

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. Ulrich Hadding

**FUNKTION UND ZELLULÄRER TRANSPORT DES HIV-1
GLYKOPROTEINS**

HABILITATIONSSCHRIFT

der Hohen Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Dr. med. Ortwin Adams
aus Oberhausen

2001

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	7
1.1	Historie der humanen Retroviren	7
1.2	Virusgenom und viruskodierte Proteine	9
1.3	Aufbau des reifen Viruspartikels	11
1.4	Replikationszyklus des HIV	12
1.5	Das HIV-Glykoprotein	15
1.5.1	Struktur des Glykoproteins	15
1.5.2	Prozessierung des Glykoproteins in der Zelle	19
1.5.3	Die durch das Glykoprotein vermittelte Membranfusion	21
1.5.4	HIV-Membranfusion als therapeutisches Angriffsziel	24
1.6	Rezeptoren und Korezeptoren auf der Zielzelle	24
1.6.1	Der CD4-Rezeptor	24
1.6.2	Chemokin-Bindungsstellen als Korezeptoren	25
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	26
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Isolierung von HIV in der Zellkultur	27
2.1.1	Periphere Blutlymphozyten (PBL)-Kulturen	28
2.1.2	Makrophagenkulturen	28
2.1.3	Korezeptoranalyse	29
2.2	Rekombinante DNA-Techniken	31
2.2.1	DNA-Extraktion aus Eukaryonten	31
2.2.2	PCR-Amplifikation und Klonierung in Prokaryonten	31
2.2.3	Plasmid-DNA-Isolierung und Reinigung	32
2.2.4	Transfektion von Plasmid-DNA in Eukaryonten	32
2.3	Transfektion in Eukaryonten mittels Mikroinjektion	33
2.4	Rekombinante Vektoren	33
2.4.1	Env-exprimierende Vektoren	33
2.4.2	Nef-exprimierende Vektoren	38
2.4.3	MA-exprimierender Vektor unter RRE-Kontrolle	39

2.5	Proteinnachweise	40
2.5.1	Syncytien-Assay	40
2.5.2	Radioimmunpräzipitation	42
2.5.3	Immunoblot	44
2.5.4	Protein-capture-ELISA	44
2.5.5	Aufreinigen von extrazellulären Mikrovessikeln	45
2.6	Real-time-PCR	46
2.6.1	Prinzip der Real-time TaqMan™ PCR	46
2.6.2	HgH-TaqMan-PCR	48
2.6.3	Rev-mRNA-Nachweis mittels PCR	51
2.6.4	Env-mRNA-Nachweis mittels PCR	52
3	RESULTATE	53
3.1	Fusionskapazität von Wildisolaten	53
3.2	Korezeptorenanalyse	54
3.3	Einfluß von Variationen im V3-loop	55
3.4	Einfluß von Variationen im gp41-N-Terminus	57
3.4.1	Sequenzanalyse der rekombinanten Isolate	57
3.4.2	Fusionskapazität der rekombinanten Plasmide nach Transfektion	59
3.4.3	Glykoproteinexpression der rekombinanten Klone	60
3.4.4	Gp160/gp120 capture ELISA	61
3.4.5	Durch Punktmutationen verursachte Veränderungen des N-Terminus	62
3.4.6	Hydrophobizitätsberechnungen des gp41-N-Terminus	65
3.5	Deletionen im gp41-N-Terminus und Beeinflussung der Spaltbarkeit	66
3.6	Terminale Glykosilierung des HIV-Glykoproteins	70
3.7	Transport von Glykoprotein mittels Mikrovessikel	71
3.8	Glykosidase und Protease-Resistenz der Mikrovessikel	74
3.9	Deletionen im HIV-gp41-C-Terminus	78
3.9.1	Proteinexpression und Fusionsaktivität	78
3.9.2	Env-mRNA-Nachweis	80
3.9.3	Mikrovessikeltransport	81
3.9.4	Spaltbarkeit des Glykoproteins	82
3.10	Einfluß von MA-Protein auf die Bildung von Mikrovessikeln	82

3.11	Mikrovesikel-Nachweis als Werkzeug für die Kontrolle des Protein-transports	83
3.11.1	HIV-gp120-Deletionsmutanten	84
3.11.2	Nachweis von extrazellulärem HIV-Nef und MA	85
4	DISKUSSION	87
4.1	Methodischer Ansatz	87
4.2	Heterogenität von Wildisolaten	88
4.2.1	Zelltropismus	88
4.2.2	Variationen im Bereich um die Spaltstelle gp120/gp41	89
4.2.3	Variabilitäten in der V3-Region	93
4.3	Gezielte Mutagenese in der Region um die Spaltstelle gp120/gp41	94
4.3.1	Deletionen im gp41 N-Terminus	94
4.3.2	Proteinexport mittels Mikrovesikel	96
4.3.3	Glycosidaseresistenz der Mikrovesikel	100
4.3.4	Interaktion des HIV-Env mit MA-Proteinen	103
4.4	HIV-gp41-C-Terminus-Deletionen	104
4.5	Weitere in Mikrovesikel inkorporierte HIV-Proteine	105
4.6	Rolle extrazellulärer HIV-Proteine für die Pathogenese der HIV-Infektion und Impfstoffentwicklung	108
5	ZUSAMMENFASSUNG	111
6	LITERATUR	113
7	DANKSAGUNG:	144

Liste der verwendeten Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp	Ampicillin
AZT	Azidothymidin, Zidovudin
BSA	Rinderserum-Albumin
CA	Kapsid-Protein
CPE	cytopathischer Effekt
ddH ₂ O	deionisiertes und destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure x Na ₂ -Salz
EIAV	equine infectious anemia virus
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
Env	retrovirales Glykoprotein (envelope)
<i>env</i>	Gen für retrovirales Glykoprotein (<i>envelope</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
gp	Glykoprotein
HA	Influenza Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
hGH	humanes Wachstumshormon
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ 1
HRPO	horse-radish-peroxidase
HTLV-1	Humanes T-Zell-Leukämievirus
IL-2	Interleukin-2
LB-Medium	Luria Broth Base Medium
LTR	long terminal repeat
MA	HIV-Matrix-Protein (p17)
MHC	major histocompatibility complex
MLV	Murines Leukämie Virus
mRNA	messenger RNA
M-trope Isolate	Makrophagen-trope Isolate
NC	Nukleokapsid-Protein
NSI	nicht-Syncytien-induzierend
OPD	o-Phenylendiamin
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
pA	Polyadenylierungssignal

PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	$-\log [H^+]$
PHA-P	Phytohämagglutinin-P
POD	Peroxidase
Rev	HIV-1 Protein rev (regulator of virion protein expression)
<i>rev</i>	Gen für das HIV-1 Protein Rev
RIPA	Radioimmunopräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonucleoprotein
RRE	Rev responsive element
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl-sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SI	Syncytien-induzierend
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SU	Oberflächen (surface) - Domäne von Retroviren
SV40	Simian Virus 40
SV40e	SV40 _{early} Promotor
Tab.	Tabelle
TAR	tat-bindende Region des HIV
TBE	Tris-Borat mit EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TM	transmembrane Domäne von Retroviren
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T-trope Isolate	T-Zell-trope Isolate
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
V3-loop	dritte hochvariable Domäne im HIV-1 Env
vgl.	vergleiche
w/v	weight per volume

1 Einleitung

1.1 Historie der humanen Retroviren

Die Suche nach Retroviren als Ursache für Tumoren und andere Erkrankungen in der Humanmedizin zeigte erstmals 1977 erfolgversprechende Fortschritte: Grundlage waren klinische und epidemiologische Beobachtungen auf einigen japanischen Inseln, wo eine erhöhte Inzidenz von ansonsten seltenen Formen der adulten T-Zell-Leukämie festgestellt worden war (340). Dem vorangegangen war als technischer Fortschritt die *in vitro* Langzeitkultivierung von humanen T-Lymphocyten (243, 284) unter Verwendung von T-cell-growth factor, später bekannt geworden als Interleukin-2 (IL-2). Kulturen leukämischer T-Zellen von Patienten mit T-Zell-Leukämie brachten einige Jahre später die Entdeckung des ersten humanen Retrovirus, des Humanen T-Zell-Leukämievirus (HTLV-1) hervor (378, 379). Wenn auch dieses Virus epidemiologisch gesehen insgesamt eine untergeordnete Rolle spielt, so war damit jedoch der Prototyp eines komplexen Retrovirus gefunden, der bis heute Gegenstand von Forschungen bezüglich der Genregulation von Retroviren ist.

Der Entdeckung des epidemiologisch weitaus bedeutenderen Humanen Immundefizienz Virus (HIV) gingen ebenfalls klinische Beobachtungen voraus: Im Juni 1981 erfolgten erste Berichte im Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) und New England Journal Medicine (147) über eine Häufung der ansonsten seltenen *Pneumocystis carinii* Pneumonie bei zuvor gesunden jungen Männern in Los Angeles. Bis Ende 1982 wurden in den USA über 800 Fälle in mehr als 30 Staaten beschrieben. 1983 gelang der Arbeitsgruppe um L. Montagnier am Pariser Pasteur Institut die erste Isolierung eines bis dahin unbekannten Retrovirus (21). Bei den Anzüchtungen des Virus aus menschlichen Blutzellen kamen die oben genannten Erfahrungen mit Lymphocyten-Kulturen und dem HTLV zugute, wozu die Arbeitsgruppe um R. Gallo in USA wichtige Vorarbeiten geleistet hatte. Das Virus erhielt in den nachfolgenden Jahren verschiedene Bezeichnungen, bevor es 1986 vom International Committee on taxonomy of viruses in "Human Immunodeficiency Virus (HIV)" umbenannt wurde. 1986 erfolgte aus Patienten in West-Afrika die Isolierung eines Virus (71), das sich auf Genomebene um mehr als 50 % vom bis dahin bekannten HIV unterschied (157), woraufhin die Einteilung in HIV-1 und HIV-2 erfolgte, die später nach der Entdeckung einer lokalen Variante des Virus in Kamerun um die Bezeichnung HIV-O ("outlier") (155, 344) ergänzt wurde. Mit der Isolierung des Virus ging schnell die Etablierung von Testen für den Nachweis von spezifischen Antikörpern einher. In vielen Ländern wurde bald der Ausschluß von HIV-Antikörpern bei Blutprodukten

(Blutkonserven, Plasmapräparaten) gesetzlich vorgeschrieben - in der BRD im Oktober 1985 -, so daß die Inzidenz von HIV-Infektionen zumindest in einer Risikogruppe, nämlich den Empfängern von Blutprodukten (251), beinahe auf Null gesenkt werden konnte.

Die Entdeckung des HTLV und noch vielmehr des HIV als human-pathogene Viren hat der Beschäftigung mit Retroviren insgesamt einen erheblichen Aufschwung gegeben. Dabei sei jedoch darauf hingewiesen, daß die Geschichte der Retrovirologie bereits Anfang des 20. Jahrhunderts mit ersten Beschreibungen von P. Rous am Rockefeller Institut in New York beginnt. Er zeigte die zellfreie Übertragung von Sarkom-Erkrankungen in Hühnern (283), womit erstmals das Prinzip eines transmissiblen onkogenen Agens beschrieben wurde. Lentivirale Erkrankungen, zu denen auch die Infektion mit HIV zählt, wurden zur selben Zeit erstmals bei Pferden beschrieben, wofür später als Ursache das equine infectious anemia virus (EIAV) gefunden wurde. Das Konzept für langsame virale Infektionen des zentralen Nervensystems ("slow virus infections") wurde von Sigurdsson 1954 bei Schafen mit der Entdeckung des Visna-Virus entwickelt, eine Infektion, die Analogien in der Pathogenese zur AIDS-Enzephalopathie aufweist. Auch die Entdeckung der bis heute wirksamsten Substanz zur Hemmung des HIV, des Reverse Transkriptase Hemmers Zidovudin (AZT) geht auf die 60-er Jahre zurück. Nachdem es ursprünglich als Anti-Onkogen getestet worden war, zeigte sich später seine Wirkung auf die Reverse Transkriptase des Friend-Leukämie Virus (255).

Unter den vielen Arbeitsbereichen, die sich im Zusammenhang mit der Erforschung des HIV entwickelt haben, spielt die Beschäftigung mit dem HIV-Glykoprotein eine besondere Rolle, da man sich von Kenntnissen über dieses Protein weitere Einblicke in die Pathogenese der HIV-Erkrankung und daraus ableitbare therapeutischen Strategien erhofft. Aus der Erfahrung mit der Entwicklung von Impfstoffen gegen andere Membranviren ist es bekannt, daß die Immunantwort gegen das Glykoprotein einen ganz entscheidenden Anteil zum Erfolg einer Vakzine beiträgt. Dies wird ebenfalls für das HIV-Glykoprotein gelten, wobei vieles über seine Struktur und Funktion bereits von vorangegangenen Forschungen auf dem Gebiet anderer Membranviren abgeleitet worden ist, insbesondere den Paramyxovirus- und Influenzaviren. Kenntnisse über die Struktur und Funktionsweise des am besten charakterisierten viralen Glykoproteins, des Influenza Hämagglutinins (HA) werden immer wieder herangezogen, um unklare Aspekte des experimentell schwerer zugänglichen HIV-Glykoproteins zu erklären.

1.2 Virusgenom und viruskodierte Proteine

Die Genomorganisation des HIV-1 ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

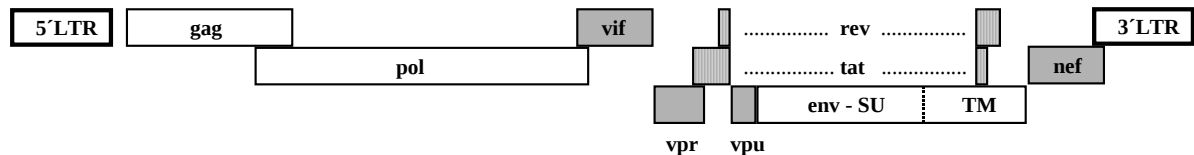


Abb. 1 Schematische Darstellung des HIV-1 Genoms. Die Sequenzbereiche für die regulatorischen Proteine Tat und Rev sind mit Punktmuster dargestellt, die für die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef in grau.

Wie bei allen Retroviren finden sich im HIV-Genom Bereiche, die für die Bildung von Viruspartikeln essentiell sind: der gag-Bereich für ein Kapsid-Vorläuferprotein, das während der Reifung spät im Replikationszyklus durch die viruseigene Protease in die Untereinheiten Matrix (MA)-, Capsid (CA)- sowie Nucleocapsid (NC) prozessiert wird, weiterhin der pol-Bereich, der für die bereits genannte Protease, die Reverse Transkriptase sowie die Integrase kodiert. Als drittes folgt der env-Bereich, der für das virale Glykoprotein kodiert und der weiter unten noch ausführlich beschrieben wird. Flankiert werden alle retroviralen Genome vom long terminal repeat-Bereich (LTR), der vom 5' Ende her als viraler Promotor fungiert und darüberhinaus Bindungsstellen für virale und zelluläre Enhancer besitzt.

Das HIV gehört innerhalb der Gruppe der Retroviren zu der Unterfamilie der Lentiviren (68, 146), die sich durch eine komplexe Regulation ihrer Genexpression auszeichnen. Dazu kodieren sie zusätzlich zu den genannten Proteinen für eine Reihe von akzessorischen und regulatorischen Proteinen. Essentiell für die Virusreplikation des HIV ist zum einem das tat-Protein, das sich an eine am 5'LTR liegende Region mit ausgeprägter Sekundärstruktur (TAR) bindet und damit die Menge an viraler RNA vermehrt (82, 117, 139). Ein weiteres essentielles Protein ist das Rev, das sich an die Rev-bindende Domäne (RRE) der viralen RNA bindet und die Mengen an einfach- und ungespleißten RNAs erhöht, die für die späten Proteine einschließlich der Strukturproteine des Virus kodieren (79, 108). Rev bewirkt darüberhinaus, daß ein effektiver Transport von ungespleißter und einfach gespleißter mRNA vom Zellkern in das Zytoplasma stattfindet (109, 196, 221, 222). Es führt diese Funktion als Multimer aus (328, 387, 388) und ist im Zellkern und im Nukleolus zu finden (80). Die Lokalisation des RRE befindet sich im N-terminalen Bereich der HIV-1 Env-kodierenden Sequenz, was zur Folge hat, daß Mutationen in dieser Region sich auf zwei völlig unterschiedliche Funktionen des Virus, nämlich auf der Ebene der

Genexpression sowie auf Funktionen des Glykoproteins auswirken können. Das RRE bildet eine ausgeprägte Sekundärstruktur (s. Abb. 2) aus, was für eine proteinbindende RNA-Domäne typisch ist.

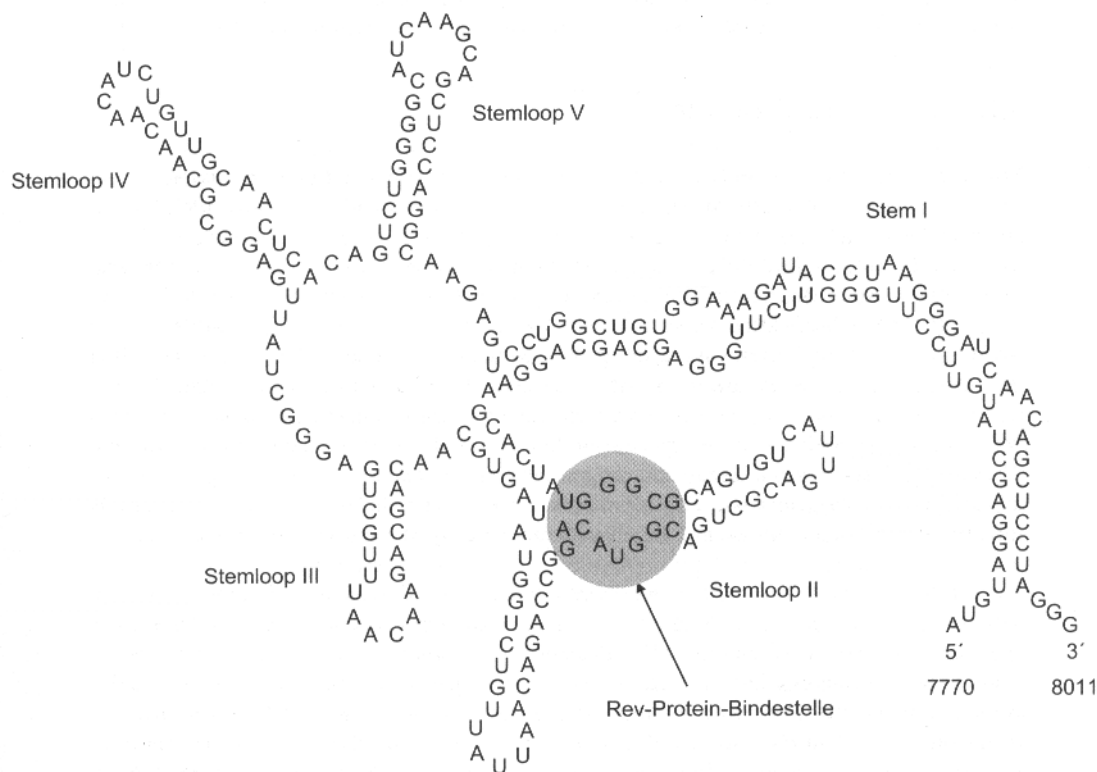


Abb. 2 Sekundärstruktur des HIV-1 Rev-responsive Element (RRE). Das 5' terminale Ende liegt bezogen auf die Envkodierende Sequenz an Aminosäure-Position 4 des HIV-1 gp41-Proteins. Am Stemloop II vermutet man die Bindungsstelle für das HIV-Rev-Protein (aus: Modrow/Falke: Molekulare Virologie, Spektrum Verlag, 1997)

Die Gruppe der akzessorischen Proteine umfasst das Vif, Vpr, Vpu und das Nef. Vif beeinflusst die Infektiosität der freigesetzten Viruspartikel in Abhängigkeit von dem Zelltyp, aus dem sie freigesetzt werden (133, 347) und ist notwendig für die Replikation in primären CD4-Zellen. Vpr ist notwendig für eine effiziente Replikation von HIV in Makrophagen und für die nukleäre Lokalisation neugebildeter viraler Nukleinsäuren (166). Vpu, ein kleines integrales Membranprotein, reguliert in der infizierten Zelle den Level an CD4-Rezeptoren hinunter (298, 367, 368). Die Befunde bezüglich der Bedeutung des Nef sind zahlreich und teilweise widersprüchlich. Es scheint komplexe Effekte auf die Signaltransduktion in der infizierten Zelle auszuüben und führt an der Zelloberfläche zu einer Herunterregulierung des CD4-Rezeptors (138). Darüber hinaus erhöht es die Infektiosität von Viruspartikeln (301) und aktiviert die Reverse Transkriptase (302). Bei Infektionen mit den meisten natürlichen Isolaten findet man in der Zelle das Nef durch das Anhängen einer Myristilinsäure an das N-terminale Glycin in modifizierter Form vor, das damit eine Verankerung an zelluläre Membranen ermöglicht.

1.3 Aufbau des reifen Viruspartikels

Der Aufbau des reifen HIV-Partikels ist in Abb. 3 dargestellt:

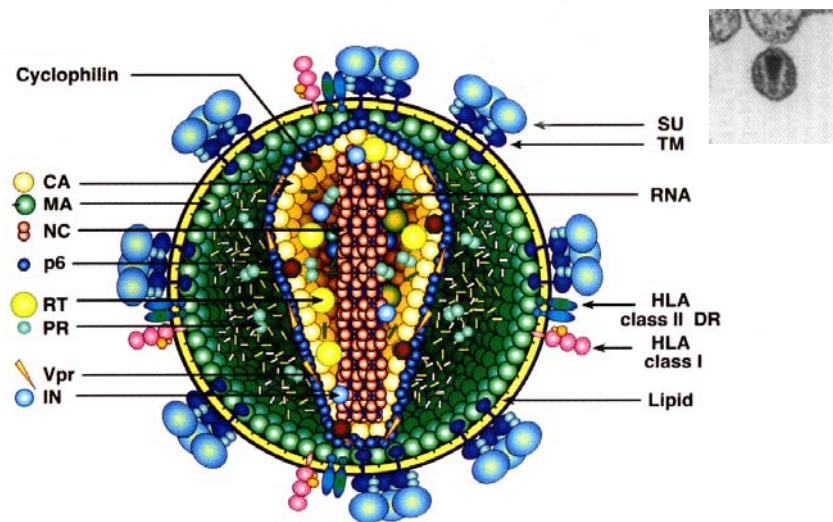


Abb. 3 Schematischer Aufbau des reifen HIV-1 Partikels. Links die im gag-Bereich kodierten Proteine CA, MA, NC, p6 sowie die aus dem pol-Bereich stammenden Proteine RT, PR und IN. Rechts die aus dem Env-Vorläuferprotein hervorgegangenen Surface-(SU) und Transmembrane (TM)-Domänen. Als einziges akzessorisches Protein findet sich das Vpr in relevanten Mengen. Mit in das reife Partikel eingeschlossen sind zelluläre Proteine wie das Cyclophilin im Nukleokapsid sowie HLA Klasse I und II Moleküle in der Virusmembran. Rechts oben ein HIV-Partikel im Elektronenmikroskop (nach Coffin et al., *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Press 1997).

Der Durchmesser eines reifen Viruspartikels beträgt 80-120 nm, seine Dichte ungefähr 1.16 g/ml, dem entsprechen 35 % Sucrose. Dies erschwert die Aufreinigung von Virus in Gradienten, da Membranvesikel von lysierten oder intakten Zellen eine vergleichbare Dichte aufweisen. Lentivirale Partikel zeichnen sich durch ein konisch geformtes Nukleokapsid aus. Die am häufigsten im reifen HIV-Partikel zu findenden Proteine sind die im gag-Bereich kodierten MA, CA und NC-Proteine. Mit ca. 2000 Molekülen pro Viruspartikel stellen sie mehr als 75% der Gesamt-Virusproteinmasse. Diesen Umstand machte man sich schon früh zunutze mit dem Nachweis des HIV-1-p24 Ag im Serum infizierter Patienten, das dem CA entspricht. Da die untere Nachweisgrenze der dabei verwendeten ELISA-Techniken bei mehr als 100.000 Viruspartikeln/ml liegt, ist der Test im Vergleich zu heutigen Virusgenomnachweisen mit Nachweisgrenzen von weniger als 100 Kopien/ml (225) eher von historischer Bedeutung. Produkte des pol-Bereichs stellen in ihrer Gesamtmenge nur ca. 5% im Vergleich zum gag-Proteinen dar. Die spezifische Aktivität der Reverse Transkriptase machte man sich nach ihrer Entdeckung zu Beginn der 70-er Jahre (20, 331) zunutze im Reverse Transkriptase Test, der jedoch in der HIV-Diagnostik keine Bedeutung erfahren hat. In die Virusmembran eingelagert sind in oligomerer Form die beiden Untereinheiten des HIV-Env-Glykoproteins, die SU und die TM-Domäne, die mengenmäßig im Vergleich zu den gag-Proteinen ca. 10% ausmachen.

Von den übrigen HIV-kodierten Proteinen befindet sich in relevanten Mengen im reifen Viruspartikel nur das Vpr, das mengenmäßig an das Gag heranreicht (74). Ferner gab es in den letzten Jahren Berichte, wonach das virale Nef in Mengen zwischen 5-70 Molekülen pro Viruspartikel nachzuweisen ist (202, 262, 354).

Darüberhinaus findet man im reifen Viruspartikel einige zelluläre Proteine. Im Viruskapsid befinden sich an die virale Gag-Domäne CA gebunden in signifikanten Mengen Cyclophilin A-Moleküle (121, 122, 215, 336). Cyclophiline sind hochkonservierte zelluläre Proteine, die in ihrer Funktion als Chaperone für das korrekte Falten neugebildeter Proteine sorgen. Die Tatsache, daß Cyclosporin als Hemmer der Cyclophiline die Replikation des HIV-1 hemmt (41, 277, 280, 377), deutet darauf hin, daß Cyclophilin A nicht als quasi-Kontamination von Viruspartikeln mit zellulären Proteinen anzusehen ist, sondern funktionell aktiv ist. Neben weiteren cytoskeletalen Proteinen ist noch das Ubiquitin mit ca. 100 Partikeln pro Viruspartikel zu finden (272). In der Virusmembran befinden sich Moleküle der MHC I Komplexes in ungefähr gleichen Mengen wie das virale Glykoprotein (17). Aus der Tatsache, daß diese für die Virusreplikation entbehrlich sind, darf nicht geschlossen werden, daß sie für die Pathogenese der HIV-Erkrankung bedeutungslos sind. Bei Immunisierungsversuchen in Affen mit dem Simian Immunodeficiency Virus (SIV) zeigte sich, daß Tiere, die mit SIV, das aus menschlichen Zellkulturen stammte, geimpft worden waren, besser vor einer nachfolgenden Infektion geschützt waren als Tiere mit Impfstoffen aus Affenzellkulturen, was auf das Vorhandensein von menschlichen MHC I - Komplexen zurückgeführt werden konnte (16).

1.4 Replikationszyklus des HIV

Eine Übersicht über den Replikationszyklus gibt Abb. 4: Der Replikationszyklus des HIV-1 und HIV-2 läßt sich in eine frühe und eine späte Phase einteilen. Die frühe Phase beginnt mit der Anbindung des Virus an die Zellrezeptoren, dem folgt die Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran. Damit wird das Nukleokapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle eingebracht.

Im Nukleokapsid vollzieht sich dann mittels der mit in die Zelle gebrachten Reversen Transkriptase die Umschreibung des RNA-Genoms in eine doppelsträngige DNA. Das Nukleokapsid wird anschließend aufgelöst („uncoating“). Der Nukleoproteinkomplex wird in den Zellkern transportiert und dort durch die virale Integrase in die Wirtszell-DNA integriert. Diese Phase der proviralen Existenz schließt die frühe Phase ab und kann bei den verschiedenen Retroviren unterschiedlich lange anhalten, ohne daß die weiteren Schritte in Richtung einer Virusreplikation folgen. Da noch keine Virusproteine gebildet werden, entziehen sich Provirus-enhaltene Zellen der Erkennung durch das Immunsystem.

