGGC	GCAGCGTCAA
7861	TGACGCTGAC	GGTACAGGCC	AGACAATTAT	TGTCTGGTAT	AGTGCAGCAG	CAGAACAATT
7921	TGCTGAGGGC	TATTGAGGCG	CAACAGCATC	TGTTGCAACT	CACAGTCTGG	GGCATCAAGC
7981	AGCTCCAGGC	AAGAATCCTG	GCTGTGGAAA	GATACCTAAA	GGATCAACAG	CTCCTGGGGA
8041	TTTGGGGTTG	CTCTGGAAAA	CTCATTTGCA	CCACTGCTGT	GCCTTGGAAT	GCTAGTTGGA
8101	GTAATAAATC	TCTGGAACAG	ATTTGGAATA	ACATGACCTG	GATGGAGTGG	GACAGAGAAA
8161	TTAACAATTA	CACAAGCTTA	ATACACTCCT	TAATTGAAGA	ATCGCAAAAC	CAGCAAGAAA
8221	AGAATGAACA	AGAATTATTG	GAATTAGATA	AATGGGCAAG	TTTGTGGAAT	TGGTTTAACA
8281	TAACAAATTG	GCTGTGGTAT	ATAAAATTAT	TCATAATGAT	AGTAGGAGGC	TTGGTAGGTT
8341	TAAGAATAGT	TTTTGCTGTA	CTTTCTGTAG	TGAATAGAGT	TAGGCAGGGA	TATTCACCAT
8401	TATCGTTTCA	GACCCACCTC	CCAATCCCGA	GGGGACCCGA	CAGGCCCGAA	GGAATAGAAG
8461	AAGAAGGTGG	AGAGAGAGAC	AGAGACAGAT	CCATTTCGATT	AGTGAACGGA	TCCTTAGCAC
8521	TTATCTGGGA	CGATCTGCGG	AGCCTGTGCC	TCTTCAGCTA	CCACCGCTTG	AGAGACTTAC
8581	TCTTGATTGT	AACGAGGATT	GTGGAAC TTC	TGGGACGCAG	GGGGTGGGAA	GCCCTCAAAT
8641	ATTGGTGGA	TCTCCTACAG	TATTGGAGTC	AGGAGCTAAA	GAATAGTGCT	GTTAGCTTGC
8701	TCAATGCCAC	AGCTATAGCA	GTAGCTGAGG	GGACAGATAG	GGTTATAGAA	GTAGTACAAG
8761	GAGCTTATAG	AGCTATTTCG	CACATACCTA	GAAGAATAAG	ACAGGGCTTG	GAAAGGATTT
8821	TGCTATAAGA	TGGGTGGCAA	GTGGTCAAAA	AGTAGTGTGG	TTGGATGGCC	TGCTGTAAGG
8881	GAAAGAATGA	GACGAGCTGA	GCCAGCAGCA	GATGGGGTGG	GAGCAGCATC	TCGAGACCTG
8941	GAAAAACATG	GAGCAATCAC	AAGTAGCAAT	ACAGCAGCTA	CCAATGCTGC	TTGTGCCTGG
9001	CTAGAAGCAC	AAGAGGAGGA	GGAGGTGGGT	TTTCCAGTCA	CACCTCAGGT	ACCTTTAAGA
9061	CCAATGACTT	ACAAGGCAGC	TGTAGATCTT	AGCCACTTTT	TAAAAGAAAA	GGGGGGACTG
9121	GAAGGGCTAA	TTCACTCCCA	AAGAAGACAA	GATATCCTTG	ATCTGTGGAT	CTACCACACA
9181	CAAGGCTACT	TCCCTGATTA	GCAGAACTAC	ACACCAGGGC	CAGGGGTCAG	ATATCCACTG
9241	ACCTTTGGAT	GGTGCTACAA	GCTAGTACCA	GTTGAGCCAG	ATAAGATAGA	AGAGGCCAAT
9301	AAAGGAGAGA	ACACCAGCTT	GTTACACCTT	GTGAGCCTGC	ATGGGATGGA	TGACCCGGAG
9361	AGAGAAGTGT	TAGAGTGGAG	GTTTGACAGC	CGCCTAGCAT	TTCATCACGT	GGCCCCGAGAG
9421	CTGCATCCGG	AGTACTTCAA	GAAGTCTGTA	CATCGAGCTT	GCTACAAGGG	ACTTTCCGCT
9481	GGGGACTTTC	CAGGGAGGCG	TGGCCTGGGC	GGGACTGGGG	AGTGGCGAGC	CCTCAGATCC
9541	TGCATATAAG	CAGCTGCTTT	TTGCCTGTAC	TGGGTCTCTC	TGGTTAGACC	AGATCTGAGC
9601	CTGGGAGCTC	TCTGGCTAAC	TAGGGAACCC	ACTGCTTAAG	CCTCAATAAA	GCTTGCCTTG

9661 AGTGCTTCAA GTAGTGTGTG CCCGTCTGTT GTGTGACTCT GGTAAGTAGA GATCCCTCAG
 9721 ACCCTTTTAG TCAGTGTGGA AAATCTCTAG CA

Oligonukleotide zur Sequenzierung von pNL4-3

1 pNLmutp6* (f)