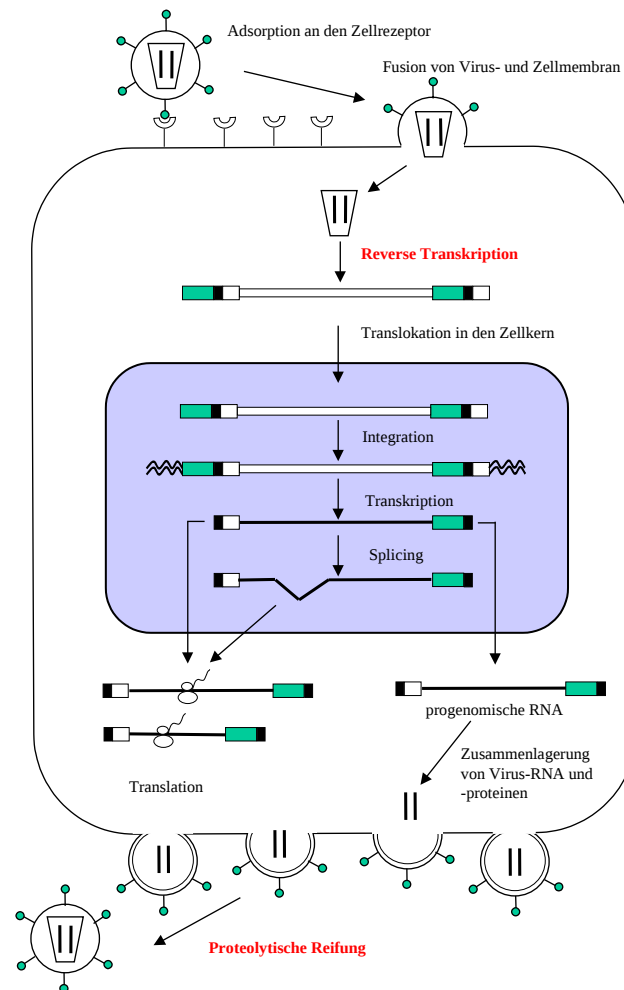


Abb. 4 Replikationszyklus des HIV. Dargestellt in ein kompletter Zyklus, beginnend mit der Adsorption an der Zellmembran (oben) bis zum Ausschleusen kompletter Viruspartikel (unten). In rot hervorgehoben die Schritte der Replikation, die Zielpunkte der antiviralen Chemotherapie sind. (nach Coffin et al., Retroviruses, Cold Spring Harbor Press 1997).

Die späte Phase der Virusreplikation beginnt mit der Transkription und den anschließenden Spleißprozessen der viralen RNA (271). Dabei werden anfangs überwiegend die oben genannten akzessorischen und regulatorischen Virusproteine gebildet. Transkription und Replikation des Virusgenoms erfolgen durch die zelleigene RNA Polymerase II. Neugebildete unreife Kapside sowie das replizierte Genom finden an Bereichen der Wirtszellmembran zusammen („virus assembly“), in die bereits virale Glykoproteine inseriert sind und verlassen die Zelle durch Ausstülpfen aus der Membran („budding“). Während dieses Prozesses sowie im frühen unreifen Viruspartikel bewirkt die virale Protease die proteolytische Spaltung der bis dahin vorhandenen Polyproteine, was in die Bildung neuer infektiöser Viruspartikel mündet.

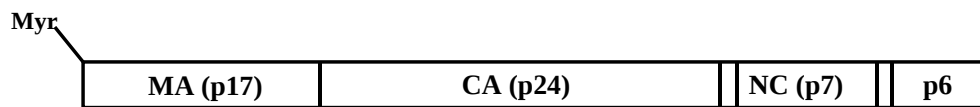


Abb. 5 Proteolytische Spaltung des HIV-1 gag-Vorläuferproteins in die reifen Proteine Matrix-Protein (MA), Kapsid-Protein (CA) , Nukleokapsidprotein (NC) sowie das kleine p6-Protein. Im reifen Viruspartikel findet man das MA-Protein in myristilierter Form am N-terminalen Glycin in die Membran verankert.

Die Organisation des gag-Proteins in die Untereinheiten Matrix-Protein (MA) - manchmal auch als *membran-assoziiertes Protein* interpretiert -, Kapsid-Protein (CA) und Nukleokapsid-Protein (NC) im Vorläuferprotein sowie im reifen Viruspartikel ist in allen Retroviren hoch konserviert (369). Von MA-Proteinen ist gezeigt, daß sie aktiv am Assembly und der Stabilisierung von Viruskapsiden teilnehmen. Wesentlich für diese Funktion ist ihre Membran-bindende Domäne, die beim MA der meisten Retroviren am myristylierten N-Terminus lokalisiert worden ist (54, 185, 313, 345, 389, 390, 391) (s.Abb. 5). Die MA-Struktur des HIV-1 (170) sowie des SIV (275) konnten in der Röntgenstrukturanalyse dargestellt werden. Danach formiert sich das MA-Protein zu einem Trimer, das in seinem Zentrum einen dreieckigen Raum freiläßt, von dem man annimmt, daß sich dort der cytoplasmatische Schwanz des Env-Proteins bindet (s. Abb. 6 und Abb. 7). Die Vorstellung einer Interaktion zwischen dem MA und dem Env-Protein wird unterstützt durch Mutationsanalysen und Deletionen im MA-Protein, die die Env-Inkorporation ins Viruspartikel beeinflussen bzw. in manchen Fällen verhindern können (95, 254, 381, 382). Das Vorhandensein vom gag-Vorläuferprotein pr55 in der infizierten Zelle ist bereits ausreichend, um eine Internalisierung von Env von der Oberfläche infizierter Zellen in den intrazellulären Abbauweg zu vermindern (100). Auf diese Weise kann die Interaktion des Matrix-Proteins mit dem Env dafür sorgen, daß vermehrt Env-Moleküle in Viruspartikel inkorporiert werden können.

Wie bei vielen Viren ist die Bildung neuer Viruspartikel auch bei Retroviren ein ineffektiver Prozeß, d.h. das Verhältnis physikalischer zu infektiösen Partikeln beträgt ca. 100:1. Die neugebildeten Viruspartikel enthalten ein dimeres Genom, dessen Untereinheiten über eine definierte Region nahe dem 5' Ende miteinander verknüpft sind (23).



Abb. 6 Trimere des SIV-MA in der Betrachtung von oben. Im Zentrum bleibt ein Freiraum, in dem sich vermutlich die zytoplasmatische Domäne des Env-Glykoprotein einlagern kann. Aus Conte et al (75)

1.5 Das HIV-Glykoprotein

1.5.1 Struktur des Glykoproteins

Das HIV besitzt wie alle Retroviren nur ein Glykoprotein, das im Wesentlichen zwei Funktionen ausübt: Die Anheftung an einen spezifischen Rezeptor der Wirtszelle sowie die daraufhin folgende Fusion von Virusmembran mit der Membran der Zielzelle. Es ist ein integrales Membranprotein mit einer extrazellulären (SU) Domäne sowie einem Transmembranteil (TM). Abb. 7 zeigt schematisch den Aufbau des HIV-Glykoproteins im Vergleich zu einem Glykoprotein des Murinen Leukämie Virus (MLV), einem Typ C Retrovirus:

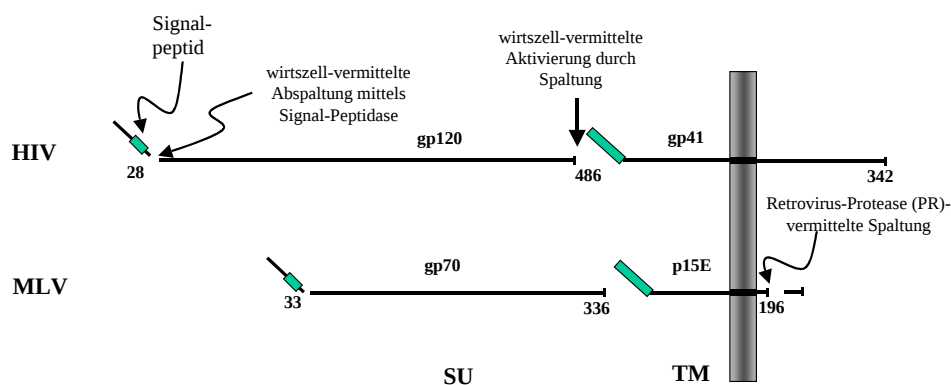


Abb. 7 Schema des HIV-Glykoproteins im Vergleich zu einem Retrovirus Typ C – Glykoprotein (Murines Leukämie Virus, MLV). SU = surface – Region, TM = transmembrane – Region (modifiziert nach Coffin et al., Retroviruses, Cold Spring Harbor Press 1997). Der graue Balken stellt die Membran dar. Es ist zu erkennen, daß das HIV im Gegensatz zum MLV eine erheblich längere cytoplasmatische Domäne hat.

Das HIV-Glykoprotein wird als Vorläuferprotein gp160 synthetisiert, das nachfolgend in die beiden Untereinheiten gp120 (SU) sowie gp41 (TM) gespalten wird (37, 126, 234, 281). Im Gegensatz zu den anderen HIV-Polypeptiden erfolgt die proteolytische Spaltung in die SU- und die TM-Domäne durch zelluläre Proteasen. Eine durch die viruseigene Protease bewirkte Spaltung im intracellulären Bereich des TM-Proteins wie beim MLV (s. Abb. 7) ist beim HIV nicht beschrieben. Wie weiter unten ausführlicher beschrieben (s.1.5.2 und 1.5.3) erscheint das Glykoprotein auf der Membran der infizierten Zelle und damit auch später in der Virusmembran in oligomerer Form. Ungespaltenes Glykoprotein wird nur ineffizient in Viruspartikel inkorporiert (37, 97). Beinahe die Hälfte seines Molekulargewichtes kommt durch die ausgeprägte Glykosylierung zustande (s. auch 4.3.3) mit annähernd 30 Glykosylierungsstellen, wovon mehr als 80% in der gp120-Domäne liegen (208). Diese starke "Verzuckerung" des Proteins hat bis heute die Aufklärung der räumlichen Struktur in der Röntgenstrukturanalyse erheblich erschwert, so daß Vorstellungen über die Lage einzelner Domänen immer noch Modellcharakter haben. Abb. 8 zeigt, wie man sich die Assoziation der Untereinheiten auf der Membran vorstellt:

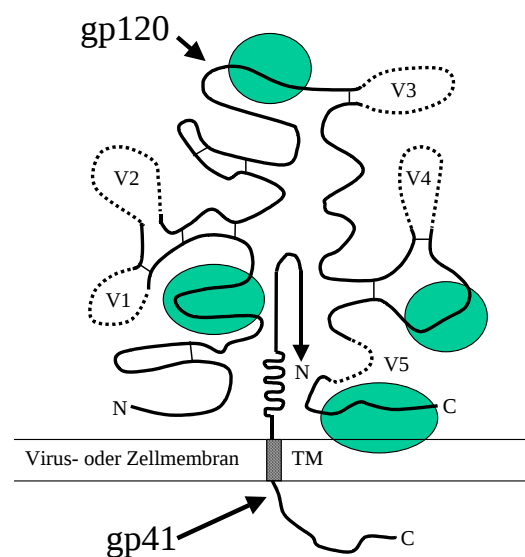


Abb. 8 Modell der räumlichen Struktur des HIV-Glykoproteins. Aus Gründen der Vereinfachung ist der Proteinkomplex nur als Monomer dargestellt. Hypervariable Bereiche sind mit V1-V5 bezeichnet und gestrichelt dargestellt. Die vier oval gekennzeichneten Regionen markieren Interaktionspunkte des Glykoproteins mit dem CD4-Komplex auf der Zielzelle. Die Verbindungslinien an der Basis der Schleifen sind Disulfidbrücken. N = aminoterminal Ende, C = carboxyterminal Ende, TM = Transmembran-Region (nach Fields, Virology, Kapitel 60, Raven Press 1996)

Nach der Spaltung des Glykoproteins in die beiden Untereinheiten sind diese über nicht-kovalente Bindungen miteinander assoziiert (168, 182) wie auch bei einigen anderen Retroviren

beschrieben (46, 47). Bei anderen Retroviren dagegen sind die Untereinheiten in Analogie zu der Erstbeschreibung dieses Mechanismus bei Paramyxoviren (291, 294) in Form von Disulfid-Brücken miteinander verbunden (207, 371). Die beim HIV vorliegende Form der Assoziation führt zu einer relativ labilen Bindung, so daß nach Erscheinen des prozessierten Glykoproteins auf der Zelloberfläche ein spontanes Dissoziieren des SU-Komplexes von der TM-Domäne bei einem Teil der Env-Moleküle beschrieben ist ("Env-shedding") (30). Dieses Phänomen ist verstärkt zu beobachten beim gezielten Einführen von polaren Aminosäuren im N-terminus des TM (37, 124, 125, 126, 127).

Der 550 Aminosäuren lange HIV-gp120 Bereich zeichnet sich durch das Vorhandensein von konservierten Abschnitten und fünf hypervariablen Regionen aus (s.Abb. 8). Die Frequenz der stillen Mutationen im gesamten Env wird auf 17.2×10^{-3} für stille bzw. 14.0×10^{-3} für nicht stille Mutationen geschätzt (210). Die letztere Rate liegt damit mehr als 8-fach über der Mutationsrate im gag-Bereich (210). Die Tertiärstruktur des gp120 wird bestimmt durch neun nach außen gerichtete Schleifen ("loops"), deren Basis jeweils durch das Vorhandensein von Disulfidbrücken ausgebildet wird. Besondere Aufmerksamkeit erfuhr in den vorangegangenen Jahren dabei die dritte variable Region, die als V3-loop in die Literatur eingegangen ist. Sie ist schematisch dargestellt in Abb. 9:

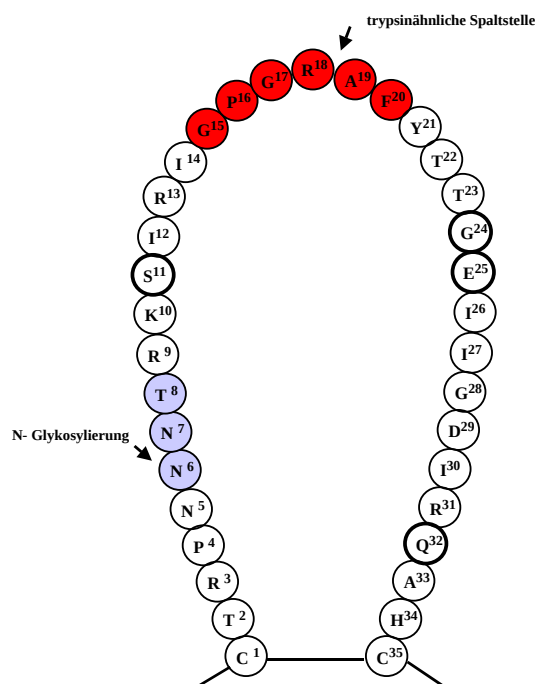


Abb. 9: Schema der dritten variablen Region des HIV-gp120 ("V3-loop"). In Fett gedruckte Kreise kennzeichnen Positionen, an denen syncytien-induzierende (SI)-Isolate meist basische Aminosäuren haben. Weitere Angaben siehe Text (nach Luciw (216))

Der V3-loop wird durch die Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren Cys 301 und Cys 335 ausgebildet. Obwohl er eine hypervariable Region darstellt, ist die Sequenz an der Spitze des loops konserviert mit den vier Aminosäuren Gly Pro Gly Arg (GPGR). Man nimmt für die Spitze eine α -helikale und für die flankierenden Regionen eine β -Faltblattstruktur an (204). Von dem Tetrapeptid GPGR wurde gezeigt, daß es die Hauptneutralisationsdomäne des HIV-1 beinhaltet (149, 261, 285, 297), wobei der neutralisierende Effekt streng typenspezifisch ist. Die Antikörper verhindern nicht die Anbindung des Glykoprotein an den Zellrezeptor, wohl aber unterbinden sie die danach erfolgende Fusion der Membranen. Deletionen im V3-loop führen zum Ausbleiben von Membran-Fusionen (338). In den meisten Isolaten findet sich in Position 6-8 (s. Abb. 9) eine potentielle Glykosilierungsstelle mit der Konsensussequenz N-X-S/T. Studien mit sequentiell gewonnenen Isolaten von Patienten (83) zeigten, daß mit der Krankheitsprogression die Anzahl an basischen Mutationen im V3-loop zunahm; damit korrelierten die Syncytienbildung der Isolate in der Zellkultur und der Wechsel von Makrophagen-tropen (M-tropen) zu den T-Zell-tropen (T-tropen) Eigenschaften des Virus (s. auch unter 1.5.3 und unter 1.6.2). Die T-tropen Isolate weisen dabei typischerweise an den Positionen 11, 24, 25, 32 (s. Abb. 9) basische Aminosäuren auf, während M-trope Isolate vor allem an Position 25 entweder eine saure Aminosäure oder Alanin aufweisen (90, 91, 237, 238, 304, 315). Mit der Hilfe von rekombinanten Vektoren wurde allerdings auch gezeigt, daß der Wechsel des Zelltropismus nicht ausschließlich durch die Einführung von basischen Aminosäuren in den V3-loop, sondern auch durch Regionen 5' und 3' wärts des V3-loops determiniert wird (39, 65, 66). Mit dem Wechsel von M-tropen zu T-tropen Isolaten korreliert zeitlich als Zeichen der Progredienz zum Krankheitsbild AIDS der Verlust an CD4⁺ T-Zellen (19, 63, 199, 296, 334). Ferner zeigte sich, daß die M-tropen Varianten in der Regel diejenigen sind, die vom infizierten Patienten übertragen werden (235, 299, 300, 341, 392), was dafür spricht, daß sich trotz des Vorherrschens von T-tropen Isolaten beim AIDS-Erkrankten immer noch M-trope Varianten im Hintergrund verbergen. Der Wechsel des Phänotyps wirkt sich auf die Neutralisierbarkeit des Isolats durch Antikörper insofern aus, daß die T-tropen Varianten diesbezüglich empfindlicher sind als die M-tropen (38, 63, 325). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Struktur des V3-loop wichtige biologische und immunologische Eigenschaften des Virus determiniert.

Unklar ist die Bedeutung einer trypsinähnlichen Spaltstelle an der konservierten Spitze des V3-loops (s. Abb. 9), an der durch eine membranständige Serin-Protease (TL2) geschnitten werden kann (73, 190, 248). Es ist zu vermuten, daß diese Spaltung eine Konformationsänderung im Glykoprotein nach sich zieht, die für den anschließenden Fusionsprozeß von Wichtigkeit ist.

Einige HIV-1 Isolate sowie HIV-2 und das SIV besitzen diese Spaltstelle nicht, dafür aber eine chymotrypsin-ähnliche Spaltstelle unmittelbar C-terminal. Die chemische Hemmung einer zellulären, membranständigen Protein-Disulfid-Isomerase verhindert die Ausbreitung von Virus in der Zellkultur (286).

1.5.2 Prozessierung des Glykoproteins in der Zelle

Der zeitliche Verlauf vom Eintritt des Env-Translationskomplexes in das Endoplasmatische Retikulum (ER) bis hin zum Erscheinen des Glykoproteins auf der Zelloberfläche ist schematisch in Abb. 10 dargestellt:

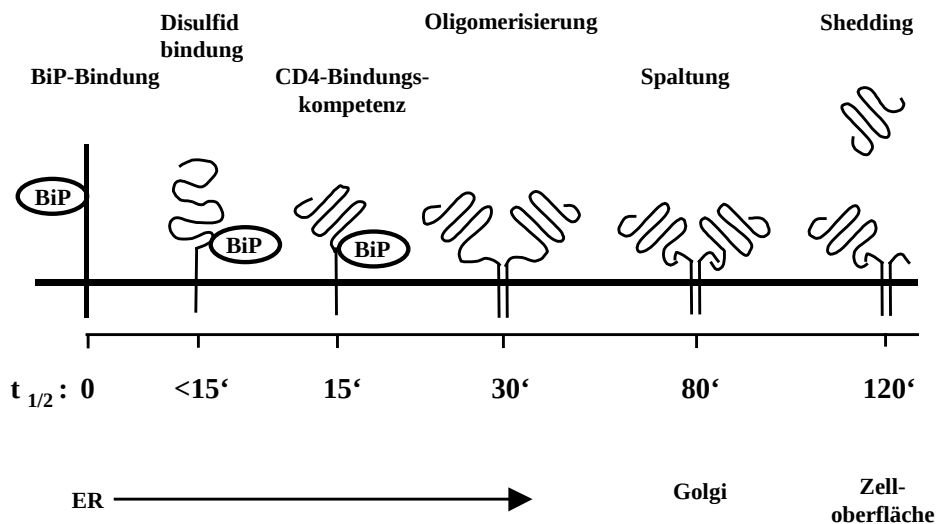


Abb. 10 Biosynthese und Transport des HIV-1 Env-Glykoproteins. Die wesentlichen posttranskriptionalen Ereignisse sind oben genannt. Auf der Zeitskala ist für jeden Schritt die $t_{1/2}$ in Minuten angegeben. Die Daten stammen aus radioaktiv-markierten pulse-chase-Experimenten. Unten die Zuordnung der Ereignisse zu den subzellulären Kompartimenten. BiP= Bindungsprotein. (modifiziert nach (99)).

Das Env wird wie alle zellulären Glykoproteine an membrangebundenen Ribosomen gebildet und tritt als das Vorläuferprotein gp160 kotranslational in einer ungefalteten Form in das ER ein (92, 203). Das unreife gp160 ist bereits hochgradig glykosiliert, sulfatiert und palmitoyliert (25, 99, 114, 376). Die spätere Ektodomäne, die die größte Masse des Proteins sowie sämtliche Glykosylierungsstellen und Disulfidbindungsstellen beinhaltet, faltet sich im Lumen des ER unter Zuhilfenahme der zellulären Chaperone, u.a. des GRP78/BiP (99) und des Calreticulin (259). Bereits im ER erwirbt es die Fähigkeit, CD4-Moleküle - den Hauptrezeptor des HIV - zu binden, d.h. ein Teil des synthetisierten Env dient dazu, in der infizierten Zelle den CD4-Gehalt herunterzuregulieren, wahrscheinlich um zu verhindern, daß Env-Moleküle, die die Zelloberfläche erreicht haben, dort direkt an das zelleigene CD4 binden und somit frühzeitig

aktiviert werden. Ebenfalls im ER erfolgt die Oligomerisierung (258, 268, 290) sowie das Anhängen von mannosereichen Zuckerseitenketten (114, 141, 173, 322). Nur korrekt gefaltete, oligomere Proteine verlassen nach Ablösen der Chaperone in Form von intrazellulären Vesikeln das ER, um sich anschließend im Golgi-Apparat dem "trimming" der Zuckerseitenketten zu unterziehen. Einer der letzten Schritte dabei ist das Anhängen von Neuraminsäureresten ("Sialinsäuren") durch Sialyltransferasen, deren Sitz im Trans-Golgi-Komplex ist (201, 282).

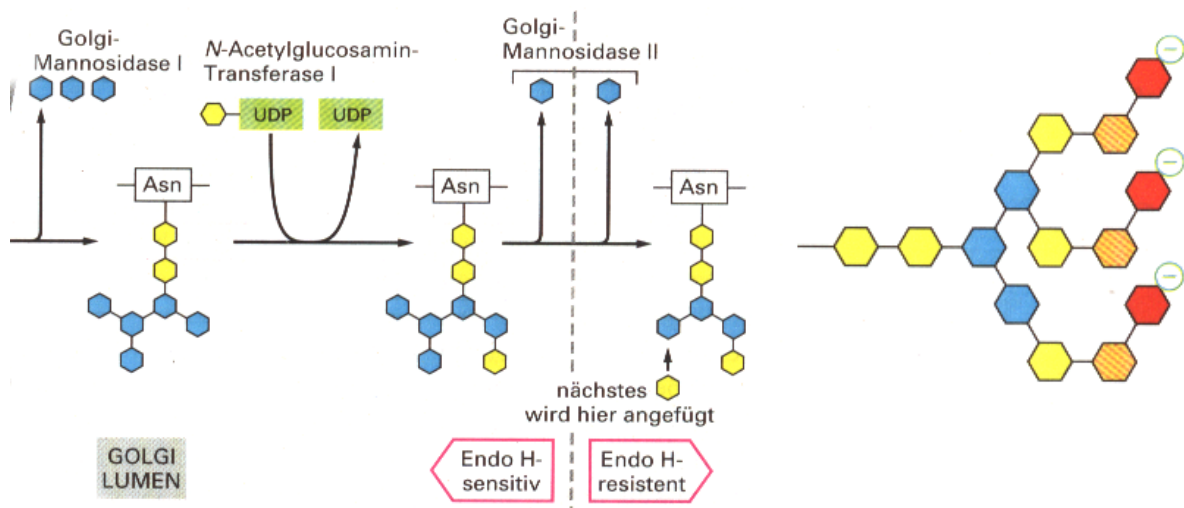


Abb. 11 **Links:** Processing der Oligosaccharide im Golgi-Apparat. Dem im Endoplasmatischen Retikulum noch mannosereichen Oligosaccharid werden nach vorangegangenen trimming-Prozessen an Asparagin-Positionen (Asn) Mannosereste (blau) abgetrennt und im Nachfolgenden N-Acetylglucosaminreste (GlcNAac, gelb) angefügt. Dabei werden die beiden kernständigen GlcNAac-Reste sehr widerstandsfähig gegen die Endoglycosidase H (*Endo H*). Dieses Enzym wird daher häufig benutzt, um komplexe von Mannose-reichen Oligosacchariden zu unterscheiden. **Rechts:** Struktur eines komplexen, reifen Oligosaccharids, wie es im HIV-Glykoprotein gefunden wird. Im trans-Golgi-Bereich werden als letzte trimming-Prozesse Galactose (orange) - sowie die negativ geladenen Neuraminsäurereste (rot) angekoppelt (aus Alberts: Molekularbiologie der Zelle, VCH-Verlag, 3. Auflage).

Ebenfalls im Trans-Golgi-Netzwerk erfolgt die Spaltung in die beiden Untereinheiten SU und TM (322, 366) durch eine zelleigene furinähnliche Protease (85, 159, 160), die an einer trypsinähnlichen Spaltstelle am C-terminus des gp120 mit der konservierten Sequenz Arg Glu Lys Arg (REKR) spezifisch schneidet (37, 154, 346). Unklar ist dabei die Bedeutung einer zweiten putativen Spaltstelle unmittelbar vor dieser Sequenz mit dem Motif Lys Ala Lys Arg (KAKR) (176, 244, 250).

Dieser letzte Schritt ist als ein einheitliches Prinzip bei vielen viralen Glykoproteinen zu finden, erstmals gezeigt bei den Paramyxoviren (292, 293). Dabei finden sich weitgehende Homologien in der oben genannten Spaltstellenregion. Die Spaltung ist Voraussetzung für die Infektiosität des Virus sowohl bei den genannten Paramyxoviren (70, 292, 295) wie auch bei den Influenzaviren (206). Bereits einige Jahre nach der Erstisolierung des HIV wurde dieses Prinzip beim HIV (234) und auch bei anderen Retroviren bestätigt (93, 264). Die Spaltung ist damit ebenfalls notwendige Voraussetzung für das Phänomen der Syncytienbildung in infizierten

Zellkulturen, die durch Membranfusion benachbarter Zellen zustande kommt (323). Erhebliche Unterschiede gibt es zwischen den verschiedenen Membranviren in der Effizienz, mit der synthetisiertes Glykoprotein an seinen Bestimmungsort, die Zelloberfläche gelangt. Während bei den Influenzaviren mehr als 90% dieses Ziel erreichen (42, 76, 140) und bei den Paramyxoviren dieser Wert ähnlich hoch ist (245, 246) gelangen bei den Retroviren und somit auch beim HIV nur ca. 5-15% des synthetisierten Glykoproteins bis zum Ort der Spaltung, dem Trans-Golgi-Komplex (s. Abb. 10 und Abb. 11), während der größte Teil bereits vorher dem lysosomalen Abbau zugeführt wird (92, 99, 365).

1.5.3 Die durch das Glykoprotein vermittelte Membranfusion

Strukturähnlichkeiten zwischen den Membranviren wie in der Beschaffenheit der tryptischen Spaltstelle betreffen auch weitere Bereiche, vor allem in der TM-Region (135, 136). Dabei hat sich in den letzten Jahren ein weitgehend einheitlicher Mechanismus herauskristallisiert, wie virale Proteine es bewerkstelligen, daß zwei Membranen, die sich aufgrund ihrer polaren Lipidschichten prinzipiell abstoßen, so nahe zusammengeführt werden können, daß sie miteinander verschmelzen. Dies ist beim Influenzavirus bisher am besten untersucht worden, was in Abb. 12 modellhaft zu sehen ist:

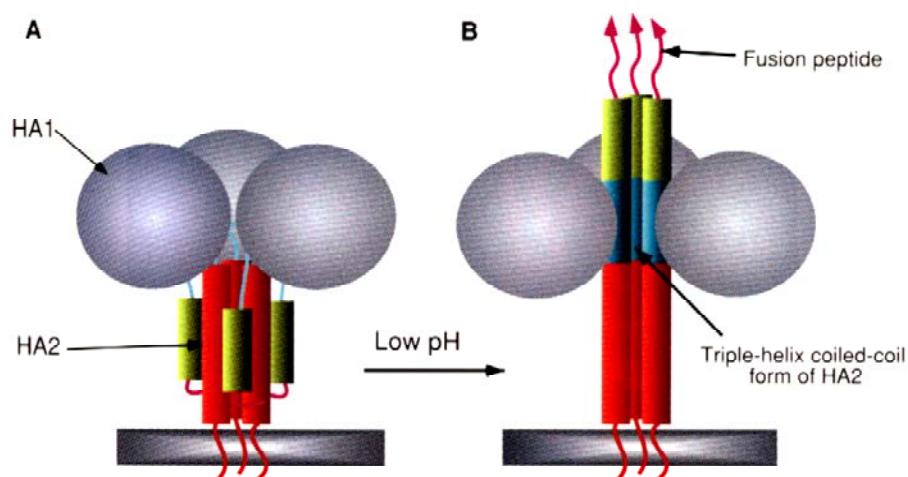


Abb. 12 Modell des trimeren Influenza HA-Proteins verankert in eine Membran im inaktiven Zustand (A) sowie im aktiven Zustand nach Eintritt in die Lysosomen. Funktionell ist dabei das HA1 dem HIV-gp120 sowie das HA2 dem HIV-gp41 vergleichbar (aus Coffin et al., *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Press 1997).

Die dreidimensionale Struktur des Influenza HA ist schon seit den frühen 80-er Jahren weitgehend entschlüsselt (49, 370); es bindet auf der Zielzelle mit hoher Affinität an Neuraminsäurereste. Entscheidend für die anschließende Fusion von Virus- mit Zellmembran

sind zum einen der hydrophobe N-Terminus des HA2 ("fusion peptide") sowie zwei weitere zwischen Fusionspeptid und Transmembranregion liegende α -helikale Regionen. Im Unterschied zu den Retroviren fusioniert das Influenzavirus erst nach Eintritt in die Zelle in den Endosomen. Dieser Vorgang wird durch den dort existierenden sauren pH getriggert. Im inaktiven Zustand (s. Abb. 12A) liegt das HA2 wie eine Haarnadel gekrümmt, vom HA1 regelrecht begraben, auf der Membran. Nach Eintritt in die Lysosomen streckt sich die HA2 – Haarnadel, das hydrophobe Fusionspeptid springt aus dem Proteinkomplex heraus und leitet die Fusion mit der Zielmembran ein ("spring-load-Mechanismus") (49, 56).

Entscheidend für das Nachfolgende ist die Tatsache, daß das Glykoprotein als Trimer vorliegt. Die beiden oben genannten trimeren α -Helices scheren seitlich aus und verdrehen sich miteinander, so daß ein sechsbündeliger α -helikaler Komplex entsteht, der eine stabähnliche Struktur ("rod-like complex") (vgl. Abb. 14) besitzt. De facto tritt damit eine Kürzung des Proteins in seiner Längenausdehnung ein, die die Membranen damit vermutlich so nahe aneinander bringt, daß die Hydratationsbarriere zwischen ihnen überwunden werden kann. Diese Ausbildung eines rod-like-Komplexes ist mittlerweile durch Röntgenstrukturanalysen in ähnlicher Form bei der Fusion von intrazellulären Transportvesikeln mit ihrer Zielmembran auf den Zellorganellen nachgewiesen worden, so daß es sich hierbei um ein übergeordnetes biologisches Prinzip zu handeln scheint (310, 326, 350).

Trotz der unvollständigen dreidimensionalen Strukturaufklärung des HIV-Glykoproteins konnten Untersuchungen der letzten Zeit den oben genannten Mechanismus auch bei der durch das HIV verursachten Membranfusion bestätigen (353, 353, 374). Dabei ist gezeigt worden, daß im Unterschied zu der Situation beim Influenzavirus ein saurer pH für die Initiierung der Fusion nicht vonnöten ist (232, 233, 308, 323). Die für den Fusionsprozeß entscheidenden Strukturen auf dem gp41 sind in Abb. 13 schematisch dargestellt:

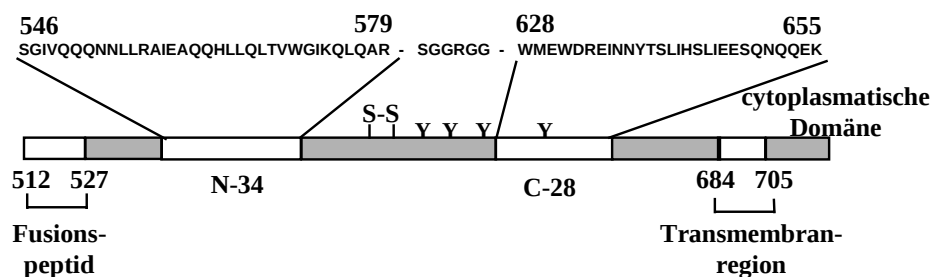


Abb. 13 Struktur des HIV gp41. Links außen der hydrophobe N-terminus (Fusionspeptid), nahe am rechten Ende die Transmembranregion, gefolgt vom cytoplasmatischen Teil. Dazwischen liegend die für den Fusionsprozeß entscheidenden α -helikalen Regionen (Heptad repeat N-34 und C-28) (modifiziert nach Ji et al. (183)).

In Analogie zum Influenzavirus und den oben genannten zellulären Proteinen finden sich dort zwei Regionen (N-34 und C-28), die amphipathische α -Helices ausbilden und sich zu einem sechsbündeligen stabähnlichen Komplex formieren, der gp41-core-Komplex genannt wird und der sich durch eine extreme Thermostabilität auszeichnet (58, 87, 136, 309). Eine funktionell analoge Region ist ebenfalls beim SIV beschrieben worden (31). Wie beim HIV und beim Rous Sarkom Virus gezeigt, sind derartige Regionen für die Oligomerisierung des Glykoproteins mit verantwortlich (98, 102, 102, 103). Dies und eine hohe Proteaseresistenz des Komplexes (31, 213) sprechen für die Auffassung, daß sich die viralen TM-Glykoproteine beim Übergang in diesen Zustand von einer metastabilen Form in eine äußerst stabile, irreversible Form begeben (353). Aufgrund des erhöhten Anteils an Leucinen wurde diese Region anfangs als "Leucin-Zipper-Region" bezeichnet (216). Da Leucin-Zipper-Domänen jedoch im allgemeinen dimere α -helikale Proteindomänen bezeichnen, die man von DNA-bindenden Proteinen kennt, diese Region beim HIV jedoch eine sechsbündelige coiled-coils-Struktur einnimmt, ist dieser Begriff im Zusammenhang mit dem HIV-gp41 nicht mehr gebräuchlich. Das Gesamtszenario, wie die derzeitige Vorstellung über den Fusionsprozeß beim HIV-Glykoprotein aussieht, ist in Abb. 14 dargestellt.

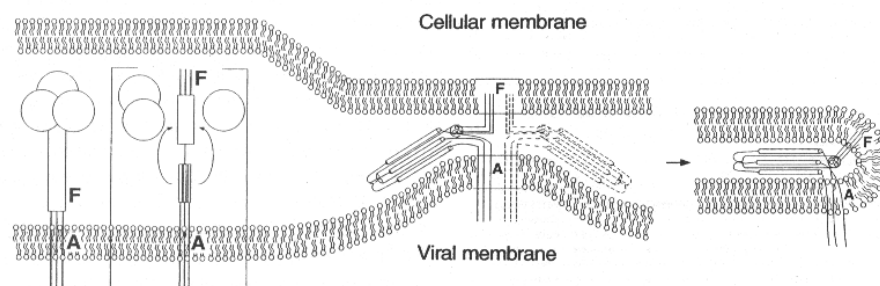


Abb. 14 Modell für die Interaktion der viralen Membran mit Membranen der Zielzelle. Für die Einzelheiten siehe Text. (nach Weissenhorn et al. (352)).

Danach befindet sich im reifen Viruspartikel das gp41 in einer nativen nicht fusogenen Form, bei der es im Glykoproteinkomplex eingegraben ist (s. Abb. 14, links außen). Diese Struktur wird stabilisiert durch Interaktionen mit dem gp120 (symbolisiert durch die drei Kreise). Wenn sich das gp120 an den Zellrezeptor CD4 und die Korezeptoren bindet (s. Abb. 15), findet im gp120 eine Konformationsänderung statt, die die gp41-gp120 Interaktion verändert und damit das gp41 in eine langgestreckte, metastabile Form überführt (s. Abb. 14, Modell in eckigen Klammern), wobei andere reaktive Epitope des gp41 exponiert werden. Mit der Bindung des CD4 an das gp120 wird der V3-loop in räumliche Nähe zu den Korezeptoren der Zielzelle gebracht und die Membranen weiter angenähert (69, 339, 373). Dabei wird das hydrophobe Fusionspeptid in die Zielmembran inseriert, vermutlich penetriert es diese. Die C-terminale α -Helix bleibt dabei noch

unbeteiligt, wahrscheinlich ist sie noch mit gp120-Domänen assoziiert, von denen sie sich nur langsam lösen kann. Der Übergang von diesem metastabilen Zustand in den späteren "rod-like"-Zustand (26, 358) (s.Abb. 14) erfolgt entsprechend langsam und ist durch spezifische Peptide, die an die C-terminale α -Helix binden, hemmbar (131, 184, 247, 359, 361, 362). Wie es anschließend zu der endgültigen Fusion der Membranen kommt, ist noch nicht detailliert geklärt. Mit Hilfe von Video-Mikroskopie und fluoreszierenden Farbstoffen wurde versucht, die Zeit für den gesamten Fusionsprozeß zu bestimmen (247): Danach werden die Konformationsänderungen nach Bindung an den Rezeptor innerhalb von 1-4 min initiiert und sind nach ca. 20 min abgeschlossen.

1.5.4 HIV-Membranfusion als therapeutisches Angriffsziel

In den letzten Jahren zeigte sich, daß Peptide, die analog zu der N-34 oder C-28 Region sind, potentielle Inhibitoren für den HIV-1 Eintritt in die Zelle und die frühen Phasen der Replikation sind (184, 213, 359, 360, 361, 362). Nach dem oben geschilderten geht man davon aus, daß diese Peptide Konformationsänderungen im gp41-Molekül bewirken können. In ersten klinischen Studien mit dem Peptid-Inhibitor T-20 zeigte sich dabei ein signifikanter, dosisabhängiger Effekt auf die meßbare Menge an HIV-RNA im Plasma bei HIV-Infizierten (192). Über die Anwendung bei HIV-Infektionen hinaus könnte sich damit ein interessanter Angriffspunkt für eine Reihe von Membranviren mit analogen funktionellen Regionen wie im HIV-Glykoprotein herausbilden.

1.6 Rezeptoren und Korezeptoren auf der Zielzelle

1.6.1 Der CD4-Rezeptor

Die Suche nach dem HIV-Rezeptor auf der Zielzelle führte bereits 1984 zum Erfolg (81, 197), als der CD4-Komplex als Hauptrezeptor des HIV beschrieben wurde. Dieses 60 kD-Glykoprotein war ursprünglich als Zelloberflächenmarker von T-Helferzellen beschrieben (zusammengefaßt von (327)). Es gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und spielt eine zentrale Rolle bei der immunologischen Erkennung und der T-Zell-Aktivierung (55). Darüberhinaus findet man ihn auf Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen. Der N-terminale Teil besteht aus vier immunglobulinähnlichen Domänen (s.Abb. 15) mit stabähnlicher Struktur von ca. 12,5 nm Länge. Eine hochaffine Bindungsstelle für das virale Oberflächen-Protein gp120 (Env) befindet sich in der Domäne 1 (43).

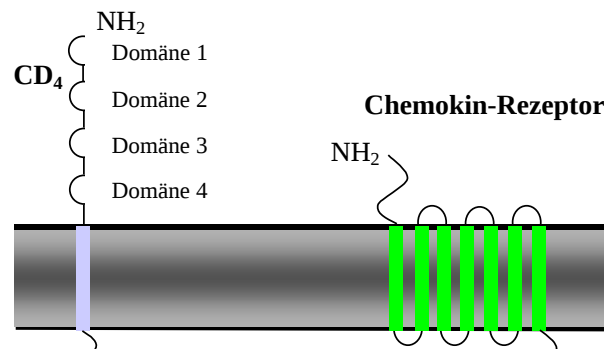


Abb. 15 Schematische Darstellung der Rezeptoren des HIV. Links das CD4 mit vier immunglobulinähnlichen Domänen, rechts der Chemokinrezeptor (CXCR4 oder CCR5) mit sieben zellmembran-durchspannenden Domänen (nach Coffin et al., *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Press 1997).

1.6.2 Chemokin-Bindungsstellen als Korezeptoren

Mit Beginn der Anzucht von Patientenisolaten in den 80-er Jahren wurde bald deutlich, daß diese bezüglich Anzüchtbarkeit, Replikationskinetik und Fusionsaktivität erhebliche Unterschiede aufweisen (19, 63, 332, 333). Deshalb wurde bald vermutet, daß es außer dem CD4-Komplex noch weitere Determinanten geben muß, die den Zelltropismus bestimmen. Es dauerte aber noch mehr als 10 Jahre, bis die aus der Immunologie bekannten Chemokinrezeptoren als Korezeptoren erkannt wurden (14, 69, 88, 94, 96). Die beschriebenen "klassischen Korezeptoren" sind zum einen der Chemokinrezeptor CXCR4, der vorwiegend von T-Zell-tropischen HIV-Stämmen genutzt wird. Seine natürlichen Liganden sind α -Chemokine wie SDF-1 (27, 112). Primär Makrophagen-trope Stämme nutzen den Rezeptor CCR5, dessen natürliche Liganden β -Chemokine wie MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sind (14, 96). Mittlerweile sind weitere Korezeptoren für das HIV vor allem aus der Gruppe der β -Chemokinrezeptoren (u.a. CCR2, CCR3, CCR8, V28, BONZO) identifiziert worden. (52). Allen gemeinsam ist eine ähnliche Struktur, zu der eine siebenmal die Membran durchspannende Domäne gehört (s. Abb. 15). Physiologischerweise dient die Interaktion von Chemokinrezeptor und Liganden der Steuerung lokaler Entzündungsreaktionen. Die Bedeutung der Korezeptoren für die Pathogenese des Krankheitsbilds AIDS wird durch die Entdeckung unterstrichen, daß man Infizierte mit hereditären Deletionen im CCR5-kodierenden Bereich gefunden hat (274). Diese Patienten erwiesen sich zum einen als weitgehend geschützt gegenüber einer HIV-Infektion; infizierte Patienten mit entsprechender Deletion zeigen eine langsamere Progredienz.

Mit der Entdeckung der Korezeptoren wurden bis dahin bereits existierende Klassifizierungen von Isolaten auf molekulare Ebene gestellt. Die T-(Lymphozyten)-tropen Isolate sind weitgehend gleichzusetzen mit der Eigenschaft, in der Lymphozytenkulturen große Syncytien hervorzurufen und wurden deshalb als Syncytien-induzierende (SI)-Isolate bezeichnet, die

M(akrophagen)-tropen Isolate können dies nicht und werden deshalb als Nicht-Syncytien-induzierende (NSI)-Isolate bezeichnet. Daneben gibt es dual-trope Isolate, die mehrere Klassen von Chemokinrezeptoren benutzen können. Sequentielle Isolate von Patienten zeigen eine Tendenz von NSI-Isolaten im asymptomatischen Krankheitsstadien zu SI-Isolaten in fortgeschrittenen Stadien (333). Frühere Befunde über spezifische Mutationen im V3-loop (s. 1.5.1) können jetzt über einen Wechsel vom M-tropen zu T-tropen Typus erklärt werden, der sich als Anpassung des gp120 an einen anderen Korezeptor erklären läßt. Wie bereits oben ausgeführt in 1.5.1, spielt bei diesem Wechsel der V3-loop eine wesentliche, aber in Anbetracht der komplexen Tertiärstruktur des Glykoproteins nicht die einzige Rolle (339, 373).

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist die Frage, inwiefern strukturelle Veränderungen im HIV-1-Env-Protein die Funktion des Glykoproteins bezüglich der Membranfusion beeinflussen können. Dabei werden zwei Ansätze verfolgt. Zum einem wird in Patientenisolaten, die aus der hiesigen Klinik stammen, das Vorhandensein von natürlichen Mutationen im Bereich der gp120/gp41-Spaltstelle und im gp41-N-Terminus untersucht und der Frage nachgegangen, wie diese sich auf die Spaltbarkeit, Dissoziation der Proteinuntereinheiten und die Fusionsaktivität des Glykoproteins auswirken. Dieser methodische Ansatz wird bei einer weiteren prominenten Region des HIV, dem V3-loop ebenfalls angewendet. Zum zweiten werden mittels gezielter Mutagenese im SU- sowie im TM-Bereich des Glykoproteins funktionell wichtige Strukturen mutiert beziehungsweise deletiert und auch deren Auswirkungen getestet. Als Hauptwerkzeuge werden subgenomische HIV-Konstrukte verwendet, die mittels transienter Transfektion in Zellkulturen eingeschleust werden.

Darüberhinaus wird der Frage nachgegangen, welche Möglichkeiten für virale Proteine existieren, die infizierte Zelle zu verlassen neben dem bekannten Mechanismus über die Bildung reifer Viruspartikel. Dabei wird der Prozeß des Glykoprotein-sheddings von der Membranoberfläche quantitativ analysiert. Als weitere Möglichkeit des Proteinexports aus der Zelle wird die Ausschleusung von Mikrovesikeln, die virale Proteine enthalten, beim Wildtyp wie auch bei Mutanten untersucht. Biochemische Eigenschaften der in diese Vesikel verpackten Virusproteine werden getestet und es werden Rückschlüsse auf die räumlichen Anordnung in diesen Mikrovesikeln gezogen. Desweiteren wird untersucht, ob der Mikrovesikeltransport ein zellulärer Exportweg ist, der es auch solchen HIV-1 Proteinen ermöglicht, die Zelle zu verlassen, die von ihrer Natur her keine sekretorischen Proteine sind.

2 Material und Methoden

2.1 Isolierung von HIV in der Zellkultur

Für die Isolierung von primären HIV-Isolaten verwendeten wir in erster Linie Kulturen von peripheren Blutlymphozyten (PBL). Wie oben bereits erwähnt (s. 1.1), war es seit der Entdeckung des IL-2 in den 70-er Jahren möglich, Lymphozyten über Wochen in Kultur zu halten. Als Quelle für größere Mengen an PBL und primären Makrophagen dienten uns hauptsächlich buffy coats aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik. Der Arbeitsgang der Reinigung und Kultivierung dieser Zellen ist schematisch in Abb. 16 dargestellt:

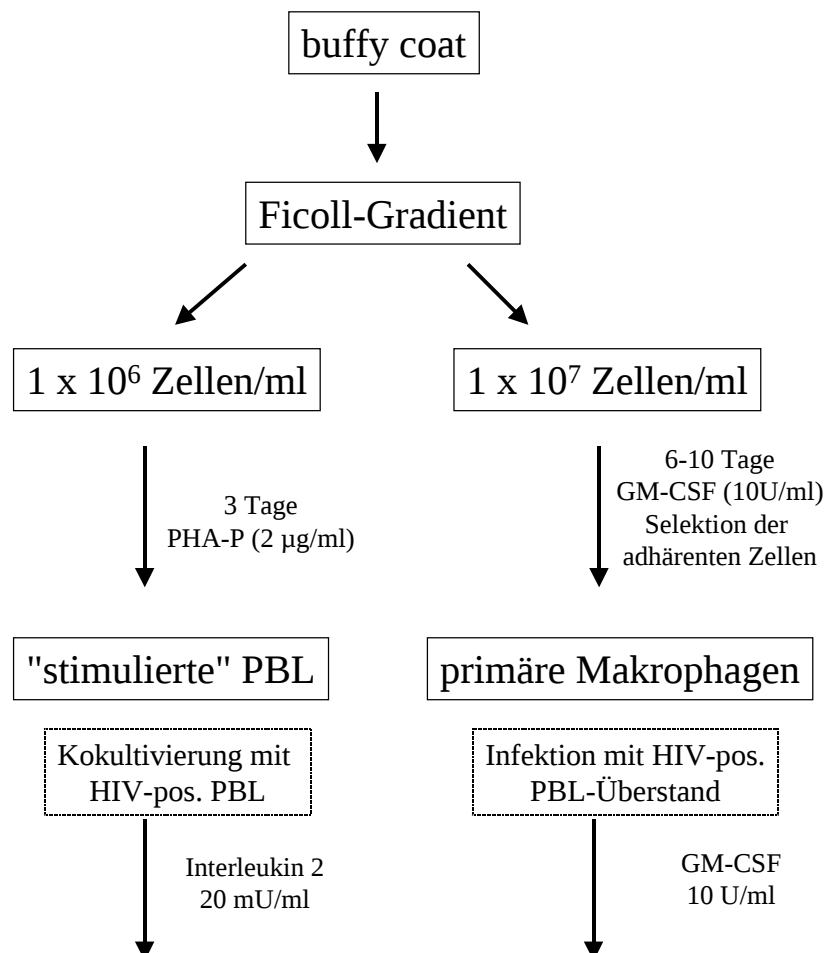


Abb. 16 Schematische Darstellung der HIV-Isolierung in PBL und primären Makrophagen. Der wesentliche Unterschied in den beiden Methoden liegt in der Dichte der Zellen sowie den jeweiligen Stimulantien, die dem Kulturmedium zugesetzt werden.

2.1.1 Periphere Blutlymphozyten (PBL)-Kulturen

Die Technik der Kokultivierung von Patientenlymphozyten mit stimulierten Spenderlymphozyten zur Isolierung von HIV war in der Mitte der 80'er Jahre entwickelt und mehrfach modifiziert worden (18). Wir verwendeten Spenderlymphozyten, die drei Tage mit Phytohämagglutinin-P (PHA-P) (2 µg/ml) in RPMI-1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert worden waren. Als technische Vereinfachung führten wir das portionsweise Einfrieren von stimulierten PBLs ein, die dann bei Bedarf zur Kokultivierung mit Patientenlymphozyten aufgetaut wurden. Die Kokultivierung erfolgte in RPMI-1640 (10% FKS) und Humanen Interleukin-2 (IL-2, 20 mU/ml). Die Kulturen wurden täglich mikroskopiert im Hinblick auf das Auftreten von Syncytien. Zweimal wöchentlich wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und der entnommene Überstand auf das Vorhandensein von p24-Ag im ELISA (p24 core profile ELISA, Dupont) untersucht. In Wochenabständen wurde die Zellzahl bestimmt, die Kultur auf 2×10^6 Zellen reduziert und dieselbe Anzahl frischer, stimulierter PBL hinzugegeben. Die Kulturen wurden über maximal 3 Wochen gehalten. Bei Auftreten eines deutlichen cytopathischen Effekts (CPE) in Form von Syncytienbildung oder/und beim Nachweis von p24-Ag im Zellkulturüberstand wurde die Kultur vorzeitig beendet.

Die Klassifizierung in Syncytien-induzierend (SI) und Nicht-Syncytien-induzierend (NSI) wurde wie folgt vorgenommen: Kulturen, die starke Syncytienbildung zeigten, wurden als SI-Isolate klassifiziert. Wenn kein CPE innerhalb der ersten 10 Tage auftrat, wurden sie bei Nachweis von p24-Ag als NSI-Isolat klassifiziert. In allen Fällen wurde die Übertragbarkeit von zellfreiem Kulturüberstand auf frische PBLs untersucht und weiterhin auf das Auftreten eines CPE täglich mikroskopiert. Isolate, die in dieser zweiten Passage zu einem CPE oder zu einem Nachweis von p24-Ag führten, wurden als zellfrei-transmissibel klassifiziert.

2.1.2 Makrophagenkulturen

Wie in Abb. 16 schematisch dargestellt, wurden für die Etablierung von primären Makrophagenkulturen die über Ficoll-Gradienten gewonnenen mononukleären Zellen in 10-fach höherer Dichte in Kultur genommen als für die Gewinnung von Lymphozyten und dann zur Selektion mit Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF, Roche Diagnostics, 10 U/ml) inkubiert. Die gleichzeitig in der Kultur vorhandenen Lymphocyten produzieren Mediatoren, die das Wachstum der Makrophagen unterstützen. Um diesen Effekt nutzen zu können, wurden sie in den folgenden 10 Tagen nur schrittweise entfernt, indem alle 3 Tage die Hälfte des Mediums mit den darin befindlichen nicht-adhärenenten Zellen durch frisches Medium ersetzt wurde. Dabei blieben die adhärenenten Makrophagen und dendritischen Zellen am

Flaschenboden haften und konnten proliferieren. Nach 10 Tagen war der Zellrasen zu ca. 50% konfluent und zeigte eine Mischung von primären Makrophagen und dendritischen Zellen. (s. Abb. 17). Die Zugabe des Inokulums erfolgte in Form von zellfreiem Virusüberstand aus vorangegangenen PBL-Passagen direkt in die Originalkulturen, d.h. eine Passage der Makrophagenkulturen in neue Zellkulturgefäße hinein wurde vermieden. In den folgenden 14 Tagen wurden die Zellen regelmäßig mikroskopiert und auf das Vorhandensein von p24-Ag im Zellkulturüberstand getestet. Eine Passage wurde als positiv angesehen, wenn zwei sequentielle p24-Ag-Teste ein Signal von mindestens dem doppelten Wert des cutoffs aufwiesen.

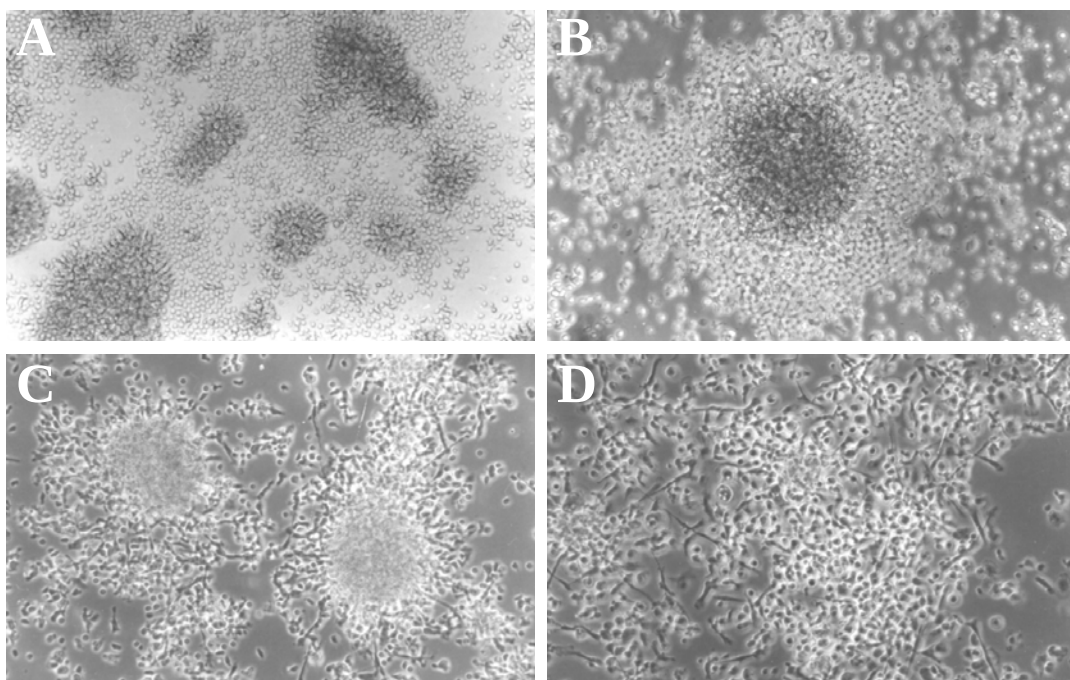


Abb. 17 Primäre Makrophagenkulturen. Die über einen Ficoll-Gradienten gereinigten mononukleären Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in Kultur gebracht. Während am Tag1 (A) im mikroskopischen Bild noch überwiegend nicht-adhärenente Zellen zu sehen waren, waren in den folgenden Tagen zunehmend Zellansammlungen zu beobachten (B). Nach ca. 1 Woche waren dendritische Zellen erkennbar (C). Nach ca. 10-12 Tagen waren alle nicht-adhärenenten Zellen entfernt und der Boden der Kulturgefäße zu ca. 50% konfluent mit dendritischen Zellen und primären Makrophagen (D).