ApaI

CAGGGCCCCCT AGGAAAAAG

2 pNLmutp6*rev (r)

GGTTTCCATC TTCCTGGC

3 nested p6*rev (r)

GTATCATCTG CTCCTGTATCT

Nukleotidsequenz von NL4-3

1 TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCC GAGACGGTCA
 61 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCC TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG
 121 TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC
 181 ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC
 241 ATTCGCCATT CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT
 301 TACGCCAGGG GAGGCAGAGA TTGCAGTAAG CTGAGATCGC AGCACTGCAC TCCAGCCTGG
 361 GCGACAGAGT AAGACTCTGT CTCAAAAATA AAATAAATAA ATCAATCAGA TATTCCAATC
 421 TTTTCCTTTA TTTATTTATT TATTTTCTAT TTTGGAAACA CAGTCCTTCC TTATTCCAGA
 481 ATTACACATA TATTCTATTT TTCTTTATAT GCTCCAGTTT TTTTtagacc TTCACCTGAA
 541 ATGTGTGTAT ACAAATCTA GGCCAGTCCA GCAGAGCCTA AAGGTAAAAA ATAAAAATAAT
 601 AAAAAATAAA TAAAATCTAG CTCACTCCTT CACATCAAAA TGGAGATACA GCTGTTAGCA
 661 TTAAATACCA AATAACCCAT CTTGNCCTCA ATAATTTTAA GCGCCTCTCT CCACCACATC
 721 TAACTCCTGT CAAAGGCATG TGCCCCCTCC GGGCGCTCTG CTGTGCTGCC AACCAACTGG
 781 CATGTGGACT CTGCAGGGTC CCTAACTGCC AAGCCCCACA GTGTGCCCTG AGGCTGCCCC
 841 TTCCTTCTAG CGGCTGCCCC CACTCGGCTT TGCTTTCCCT AGTTTCAGTT ACTTGCGTTC
 901 AGCCAAGGTC TGAAACTAGG TGCGCACAGA GCGGTAAGAC TGCGAGAGAA AGAGACCAGC
 961 TTTACAGGGG GTTTATCACA GTGCACCCTG ACAGTCGTCA GCCTCACAGG GGGTTTATCA
 1021 CATTCACACC TGACAGTCGT CAGCCTCACA GGGGGTTTAT CACAGTGCAC CTTACAATC
 1081 ATTCCATTTG ATTCACAATT TTTTtagtct CTAAGTGCC TAACTTGTA GTTAAATTTG
 1141 ATCAGAGGTG TGTTCACAGA GGGGAAAACA GTATATACAG GGTTCAGTAC TATCGCATTT
 1201 CAGGCCTCCA CCTGGGTCTT GGAATGTGTC CCCCAGGGG TGATGACTAC CTCAGTTGGA
 1261 TCTCCACAGG TCACAGTGAC ACAAGATAAC CAGACACCTC CAAGGCTACA CAATGGGCCG
 1321 CCCTCCACGC GGCCCGTGCA CATGGCCGGA GAACTGCCTG TCGGAGGTGC AAGCACACCT
 1381 GCGCATCAGA GTCCTTGGTG TGGAGGGAGG GACCAGCGCA GCTTCAGCC ATCCACCTGA
 1441 TGAACAGAAC CTAGGGAAAG CCCAGTTCT ACTTACACCA GGAAAGGCTG GAAGGGCTAA
 1501 TTTGGTCCCA AAAAAGACAA GAGATCCTTG ATCTGTGGAT CTACCACACA CAAGGCTACT
 1561 TCCCTGATTG GCAGAACTAC ACACCAGGGC CAGGGATCAG ATATCCACTG ACCTTTGGAT