2.1.3 Korezeptoranalyse

Wie bereits oben erwähnt (1.6.2) unterscheiden sich M-trope und T-trope HIV-Isolate in der Benutzung verschiedener Chemokinrezeptoren auf der Zielzelle, die im Zusammenhang mit dem HIV als Korezeptoren bezeichnet werden, während der CD4-Rezeptor von allen gemeinsam benutzt wird und deshalb als Hauptrezeptor angesehen wird. Die Charakterisierung der in dieser

Arbeit vorliegenden HIV-Wildisolate erfolgte diesem Schema entsprechend mit drei verschiedenen Zelltypen (s. Abb. 18): Der CD4⁺, CXCR4⁺ Zelllinie HeLa-T4⁺ (220), der CD4⁺, CXCR4⁺, CCR5⁺ Zelllinie PM1 (218) sowie den im eigenen Labor isolierten primären Makrophagenkulturen, die als CD4⁺, CCR5⁺ anzusehen sind. Trotz des Vorhandenseins von CXCR4-Molekülen auf ihrer Oberfläche gelten sie als funktionell negativ für diesen Korezeptor, vermutlich als Folge eines Blocks nach der Bindung. Zusammen mit den PBL-Kulturen als Ausgangszellen für die Virusisolierung ergibt sich für die Zuordnung eines Isolats in die Kategorie Syncytien-induzierend (SI), Nicht-syncytien-induzierend (NSI) und dual-trope folgendes Schema:

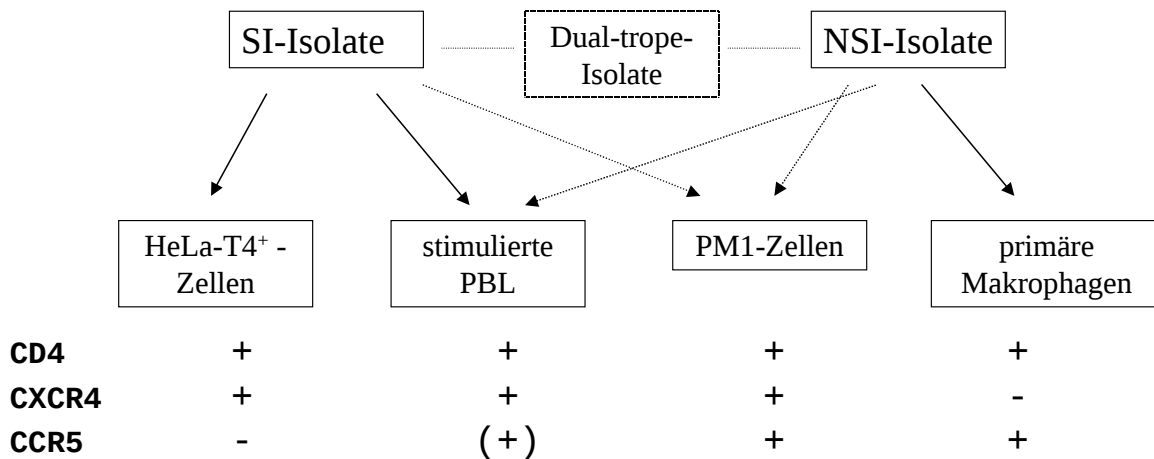


Abb. 18 Schema für die Klassifizierung der primären HIV-Isolate in die Kategorien Syncytien-induzierend (SI), nicht-syncytien-induzierend (NSI) sowie dual trop. Unter den verwendeten Zellen bzw. Zelllinien die vom HIV benutzten Rezeptoren. Die gestrichelten Pfeile sollen im Unterschied zu den durchgezogenen Pfeilen andeuten, daß ein Übertragungsversuch nicht regelmäßig gelingt.

Während die primäre Isolierung aus den Patienten-PBL durch Kokultivierung mit stimulierten Spender-Lymphozyten geschah (s. 2.1.1), erfolgten die Passageversuche auf weitere PBL-Kulturen sowie auf die anderen Zelltypen ausschließlich durch Inokulation mit zellfreiem Virusüberstand. Das Monitoring bestand neben der Mikroskopie in der Bestimmung des p24-Ag im Zellkulturüberstand. Mit den HeLa-T4⁺-Zellen wurde darüberhinaus eine Immunfluoreszenz zum Nachweis von viralem Protein mit Hilfe eines humanen HIV-positiven Serums durchgeführt. Die Kultur in den HeLa-T4⁺-Zellen erfolgte über 5 Tage, in allen anderen Zellen über maximal 14 Tage. Bei Auftreten eines deutlichen cytopathischen Effekts (CPE) in Form von Syncytienbildung oder/und beim Nachweis von p24-Ag im Zellkulturüberstand wurde die Kultur vorzeitig beendet.

2.2 Rekombinante DNA-Techniken

2.2.1 DNA-Extraktion aus Eukaryonten

Für die rekombinanten Vektoren, die HIV-1-Wildtypsequenzen enthalten, wurden PCR-Amplifikate verwendet. Dazu wurde zuvor aus infizierten Zellen (PBL, PM1-Zellen, Makrophagen) die DNA extrahiert mittels Proteinase K-Verdau (180). Bei einigen Versuchen der letzten Zeit wurde zur Erhöhung der DNA-Reinheit statt dessen eine Extraktion auf der Grundlage der Adsorption von DNA an Silikapartikel verwendet ("Boom-Extraktion", (34)) mittels einer kommerziellen Methode (Nuclisens[®], Organon).

2.2.2 PCR-Amplifikation und Klonierung in Prokaryonten

Die für die PCR-Amplifikationen verwendeten Oligonukleotide wurden entweder im eigenen Labor synthetisiert (Modell 381A, Applied Biosystems, Weiterstadt, BRD) und anschließend über eine Ausschußchromatographie mit Hilfe einer NAP25-Säule (Pharmacia) gereinigt oder in einer entsprechenden Form von der Firma Pharmacia bezogen. Die Amplifikation wurde in DNA-Thermocyclern der Firma Perkin Elmer (Modell 480 und 9600) nach Standardprotokollen durchgeführt. Für Experimente der jüngeren Zeit wurde statt der Taq-Polymerase (Perkin Elmer) die Pwo-Polymerase[®] (Roche, Nr. 1644947) verwendet, die neben der 5'-3' Polymeraseaktivität eine 3'-5' Exonukleaseaktivität ("proof-reading-activity") besitzt und deshalb weniger Lesefehler bei der Amplifikation macht. Die PCR-Amplifikate sowie die Vektoren, in die die Amplifikate hineinkloniert werden sollten, wurden mit Restriktionsenzymen verdaut, elektrophoretisch in Low-Melt-Agarose[®] (NuSieve, Rockland) aufgetrennt und anschließend mittels T4-DNA-Ligase[®] (Roche, Nr. 481220) rekombiniert. Die verwendeten DNA-Plasmide enthielten einen "origin of replication" (ori) für die Replikation im E. coli und als prokaryotischen Selektionsmarker das β -Lactamase-Gen (Ampicillin resistenz, amp^r). Als transformationskompetente Prokaryonten wurde der Stamm E.coli DH5 α F'IQ (Life Technologies) verwendet, der nach Vorbehandlung mittels Hexaminocobaltchlorid und DMSO zur Aufnahme von Plasmiden kompetent gemacht worden war (287). Die Transfektion erfolgte unter einem 90sec-Hitze/Kälteschritt und anschließendem Bebrüten eines LB-Agars (Luria Broth) unter dem Zusatz von Ampicillin. Nach 20 h wurden Kolonien von der Platte in LB-Medium (Luria Broth Base-Medium, GibcoBRL/Ampicillin, 50 μ g/ml) überführt und über Nacht im Bakterieneschüttler amplifiziert. Die Plasmidextraktion aus den Kulturen erfolgte nach Standardprotokollen mittels alkalischer Lyse (287). Die anschließende Selektion der gesuchten rekombinanten Plasmide

erfolgte über Restriktionsverdau und Analyse der Fragmente im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel unter einem UV-Schirm.

2.2.3 Plasmid-DNA-Isolierung und Reinigung

Für die präparative Isolierung und Reinigung der Plasmide wurden zwei Methoden verwendet. Für die frühen Experimente wurde aus 500 ml-Über-Nacht-Kulturen, die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse grob von der bakteriellen DNA getrennt und anschließend unter Ethidium-Bromid-Zusatz im Cäsiumchlorid-Gradienten weiter gereinigt (287). Da zum Zeitpunkt der späteren Experimente die Transfektionstechnik in Eukaryonten erheblich effizienter wurde (s.u.), waren die bei der Cäsiumchlorid-Gradienten-Technik erhaltenen DNA-Mengen (zwischen ca. 300-2000 µg DNA) nicht mehr nötig. Deshalb erfolgte die Reinigung der Plasmide später über eine Reinigung mittels einer Anionenaustauscher-Säule (Quiagen®, Plasmid Maxi Kit No. 12162). Der Ansatz erfolgte aus 150 ml LB-Medium, erbrachte Erträge von ca. 200-500 µg DNA von vergleichbarer Reinheit, aber unter erheblich geringerem Arbeitsaufwand.

2.2.4 Transfektion von Plasmid-DNA in Eukaryonten

Für die Transfektion der rekombinanten Plasmide in Eukaryonten wurden Zellen über Nacht in 6-Loch-Platten (9.6 cm² Fläche/cup) kultiviert in einer Anfangsdichte von 2.5×10^5 Zellen/cup. Nach einem Mediumwechsel am nächsten Tag erfolgte die Transfektion nach einer Standard-Calcium-Phosphat-Methode (287) mit 5µg Plasmid-DNA pro Ansatz. Nach einem Mediumwechsel am Tag 1 erfolgte die Ernte der Zellen sowie die anschließenden Analysen am Tag 2 ca. 40 h nach Transfektion. Die späteren Transfektionsexperimente wurden ausschließlich mit der neueren Technik auf der Basis von nicht-liposomalen Transfektionsreagenzien (FuGENE 6 Transfection reagent®, Roche No. 1814443) durchgeführt unter ähnlichen Zellkulturbedingungen bei einem Einsatz von 2µg Plasmid-DNA/Ansatz.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden 0.2 µg des Plasmids pGL3® (Promega) kotransfiziert. Das Plasmid kodiert für das Luciferase-Gen aus *Photinus pyralis* unter der Kontrolle des SV40_{early} Promotor (SV40e) (13). Nach Ernte und Lyse der Zellen wurde die Luciferase-Aktivität mit Hilfe eines kommerziellen Reagenz (Luciferase Assay System®, Promega) in einem Luminometer (DCR-1, DIGENE Diagnostics, Inc.) in Form von relative light units (RLU) bestimmt, wobei das Luciferase-Enzym eine Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert, die zu einer Biolumineszenz führt. Die Messung der Lichtemission erfolgte 5 sec nach Zugabe des Substrats über einen Zeitraum von 15 sec.

2.3 Transfektion in Eukaryonten mittels Mikroinjektion

Mittels der Technik der Mikroinjektion ist es möglich, gereinigte DNA im Femtoliterbereich in einzelne Zellen gezielt zu injizieren. Durch Zugabe eines Dextran-konjugierten Farbstoff (FITC-Dextran, MW 150.000, Sigma), der aufgrund seines Molekulargewichtes nicht die Zellmembran durchdringen kann, ist es möglich, die Effizienz der Injektion auch noch Tage später zu kontrollieren. Für eine Injektionsserie werden 2 µl DNA-Lösung mit 2 µl gefilterter FITC-Dextran-Lösung vermischt und zentrifugiert. Der Überstand wird mit Hilfe eines Beladeaufsatzes (Microlader[®], Eppendorf) in eine Glaskapillare (Austrittsdurchmesser 0,5 µm, Femtotip[®], Eppendorf) gebracht.

HeLa bzw. HeLa-T4⁺ - Zellen wurden zuvor in Petrischalen kultiviert, deren Boden zuvor mit autoklavierten, runden Deckgläschen versehen worden waren, die nach Anwachsen der Zellen (1-2 Tage) für die Mikroinjektion verwendet wurden. Die Mikroinjektion erfolgte unter Phasenkontrast-Optik an einem Invertmikroskop (IM35, Zeiss) an einem vibrationsfreien Arbeitstisch mit Hilfe des Mikromanipulators 5170[®] (Eppendorf) als axiale Injektion in einem Winkel von 45°. Es wurde am Gerät ein Dauerhaltedruck von 10-30 mbar eingestellt, der während der Injektionsphase auf 70-100 mbar erhöht wurde. Die Injektionszeit betrug 0,2 – 0,5 sec. Während einer Sitzung wurden ca. 100-120 Zellen injiziert und die Zellen anschließend weiterkultiviert. Nach 24 h wurden die markierten Zellen aufgesucht und die Synzytien ausgezählt, wobei bei großen Zellfusionen das Wiederfinden durch die starke Verdünnung des Farbstoffes erschwert war.

2.4 Rekombinante Vektoren

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Expressionsvektoren handelt es sich ausschließlich um subgenomische HIV-1 Konstrukte, die durch entsprechende Deletionen nicht fähig sind, nach Transfektion in Eukaryonten infektiöse Viruspartikel zu bilden.

2.4.1 Env-exprimierende Vektoren

2.4.1.1 Expression von Wildtyp-gp120/gp41-Sequenzen

Ausgangskonstrukt für die rekombinante Expression von Env-Wildtyp-Varianten sowie für die gp41-N-Terminus-Deletionsmutanten war das Konstrukt pNLA1, ein subgenomisches cDNA-Derivat vom pNL4-3 (1), dem das erste Intron fehlt. Durch diese Deletion des gag- und pol-

Bereiches kann das Konstrukt keine Viruskapsidproteine sowie Polymeraseproteine bilden, jedoch alle weiteren HIV-kodierten Proteine wie in Abb. 19 schematisch gezeigt:

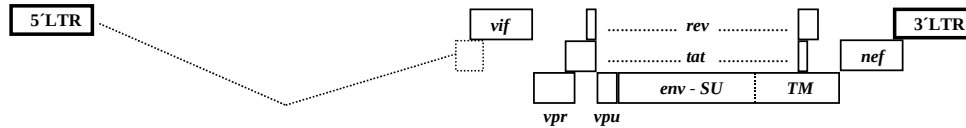


Abb. 19 Env-Expressionvektor pNLA1, ein subgenomisches Konstrukt des pNL4-3.

Für die rekombinanten Env-exprimierenden Konstrukte wurden dabei folgende Modifikationen vorgenommen: a) Zwei nur einmal im Plasmid vorkommende Restriktions-Stellen, *Ecl*XI und *Pst*I wurden durch Einführung von stillen Mutationen 200 bp stromaufwärts bzw. 120 bp stromabwärts der gp160/gp41 Spaltstelle geschaffen (s. Abb. 20). Dies geschah mit Hilfe von gezielter Mutagenese unter Verwendung degenerierter PCR-primer, deren Sequenz die entsprechenden Mutationen enthielt. b) Die Sequenz des *nef*-Gens zwischen der *Xho*I-Stelle (nt 8887) und der *Kpn*I-Stelle (nt 9005) wurden ausgetauscht gegen eine zweite, das Rev-responsive-Element (RRE) enthaltende Region (s.1.2). Das natürliche RRE liegt in einer ca. 240bp langen Region, beginnend am Anfang der gp41-kodierenden Sequenz. Da dies weitgehend dieselbe Region ist, die in den rekombinanten Vektoren gegen Wildtypsequenzen ausgetauscht wurde (s.Abb. 20), sollten durch das Einführen eines weiteren RRE mögliche Störungen der Rev-Bindung an das natürliche RRE kompensiert werden (223, 289). c) In die Region zwischen der *Ecl*XI und der *Pst*I-Stelle wurden anschließend insgesamt 27 PCR-Amplifikate, aus extrahierter DNA von Patienten-PBL stammend, hineinkloniert (s. Abb. 20, unten).

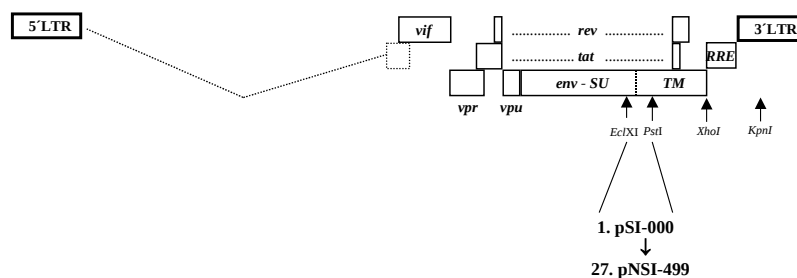


Abb. 20 Env-Expressionsvektor penvPstRRE. Die Veränderungen gegenüber dem Ausgangsplasmid pNLA1 (s. Abb. 19) sind die Einführung zweier unique-Schnittstellen (*Ecl*XI und *Pst*I) sowie der Ersatz der Nef-kodierenden Sequenz durch ein zweites Rev-responsive-Element (RRE).

2.4.1.2 Expression von Wildtyp V3-Sequenzen

Für die Expression von Wildtyp-V3-loop wurde ein Vektor geschaffen, der statt des viruseigenen LTR-Promotors den SV40_{early} Promotor (SV40e), den T7 Phagenpromotor (T7) sowie die Polyadenylierungsstelle des SV40 t-Antigens (pA) enthält (s. Abb. 21) (32). Zusätzlich wurde eine Deletion im tat Exon 1 durchgeführt. Das Fehlen des ersten tat-ATGs, eines starken, den Translationsstart initiiierenden ATGs, führt vermutlich nach dem "leaky scanning Mechanismus" dazu, daß ein Teil der 40S Ribosomenuntereinheit das zweite "schwächere" tat-ATG überspringt und eine effektive Translation erst beim open reading frame (ORF) des Rev oder Env beginnt. Der SV40_{early} Promotor benötigt im Unterschied zum viruseigenen LTR kein Tat für eine effektive Expression. Zum Einklonieren von V3-Wildsequenzen wurde eine natürlich vorkommende PvuII-Schnittstelle, die 10 Aminosäuren vor dem ersten Cystein des V3-loop (vgl. Abb. 9) liegt, sowie eine XbaI-Schnittstelle verwendet, die durch gezielte Mutagenese mit Hilfe von degenerierten PCR-primern drei Aminosäuren hinter dem zweiten Cystein geschaffen wurde. Um die XbaI-Schnittstelle nur einmal im Vektor zu haben, wurde eine weiter 3' liegende zweite XbaI-Schnittstelle entfernt. Der daraus resultierende Vektor SVATGXbade1 zeigte in den Proteinanalysen (Westernblot, RIPA) eine gegenüber dem Ausgangskonstrukt pNLA1 verstärkte Env-Expression. Durch die oben genannten Modifikationen fehlen diesem Konstrukt außerdem das Vif, das Vpr sowie das Nef.

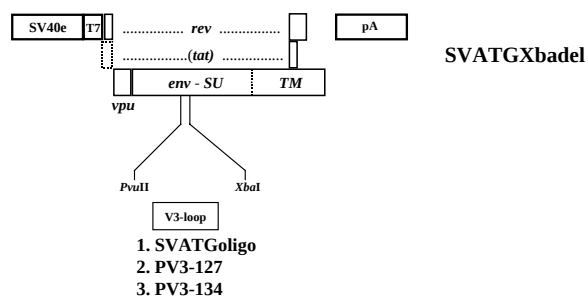


Abb. 21 SVATGXbade1 als Ausgangskonstrukt für das Einfügen von Wildtyp-V3-Varianten. Das Konstrukt enthält die aus dem pNLA1 (s. Abb. 19) stammenden Sequenzen, die für das Rev, Vpu und Env kodieren unter der Kontrolle des SV40_{early} Promotor und der SV40 Polyadenylierungsstelle. Die aus Wildvirus amplifizierten V3-Regionen wurden zwischen die unique-Schnittstellen PvuII und XbaI kloniert.

2.4.1.3 Expression von gp41-N-Terminus-Deletionsmutanten

Die rekombinanten Env-exprimierenden Konstrukte mit Deletionen im N-Terminus waren ähnlich der früher publizierten Konstruktsreihe env0RRE (289) mit zwei entscheidenden

Unterschieden: Die Einführung eines zweiten RRE (vgl.1.2) wurde unterlassen, da die Deletionen der ersten 12 Nukleotide der gp41-kodierenden Sequenz eine Region betrifft, die stromaufwärts des für die Funktion des RRE wichtigen stem-loop II liegt. Stattdessen wurden die ersten 90 Nukleotide des nef-Gens deletiert, die die beiden Nef-Startkodons beinhalten. Zum zweiten wurde eine in der o.g. env0RRE-Serie ursprünglich ungewollte Mutation in Position 22 (Alanin zu Threonin) wieder zurückmutiert, die nach eigenen Ergebnissen zu mindestens zwei unabhängigen Effekten geführt hatte: Durch Veränderung auf RNA-Ebene kam es bei diesen Konstrukten zur Beeinträchtigung des RRE durch Veränderung im stem-loop II und damit zu verminderter Proteinexpression. Zum zweiten führte die Einführung einer polaren Aminosäure in den N-Terminus zu Veränderungen der Funktionalität durch eine gestörte Assoziation der Glykoprotein-Untereinheiten. Für die Klonierung wurden die in der o.g. Arbeit verwendeten PCR-primer sowie das Konstrukt envPstRRE (s. Abb. 20 wegen seiner *Pst*-Schnittstelle verwendet.

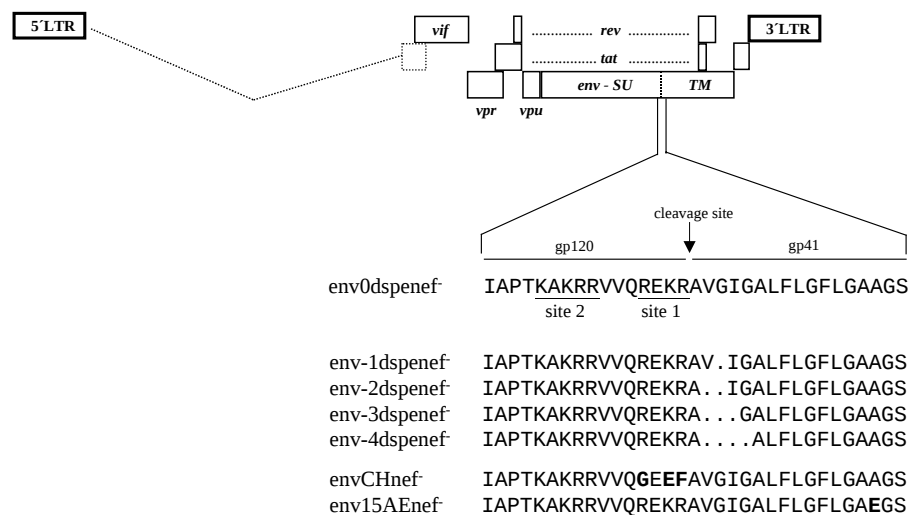


Abb. 22 Env0dspnef als Ausgangskonstrukt für die Deletion im gp41-N-Terminus sowie der Chymotrypsin-Mutante envCHnef und der shedding-Mutante env15Anef. "Site 1" und "site 2" markieren die beiden putativen proteolytischen Spaltstellen zwischen gp120 und gp41 (vgl. unter 1.5.2).

In dem Plasmid envCHnef wurde in Analogie zur Erstbeschreibung (234) die trypsinähnliche Spaltstelle am C-Terminus des gp120 durch eine Chymotrypsin-Spaltstelle ersetzt unter Verwendung der von diesen Autoren verwendeten PCR-primer. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor env0dspnef eingeführt über den Austausch des *NheI/BamHI*-Fragmentes. In ähnlicher Weise wurde das Plasmid env15Anef konstruiert: Es besitzt eine Mutation, die zu einem einzelnen Aminosäureaustausch an Position 15 des gp41 N-Terminus führt (Alanin zu Glutaminsäure). Ein derartiges Konstrukt war zuvor von anderen Autoren beschrieben worden

(127) und das daraus resultierende Env-Protein als in seiner Assoziation der Untereinheiten gestört ("shedding-Mutante") charakterisiert worden.

2.4.1.4 Expression von *gp120*-Deletionsmutanten

Als Grundlage für die rekombinanten Env-exprimierenden Konstrukte mit Deletionen im *gp120* wurde das Konstrukt SVATGrev als Ausgangsklon verwendet, das bis auf eine natürlich vorhandene *Xba*I-Schnittstelle mit dem oben beschriebenen SVATGXbadel (s. Expression von Wildtyp V3-Sequenzen) identisch ist. Das daraus hervorgegangene Konstrukt SVATGrevΔ120 kodiert für ein Env-Glykoprotein, das ab der Aminosäure 45 eine Deletion für den weitaus größten Teil des *gp120* bis zu der Position –16 am Ende des *gp120* Bereichs besitzt (s. Abb. 23). Die dabei noch erhaltenen Proteinbereiche des *gp120* kodieren für die beiden putativen Spaltstellen zwischen *gp120* und *gp41* (vgl. Abb. 22 sowie unter 1.5.2)(3).

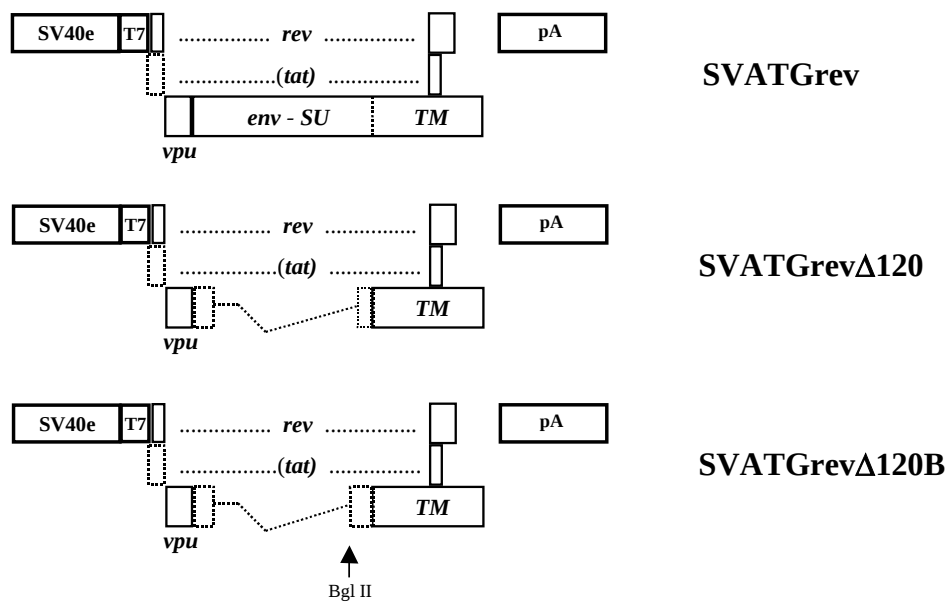


Abb. 23: SVATGrev und die daraus hervorgegangenen Konstrukte mit Deletionen im *gp120* des HIV-1 SVATGrevΔ120 sowie SVATGrevΔ120B. Die beiden letztgenannten Konstrukte unterscheiden sich nur durch das Vorhandensein von 30 zusätzlichen Aminosäuren im *gp120* C-Terminus.

Das zweite Konstrukt, SVATGrevΔ120B unterscheidet sich von dem vorangegangenen lediglich dadurch, daß die Deletion im *gp120* Bereich eingekürzt ist – auf Genomebene bis zu der *Bgl*II-Schnittstelle –, so daß dieser Vektor für insgesamt 46 Aminosäuren des *gp120* C-Terminus kodiert.

2.4.1.5 Expression von gp41-C-terminus-Deletionsmutanten

Als Grundlage für die gp41-C-terminus-Deletionsmutanten diene ein pSG5-Vektor® (Stratagene). Dieser 4.1 kb eukaryontische Expressionsvektor steht unter der Kontrolle des SV40_{early} Promotor (SV40e). Als Besonderheit enthält er zwischen diesem Promotor und dem T7 Phagenpromotor (T7) das Intron II des Kaninchen β -Globin-Gens, das für die Expression des jeweiligen inserts (in unserem Falle HIV-env bzw. nef-Sequenzen (s. 2.4.2)) herausgespleißt wird. Diese intronhaltigen mRNAs zeichnen sich durch eine erhöhte Stabilität aus, was zu einer deutlich erhöhten Expression führen kann (153, 161, 217).

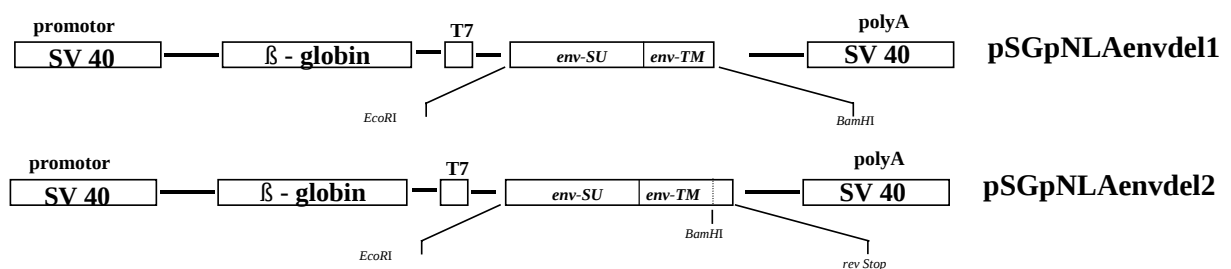


Abb. 24 pSGpNLA1envdel1 und pSGpNLA1envdel2 sind zwei Konstrukte auf der Grundlage von pSG-Vektoren (Promega®), die als einziges HIV-Protein das Env exprimieren und im cytoplasmatischen Bereich des gp41 Deletionen von unterschiedlicher Länge besitzen.

Es wurden zwei gp41-Deletionsmutanten unterschiedlicher Länge geschaffen. Dem Konstrukt pSGpNLA1envdel 1 fehlen die 105 C-terminalen Aminosäuren des gp41 (bis zur *BamHI*-site auf Genomebene), dem Konstrukt pSGpNLA1envdel 2 lediglich die terminalen 47 Positionen (bis zum Ende der rev-kodierenden Exon 2-Sequenz). In beiden Fällen reicht das exprimierte Protein bis hinter die Transmembranregion, so daß der intrazelluläre Transport über das ER und den Golgi-Apparat möglich ist. Beide Konstrukte exprimieren im Gegensatz zu den anderen verwendeten Konstrukten als einziges HIV-Protein das HIV-Env ohne akzessorische oder regulatorische Proteine (s.u. 1.2). Für den Transport der einfach gespleißten env-mRNAs vom Zellkern in das Zytoplasma ist es deshalb nötig, bei der Transfektion dieser Konstrukte in Eukaryonten Rev-Protein in Form eines rev-kodierenden Vektors (s.u. 2.4.3) zuzuführen.

2.4.2 Nef-exprimierende Vektoren

Als Grundlage für die Nef-exprimierenden Konstrukte diene der pSG5-Vektor® (Stratagene). Wie oben erklärt (s.u. 2.4.1.5), führt das Vorhandensein des β -Globin-Introns zu einer erhöhten Expression. Mit einem verwandten Konstrukt aus dem eigenen Labor, dem dieses Intron fehlt

(SVcnef, (187)) ließ sich entsprechend auf Immunoblot-Ebene kein Protein nachweisen. Mit dem in Abb. 25 dargestellten Vektor war dies hingegen möglich.

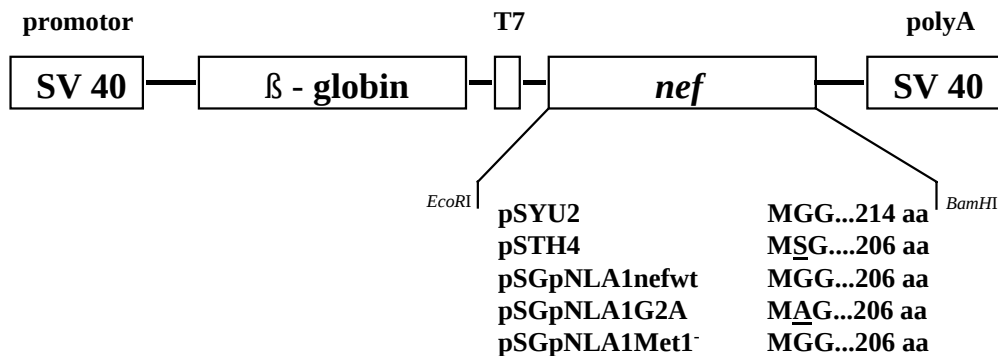


Abb. 25 Nef-exprimierende Vektoren pSYU2 und pSTH4. Das Nef aus dem Laborstamm pNLA1 wurde ebenfalls in diesen Vektor hineinkloniert und zusätzlich noch Mutanten hergestellt, die den N-terminalen Teil des N-Proteins betreffen.

Zwischen die bei diesem Vektor vorgesehenen Klonierungsstellen *EcoRI* und *BamHI* wurden nach PCR-Amplifikation und Restriktionsverdau die Nef-Wildtyp-Sequenzen aus dem Konstrukt pNLA1 (pSGpNLA1neft) sowie von zwei weiteren Wildtypen (pSYU2 und pSTH4) kloniert, wobei wir die letzten beiden Konstrukte aus einem anderen Labor (G. Sutter, GSF, München) erhalten haben. pSYU2 und pSTH4 unterscheiden sich unter anderem durch das Vorhandensein eines Glycin an Position 2, mit dessen Hilfe das Protein über das Anhängen einer Myristilinsäure in der Membran verankert werden kann (vgl. Abb. 82). Um diesen Unterschied direkt vergleichen zu können, wurde mittels gezielter Mutagenese im Konstrukt pNLA1neft die Position 2 von Glycin zu Alanin (pNLA1nefG2A) ausgetauscht, desweiteren im Konstrukt pNLA1neftMet1⁻ das erste Startkodon durch Mutagenese ausgeschaltet, so daß die Translation erst beim zweiten Methionin in Position 20 beginnen kann.

2.4.3 MA-exprimierender Vektor unter RRE-Kontrolle

In Analogie zu den unter 2.4.2 gezeigten Nef-exprimierenden Vektoren wurde ein Konstrukt geschaffen, das aus dem HIV-1 gag-Bereich (vgl. Abb. 5) das MA-Protein (p17) exprimiert (s. Abb. 26). Dazu wurde mittels sequenzspezifischer primer aus dem Konstrukt 3-CCC (372) die MA-kodierende Region mittels PCR herausamplifiziert und in den pSG-Vektor hineinkloniert.

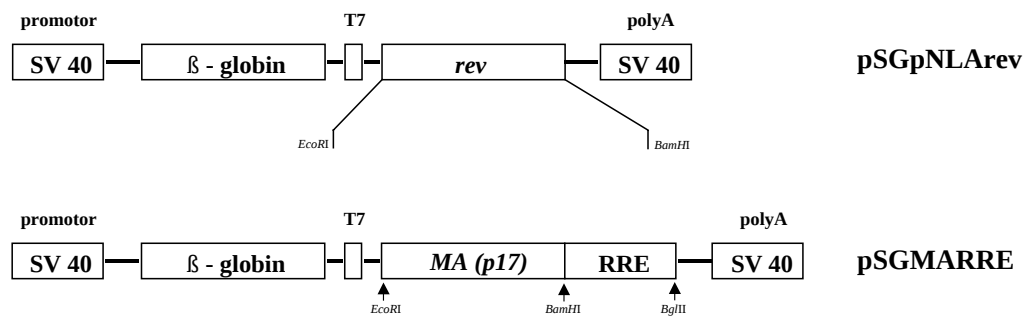


Abb. 26 Rev-exprimierender Vektor pSGpNLArev (oben) und MA-exprimierender Vektor pSGMARRE (unten). pSGMARRE enthält hinter der HIV-1 MA-exprimierenden Region ein Rev-responsive-Element (RRE) zur Bindung des Rev. Kotransfektionen des Konstrukts mit pSGpNLArev führen zu einer deutlich gesteigerten Expression.

Für einen effizienten Transport der MA-kodierenden mRNA vom Zellkern in das Zytoplasma ist das Vorhandensein eines rev-responsive-Elementes (RRE) nötig (s. u. 1.2), an das sich das Rev-Protein binden kann. Es zeigte sich, daß auch ohne Zugabe von Rev-Protein auf niedrigem Niveau MA exprimiert wird, bedingt durch das im pSG-Vektor erfolgte Herausspleißen der β -Globin intron-Sequenz (s. 2.4.2). Zugabe des rev-exprimierenden Vektors pSGpNLArev (s. Abb. 26) führt zu einer erheblich gesteigerten Expression von MA.

2.5 Proteinnachweise

2.5.1 Syncytien-Assay

Wie oben bereits dargestellt (s.1.5.2), ist eine der wesentlichen Funktion des HIV-Glykoproteins die Fusion von der Virus- mit der Zellmembran. Expression von HIV-Glykoprotein in Eukaryonten führt zum Inserieren des Proteins in die Zellmembran, so daß diese mit Nachbarzellen fusionieren kann, sofern diese die entsprechenden Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche besitzen (s. 1.6). Im Gegensatz zur Virus-/Zellmembran-Fusion ist der letztgenannte Prozeß im Lichtmikroskop in der Zellkultur zu verfolgen. Dabei korrelieren nach Transfektion von Glykoprotein-exprimierenden Vektoren die Anzahl und die Größe der Fusionen einerseits mit dem Maß an Expression, andererseits mit der Funktionalität des Proteins. Als nützlich erwies sich dabei der Gebrauch von HeLa-T4⁺-Zellen (220), die als adhärente Zellen unter HIV-1 Env-Expression leicht zu erkennende Fusionen ausbilden, wie in Abb. 27 zu sehen ist:

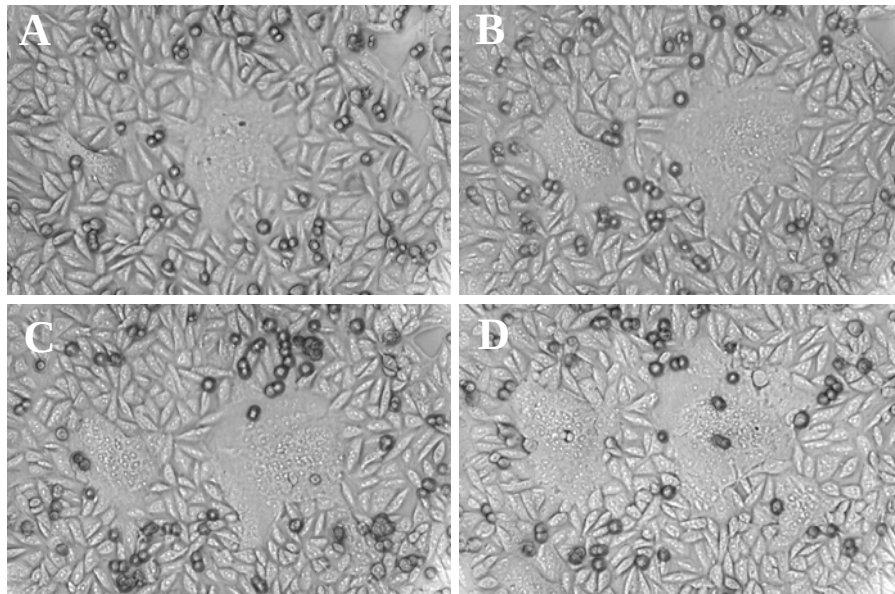


Abb. 27 Entwicklung von Syncytien nach Transfektion des Vektors pNLA1 in HeLa-T4⁺ - Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten A. nach 19 Stunden B. nach 22 Stunden C. nach 25 Stunden D. nach 28 Stunden.

Um aus einem Experiment gleichzeitig die Fusionskapazität eines Konstruktes sowie Proteinnachweise im Immunoblot (s. 2.5.3) und im gp-capture-ELISA (s. 2.5.4) nachweisen zu können, wurde in HeLa-Bristol-Zellen (CD4-negativ) transfiziert, die einen Tag zuvor in L6-Platten (9.6 cm²/cup) in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/cup in Kultur gebracht worden waren. Am Tag 1 nach Transfektion wurden die Zellen mittels Trypsin gelöst und zu zwei gleichen Teilen wieder in L6-Platten überführt. Die eine Hälfte wurde weitere 24h kultiviert und dann für die Proteinanalysen verwendet. Dazu wurde nach Lyse der Zellen mit einem Detergenzien-enthaltenden Lysis-Puffer und Zentrifugation aus dem Überstand die Luciferase-Aktivität bestimmt als Maß für die Effizienz der Transfektion. Dasselbe Lysat wurde verwendet für die Messung des gp120 im gp-capture-ELISA und dieser Wert in Relation gesetzt mit dem gp120-Gehalt des Zellkulturüberstands, der nach kurzer Zentrifugation zur Entfernung von Zelltrümmern direkt verwendet wurde. Das Pellet des Zelllysats wurde in SDS-PAGE-Probenpuffer (205) aufgenommen und im Immunoblot untersucht.

Die zweite Hälfte der transfizierten HeLa-Bristol-Zellen wurde in der Zählkammer gezählt und für die Bestimmung der Fusionskapazität mit derselben Menge HeLa-T4⁺ Zellen kokultiviert. Dabei waren bereits nach wenigen Stunden beginnende Zellfusionen erkennbar, die bis zum nächsten Tag zunahmen. Zur Erleichterung des Zählens wurden die Zellen zu diesem Zeitpunkt

mit dem XC-stain (0.5% Methylen-Blau, 0.17% Karbol-Fuchsin in Methanol) (111) gefärbt. Die Anzahl der Syncytien (> 3 Zellkerne) wurden in 10 Blickfeldern ausgezählt und das arithmetische Mittel + Standardabweichung bestimmt. Zur Berechnung der relativen Fusionskapazität wurde dieser Wert auf den gemessenen Luciferase-Wert normiert. Das gesamte Protokoll in Abb. 28 schematisch dargestellt.

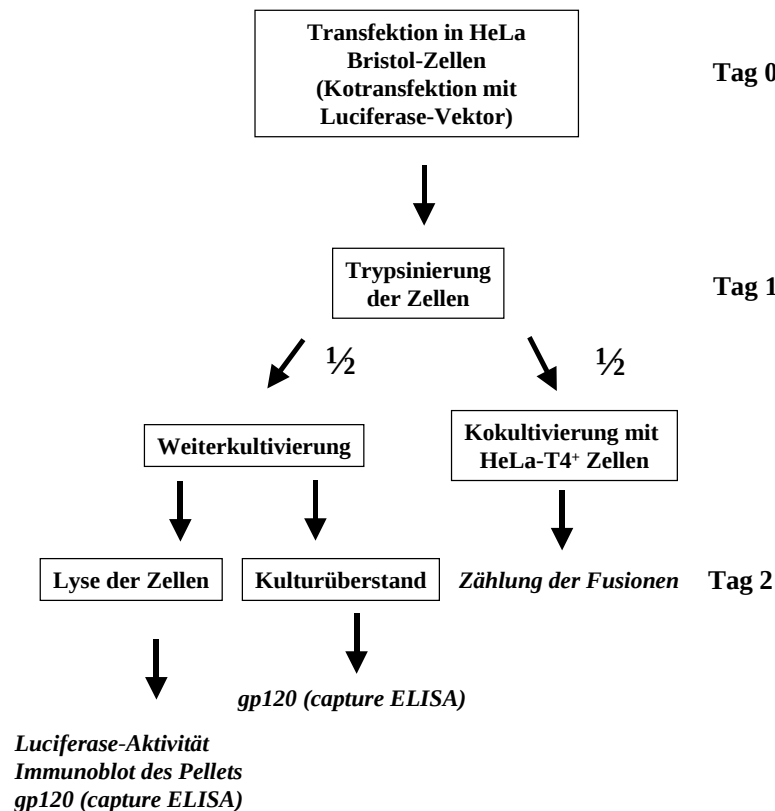


Abb. 28 Schematische Darstellung des Protokolls für den Syncytien-Assay.

2.5.2 Radioimmunpräzipitation

Radioimmunopräzipitationen (RIPA) zum Nachweis von HIV-1 Proteinen wurden mit HeLa, HeLa-T4⁺ sowie mit COS-Zellen durchgeführt. Zur Präzipitation wurden dabei humane HIV-1 positive Seren eingesetzt, die von Patienten der Düsseldorfer Universität stammten und im Immunoblot (New-LAV-Blot[®], Pasteur) vorgetestet worden waren. Subkonfluente Zellen (ca. 2.5×10^5 /cup) in L6-Platten (9.6 cm² pro cup) wurden mit 2 µg Plasmid transfiziert (s. u. 2.2.4). 40 Stunden nach Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen für 60 min in Methionin/Cystein-freiem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 µCi [³⁵S]Methionin-Cystein-Mix (Pro-MixTM, Amersham-Buchler, Braunschweig) über weitere 60 min ("pulse"). Das Medium samt Markierungsreagenz wurde entfernt, die Zellen mit Pufferlösung gewaschen und Dulbecco's MEM ohne Serumzusatz für weitere zwei Stunden

zugegeben ("chase"). Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen lysiert (0.15M NaCl, 1% Natrium-Deoxycholat, 1% Triton X-100, 0.1 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 1µg/ml Aprotinin, 1µg/ml Leupeptin, 100 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in 10 mM Tris-Cl, pH 7.4). Das Zellysate wurde voradsorbiert mit einer Suspension von Protein-A-Agarose (Roche Nr. 1719408) vor der Immunopräzipitation mit dem humanen Serum eines HIV-1 positiven Patienten. Kriterium für die Verwendung der Seren im RIPA war eine gute Reaktivität mit den HIV-1-Env-Proteinen bei gleichzeitig geringer unspezifischer Reaktion mit zellulären Proteinen. Die Präzipitate wurden dreimal in 1% Triton X-100, 0.1 % SDS in 10 mM Tris-Cl, pH 7.4 gewaschen und zuletzt in SDS-PAGE-Probenpuffer unter reduzierenden Bedingungen (5% Mercaptoethanol) bei 95 °C für 5 min inkubiert. In einigen Fällen erfolgte zuvor ein Verdau des Lysats mit Neuraminidase (aus *Cl. perfringens*, Roche Nr. 1585886) mit 10 mU des Enzyms für 60 min bei 37 °C. Die Elektrophorese erfolgte in 8%, 10% oder 12 % SDS-Polyacrilamidgelen. Die Gele wurden anschließend mit AmplifyTM behandelt, getrocknet und für 2-4 Tage bei -70 °C auf einem Röntgen-Film (Hyperfilm-MPTM) exponiert.

Die Immunpräzipitation aus dem Zellkulturüberstand zum Nachweis von freiem Protein erfolgte ohne Voradsorption aus 200 µl Medium, das zuvor zur Beseitigung von Zellresten 10 min bei 14.000 UPM zentrifugiert worden und mittels Zugabe von Tris-HCl auf einen pH 7.4 eingestellt worden war.

Das Protokoll für die Markierung ist in Abb. 29 schematisch dargestellt:

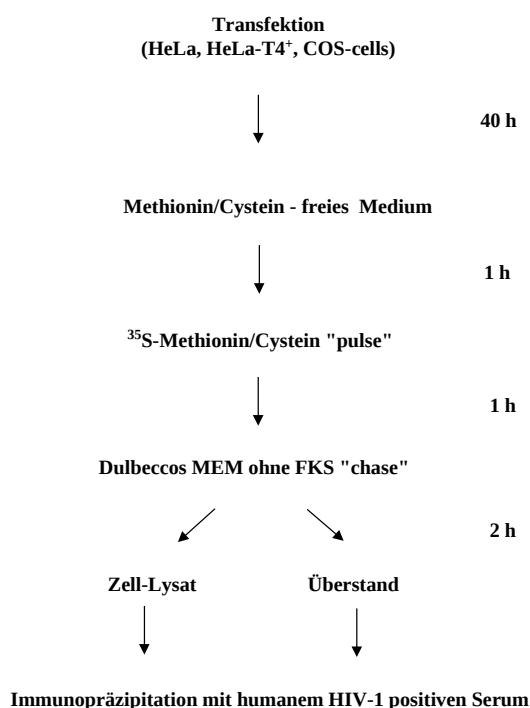


Abb. 29 Schematische Darstellung der Radioimmunopräzipitation zum Nachweis von HIV-1 Proteinen.

2.5.3 Immunoblot

Für die Immunoblot-Analyse wurden die Zellen 40 h nach Transfektion lysiert in Probenpuffer (70 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerol, 5% Mercaptoethanol, Bromphenolblau) und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 8%, 10% oder 12 % SDS-Polyacrylamidgelen. Die Polypeptide wurden auf eine modifizierte Nitrozellulose-Membran überführt (ImmobilonTM). Die Blockierung freier Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation mit Blockierungsreagenz (1% Tween 20, 1% Bovines Serum Albumin) über 2 h bei Raumtemperatur. Der spezifische Nachweis erfolgte durch Inkubation über 1 h mit HIV-1 spezifischen monoklonalen Antikörpern (anti-gp120, Behring No. 87-133/026; anti-gp41, Chessie 8; oder anti-Nef (Dupont Nr. 9302). Nach Waschen der Membranen wurden sie mit einem anti-mouse-horse-radish-peroxidase-Konjugat (Amersham[®]) über 60 min inkubiert. Die Reaktionen wurden mittels Chemilumineszenz (ECL-detection reagents, Amersham[®]) nachgewiesen.

2.5.4 Protein-capture-ELISA

Für den quantitativen Nachweis von HIV-1 gp120 aus Zellysat und Zellkulturüberstand wurde ein gp-capture-ELISA entwickelt, wie er schematisch in

Abb. 30 dargestellt ist.

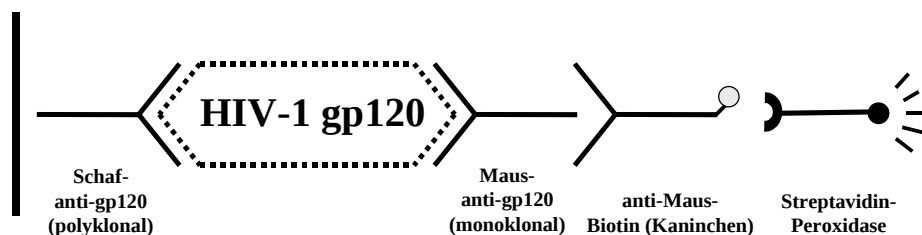


Abb. 30 Schematische Darstellung des gp120-capture ELISA. Links außen als schwarzer Balken die Festphase (Mikrotiterplatte).

An die Festphase (Nunc Immunoplate Maxisorp 96U) gebunden ist ein polyklonaler anti-gp120-Antikörper vom Schaf (Biochrom[®] D7324). Zellen wurden mit detergenzhaltigem Puffer lysiert, die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand in PBS/1% Triton X-100 verdünnt in die Mikrotiterplatte gegeben und über 2 Stufen ausverdünnt. Zellkulturüberstand wurde unverdünnt sowie in der Verdünnung von 1:4 ausgetestet. Die Inkubation erfolgte über

Nacht bei Raumtemperatur. Nach Waschen der Platte erfolgte die Zugabe von einem biotinylierten anti-Maus-Antikörper vom Schaf (Amersham[®] RPN1021) sowie ein Streptavidin biotinylierter horseradish peroxidase Komplex (Amersham[®] RPN 1051). Die Farbreaktion erfolgte mit einem o-Phenylendiamine (OPD) Dihydrochlorid (Sigma[®] P-8412). Als Standard diente ein kommerziell erhältliches HIV-1 gp120 (Dupont[®], Nr. NEA-201, 100µg), das über 8 Verdünnungsstufen beginnend bei 100 ng/ml im Doppelansatz auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt wurde und als Berechnungsgrundlage für die quantitative Auswertung diente.

2.5.5 Aufreinigen von extrazellulären Mikrovesikeln

Als Quelle für die zellfreien Mikrovesikel diente in allen Fällen Zellkulturüberstand von HeLa, HeLa-T4⁺, oder COS-Zellen, die mit den oben (s. u. 2.4) beschriebenen transient exprimierenden Vektoren transfiziert wurden.

2.5.5.1 Fraktionierte Ultrazentrifugation

Die Methodik zur Aufbereitung der Mikrovesikel ist schematisch in Abb. 31 dargestellt.

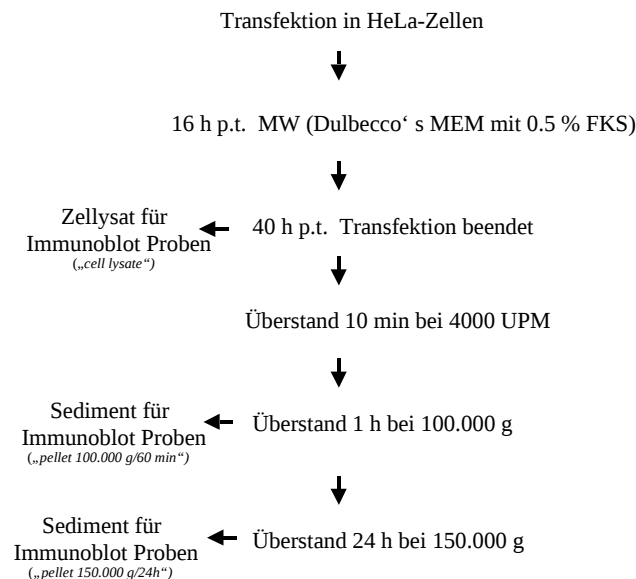


Abb. 31 Schematische Darstellung der Methodik zur Gewinnung und Nachweis von extrazellulären Mikrovesikeln. (MW = Mediumwechsel)

HeLa, HeLa T4⁺ oder COS-Zellen wurden im Dreifachansatz wie oben beschrieben (s. 2.2.4) transfiziert. Nach 16 h erfolgte ein Mediumwechsel auf ein Medium, das 2 ml Dulbecco's MEM mit 0.5 % FKS enthielt. 40 h nach Transfektion wurde der Überstand von den drei

Einzelansätzen vereint und zum Entfernen der Zelltrümmer 10 min bei 4000 UPM zentrifugiert. 5 ml des vorgeklärten Überstands wurden für 60 min bei 100.000 g zentrifugiert (Beckmann SW55 Rotor) und das Sediment direkt in 100 µl SDS-PAGE-Probenpuffer gelöst. Um den zellfreien Anteil an gp120 zu sedimentieren, wurde der Überstand der ersten Zentrifugation einer zweiten Zentrifugation über 24 h bei 150.000 g unterzogen und das Sediment wiederum in 100 µl SDS-PAGE-Probenpuffer gelöst. Die Zellysate sowie die Sedimente der ersten und zweiten Zentrifugation wurden im Immunoblot (s. u. 2.5.3) mit einem anti-HIV-1-gp120 Ak sowie einem anti-HIV-1 gp41 Antikörper untersucht.

Der enzymatische Verdau der Neuramininsäuren erfolgte mit Neuraminidase (aus *Cl. perfringens*, Roche Nr. 1585886) mit 10 mU des Enzyms für 60 min bei 37 °C. In einigen Experimenten wurde das Enzym dem vorgeklärten Zellkulturmedium zugesetzt, in anderen Experimenten wurde das Sediment der beiden Zentrifugationsschritte nicht in SDS-PAGE-Probenpuffer gelöst, sondern in PBS, dem dann anschließend der Verdau mit der Neuraminidase folgte. Als weitere spezifische Glykosidasen wurde N-glycosidase F (PNGaseF) aus *Flavobacterium meningosepticum* (Roche, No. 1365 185) sowie Endoglycosidase H aus *Streptomyces plicatus* (Roche, No. 1088726) verwendet.

2.5.5.2 Reinigung über einen Sucrosegradienten

Für die Reinigung der extrazellulären Mikrovesikel über einen Sucrosegradienten wurde das Sediment nach der ersten Zentrifugation in 200 µl PBS gelöst und diese Suspension auf einen diskontinuierlichen Gradienten (60% Sucrose/PBS bis 20 % Sucrose/PBS) überschichtet. Nach einer Zentrifugation über 60 min bei 100.000 g wurden vom Boden des Röhrchens 10 Fraktionen mit jeweils 300 µl entnommen. 75 µl einer jeden Fraktion wurden mit 25 µl eines 4-fach konzentrierten SDS-PAGE-Probenpuffers gemischt und im Immunoblot wie unter 2.5.5.1 untersucht. Die Sucrose-Konzentration der einzelnen Fraktionen wurde refraktometrisch (Zeiss Abbe-Refraktometer) bestimmt.

2.6 Real-time-PCR

2.6.1 Prinzip der Real-time TaqMan™ PCR

Im Gegensatz zur konventionellen PCR ermöglicht die Real-time-PCR-Technologie die simultane Durchführung der Amplifikation sowie der Detektion in einem Reaktionsgefäß. Dem Verfahren liegt der Anfang der 90'er Jahre beschriebene 5' Nuklease assay (172) zugrunde, bei dem man sich die 5' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zunutze macht. Der 1993 von der

Firma Applied Biosystems TaqManTM PCR Assay verwendet als Sonde ein Oligonukleotid, dessen 5' Ende mit dem Fluoreszenz-Reporter- Farbstoff (Fluorescein-Derivat, zumeist 6-Carboxy-Fluorescein, FAM) und das 3' Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat, zumeist 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, TAMRA) markiert ist.