1621 GGTGCTTCAA GTTAGTACCA GTTGAACCAG AGCAAGTAGA AGAGGCCAAA GAAGGAGAGA
 1681 ACAACAGCTT GTTACACCCT ATGAGCCAGC ATGGGATGGA GGACCCGGAG GGAGAAGTAT
 1741 TAGTGTTGAA GTTTGACAGC CTCCTAGCAT TTCGTCACAT GGCCCCGAGAG CTGCATCCGG
 1801 AGTACTACAA AGACTGCTGA CATCGAGCTT TCTACAAGGG ACTTTCCGCT GGGGACTTTC
 1861 CAGGGAGGTG TGGCCTGGGC GGGACTGGGG AGTGGCGAGC CCTCAGATGC TACATATAAG
 1921 CAGCTGCTTT TTGCCTGTAC TGGGTCTCTC TGGTTAGACC AGATCTGAGC CTGGGAGCTC
 1981 TCTGGCTAAC TAGGGAACCC ACTGCTTAAG CCTCAATAAA GCTTGCCTTG AGTGCTCAAA
 2041 GTAGTGTGTG CCCGTCTGTT GTGTGACTCT GGTAAGTAGA GATCCCTCAG ACCCTTTTAG
 2101 TCAGTGTGGA AAATCTCTAG CAGTGGCGCC CGAACAGGGA CTTGAAAGCG AAAGTAAAGC
 2161 CAGAGGAGAT CTCTCGACGC AGGACTCGGC TTGCTGAAGC GCGCACGGCA AGAGGCGAGG
 2221 GGCGGCGACT GGTGAGTACG CCAAAAATTT TGAAGTAGCG AGGCTAGAAG GAGAGAGATG
 2281 GGTGCGAGAG CGTCGGTATT AAGCGGGGGA GAATTAGATA AATGGGAAAA AATTTCGGTTA
 2341 AGGCCAGGGG GAAAGAAACA ATATAAACTA AAACATATAG TATGGGCAAG CAGGGAGCTA
 2401 GAACGATTCT CAGTTAATCC TGGCCTTTTA GAGACATCAG AAGGCTGTAG ACAAATACTG
 2461 GGACAGCTAC AACCATCCCT TCAGACAGGA TCAGAAGAAC TTAGATCATT ATATAATACA
 2521 ATAGCAGTCC TCTATTGTGT GCATCAAAGG ATAGATGTAA AAGACACCAA GGAAGCCTTA
 2581 GATAAGATAG AGGAAGAGCA AAACAAAAGT AAGAAAAAGG CACAGCAAGC AGCAGCTGAC
 2641 ACAGGAAACA ACAGCCAGGT CAGCCAAAAT TACCCTATAG TGCAGAACCT CCAGGGGCAA
 2701 ATGGTACATC AGGCCATATC ACCTAGAACT TTAAATGCAT GGGTAAAAGT AGTAGAAGAG
 2761 AAGGCTTTCA GCCCAGAAGT AATACCCATG TTTTCAGCAT TATCAGAAGG AGCCACCCCA
 2821 CAAGATTTAA ATACCATGCT AAACACAGTG GGGGGACATC AAGCAGCCAT GCAAATGTTA
 2881 AAAGAGACCA TCAATGAGGA AGCTGCAGAA TGGGATAGAT TGCATCCAGT GCATGCAGGG
 2941 CCTATTGCAC CAGGCCAGAT GAGAGAACCA AGGGGAAGTG ACATAGCAGG AACTACTAGT
 3001 ACCCTTCAGG AACAAATAGG ATGGATGACA CATAATCCAC CTATCCCAGT AGGAGAAATC
 3061 TATAAAAGAT GGATAATCCT GGGATTAAAT AAAATAGTAA GAATGTATAG CCCTACCAGC
 3121 ATTCTGGACA TAAGACAAGG ACCAAAGGAA CCCTTTAGAG ACTATGTAGA CCGATTCTAT
 3181 AAAACTCTAA GAGCCGAGCA AGCTTCACAA GAGGTAAAAA ATTGGATGAC AGAAACCTTG
 3241 TTGGTCCAAA ATGCGAACCC AGATTGTAAG ACTATTTTAA AAGCATTGGG ACCAGGAGCG
 3301 AACTAGAAAG AAATGATGAC AGCATGTCAG GGAGTGGGGG GACCCGGCCA TAAAGCAAGA
 3361 GTTTTGGCTG AAGCAATGAG CCAAGTAACA AATCCAGCTA CCATAATGAT ACAGAAAGGC
 3421 AATTTTAGGA ACCAAAGAAA GACTGTTAAG TGTTTCAATT GTGGCAAAGA AGGGCACATA
 3481 GCCAAAATTT GCAGGGCCCC TAGGAAAAAG GGCTGTTGGA AATGTGGAAA GGAAGGACAC
 3541 CAAATGAAAG ATTGTACTGA GAGACAGGCT AATTTTTTAA GGAAGATCTG GCCTTCCAC
 3601 AAGGGAAGGC CAGGGAATTT TCTTCAGAGC AGACCAGAGC CAACAGCCCC ACCAGAAGAG
 3661 AGCTTCAGGT TTGGGGAAGA GACAACAACCT CCCTCTCAGA AGCAGGAGCC GATAGACAAG
 3721 GAAGTGTATC CTTTAGCTTC CCTCAGATCA CTCTTTGGCA GCGACCCCTC GTCACAATAA
 3781 AGATAGGGGG GCAATTAAAG GAAGCTCTAT TAGATACAGG AGCAGATGAT ACAGTATTAG
 3841 AAGAAATGAA TTTGCCAGGA AGATGGAAAC CAAAAATGAT AGGGGGAATT GGAGGTTTTA
 3901 TCAAAGTAAG ACAGTATGAT CAGATACTCA TAGAAATCTG CGGACATAAA GCTATAGGTA
 3961 CAGTATTAGT AGGACCTACA CCTGTCAACA TAATTGGAAG AAATCTGTTG ACTCAGATTG
 4021 GCTGCACTTT AAATTTTCCC ATTAGTCCTA TTGAGACTGT ACCAGTAAAA TTAAAGCCAG
 4081 GAATGGATGG CCCAAAAGTT AAACAATGGC CATTGACAGA AGAAAAATAA AAAGCATTAG
 4141 TAGAAATTTG TACAGAAATG GAAAAGGAAG GAAAAATTTT AAAAAATTGG CCTGAAAATC
 4201 CATACAATAC TCCAGTATTT GCCATAAAGA AAAAGACAG TACTAAATGG AGAAAATTAG
 4261 TAGATTTTCT AGAACTTAAT AAGAGAACTC AAGATTTCTG GGAAGTTCAA TTAGGAATAC
 4321 CACATCCTGC AGGGTTAAAA CAGAAAAAAT CAGTAACAGT ACTGGATGTG GGCGATGCAT