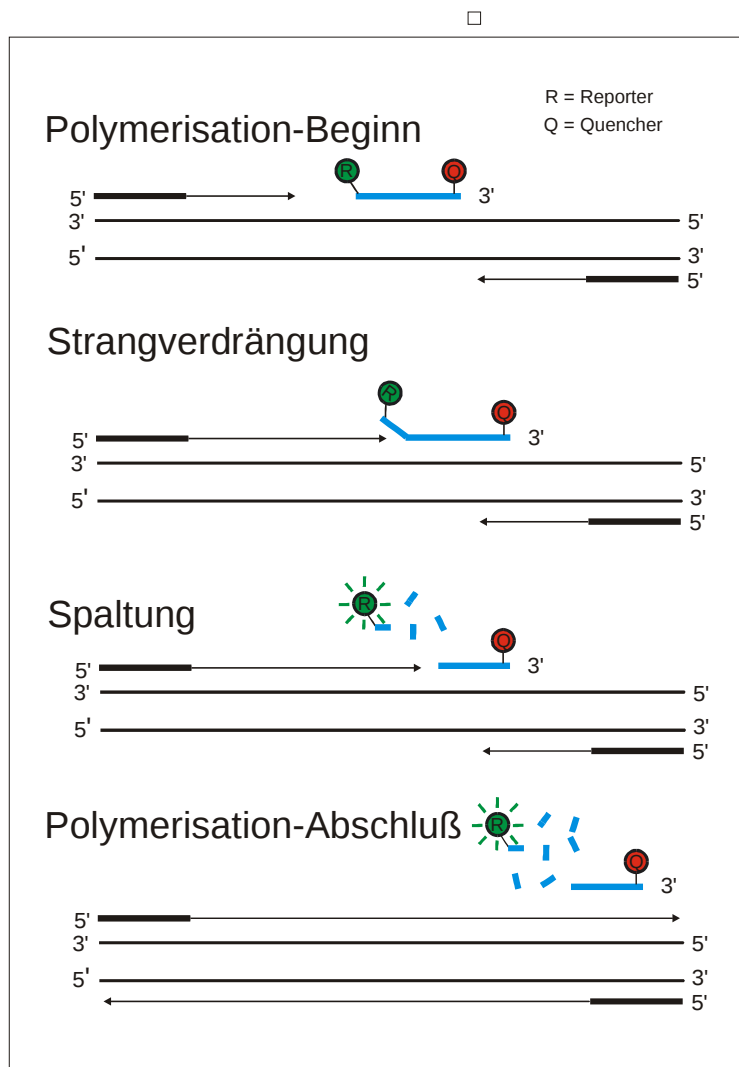


Abb. 32 Schema der Real-time TaqMan-PCR. Als entscheidende Modifikation gegenüber der konventionellen PCR ist der Einsatz einer fluoreszenz-markierten Sonde zu sehen, die am 5' Ende als Reporter (R) einen FAM-Farbstoff und am 3' Ende als Quencher (Q) einen TAMRA-Farbstoff besitzt. Die Sonde wird direkt bei der Amplifikation zugesetzt und bei der Polymerisation durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zerstört. Die dabei erfolgende räumliche Trennung von Reporter und Quencher erzeugt ein meßbares Signal, das von der CCD-Kamera des Gerätes gemessen wird.

Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher auf der intakten Sonde bewirkt, daß bei Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm kein Signal entstehen kann. Während der Annealing-Phase hybridisiert die Sonde zusammen mit den primern an der Matrize. In der Extensionsphase verdrängt die Taq-Polymerase die Sonde, die dabei hydrolysiert wird. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal wird von der CCD Kamera gemessen. Da dies bei jedem der normalerweise 40-45 Zyklen geschieht, erhält man quasi online ein Meßsignal, das proportional zum entstandenen PCR-Produkt ist. Da die Sonde exakt auf ein Primer-Paar abgestimmt sein muß und die spezielle Synthese damit recht teuer ist, gibt es als Alternative für die Erzeugung von Fluoreszenzsignalen die Verwendung von DNA-Farbstoffen, die sich

sequenz-unspezifisch an jede Form von doppelsträngiger DNA anlagern. Statt des klassischen DNA-Farbstoffs Ethidiumbromid verwendet man dabei zumeist das Sybr-Green, das sich in die kleine Grube der DNA-Doppelhelix ("minor-groove Farbstoff") interkaliert.

Entscheidend für Quantifizierungsstrategien ist dabei nicht die Stärke des Signals, das in den meisten Fällen vor den letzten Zyklen ein Plateau erreicht, sondern die Kinetik des Anstiegs. Dabei geht als Meßgröße ein, bei welchem Zyklus das Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt (CT = threshold cycle). In Abhängigkeit von der Menge an Matrize, die zu Beginn der Amplifikation vorlag, verschiebt sich dieser Wert mit steigender Menge zu einem früheren Zyklus (niedriger CT-Wert) und umgekehrt. Bei einer optimal verlaufenden Reaktion sollte sich die Menge an Amplifikaten mit jedem Zyklus verdoppeln, d.h. mathematisch kann die PCR beschrieben werden mit der Gleichung:

$$Y = X(1+E)^n$$

wobei **Y** die Menge an Amplicons, **X** die Startkopienzahl zu Beginn der PCR, **E** die Effizienz der Reaktion (im Idealfall 1.0) und **n** die Anzahl der PCR-Zyklen ist. Da die Effizienz von den Reaktionsbedingungen (Primerauswahl, Ampliconlänge, Qualität der Polymerase etc.) abhängt, ist es zur Quantifizierung von großem Vorteil, wenn bei jedem Experiment eine definierte Menge an sequenzspezifischem DNA-Standard in mehreren Verdünnungsstufen mitgetestet wird und eine Standardkurve erstellt wird.

2.6.2 HgH-TaqMan-PCR

Für die Bestimmung von HIV-spezifischer mRNA nach transienter Transfektion war es nötig, die Transfektionseffizienz durch Kotransfektion eines unabhängigen Plasmides und dessen nachfolgende Messung der Expression zu kontrollieren. Dafür wurde das Plasmid pXGH5 ausgewählt, das für das menschliche Wachstumshormon (hGH) kodiert:

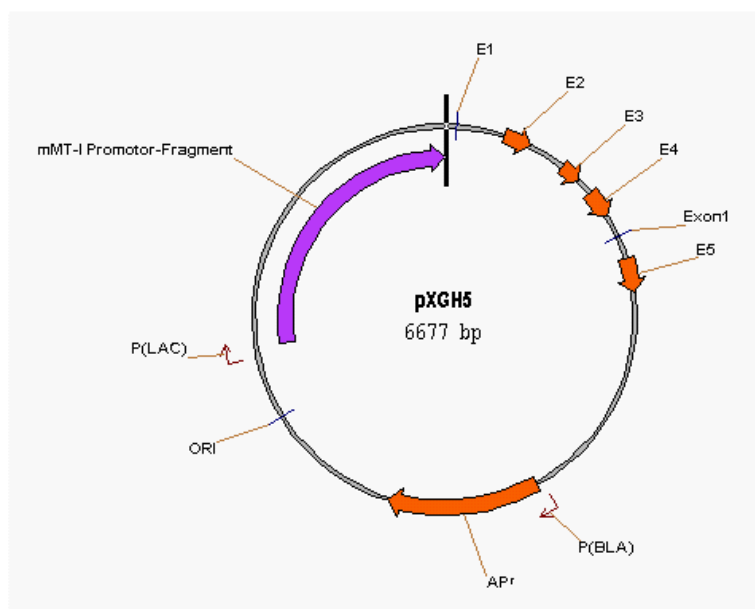


Abb. 33 Das für das humane Wachstumshormon (hGH) kodierende Plasmid pXGH5. Die fünf kodierenden Exons (E1-E5) sind mit roten Pfeilen dargestellt, unten in rot das für die Ampicillin-Resistenz kodierende β-Lactamase

Die Expression erfolgt nach RNA-splicing über insgesamt 5 Exons, so daß die zu erwartende komplett gespleißte RNA aussieht wie folgt:

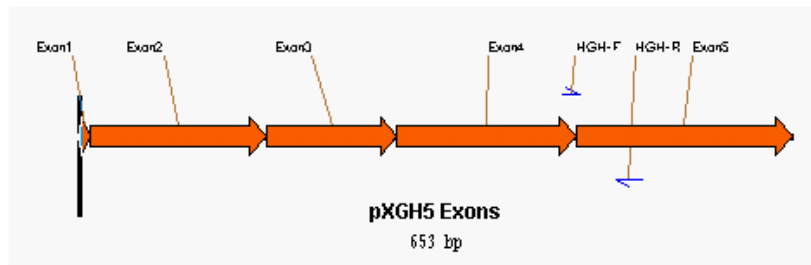


Abb. 34 Struktur der hGH-RNA, wie sie nach Transfektion in Eukaryonten vorliegt. In blau eingezeichnet die beiden in der PCR verwendeten primer HGH-F sowie HGH-R.

Die zwei für die TaqMan-PCR ausgewählten primer wurden so plaziert, daß sie das zwischen Exon 4 und Exon 5 liegende Intron (254 Basenpaare) überspannen. Darüberhinaus wurde der forward primer (HGH-F) so gewählt, daß er im Exon 4 beginnt, sein 3' Ende aber bereits im Exon 5 liegt. Beides dient dazu, zu verhindern, daß die bei der RT-PCR verwendeten primer nur die in der Zelle gebildete mRNA bzw. deren cDNA, nicht aber die DNA des transfizierten Plasmids erkennen können:

```

CCTCTGACAG CAACGTCTAT GACCTCCTAA AGGACCTAGA GGAAGGCATC 150
GGAGACTGTC GTTGACAGATA CTGGAGGATT TCCTGGATCT CCTTCCGTAG
CAAACGCTGA TGGGAGGCTG GAAGATGGCA GCCCCCGGAC TGGGCAGATC 200
GTTTGCAGACT ACCCTCCGAC CTTCTACCGT CGGGGGCCTG ACCCGTCTAG
TTCAAGCAGA CCTACAGCAA GTTCGACACA AACTCACACA ACGATGACGC 250
AAGTTCGTCT GGATGTCGTT CAAGCTGTGT TTGAGTGTGT TGCTACTGCG
ACTACTCAAG AACTACGGGC TGCTCTACTG CTTACAGGAAG GACATGGACA 300
TGATGAGTTC TTGATGCCCCG ACGAGATGAC GAAGTCCTTC CTGTACCTGT
  
```

Abb. 35 Auswahl der beiden für die hGH-PCR verwendeten primer (blaue Pfeile) sowie der Taq-Man Sonde (grüner Kasten) in einer cDNA-Darstellung. In rot eingezeichnet das 3' Ende des Exon 4. Die Suche nach den optimalen primern und Sonden erfolgte mit Hilfe der Primer Express™ - Software (Applied Biosystems).

Sequenz der ausgewählten primer und Sonde:

HGH-F: 5' CAAACGCTGATGGGAGGC 3'

Bindet zwischen den Positionen 151 and 168 mit einer Tm von 59°.

HGH-R: 5' GAACTTGCTGTAGGTCTGCTTGAA 3'

Bindet zwischen den Positionen 224 and 201 mit einer Tm von 59°.

TaqMan Probe: 5' CAGCCCCCGGACTGGGCA 3'

Bindet zwischen den Positionen 179 und 196 mit einer Tm von 68°.

Generell sollten für eine effektive TaqMan-PCR die primer so ausgewählt sein, daß sie bei ca. 60°C an die Matrize binden, die dazugehörige Sonde ca. 10 °C höher. Hinzu kommen eine Reihe weiterer Kriterien (kurze Amplicons, geringe Sekundärstrukturen der primer etc.), so daß man die Auswahl in der Regel software-gestützt vornimmt (Primer ExpressTM Software, Applied Biosystems). Die RT-PCR erfolgte in zwei Schritten: Die RT-Reaktion wurde mit dem Enzym Superscriptase II[®] RNase H⁻ Reverse Transcriptase (GibcoBRL, No. 18064-014) bei 45 °C unter Verwendung von oligo(dT) als primer durchgeführt, die anschließende Amplifikation der cDNA mit dem TaqMan[®]-Universal-PCR Master Mix (Applied Biosystems, No. 4304437) in einer Two-step-PCR (60°C annealing und extension, 95 °C Denaturierung) in einem PE5700-Zykler (Applied Biosystems).

Als Standard wurde ein Plasmid geschaffen (pSGhGHcDNA), das ein Stück der hGH-cDNA enthält, das das Amplicon der TaqMan-PCR umfasst. Das gereinigte Plasmid wird in drei Verdünnungsstufen (10000, 1000 sowie 100 Kopien/Ansatz) im Doppelansatz eingesetzt und dient damit als Kontrolle für die DNA-Amplifikation sowie für die Erstellung einer Standardkurve:

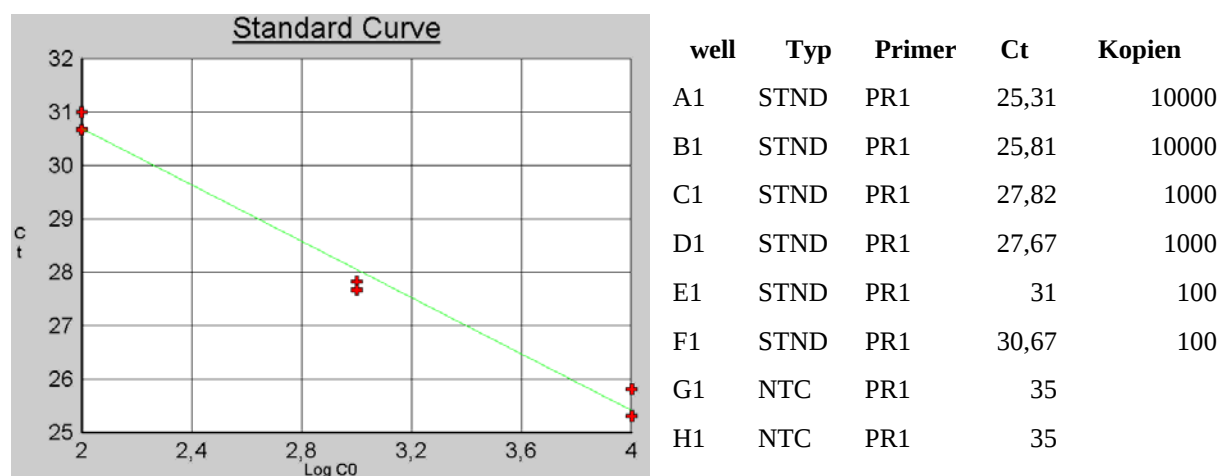


Abb. 36 PCR zum Nachweis von hGH-RNA. Das hGH-kodierende Kontrollplasmid pSGhGHcDNA wurde in 10.000, 1000 sowie 100 Kopien/Ansatz im Doppelansatz getestet und daraus eine Standardkurve erstellt (links). In der Tabelle rechts in der Spalte Ct die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenzsignale einen festgelegten Schwellenwert überschritten haben. Die Gesamtzahl der Zyklen betrug 35, die negativen Kontrolle (NTC = no template control) erreichen diesen Schwellenwert bis zum Schluß der Amplifikation nicht. Bei diesem Experiment wurde statt der TaqMan-Sonde die Sybr-Green-Technik eingesetzt.

Um bei der Sybr-Green-Technik Anhalte dafür zu gewinnen, ob das entstandene Amplifikat tatsächlich dem gesuchten entspricht, gibt es neben der Größenauftrennung in der Gelelektrophorese die Möglichkeit, im Anschluß an die Amplifikation eine Schmelzkurve des entstandenen Amplicons vom Thermozykler erstellen zu lassen. Dabei wird über ca. 15 min ein

Temperaturgradient von 60°C bis 95 °C erstellt, der bei Erreichen des T_m-Werts des Amplicon zu einer Freisetzung des intercalierten Sybr-Greens führt und gemessen werden kann:

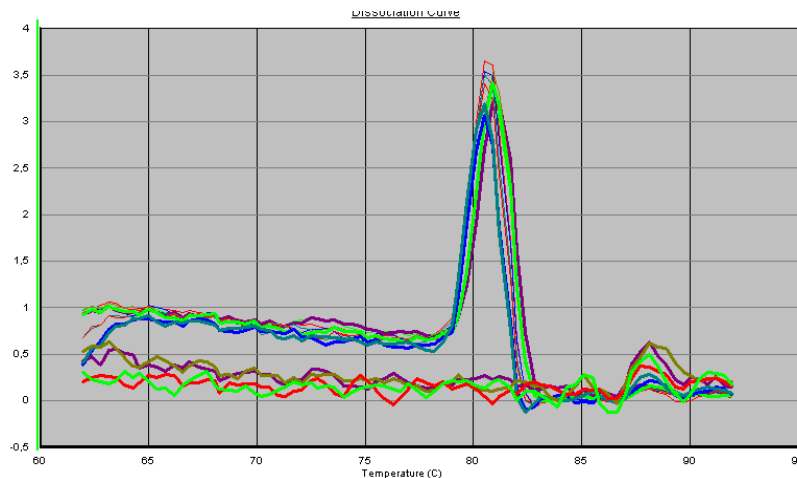


Abb. 37 Schmelzpunktanalyse des hGH-cDNA-Amplicons mittels eines Temperaturgradienten. Das Erreichen des T_m-Wertes des Amplicons (hier bei ca. 82 °C) führt zu einer Freisetzung des Sybr-Green-Farbstoffs.

2.6.3 Rev-mRNA-Nachweis mittels PCR

Der Nachweis von rev-mRNA nach Transfektion der gp41-N-Terminus-Deletionsmutanten (s. u. 2.4.1.5) erfolgte mit Hilfe des real-time PCR-Verfahrens unter Verwendung von Sybr-Green. Die rev-mRNA gehört zu der Gruppe der mehrfach-gespleißten HIV-kodierten mRNAs, wobei im Genom zwischen Exon 1 und Exon 2 ein Intron von ca. 2300 bp liegt. Die beiden PCR-primer wurden so gewählt, daß der 5'primer im Exon 1 und der 3'primer im Exon 2 liegt:

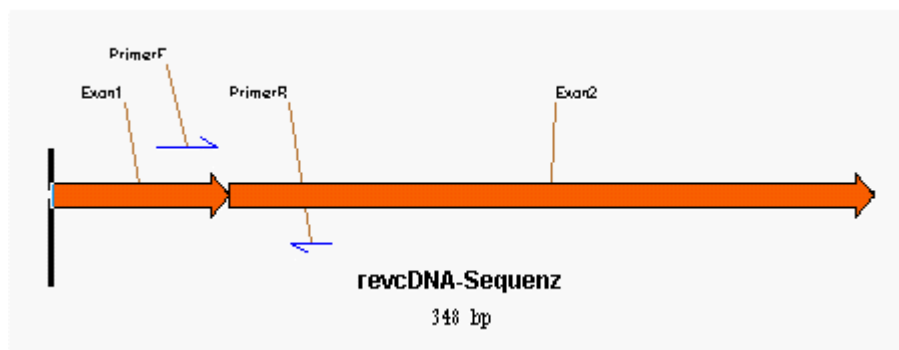


Abb. 38 rev-cDNA-Sequenz nach dem Herausspleißen des Introns. Die für die PCR verwendeten primer (primer F und primer R) erzeugen ein Amplicon von 75 bp.

Als Kontrolle diente ein revcDNA-Klon (pSGpNLA1Rev, s.u. 2.4.3), der zur Erstellung einer Standardkurve in 10.000, 1000 sowie 100 Kopien/Ansatz verwendet wurde. Als primer für die Amplifikation dienten:

HIVRevF: 5' AGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCA 3'

Bindet zwischen den Positionen 45 und 71 mit einer T_m von 58°.

HIVRevR: 5' TTCCTTCGGGCCTGTCG 3'

Bindet zwischen den Positionen 119 und 103 mit einer T_m von 59°.

2.6.4 Env-mRNA-Nachweis mittels PCR

Der Nachweis von Env-mRNA der gp41-C-Terminus-Deletionsmutanten (s.u.2.4.1.5) erfolgte mit Hilfe des real-time PCR-Verfahrens unter Verwendung von Sybr-Green. Die Env Expression im pSG-Vektor führt zu einer mRNA, die über ein β -Globin Intron (608 bp) hinweg gespleißt wird.

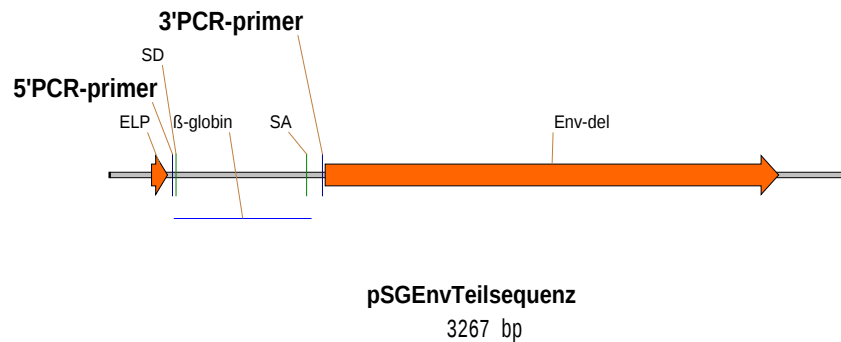


Abb. 39 Lage der beiden PCR-primer für den Nachweis von Env-mRNA. Dargestellt ist die genomische Sequenz des für die Transfektion benutzten pSG-Plasmids

Der 5'primer, der für die PCR verwendet wurde, bindet dabei vor dem β -Globin intron, der 3'primer am Beginn der Env-kodierenden Sequenz. Als primer für die Amplifikation dienten:

pSGEnv-F: 5' TCGATCCTGAGAACTTCAGGC 3'

Bindet zwischen den Positionen 71 und 91 mit einer T_m von 58°.

pSGEnv-R: 5' TCACTCTCATGAATTCGCCCTA 3'

Bindet zwischen den Positionen 181 und 160 mit einer T_m von 58°.

3 Resultate

3.1 Fusionskapazität von Wildisolaten

Auf der Basis von cytopathischen Veränderungen und der Replikationskinetik wurden 17 Wildisolate in zwei größere Gruppen eingeteilt, wie in Tab. 1 dargestellt:

Tab. 1 Phänotypen der HIV-1 Isolate

HIV-1 Isolat	PBL ^a	Zellfreie Übertragung auf ^b			
		PBL	HeLa-T4 ⁺ (CXCR4)	Makrophagen (CCR5)	PM1 (CXCR4, CCR5)
SI-230	3+	2+	+	-	+
SI-127	3+	3+	+	-	+
SI-378	3+	3+	+	-	-
SI-134	3+	3+	+	-	+
SI-140	3+	3+	+	-	+
SI-153	3+	3+	+	-	+
SI-168	3+	3+	+	+	+
SI-215	2+	3+	+	-	+
SI-440	2+	3+	+	-	+
NSI-402	1+	1+	+	+	+
NSI-146	1+	1+	+	+	+
NSI-420	0	0	+	+	+
NSI-470	0	0	-	-	-
NSI-461	D	D	-	+	+
NSI-465	0	0	-	+	+
NSI-498	0	0	-	+	-
NSI-499	0	0	-	-	+

3+ große und zahlreiche Syncytien, Riesenzellen

2+ zahlreiche Syncytien

1+ wenige Syncytien

0 kein cytopathischer Effekt

D Zelltod

+ übertragbar, bestimmt mit PCR, IFT oder p24-Ag

- nicht übertragbar

^a Isolierung des Virus wurde mittels Kokultivierung mit normalen, stimulierten humanen PBLs. Das Monitoring erfolgte über die Bestimmung des p24 in Zellkulturüberständen.

^b Zellfreie Übertragung auf PBL wurde kontrolliert über PCR bei Isolat, die keine cytopathischen Veränderungen zeigten. Die Übertragbarkeit auf HeLa-T4⁺ Zellen wurde kontrolliert über die Immunfluoreszenz, auf PM1-Zellen und primäre Makrophagen durch Bestimmung des p24 im Zellkulturüberstand.

Bei den Syncytien-induzierenden (SI) Isolat war im Zellkulturüberstand p24 Ag (> 200 pg/ml) bereits nach 3-5 Tagen nachweisbar und Zellfusionen meist am 5.-6. Tag. Eingefrorene Zellkulturüberstände waren übertragbar auf HeLa-T4⁺ Zellen sowie auf frische PBLs, in denen sie wiederum Zellfusionen verursachten wie in Abb. 40 dargestellt.

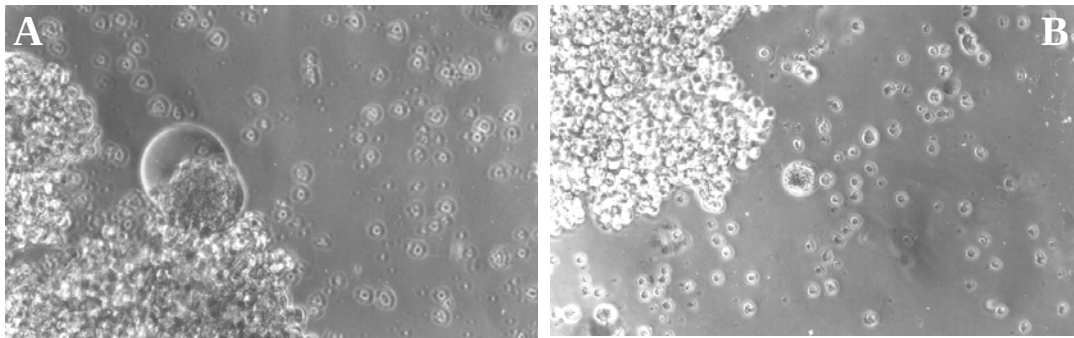


Abb. 40 Typisches Erscheinungsbild von Syncytien in PBL nach Infektion mit HIV-1. Die schnell replizierenden, stark syncytien-induzierenden Isolate erzeugen meist am 5.-6. Tag eine Vielzahl von Riesenzellen (A), die wie aufgeblasene Zellhüllen aussehen ("ghost cells"). Die etwas langsameren Isolate zeigen mittelgroße Syncytien wie in der Mitte von Abbildung B zu sehen.

Die zweite Gruppe (NSI) beinhaltet die weniger cytopathogenen Isolate mit geringerer oder nicht vorhandener Syncytien-Induktion und zeigt insgesamt mehr Heterogenität: Bei allen Isolaten dieser Gruppe waren die im Zellkulturüberstand nachweisbaren p24-Ag-Konzentrationen geringer (<100 pg/ml) und erst ab Tag 6 bis 10 nachweisbar. Außer NSI-402 und NSI-146 replizierten sich diese Isolate ohne Zeichen eines cytopathischen Effekts. PCR-Nachweise und Immunfluoreszenz zeigte jedoch, daß mit Ausnahme von NSI-470 und NSI-499 alle Isolate übertragbar waren auf PBL und/oder HeLa- $T4^+$ -Zellen. Das Isolat NSI-406 führte sowohl in der ersten wie in weiteren Passagen zu vorzeitigem Zelltod, was sich in der Kultur an einer Anhäufung von pyknotischen Zellen zeigte.

3.2 Korezeptorenanalyse

Für die Korezeptorenanalyse wurden primäre Makrophagen (CCR5) sowie PM-1 Zellen (CXCR4, CCR5) verwendet wie unter 2.1.3 beschrieben. Von der SI-Gruppe war nur das Isolat SI-168 übertragbar auf Makrophagen, alle Isolate außer SI-378 replizierten sich in PM1-Zellen (s. Tab. 1. Die zweite Gruppe (NSI) zeigte sich wiederum heterogener: Fünf Isolate ließen sich auf Makrophagen sowie auf PM-1 Zellen übertragen, während sich die anderen nur in einem Zelltyp replizierten. Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß sieben Isolate sich als CXCR4-trop, vier Isolate als dual-trop (SI-168, NSI-402, NSI-146, NSI-420) und fünf Isolate als CCR5-trop erwiesen (NSI-461, NSI-465, NSI-498, NSI-499). Ein Isolat (NSI-470) konnte nicht klassifiziert werden. Das dual-trope NSI-402 war das einzige Isolat, daß zu extensiven Fusionen in PM1-Zellen führte.