Gag-Start-
Kodon

4381	ATTTTTCAGT	TCCCTTAGAT	AAAGACTTCA	GGAAGTATAC	TGCATTTACC	ATACCTAGTA
4441	TAAACAATGA	GACACCAGGG	ATTAGATATC	AGTACAATGT	GCTTCCACAG	GGATGGAAAG
4501	GATCACCAGC	AATATTCCAG	TGTAGCATGA	CAAAAATCTT	AGAGCCTTTT	AGAAAACAAA
4561	ATCCAGACAT	AGTCATCTAT	CAATACATGG	ATGATTTGTA	TGTAGGATCT	GACTTAGAAA
4621	TAGGGCAGCA	TAGAACAAAA	ATAGAGGAAC	TGAGACAACA	TCTGTTGAGG	TGGGGATTTA
4681	CCACACCAGA	CAAAAACAT	CAGAAAGAAC	CTCCATTCCCT	TTGGATGGGT	TATGAACTCC
4741	ATCCTGATAA	ATGGACAGTA	CAGCCTATAG	TGCTGCCAGA	AAAGGACAGC	TGGACTGTCA
4801	ATGACATACA	GAAATTAGTG	GGAAAATTGA	ATTGGGCAAG	TCAGATTTAT	GCAGGGATTA
4861	AAGTAAGGCA	ATTATGTAAA	CTTCTTAGGG	GAACCAAAGC	ACTAACAGAA	GTAGTACCAC
4921	TAACAGAAGA	AGCAGAGCTA	GAACTGGCAG	AAAACAGGGA	GATTCTAAAA	GAACCGGTAC
4981	ATGGAGTGTA	TTATGACCCA	TCAAAAGACT	TAATAGCAGA	AATACAGAAG	CAGGGGCAAG
5041	GCCAATGGAC	ATATCAAATT	TATCAAGAGC	CATTTAAAAA	TCTGAAAACA	GGAAAATATG
5101	CAAGAATGAA	GGGTGCCCAC	ACTAATGATG	TGAAACAATT	AACAGAGGCA	GTACAAAAAA
5161	TAGCCACAGA	AAGCATAGTA	ATATGGGGAA	AGACTCCTAA	ATTTAAATTA	CCCATACAAA
5221	AGGAAACATG	GGAAGCATGG	TGGACAGAGT	ATTGGCAAGC	CACCTGGATT	CCTGAGTGGG
5281	AGTTTGTCAA	TACCCCTCCC	TTAGTGAAGT	TATGGTACCA	GTTAGAGAAA	GAACCCATAA
5341	TAGGAGCAGA	AACTTTCTAT	GTAGATGGGG	CAGCCAATAG	GGAAACTAAA	TTAGGAAAAG
5401	CAGGATATGT	AACTGACAGA	GGAAGACAAA	AAGTTGTCCC	CCTAACGGAC	ACAACAAATC
5461	AGAAGACTGA	GTTACAAGCA	ATTCATCTAG	CTTTGCAGGA	TTCGGGATTA	GAAGTAAACA
5521	TAGTGACAGA	CTCACAATAT	GCATTGGGAA	TCATTCAAGC	ACAACCAGAT	AAGAGTGAAT
5581	CAGAGTTAGT	CAGTCAAATA	ATAGAGCAGT	TAATAAAAAA	GGAAAAAGTC	TACCTGGCAT
5641	GGGTACCAGC	ACACAAAGGA	ATTGGAGGAA	ATGAACAAGT	AGATGGGTTG	GTCAGTGCTG
5701	GAATCAGGAA	AGTACTATTT	TTAGATGGAA	TAGATAAGGC	CCAAGAAGAA	CATGAGAAAT
5761	ATCACAGTAA	TTGGAGAGCA	ATGGCTAGTG	ATTTTAACCT	ACCACCTGTA	GTAGCAAAAG
5821	AAATAGTAGC	CAGCTGTGAT	AAATGTCAGC	TAAAAGGGGA	AGCCATGCAT	GGACAAGTAG
5881	ACTGTAGCCC	AGGAATATGG	CAGCTAGATT	GTACACATTT	AGAAGGAAAA	GTTATCTTGG
5941	TAGCAGTTCA	TGTAGCCAGT	GGATATATAG	AAGCAGAAGT	AATTCCAGCA	GAGACAGGGC
6001	AAGAAACAGC	ATACTTCCTC	TTAAAATTAG	CAGGAAGATG	GCCAGTAAAA	ACAGTACATA
6061	CAGACAATGG	CAGCAATTTT	ACCAGTACTA	CAGTTAAGGC	CGCCTGTTGG	TGGGCGGGGA
6121	TCAAGCAGGA	ATTTGGCATT	CCCTACAATC	CCCAAAGTCA	AGGAGTAATA	GAATCTATGA
6181	ATAAAGAATT	AAAGAAAATT	ATAGGACAGG	TAAGAGATCA	GGCTGAACAT	CTTAAGACAG
6241	CAGTACAAAT	GGCAGTATTC	ATCCACAATT	TTAAAAGAAA	AGGGGGGATT	GGGGGGTACA
6301	GTGCAGGGGA	AAGAATAGTA	GACATAATAG	CAACAGACAT	ACAAACTAAA	GAATTACAAA
6361	AACAAATTAC	AAAAATTCAA	AATTTTCGGG	TTTATTACAG	GGACAGCAGA	GATCCAGTTT
6421	GGAAAGGACC	AGCAAAGCTC	CTCTGGAAAG	GTGAAGGGGC	AGTAGTAATA	CAAGATAATA
6481	GTGACATAAA	AGTAGTGCCA	AGAAGAAAAG	CAAAGATCAT	CAGGGATTAT	GGAAAACAGA
6541	TGGCAGGTGA	TGATTGTGTG	GCAAGTAGAC	AGGATGAGGA	TTAACACATG	GAAAAGATTA
6601	GTAAAAACACC	ATATGTATAT	TTCAAGGAAA	GCTAAGGACT	GGTTTTATAG	ACATCACTAT
6661	GAAAGTACTA	ATCCAAAAAT	AAGTTCAGAA	GTACACATCC	CACTAGGGGA	TGCTAAATTA
6721	GTAATAACAA	CATATTGGGG	TCTGCATACA	GGAGAAAGAG	ACTGGCATT	GGGTACAGGA
6781	GTCTCCATAG	AATGGAGGAA	AAAGAGATAT	AGCACACAAG	TAGACCCTGA	CCTAGCAGAC
6841	CAACTAATTC	ATCTGCACTA	TTTTGATTGT	TTTTCAGAAT	CTGCTATAAG	AAATACCATA
6901	TTAGGACGTA	TAGTTAGTCC	TAGGTGTGAA	TATCAAGCAG	GACATAACAA	GGTAGGATCT
6961	CTACAGTACT	TGGCACTAGC	AGCATTAATA	AAACCAAAAC	AGATAAAGCC	ACCTTTGCCT
7021	AGTGTTAGGA	AACTGACAGA	GGACAGATGG	AACAAGCCCC	AGAAGACCAA	GGGCCACAGA
7081	GGGAGCCATA	CAATGAATGG	ACACTAGAGC	TTT TAGAGGA	ACTTAAGAGT	GAAGCTGTTA

7141	GACATTTTCC	TAGGATATGG	CTCCATAACT	TAGGACAACA	TATCTATGAA	ACTTACGGGG
7201	ATACTTGGGC	AGGAGTGGA	GCCATAATAA	GAATTCTGCA	ACAACTGCTG	TTTATCCATT
7261	TCAGAATTGG	GTGTCGACAT	AGCAGAATAG	GCGTTACTCG	ACAGAGGAGA	GCAAGAAATG
7321	GAGCCAGTAG	ATCCTAGACT	AGAGCCCTGG	AAGCATCCAG	GAAGTCAGCC	TAAAACTGCT
7381	TGTACCAATT	GCTATTGTAA	AAAGTGTTGC	TTTCATTGCC	AAGTTTGT'TT	CATGACAAAA
7441	GCCTTAGGCA	TCTCCTATGG	CAGGAAGAAG	CGGAGACAGC	GACGAAGAGC	TCATCAGAAC
7501	AGTCAGACTC	ATCAAGCTTC	TCTATCAAAG	CAGTAAGTAG	TACATGTAAT	GCAACCTATA
7561	ATAGTAGCAA	TAGTAGCATT	AGTAGTAGCA	ATAATAATAG	CAATAGTTGT	GTGGTCCATA
7621	GTAATCATAG	AATATAGGAA	AATATTAAGA	CAAAGAAAAA	TAGACAGGTT	AATTGATAGA
7681	CTAATAGAAA	GAGCAGAAGA	CAGTGGAAT	GAGAGTGAAG	GAGAAGTATC	AGCACTTGTG
7741	GAGATGGGGG	TGGAAATGGG	GCACCATGCT	CCTTGGGATA	TTGATGATCT	GTAGTGCTAC
7801	AGAAAAATTG	TGGGTCACAG	TCTATTATGG	GGTACCTGTG	TGGAAGGAAG	CAACCACCAC
7861	TCTATTTTGT	GCATCAGATG	CTAAAGCATA	TGATACAGAG	GTACATAATG	TTTGGGCCAC
7921	ACATGCCTGT	GTACCCACAG	ACCCCAACCC	ACAAGAAGTA	GTATTGGTAA	ATGTGACAGA
7981	AAATTTTAAC	ATGTGGAAAA	ATGACATGGT	AGAACAGATG	CATGAGGATA	TAATCAGTTT
8041	ATGGGATCAA	AGCCTAAAGC	CATGTGTAAA	ATTAACCCCA	CTCTGTGT'TA	GTTTAAAGTG
8101	CACTGATTTG	AAGAATGATA	CTAATACCAA	TAGTAGTAGC	GGGAGAATGA	TAATGGAGAA
8161	AGGAGAGATA	AAAAACTGCT	CTTTCAATAT	CAGCACAAGC	ATAAGAGATA	AGGTGCAGAA
8221	AGAATATGCA	TTCTTTTATA	AACTTGATAT	AGTACCAATA	GATAATACCA	GCTATAGGTT
8281	GATAAGTTGT	AACACCTCAG	TCATTACACA	GGCCTGTCCA	AAGGTATCCT	TTGAGCCAAT
8341	TCCCATACAT	TATTGTGCCC	CGGCTGGTTT	TGCGATTCTA	AAATGTAATA	ATAAGACGTT
8401	CAATGGAACA	GGACCATGTA	CAAATGTCAG	CACAGTACAA	TGTACACATG	GAATCAGGCC
8461	AGTAGTATCA	ACTCAACTGC	TGTTAAATGG	CAGTCTAGCA	GAAGAAGATG	TAGTAATTAG
8521	ATCTGCCAAT	TTACACAGACA	ATGCTAAAAC	CATAATAGTA	CAGCTGAACA	CATCTGTAGA
8581	AATTAATTGT	ACAAGACCCA	ACAACAATAC	AAGAAAAAGT	ATCCGTATCC	AGAGGGGACC
8641	AGGGAGAGCA	TTTGTTACAA	TAGGAAAAAT	AGGAAATATG	AGACAAGCAC	ATTGTAACAT
8701	TAGTAGAGCA	AAATGGAATG	CCACTTTAAA	ACAGATAGCT	AGCAAATTAA	GAGAACAATT
8761	TGGAAATAAT	AAAACAATAA	TCTTTAAGCA	ATCCTCAGGA	GGGGACCCAG	AAATTGTAAC
8821	GCACAGTTTT	AATTGTGGAG	GGGAATTTTT	CTACTGTAAT	TCAACACAAC	TGTTTAATAG
8881	TACTTGGTTT	AATAGTACTT	GGAGTACTGA	AGGGTCAAAT	AACACTGAAG	GAAGTGACAC
8941	AATCACACTC	CCATGCAGAA	TAAAACAATT	TATAAACATG	TGGCAGGAAG	TAGGAAAAGC
9001	AATGTATGCC	CCTCCCATCA	GTGGACAAAT	TAGATGTTCA	TCAAATATTA	CTGGGCTGCT
9061	ATTAACAAGA	GATGGTGGTA	ATAACAACAA	TGGGTCCGAG	ATCTTCAGAC	CTGGAGGAGG
9121	CGATATGAGG	GACAATTGGA	GAAGTGAATT	ATATAAATAT	AAAGTAGTAA	AAATTGAACC
9181	ATTAGGAGTA	GCACCCACCA	AGGCAAAGAG	AAGAGTGGTG	CAGAGAGAAA	AAAGAGCAGT
9241	GGGAATAGGA	GCTTTGTTCC	TTGGGTCTCT	GGGAGCAGCA	GGAAGCACTA	TGGGCTGCAC
9301	GTCAATGACG	CTGACGGTAC	AGGCCAGACA	ATTATTGTCT	GATATAGTGC	AGCAGCAGAA
9361	CAATTTGCTG	AGGGCTATTG	AGGCGCAACA	GCATCTGTTG	CAACTCACAG	TCTGGGGCAT
9421	CAAACAGCTC	CAGGCAAGAA	TCCTGGCTGT	GGAAAGATAC	CTAAAGGATC	AACAGCTCCT
9481	GGGGATTTGG	GGTTGCTCTG	GAAAACCTCAT	TTGCACCACT	GCTGTGCCTT	GGAATGCTAG
9541	TTGGAGTAAT	AAATCTCTGG	AACAGATTTG	GAATAACATG	ACCTGGATGG	AGTGGGACAG
9601	AGAAATTAAC	AATTACACAA	GCTTAATACA	CTCCTTAATT	GAAGAATCGC	AAAACCAGCA
9661	AGAAAAGAAT	GAACAAGAAT	TATTGGAATT	AGATAAATGG	GCAAGTTTGT	GGAATTGGTT
9721	TAACATAACA	AATTGGCTGT	GGTATATAAA	ATTATTTCATA	ATGATAGTAG	GAGGCTTGGT
9781	AGGTTTAAGA	ATAGTTTTTG	CTGTACTTTC	TATAGTGAAT	AGAGTTAGGC	AGGGATATTC
9841	ACCATTATCG	TTTCAGACCC	ACCTCCCAAT	CCCAGGGGA	CCCGACAGGC	CCGAAGGAAT