3.3 Einfluß von Variationen im V3-loop

Mit einigen der in den vorangegangenen Kapiteln bereits beschriebenen Wildisolaten wurde der Versuch unternommen, durch einen gezielten Austausch der V3-Regionen mit dem Laborstamm Aufschlüsse über die Fusionskapazität dieser Region zu gewinnen. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß aufgrund der hohen Variabilität in den flankierenden Regionen der V3-Region, die auch die für die Klonierung notwendige Restriktions-Schnittstelle betraf, nur ein Teil der V3-Regionen sich amplifizieren und in den Vektor klonieren ließ. Bei einigen Isolaten gelang es, zumindest die V3-Region zu sequenzieren. Die untersuchten V3-Regionen sind in Abb. 41 dargestellt:

	301	338
SVATGXbade1	NTSVFIN C TRPNNNTRKSIRIQR GPGR AFVTIGK..IGNMRQAH C NISR	
PV3-127	KEP-----R-TL...VYY...QI.-DI-----L--	
PV3-134	-E-IV-----G-T-.R.H-HI----T-Y---...-DI-R-----L--	
PV3-440*	-----T-A-SST-----SA-V-...-I-----	
PV3-134*	-E-IV-----G-T-.R.H-HI----T-Y---...-DI-R-----L--	
PV3-680*	GE----R-P----I---G-TS...-SV-LY-.RCYS-DI-----	

Abb. 41 Sequenzen der V3-Regionen, die aus Patienten-Isolaten erhalten wurden. Oben die Sequenz des Ausgangskonstrukts SVATGXbade1, die aus dem Labor-Plasmid pNLA1 stammt. Rot markiert die für die Ausbildung des V3-loops nötigen Cysteine an den Positionen 301 und 338 (vgl. Abb. 9). Ebenfalls rot gekennzeichnet ist die weitgehend konservierte Spitze des loops mit der Konsensus-Sequenz GPGR. Von den unteren drei Isolaten (mit * gekennzeichnet) existieren nur die Sequenzierungen und keine rekombinanten Konstrukte.

Dabei zeigte sich trotz aller Variabilität innerhalb dieser Region, daß die beiden für die Ausbildung der Schleife notwendigen Cysteine konserviert waren und ebenfalls die Spitze der Schleife mit dem GPGR-Motiv bis auf das letzte Isolat (PV3-680*) ebenfalls konserviert ist. Die Länge der zwischen den Cysteinen liegenden Region variierte zwischen 30 und 34 Aminosäuren.

Von zwei V3-Regionen konnten rekombinante Konstrukte hergestellt werden. Sie wurden parallel mit dem Ausgangskonstrukt SVATGXbade1 mittels Mikroinjektion transfiziert. Nach 24h wurde anhand der fluoreszierenden Zellen die Gesamtzahl der injizierten Zellen bestimmt und diese als Berechnungsgrundlage genommen. Die Zellfusionen wurden in zwei Kategorien (4-9 ZK sowie >10 ZK) getrennt ausgezählt. Dabei zeigten sich Unterschiede nicht bezüglich der Anzahl, aber bezüglich der Größe der Fusionen: Während das Ausgangskonstrukt zu ca. 45% Fusionen mit mehr als 10 Zellkernen führte, waren dies bei den beiden rekombinanten Konstrukten deutlich weniger (20 % bzw. 17%).

Konstrukt	Injektionen	nach 24 h	4-9 Zellkerne	>10 Zellkerne
neg. Kontrolle	230	168 (73%)	0	0
SVATGXbadel	207	132 (63%)	14 (11%)	60 (45%)
PV3-127	268	168 (63%)	21 (13%)	34 (20%)
PV3-134	255	150 (59%)	18 (12%)	25 (17%)

Tab. 2 Ergebnisse der Mikroinjektion mit den rekombinanten V3-Konstrukten. Die Plasmide wurden mittels Mikroinjektion am Tag 0 in ca. 200-300 Zellen injiziert. FITC-Dextran wurde kotransfiziert. Nach 24 h waren bei mikroskopischer Auszählung zwischen 59-73 % wiederzufinden. Es wurden die Zellfusionen in zwei Kategorien (4-9 ZK, >10 ZK) ausgezählt.

Die Ladungsberechnung (PCGENE® Charge Pro) ergab für den Laborstamm einen Wert von 7,8, für PV3-127 4,8 und für PV3-134 4,9. In der nachfolgenden Proteinanalyse im Immunoblot zeigte sich für das gp120 des PV3-127 ein anderes Laufverhalten:

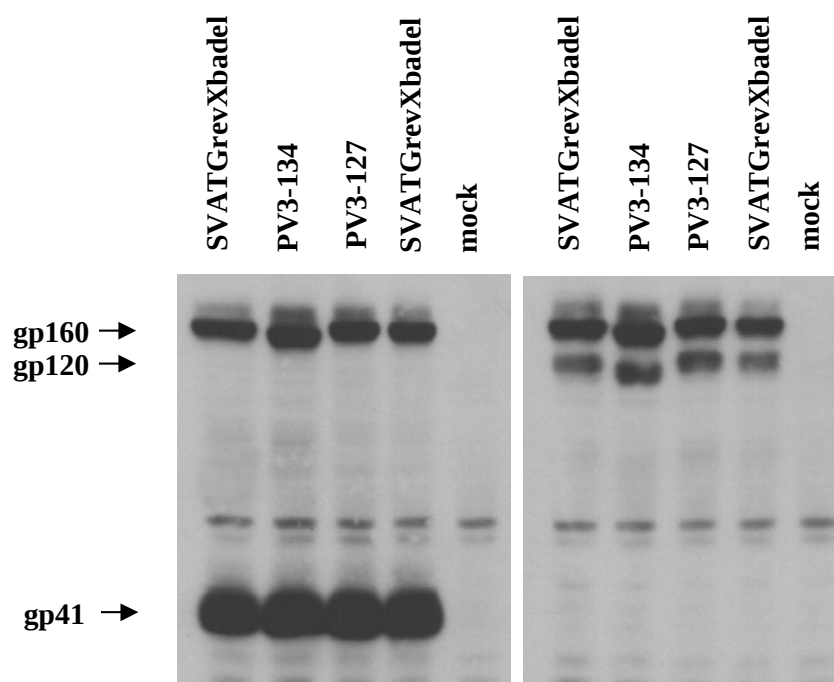


Abb. 42 Immunoblot der rekombinanten V3-Konstrukte. Zellysat wurde geblottet und der Immunoblot mit einem gp41-Mab (links) sowie einem gp120-Mab (rechts) durchgeführt. Zweimal aufgetragen als Kontrolle das Ausgangskonstrukt SVATGXbadel, in der letzten Spalte die mock-transfizierte negative Kontrolle.

Dagegen waren keine Unterschiede bezüglich der Spaltbarkeit des gp160 auszumachen: Weder bei dem gp120 (s.Abb. 42, rechts) noch beim gp41 (s.Abb. 42, links) waren signifikante

Unterschiede in der Menge zu sehen. Bei einer abschließenden Analyse in Radioimmunopräzipitation von Zellysat und Zellkulturüberstand waren darüberhinaus auch keine Unterschiede im Hinblick auf das shedding von gp120 von der Zelloberfläche zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

3.4 Einfluß von Variationen im gp41-N-Terminus

3.4.1 Sequenzanalyse der rekombinanten Isolate

Die Sequenzanalyse des gp120-C Terminus sowie des gp41-N Terminus erfolgte aus allen in Tab. 1 enthaltenen Isolaten (5, 7). Bei einigen Isolaten wurden bis zu 5 verschiedene Klone untersucht, die aus der Rekombination mit einem einzigen PCR-Produkt stammten (s. Abb. 43, pSI-168 A-C oder pNSI-146 A-F). In einigen Fällen erfolgte die Sequenzierung aus Produkten, die aus verschiedenen PCR-Ansätzen stammten (s. Abb. 43, pSI-215 A und C sowie 215-2). Ein Kontrollplasmid, pSI-000, wurde erhalten durch Amplifikation mit DNA, die aus HTLV-IIIB infizierten H9-Zellen (137) stammte. Die dabei erhaltene Sequenz war identisch mit der für das Isolat HXB2 publizierten Sequenz (249). Die Sequenzierung erfolgte bei einem Großteil der Plasmide manuell mit der enzymatischen Methode nach Sanger (288) unter Zuhilfenahme des T7-Sequencing Kit (Pharmacia®) und ³⁵S-dATP. Für die späteren Analysen erfolgte die Sequenzierung mit Hilfe des Biomedizinischen Forschungszentrum der Universität Düsseldorf auf dem dort vorhandenen Sequenzier-Automaten ABI-PRISM Modell 377.

Es zeigte sich, daß die N-terminale Region des gp41 die höchste Variabilität aufweist und flankiert wird von der konservierten Spaltstelle (REKR↓, Aminosäureposition 508-511, s. Abb. 43) und dem doppelten FLG-Motiv (Position 519-524). Zwischen diesen Regionen weisen natürliche Isolate zwischen 6 und 8 Aminosäurepositionen auf. Die Verteilung der insgesamt 9 Positionen folgt in Abb. 43 der Einteilung von Myers et al (249), wobei das nicht konservierte Glycin in Position 4 und das nachfolgende hochkonservierte Glycin in Position 7 positioniert werden. Wir fanden ein Isolat (pNSI-146) mit einer bisher nicht beschriebenen Insertion von M oder V in Position 3, wodurch durch G von Position 3 in Position 4 verschoben sind. Eine weitere Variante wurde bei den Isolaten pSI-215 A,C und 2 sowie pSI-440 in Position 2 gefunden, bei der ein V durch ein A ersetzt ist. Als überraschendste Variante fand sich ein Prolin bei denselben Isolaten in Position 3 (bzw. 4 oder 5), welches das G an dieser Stelle ersetzt. Das Fehlen eines G in dieser Position wurde bei zwei weiteren Isolaten (pNSI-461 sowie pNSI-465) gefunden.

	470	490	510	530	550	570	Fusionen nach Transfektion ^b																			
pSI000	PGGGNMRDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPT <u>KAKRRVVQREKRAV</u> .G.IGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQ						100																			
pSI230				V		K	103																			
pSI127	---D-----	Q-----					104																			
pSI127-2							119																			
pSI378	---D-----	Q-----					86																			
pSI378-2	---D-----	Q-----			I		103																			
pSI134				ML	M	R	I	119																		
pSI140			I		I			96																		
pSI153	---D-----	II-----		TL	M	I		90																		
pSI168A	---D-----			VV	M	R	IA	93																		
B	---D-----			VV	M	I		103																		
C				VV	M	I		90																		
pSI215A	---D-----	IQ-----	R	A	PI	I	R	75																		
C		IQ-----	R	A	PI	I	R	nd																		
pSI215-2	---D-----	IQ-----	R	A	PI	I	R	52																		
pSI440	---D-----	IQ-----	I	R	A	PI	I	72																		
pNSI402	---D-----	II-----		TL	M	I		93																		
pNSI146A	---D-----			V	L	V	I	99																		
C				M	L	V	I	123																		
D				M	L	M	I	110																		
E				V	L	V	I	87																		
F	---D-----			V	L	V	I	90																		
pNSI420	---D-----			T	M			105																		
pNSI470		Q-----						108																		
pNSI461	---D-----	R-----		TL	V	A	M	107																		
pNSI465			S	S	TL	M	I	23																		
pNSI498	---D-----	I-----	I	R		M	L	116																		
pNSI499	---D-----	I-----	R			M		94																		
pSI000	PGGGNMRDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPT <u>KAKRRVVQREKRAV</u> .G.IGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQ																									
publiz.	LA	D	K	INK K	IQ R	L T	I	R	R	E	I	.TL MV IM V L	M V F A		CRAVA T L V I	G	T	L	M	D	H	S	M K	D	M	E K
bestätigt:	D				IQ R		I	R				.TL MV I V	M V		VA L I							S	M K			
neu:					I		S				SAV.P M			I			S	R								

Abb. 43 Sequenzen der rekombinanten gp120 C Terminus/gp 41 N Terminus Konstrukte. Die Spaltstelle zwischen dem gp120 und dem gp41 befindet sich hinter dem Motiv REKR (Pos. 508-511), die in der obersten Zeile unterstrichen ist. Die 9 N-terminalen Positionen sind in Fettdruck hervorgehoben. ^b = Prozent von pSI000

Die zuletzt genannten Variationen sind auf natürliche Mutationen im viralen Genom und nicht auf PCR-Artefakte zurückzuführen, da sie bei zwei unabhängigen Isolaten von demselben Patienten gefunden wurden, die im Abstand von ca. 1 Jahr isoliert wurden. Ebenso wurde das Methionin/Valin in Position 3 in allen rekombinanten Konstrukten eines einzigen Isolats gefunden, das zudem auf ein zusätzliches Kodon zurückzuführen ist. Unsicherer dagegen ist die Relevanz einer Variation in Position 1 des gp41-N Terminus von Alanin zum Serin, die nur einmal im Klon pNSI-465 gefunden wurde.

N- und C-terminal dieser bisher beschriebenen Region ist die Variabilität erheblich geringer. Viele der publizierten Variationen konnten wir bestätigen (s. Abb. 43, unten); zusätzlich wurde ein Isoleucin in Position 488 bei zwei Isolaten (pSI-153 und pNSI-402) und ein Arginin in Position 533 bei zwei weiteren Isolaten (pSI-215 A und pSI-440) gefunden.

Der Vergleich zwischen den Klonen, die von SI-Isolaten, mit denen, die von NSI-Isolaten stammen, brachte keine systematische Korrelation zwischen der Aminosäuresequenz der untersuchten Region mit den Replikationscharakteristiken und der Zytopathogenität der Originalisolate hervor.

3.4.2 Fusionskapazität der rekombinanten Plasmide nach Transfektion

Die in Abb. 43 enthaltenen Sequenzen wurden in den Expressionsvektor envPstRRE eingeführt und die Fusionskapazität nach Transfektion in HeLa-T4⁺ Zellen bestimmt (s. u. 2.5.1). Zum Vergleich wurden sie auf das Plasmid pSI-000 bezogen und in Prozent berechnet (s. Abb. 43, rechte Spalte), wobei die Zählung der Synzytien 40 h nach Transfektion erfolgte. Synzytien wurden bei allen Konstrukten beobachtet, und es wurden wiederum keine Unterschiede zwischen Klonen, die von SI- oder NSI-Isolaten stammten, gefunden. Bezüglich der Kinetik, mit der sich die Synzytien ausbildeten, wurden einige Konstrukte gefunden, die sich als verlangsamt erwiesen: pNSI-465 (REKR↓A → REKR↓S) führte zu einer verlangsamt Synzytienformation mit weniger Zellkernen pro Fusion, die prozentual bei ca. 23 % gegenüber der Kontrolle lag. Die drei Klone des Isolats pSI-215 (A, C, -2) sowie der Klon pSI-440 zeigten ebenfalls geringere Synzytienbildung zwischen 50 und 70% der Kontrolle als Hinweis darauf, daß die Funktionalität des Glykoproteins bei diesen Konstrukten verändert ist.

3.4.3 Glykoproteinexpression der rekombinanten Klone

Die Glykoproteinexpression wurde im Immunoblot und mit Hilfe der ELISA-Technik (s. 2.5.3 und 1) bestimmt. Von den 28 getesteten Konstrukten exprimierten alle das Vorläuferprotein gp160. Bei der Analyse der Spaltprodukte gp120 und gp41 zeigten sich folgende Ausnahmen:

Die Klone, die von den Isolaten SI-215 sowie SI-440 stammten, zeigen neben einer verminderten Fusionskapazität (s.u. 3.4.2) geringere Mengen an Spaltprodukten gp120 und gp41 (s. Abb. 44). Gemeinsam ist diesen Konstrukten das Prolin an Position 3 des N-Terminus, d.h. das Prolin an dieser Stelle scheint die Prozessierung des Glykoproteins zu beeinträchtigen.

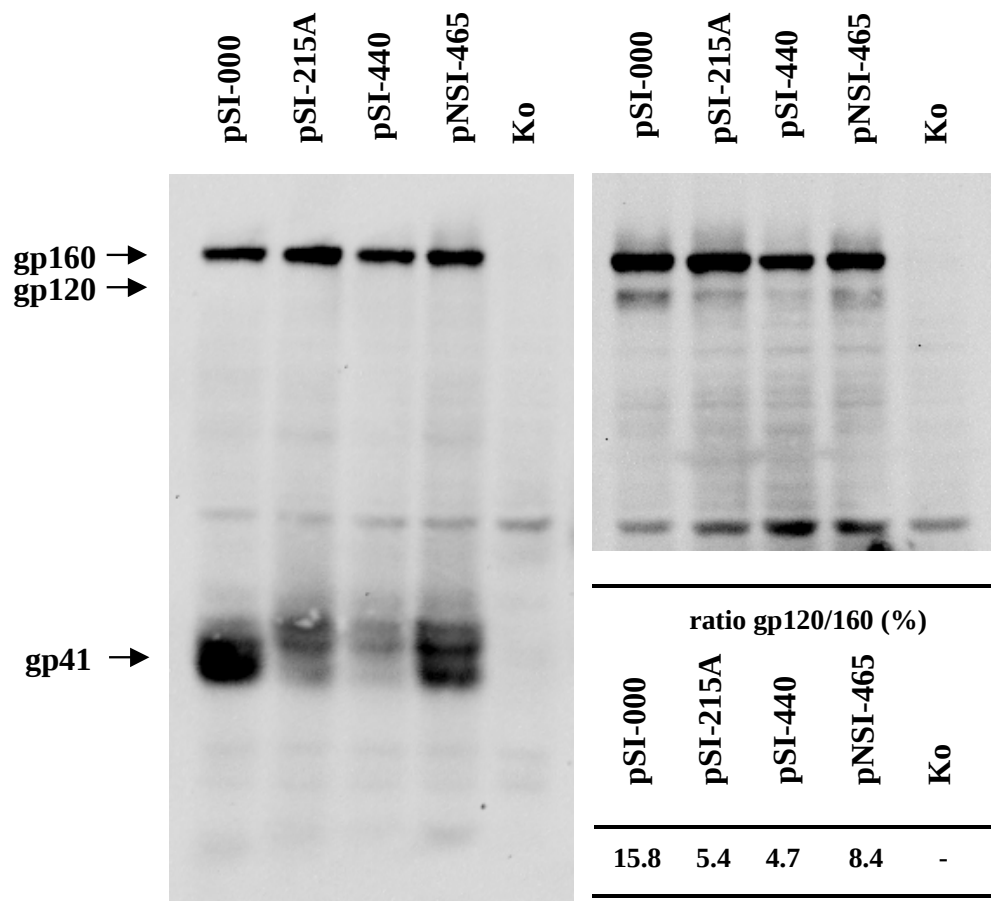


Abb. 44 Immunoblotanalyse des Kontrollkonstruktes pSI-000, pSI-215A, pSI-440 und pNSI-465. Linke Abbildung: Nachweis mit einem HIV-1 gp41 Antikörper, rechte Abbildung mit einem anti-HIV-1 gp120 Antikörper. Die Exposition und quantitative Auswertung erfolgte im Lumi-Imager® (Roche). Der Quotient von gp120-Signal zum gp160 Signal wurde errechnet (rechts unten).

Das Konstrukt pNSI-465 (REKR↓A → REKR↓S) zeigt ebenfalls geringere Mengen an gp120 und gp41 im Vergleich zum Kontrollkonstrukt (s. Abb. 44). Dieses Konstrukt wies dabei eine deutlich geringere Fusionskapazität auf (23% gegenüber der Kontrolle pSI-000).

3.4.4 Gp160/gp120 capture ELISA

Die geringeren Mengen an nachweisbaren Spaltprodukten können als Ursache eine verminderte Spaltbarkeit des Vorläuferproteins haben. Eine zweite Ursache könnte eine verminderte Assoziation der Untereinheiten sein, in deren Folge es zu einem erhöhten shedding von gp120 von der Zelloberfläche und erhöhtem Abbau des in der Membran zurückbleibenden gp41 kommt (s.u.1.5.1 und Abb. 10). Um diese beiden Effekte zu unterscheiden, wurde eine quantitative Analyse im gp-capture ELISA durchgeführt:

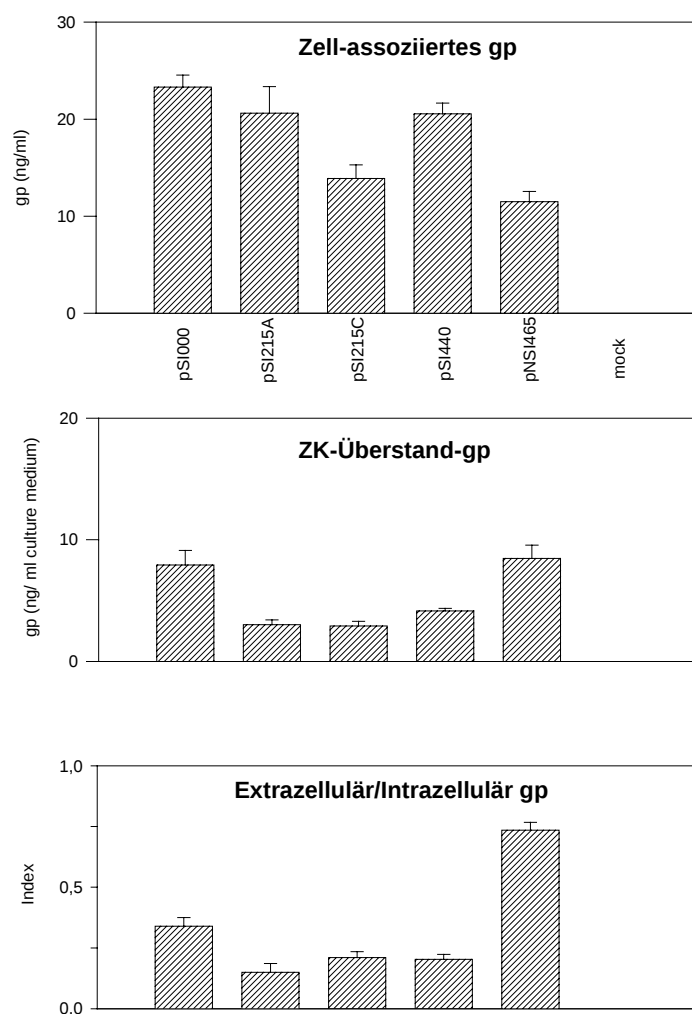


Abb. 45 gp-capture ELISA (s.u. 2.5.4) mit dem Kontrollkonstrukt pSI-000, pSI-215A und C, pSI-440 und pNSI-465.

Alle Klone, die vom Patienten SI-215 stammten (pSI-215A und C, pSI-440), zeigten reduzierte Mengen an extrazellulärem Glykoprotein, was darauf schließen läßt, daß diese Konstrukte in ihrer Spaltbarkeit des gp160 eingeschränkt sind. Dazu in klarem Kontrast verhielt sich das Konstrukt pNSI-465 (REKR↓A → REKR↓S): Es zeigte im Zellkulturüberstand erhöhte Mengen an Glykoprotein mit einem Index von zellfreiem zu zellgebundenem gp von ca. dem Zweifachen im Vergleich zum Kontrollplasmid pSI-000. Dies läßt auf ein erhöhtes shedding von gp120 von der Zelloberfläche schließen und ist dem Serin an Position 1 des gp41-N-Terminus zuzuordnen, da die weiteren in diesem Konstrukt gefundenen Aminosäureaustausche auch bei anderen Konstrukten gefunden wurden, ohne daß sie signifikante Einflüsse auf die Fusionskapazität hatten.

3.4.5 Durch Punktmutationen verursachte Veränderungen des N-Terminus

Es wurden über die in Abb. 43 dargestellten Konstrukte noch einige weitere Plasmide isoliert, die in hochkonservierten Regionen durch Punktmutationen hervorgerufene Veränderungen der Aminosäuresequenz aufwiesen, die zu Veränderungen der Funktionalität des Glykoproteins führten. Sie sind in Abb. 46 dargestellt:

	500	510	520	530
pSI-000	LGVAPT <u>KAKRRVVQREK</u> RAV . G . IGALFLGLGAAGSTMGAASMTLTV			
pSI-215D	-----R-----	AA . . PIGAL	-----K-----	I-----I-----
pNSI-146B	-----I-----	AVMG . LGAM	-----	I-----

Abb. 46 Aminosäuresequenzen der durch Punktmutationen hervorgerufenen Konstrukte pSI-215D sowie pNSI-146B im Vergleich zur Laborstammsequenz pSI-000. In Fett gedruckt sind bei den Sequenzen der unteren beiden Konstrukte die Mutationen, die für die verminderte Fusionskapazität verantwortlich sind. Die Spaltstelle zwischen gp120 und gp41 befindet sich hinter dem Sequenzmotiv REKR (in der oberen Sequenz unterstrichen).

Da die beiden Konstrukte in einer Schar von jeweils mehreren Klonen eines Experimentes nur einmal zu finden waren, liegt die Vermutung nahe, daß es sich dabei um PCR-Artefakte handelt. Da sie jedoch beide zu Verminderung der Fusionskapazität führten, wurden sie im nachfolgenden analysiert:

Das Konstrukt pSI-215D weist in dem hochkonservierten Motiv FGLFLG eine Mutation vom Glycin zum Lysin in Position 524 auf. Nach Transfektion in HeLa-T4⁺-Zellen zeigte sich ein völliger Verlust der Fusionskapazität. Um abzuklären, ob dieses Konstrukt überhaupt Env-Glykoprotein exprimiert, wurde primär eine Analyse in der Immunfluoreszenz durchgeführt, die in Abb. 47 dargestellt ist:

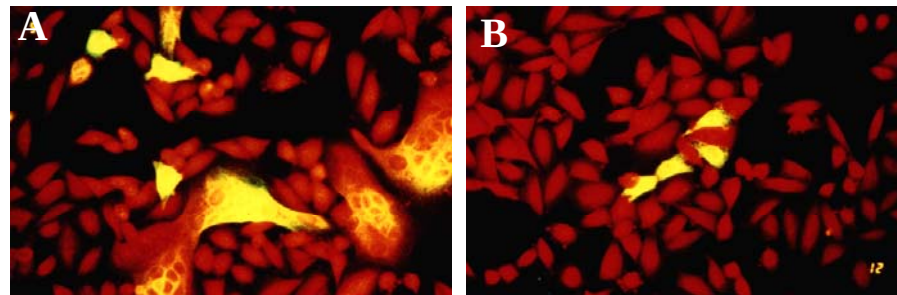


Abb. 47 Immunfluoreszenzanalyse des Konstruktes pSI-215D (B) im Vergleich zum Laborstamm pSI-000 (A). Nach Transfektion der Konstrukte wurden nach 40 h die Zellen fixiert und HIV-1-Env mittels eines monoklonalen gp120-Ak (Dupont Nr. 9305) nachgewiesen.

Es konnte gezeigt werden, daß dieses Konstrukt genügende Mengen an Glykoprotein produziert, die jedoch nicht zu Zellfusionen führen, sondern auf Expression von Einzelzellen reduziert ist. Zur weiteren Analyse wurde dieses Konstrukt in der Radioimmunpräzipitation im pulse/chase Verfahren untersucht, wie in Abb. 48. Während beim Wildtyp pSI-000 nach 60 min das Spaltprodukt gp120 zu sehen ist, sind bei der Mutante pSI-215D über dem gesamten Zeitraum keine Prozessierungsprodukte nachweisbar. Wie in Abb. 44 gezeigt, sind die Konstrukte, die vom Isolat SI-215 stammen, ohnehin schon in ihrer Spaltbarkeit eingeschränkt. Die zusätzliche Mutation am FLG-Motiv scheint diesen Effekt noch zu verstärken und damit die Spaltbarkeit und demzufolge die Fusionskapazität auf 0 Prozent zu senken.

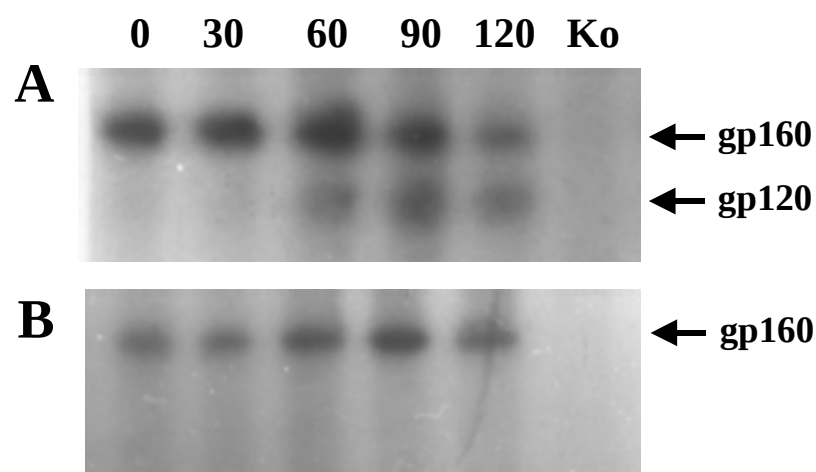


Abb. 48 Pulse-chase Analyse in der Radioimmunopräzipitation von HIV-1 Laborstamm pSI-000 (A) sowie pSI-215D (B). 40 h nach Transfektion wurden die Zellen für 60 min mit ^{35}S -Methionin markiert und anschließend über insgesamt 120 min in Normalmedium gehalten. Zum Zeitpunkt 0, 30, 60 und 90 min wurde jeweils eine Probe entnommen und mit einem HIV-1-positiven humanen Serum immunopräzipitiert.