9901 AGAAGAAGAA GGTGGAGAGA GAGACAGAGA CAGATCCATT CGATTAGTGA ACGGATCCTT
 9961 AGCACTTATC TGGGACGATC TGGGAGCCCT GTGCCTCTTC AGCTACCACC GCTTGAGAGA
 10021 CTTACTCTTG ATTGTAACGA GGATTGTGGA ACTTCTGGGA CGCAGGGGGT GGAAGCCCT
 10081 CAAATATTGG TGGAATCTCC TACAGTATTG GAGTCAGGAA CTAAAGAATA GTGCTGTAA
 10141 CTTGCTCAAT GCCACAGCCA TAGCAGTAGC TGAGGGGACA GATAGGGTTA TAGAAGTATT
 10201 ACAAGCAGCT TATAGAGCTA TTCGCCACAT ACCTAGAAGA ATAAGACAGG GCTTGGAAAG
 10261 GATTTTGCTA TAAGATGGGT GGCAAGTGGT CAAAAAGTAG TGTGATTGGA TGGCCTGCTG
 10321 TAAGGGAAAG AATGAGACGA GCTGAGCCAG CAGCAGATGG GGTGGGAGCA GTATCTCGAG
 10381 ACCTAGAAAA ACATGGAGCA ATCACAAGTA GCAATACAGC AGCTAACAAAT GCTGCTTGTG
 10441 CCTGGCTAGA AGCACAAGAG GAGGAAGAGG TGGGTTTTCC AGTCAGGCCCT CAGGTACCTT
 10501 TAAGACCAAT GACTTACAAG GCAGCTGTAG ATCTTAGCCA CTTTTTAAAA GAAAAGGGGG
 10561 GACTGGAAGG GCTAATTCAC TCCCAAAGAA GACAAGATAT CCTTGATCTG TGGATCTACC
 10621 ACACACAAGG CTACTTCCCT GATTGGCAGA ACTACACACC AGGGCCAGGG GTCAGATATC
 10681 CACTGACCTT TGGATGGTGC TACAAGCTAG TACCAGTTGA GCCAGATAAG GTAGAAGAGG
 10741 CCAATAAAGG AGAGAACACC AGCTTGTTAC ACCCTGTGAG CCTGCATGGA ATGGATGACC
 10801 CTGAGAGAGA AGTGTTAGAG TGGAGGTTTG ACAGCCGCCT AGCATTTCAT CACGTGGCCC
 10861 GAGAGCTGCA TCCGGAGTAC TTCAAGAACT GCTGACATCG AGCTTGCTAC AAGGGACTTT
 10921 CCGCTGGGGA CTTTCCAGGG AGGCGTGGCC TGGGCGGGAC TGGGGAGTGG CGAGCCCTCA
 10981 GATGCTGCAT ATAAGCAGCT GCTTTTTGCC TGTACTGGGT CTCTCTGGTT AGACCAGATC
 11041 TGAGCCTGGG AGCTCTCTGG CTAAGTAGGG AACCCACTGC TTAAGCCTCA ATAAAGCTTG
 11101 CCTTGAGTGC TTCAAGTAGT GTGTGCCCGT CTGTTGTGTG ACTCTGGTAA CTAGAGATCC
 11161 CTCAGACCCCT TTAGTTCAGT GTGGAAAATC TCTAGCACCC AGGAGGTAGA GGTTCAGTGT
 11221 AGCCAAGATC GCGCCACTGC ATTCCAGCCT GGGCAAGAAA ACAAGACTGT CTAAAATAAT
 11281 AATAATAAGT TAAGGGTATT AAATATATTT ATACATGGAG GTCATAAAAA TATATATATT
 11341 TGGGCTGGGC GCAGTGGCTC ACACCTGCGC CCGGCCCTTT GGGAGGCCGA GGCAGGTGGA
 11401 TCACCTGAGT TTGGGAGTTC CAGACCAGCC TGACCAACAT GGAGAAACCC CTCTCTGTGT
 11461 TATTTTTAGT AGATTTTATT TTATGTGTAT TTTATTACA GGTATTTCTG GAAAACGTAA
 11521 ACTGTTTTTC CTCTACTCTG ATACCACAAG AATCATCAGC ACAGAGGAAG ACTTCTGTGA
 11581 TCAAAATGTG TGGGAGAGGG AGGTTTTTAC CAGCACATGA GCAGTCAGTT CTGCCGAGA
 11641 CTCGGCGGGT GTCCTTCGGT TCAGTTCCAA CACCGCCTGC CTGGAGAGAG GTCAGACCAC
 11701 AGGGTGAGGG CTCAGTCCCC AAGACATAAA CACCCAAGAC ATAAACACCC AACAGGTCCA
 11761 CCCCGCCTGC TGCCAGGCA GAGCCGATTC ACCAAGACGG GAATTAGGAT AGAGAAAGAG
 11821 TAAGTCACAC AGAGCCGGCT GTGCGGGAGA ACGGAGTTCT ATTATGACTC AAATCAGTCT
 11881 CCCCAAGCAT TCGGGGATCA GAGTTTTTAA GGATAACTTA GTGTGTAGGG GGCCAGTGAG
 11941 TTGGAGATGA AAGCGTAGGG AGTCGAAGGT GTCCTTTTGC GCCGAGTCAG TTCCTGGGTG
 12001 GGGGCCACAA GATCGGATGA GCCAGTTTAT CAATCCGGGG GTGCCAGCTG ATCCATGGAG
 12061 TGCAGGGTCT GCAAAATATC TCAAGCACTG ATTGATCTTA GGTTTTACAA TAGTGATGTT
 12121 ACCCCAGGAA CAATTTGGGG AAGGTCAGAA TCTTGTAGCC TGTAGCTGCA TGACTCCTAA
 12181 ACCATAATTT CTTTTTTGTT TTTTTTTTTT TATTTTTGAG ACAGGGTCTC ACTCTGTCAC
 12241 CTAGGCTGGA GTGCAGTGGT GCAATCACAG CTCAGTGCAG CCTCAACGTC GTAAGCTCAA
 12301 GCGATCCTCC CACCTCAGCC TGCCTGGTAG CTGAGACTAC AAGCGACGCC CCAGTTAATT
 12361 TTTGTATTTT TGGTAGAGGC AGCGTTTTGC CGTGTGGCCC TGGCTGGTCT CGAACTCCTG
 12421 GGCTCAAGTG ATCCGCCTCA GCCTCCCAAA GTGCTGGGAC AACCAGGGGC AGTCACTGCA
 12481 CCTGGCCCTA AACCATTAATT TCTATCTTTT GGCTAATTTG TTAGTCCTAC AAAGGCAGTC
 12541 TAGTCCCCAG GCAAAAAGGG GGTTTGTTC GGGAAAGGGC TGTTACTGTC TTGTTTCAAA
 12601 CTATAAACTA AGTTCCTCCT AAAGTTAGTT CGGCCTACAC CCAGGAATGA ACAAGGAGAG

Nef-Start-
Kodon

```

12661 CTTGGAGGTT AGAAGCACGA TGAATTGGT TAGGTCAGAT CTCTTTCACT GTCTGAGTTA
12721 TAATTTTGCA ATGGTGGTTC AAAGACTGCC CGCTTCTGAC ACCAGTCGCT GCATTAAGAA
12781 TCGGCCAACG CGCGGGGAGA GCGGGTTTGC GTATTGGGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA
12841 CTGACTCGCT GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG
12901 TAATACGGTT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAAGGCC
12961 AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC
13021 CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC
13081 TATAAAGATA CCAGGCGTTT CCCCTTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC
13141 TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT
13201 GCTCAGCTG TAGGTATCTC AGTTCCGTGT AGGTCGTTTC CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC
13261 ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA
13321 ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG
13381 CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA
13441 GAAGGACAGT ATTTGGTATC TGCCTCTGCG TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG
13501 GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC
13561 AGCAGATTAC GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT
13621 CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCAATGAGA TTATCAAAAA
13681 GGATCTTCAC CTAGATCCTT TAAATTAATA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT
13741 ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA
13801 TCTGTCTATT TCGTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC
13861 GGGAGGGGCTT ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACC GG
13921 CTCCAGATTT ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG
13981 CAACTTTATC CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT
14041 CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG GTGTCACGCT
14101 CGTCGTTTGG TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT
14161 CCCCCATGTT GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAGTA
14221 AGTTGGCCGC AGTGTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT CTTACTGTCA
14281 TGCCATCCGT AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT
14341 AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC
14401 ATAGCAGAAC TTTAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTT TTCGGGGCGA AACTCTCAA
14461 GGATCTTACC GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT
14521 CAGCATCTTT TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG
14581 CAAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTTCAAT
14641 ATTATTGAAG CATTTATCAG GGTATTGTG TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT
14701 AGAAAAATAA ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA CCTGACGTCT
14761 AAGAAACCAT TATTATCATG ACATTAACCT ATAAAAATAG GCGTATCACG AGGCCCTTTC
14821 GTCG

```

Nukleotidsequenz von NL4-3R71 Δnef: Nef-Bereich

```

10261 GATTTTGCTA TAAGATGGGT GGCAAGTGGT CAAAAAGTAG TGTGATTGGA TGGCCTGCTG
10321 TAAGGGAAAG AATGAGACGA GCTGAGCCAG CAGCAGATGG GGTGGGAGCA GTATCTCGAT
10381 CGAGACCTAG AAAAAATAG AGCAATCACA AGTAGCAATA CAGCAGCTAA CAATGCTGCT

```

Nef-Start-
Kodon

Vorträge

Andreas Leiherer, Christine Ludwig and Ralf Wagner

Novel role for HIV-1 transframe protein p6* in viral replication

Deutsch-Österreichischer-AIDS-Kongress (DÖAK), 27-30. 6. 2007, Frankfurt

Andreas Leiherer, Christine Ludwig and Ralf Wagner

HIV-1 transframe protein p6*, a spacer protein dispensable for viral in vitro replication

18th Annual Meeting Society of Virology (GfV), 5-8. 3. 2008, Heidelberg

Publikationen

Ludwig, C.; Leiherer, A. and Wagner, R. (2008)

Importance of protease cleavage sites within and flanking HIV-1 transframe protein p6* for spatiotemporal regulation of protease activation. J. Virol 82 (9) 4573-84

Leiherer, A.; Ludwig, C. and Wagner, R. (2008)

The HIV-1 transframe protein p6* is a spacer protein of limited length which is dispensable for viral replication and infectivity in vitro. J. Virol. (in Vorbereitung)

Leiherer, A.; Ludwig, C. and Wagner, R. (2008)

Role of HIV-1 transframe protein p6* in viral replication. J. Virol. (in Vorbereitung)

Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen sowie für die interessante Promotionsthematik und die Finanzierung. Darüber hinaus möchte ich mich auch ganz herzlich für seine fachlich kompetente Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre, in der diese Diskussionen stattfanden, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. John C. Guatelli möchte ich mich recht herzlich für die Bereitstellung der CEM-Zelllinie und bei Herrn Prof. Dr. Hermann Katinger und Frau Gabriela Stiegler für die regelmäßigen und kostenlosen Lieferungen von Antikörpern und Reagenzien bedanken.

Ein ganz besonders lieber Dank gilt Frau Dr. Christine Ludwig, die mich bei allen auftretenden Schwierigkeiten tatkräftig unterstützte und deren Tipps und Anregungen meine Arbeit positiv beeinflusst haben.

Ferner bedanke ich mich bei all meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Wagner für Ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für die oft sehr persönliche Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Familie und meinen Freunden, die immer an mich geglaubt haben und vor allem meiner Freundin Claudia, die mich immer in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.