Die zweite in Abb. 46 gezeigte Mutante ist pNSI-146B, die aus einem Isolat stammt, von dem fünf weitere Mutanten existieren Abb. 43. Sie zeigt eine durch eine Punktmutation hervorgerufene Mutation in der zweiten putativen Spaltstelle, die das Motiv KAKR in KIKR überführt. Nach Transfektion in HeLa-T4⁺-Zellen weist dieses Konstrukt eine auf 30% reduzierte Fusionskapazität gegenüber dem Wildisolat auf. In der Immunoblotanalyse waren deutlich reduzierte Mengen an gp120 zu sehen (s. Abb. 49).

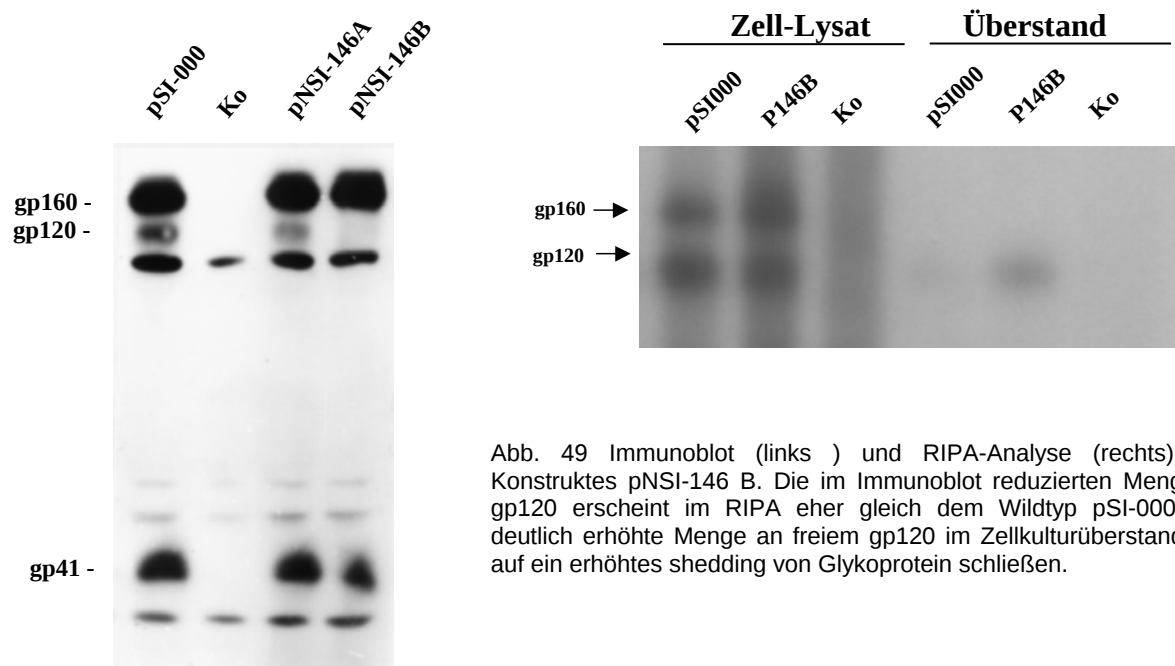


Abb. 49 Immunoblot (links) und RIPA-Analyse (rechts) des Konstruktes pNSI-146 B. Die im Immunoblot reduzierten Menge an gp120 erscheint im RIPA eher gleich dem Wildtyp pSI-000. Die deutlich erhöhte Menge an freiem gp120 im Zellkulturüberstand läßt auf ein erhöhtes shedding von Glykoprotein schließen.

In der Radioimmunopräzipitation schienen die Mengen an zellulärem gp120 gleich dem Wildtyp pSI-000, dafür waren jedoch im Zellkulturüberstand deutlich erhöhte Mengen an freiem gp120 nachweisbar, was auf ein erhöhtes shedding von Glykoprotein schließen läßt. Daraus läßt sich schließen, daß die Mutation an der zweiten putativen Spaltstelle nicht wie zu erwarten die Spaltbarkeit des Glykoproteins beeinflusst, sondern vielmehr die Assoziation der Untereinheiten durch Veränderungen der Proteinstruktur im gp120-C-Terminus.

Bei dem Versuch, diese Mutante im gp-capture-ELISA wie in Abb. 45 dargestellt zu analysieren, war festzustellen, daß weder zellulär noch extrazellulär Protein nachzuweisen war. Als Ursache konnte eine Nicht-Reaktivität des polyklonalen anti-gp120-Serums ausgemacht werden (vgl.

Abb. 30). Die Immunisierung des für die Serum-Herstellung verwendeten Schafes war mit einem Oligopeptid erfolgt, das aus der Sequenz des gp120-C-Terminus (Aminosäuren 502-516) des HIV-1 LAI-Stamms bestand (113), und damit beide putativen Spaltstellen abdeckt.

Offensichtlich hat der Austausch der einen Aminosäure von KAKR→KAIR zu einer so deutlichen Änderung der Proteinstruktur geführt, daß das Antiserum seine Bindungsfähigkeit vollständig verliert.

3.4.6 Hydrophobizitätsberechnungen des gp41-N-Terminus

Für alle in Abb. 43 enthaltenen Konstrukte sowie der in 3.4.5 genannten weiteren Mutanten wurde mit Hilfe des Programms HELIXMEM (PC/GENE, Intelligenetics, Inc. Mountain View, Calif. (104) der Hydrophobizitätsindex für die ersten 18 Aminosäuren des HIV-1 gp41-N-Terminus berechnet:

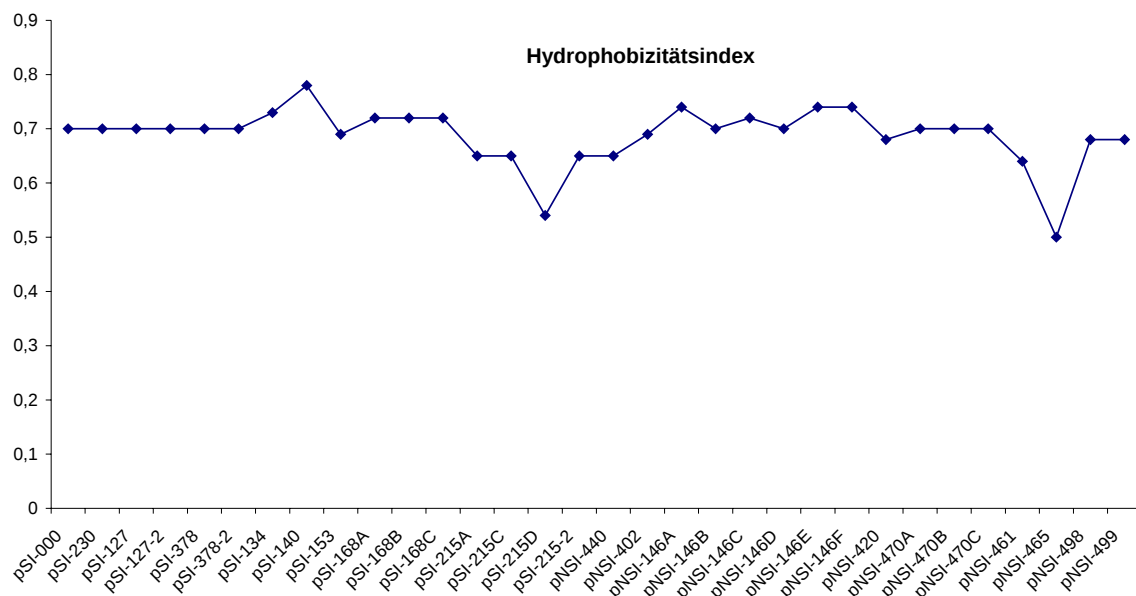


Abb. 50 Hydrophobizitätsindex für die sequenzierten N-Terminus-Mutanten mit Hilfe des Programms HELIXMEM. In die Analyse gingen die 18 N-terminalen Aminosäuren des gp41 ein.

Hierbei zeigte sich, daß trotz der hohen Variabilität des N-Terminus der hydrophobe Charakter erhalten bleibt mit Werten um 0.7 +/- 0.5 herum. Die einzigen Ausnahmen sind die zum einen die in 3.4.5 gezeigte Mutante pSI-215D, bei der die Einführung der Glutaminsäure zu einem Absinken des Index führt, sowie die in Mutante pNSI-465, bei der das Serin an Position 1 des N-Terminus ähnliche Auswirkungen hat.

3.5 Deletionen im gp41-N-Terminus und Beeinflussung der Spaltbarkeit

Im Nachfolgenden wurde der Frage nachgegangen, inwiefern Deletionen im N-Terminus des gp41 Einflüsse auf die Fusionskapazität und die Prozessierung des Glykoproteins haben (10).

	gp120 Spaltstelle ▼ gp41	Fusions- Kapazität (%)
env0dspenef	IAPT <u>KAKRRVVQ</u> REKRAVGIGALFLGFLGAAGS site 2 site 1	100.0
env-1dspenef	IAPT <u>KAKRRVVQ</u> REKRAV . IGALFLGFLGAAGS	84.2
env-2dspenef	IAPT <u>KAKRRVVQ</u> REKRA . . IGALFLGFLGAAGS	10.3
env-3dspenef	IAPT <u>KAKRRVVQ</u> REKRA . . . GALFLGFLGAAGS	0.6
env-4dspenef	IAPT <u>KAKRRVVQ</u> REKRA ALFLGFLGAAGS	0.0
envCHnef	IAPT <u>KAKRRVVQ</u> GEEF AVGIGALFLGFLGAAGS	0.0
env15Anef	IAPT <u>KAKRRVVQ</u> REKRAVGIGALFLGFLGA EGS	0.0

Abb. 51 Sequenz der N-Terminus-Deletionsmutanten sowie deren Fusionskapazität nach Transfektion in HeLa-T4⁺-Zellen. In den letzten beiden Zeilen die Chymotrypsin-Mutation envCHnef sowie die Shedding-Mutante env15Anef. In Fett gedruckt sind bei den letzten beiden Mutanten die ausgetauschten Aminosäuren.

Dabei zeigte sich, daß bezüglich der Fusionsaktivität die Deletion einer Aminosäure (env1dspenef) noch toleriert wurde, bei Deletion einer weiteren Aminosäure jedoch ein Absinken auf ca. 10% gegenüber dem Ausgangskonstrukt zu beobachten war (s. Abb. 51). Wie darüberhinaus in der Sequenz der Abbildungen A-C (s. Abb. 53) zu sehen ist, nimmt nicht nur die Anzahl, sondern auch die Größe der einzelnen Fusionen ab. Zum Vergleich wurden zwei weitere Konstrukte geschaffen und transfiziert: Die Mutante envCHnef enthält eine Mutation der Spaltstelle, die deren Trypsinempfindlichkeit in eine Chymotrypsinempfindlichkeit ändert. Dieses Protein kann nicht prozessiert werden, wenn nicht exogen Chymotrypsin zugegeben wird und zeigt folglich keine Fusionsaktivität. Ebenfalls keine fusionierenden Eigenschaften zeigt die Mutante env15Anef, die durch das Einführen einer polaren Aminosäure in den gp41-N-Terminus ein erhöhtes shedding des gp120 zeigt. Der Vergleich mit diesen beiden Konstrukten diente dazu, ein Ausbleiben von Fusionsaktivität funktionell zuzuordnen.

Da die deletierten Aminosäuren auf Genomebene unmittelbar vor der dem Bereich lokalisiert sind, der das Rev-responsive-Element (RRE) (s. Abb. 2) ausbildet, wurde ausgeschlossen, daß die Funktion des RRE beeinträchtigt ist. Wäre dies der Fall, dann würde das in der Zelle zu einer Behinderung des Umstellens von mehrfach gespleißter RNA (z.B. für rev, tat, nef, vpu, vif) zu

den einfach gespleißten RNAs (z.B. env) führen. Deshalb wurde mittels der Real-time-TaqMan PCR die Menge an rev-RNA nach Transfektion von Wildtyp und Deletionsmutanten gemessen:

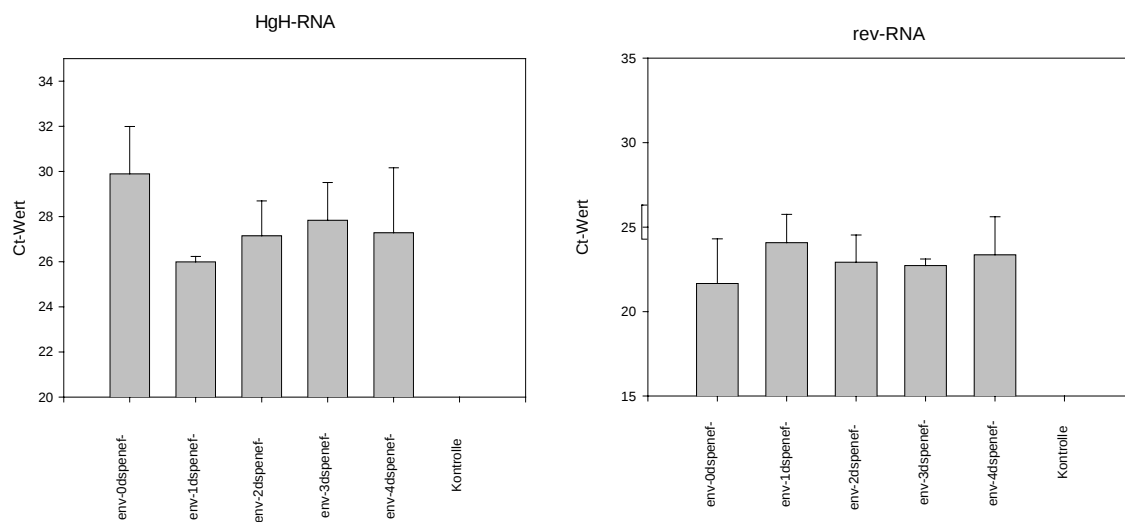


Abb. 52 Nachweis von mRNA der gp41-N-Terminus Deletionsmutanten: die Konstrukte wurden im 2-fach -Ansatz transfiziert (+ mock-Transfektion als Negativkontrolle) und nach 30 h die Gesamt-RNA extrahiert. Als interne Kontrolle wurde das Plasmid pXGH5 kotransfiziert und die HgH-spezifische mRNA bestimmt (linke Grafik). Der maximale ΔCt der Kontrollen betrug 5,32 Zyklen. Der ΔCt -Wert jeder einzelnen Transfektion wurde zur Normierung des Ct-Wertes der rev-mRNA berücksichtigt (rechte Grafik). Die Kontrollen erreichten bis zum 35 Zyklus nicht den Schwellenwert und sind deshalb in der grafischen Darstellung nicht berücksichtigt.

Dabei zeigte sich, daß keine systematischen Änderungen in der Menge an rev-mRNA nachzuweisen waren, so daß Störungen der rev-RRE-Interaktion bei den Deletionsmutanten nicht zu erwarten sind. Wäre diese Interaktion durch die Mutationen behindert worden, dann hätte man bei den Deletionmutanten erhöhte Mengen an rev-mRNA erwartet, bzw. gleichzeitig bei einem env-RNA-Nachweis verminderte Mengen.

Zur Abklärung, ob das Glykoprotein der Deletionsmutanten korrekt gespalten wird, wurden im Nachfolgenden RIPA- und Immunoblotanalysen durchgeführt (s.Abb. 54). Dabei konnten zwei Phänomene beobachtet werden: Ab der Mutante env-3dspenef- ist ein Verlust von gp120 (A) sowie gp41 (B) zu beobachten. Bei der Immunoblotanalyse war dieser Verlust erst bei der Mutante env-4dspenef- zu erkennen. Damit parallel einher geht das Auftauchen einer zweiten Bande an ungespaltenem Glykoprotein, die in der RIPA-Analyse meist eher wolkig (A), in der Immunoblot-Analyse jedoch distinkt erscheint. Parallel zum Verlust der Spaltprodukte gp120 und gp41 sind verminderte Mengen an freiem gp120 im Zellkulturüberstand nachweisbar (C), was bei einer verminderten Spaltbarkeit des Glykoproteins zu erwarten ist.

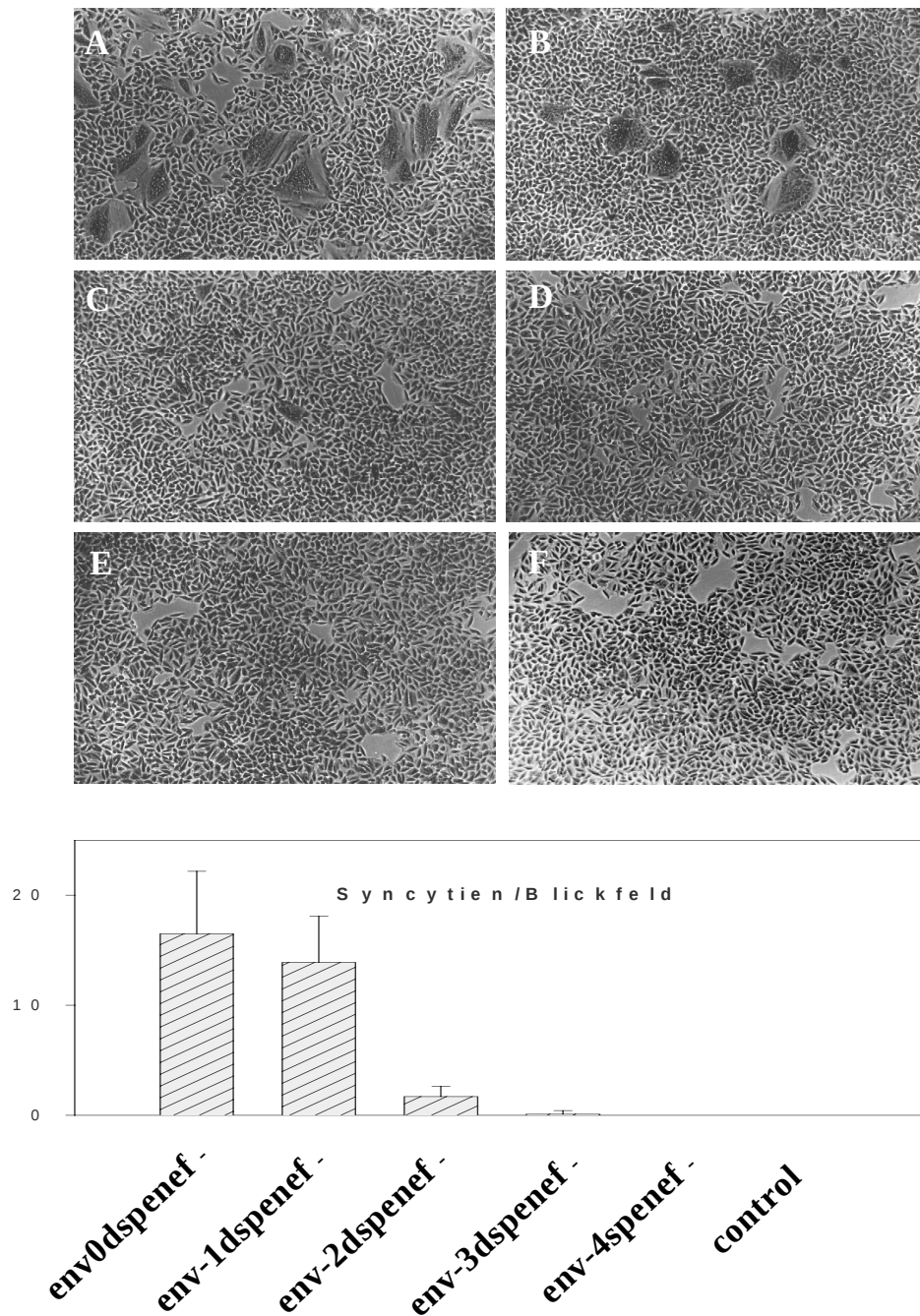


Abb. 53 Syncytienbildung nach Transfektion mit gp-41-N-Terminus-Deletionmutanten env0dspenef (A), env-1dspenef (B), env-2dspenef (C), env-3dspenef (D), env-4dspenef (E) sowie Kontrolle (F). 40h nach Transfektion wurden die Zellen mittels XC-stain gefärbt und die Anzahl der Syncytien quantitativ bestimmt. Die untere Grafik zeigt in der Ordinate die durchschnittliche Anzahl der Syncytien pro Blickfeld. Ein deutlicher Verlust der Fusionsaktivität sowohl in der Anzahl wie auch in der Größe der Syncytien war beim Übergang von der 1 nach 2 Aminosäure-Deletionen zu messen, wobei Deletionen von mehr als einer Aminosäure bei natürlich vorkommenden Isolaten nicht zu finden sind.

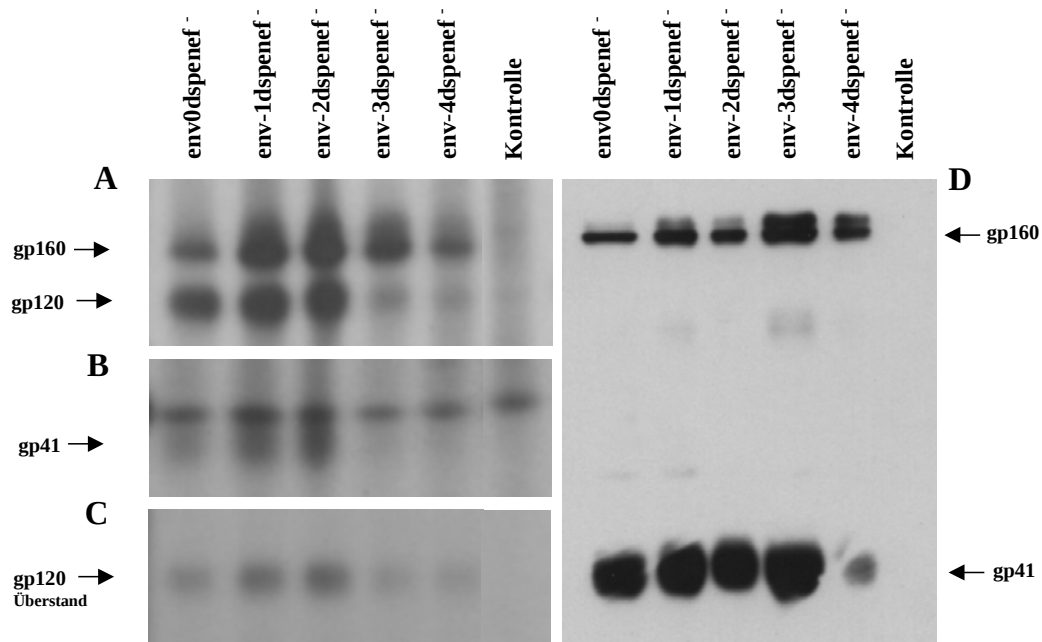


Abb. 54 RIPA (A, B, C) sowie Immunoblot-Analyse (D) des Wildtyps env0dspenf sowie der Deletionsmutanten env-1dspenf bis env-4dspenf. Für die RIPA-Analyse wurden 40 h nach Transfektion die Zellen für 2 h radioaktiv markiert und mit einem humanen HIV-positiven Serum immunpräzipitiert (A und B). Der Überstand wurde vom Zelldetritus befreit und ebenfalls mit dem humanen Serum präzipitiert (C). Für die Immunoblotanalyse (D) wurden die Zellen in gleicher Weise transfiziert und 40 h später lysiert. Die Nachweisreaktion wurde mit einem anti-HIV-1 gp41 Antikörper durchgeführt (9).

Es erfolgte die Analyse der Deletionsmutanten im gp-capture-ELISA (s. Abb. 56): Das zellassoziierte HIV-1 Glykoprotein zeigte vom Wildtyp zu den Mutanten mit zunehmender Deletion eine leichte Abnahme an Gesamtmenge. Im Kontrast zum Ergebnis des RIPA (s. Abb. 54) konnte bei der Mutante env-4dspenf jedoch eine Zunahme an zellfreiem Glykoprotein nachgewiesen werden, die mit der obigen Interpretation, nämlich dem Verlust an Spaltbarkeit nicht zu vereinbaren ist. Es soll jedoch an dieser Stelle betont werden, daß der gp-capture ELISA von seinem Design her nicht in der Lage ist, zellfreies gp120 von möglicherweise vorhandenem ungespaltenen Glykoprotein gp160 zu diskriminieren.

Ferner wurde der Wildtyp env0dspenf sowie die Mutante env-3dspenf in der RIPA-Analyse verglichen mit der nicht spaltbaren Mutante envCHnef sowie der Shedding-Mutante env15Anef. Dabei zeigten diese beiden Mutanten beide nur Spuren an gp120 im Zellysat (s. Abb. 55, A). In der Analyse des Zellkulturüberstands (s. Abb. 55, B) zeigte sich dann aber deutlich, daß der Verlust vom gp120 bei envCHnef auf die nicht vorhandene Spaltung von gp160 zurückzuführen ist, während bei env15Anef- freies gp nachweisbar ist, was sich von der

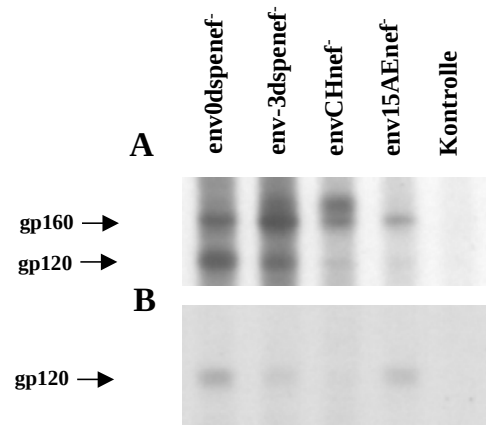
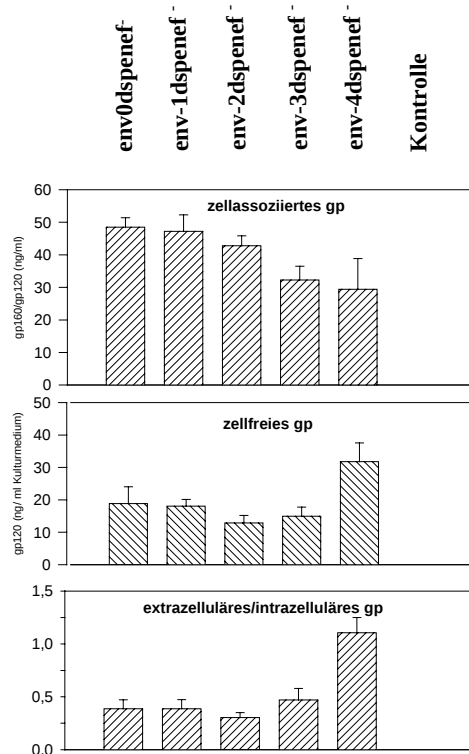


Abb. 55 RIPA-Analyse von Wildtyp, env-3dspenef- sowie der Vergleichskonstrukte envCHnef sowie env15Anef. 40 h nach Transfektion wurden die Zellen für 2 h radioaktiv markiert und mit einem humanen HIV-positiven Serum immunpräzipitiert (A). Der Überstand wurde vom Zelldetritus befreit und ebenfalls mit dem humanen Serum präzipitiert (B).

Abb. 56 Analyse des zellgebundenen sowie des zellfreien HIV-1 Glykoprotein im gp-capture-ELISA. 40 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und das intrazelluläre Glykoprotein quantitativ bestimmt (oben). Das bis dahin im Zellkulturüberstand kumulierte freie Glykoprotein wurde ebenso analysiert (Mitte) und der Index von extrazellulärem zu intrazellulärem Glykoprotein bestimmt (unten).

Oberfläche der transfizierten Zelle abgelöst hat. Ferner ist bei der Chymotrypsinmutante deutlich das ungespaltene Glykoprotein als Doppelbande erkennbar. Die Wanderung von ungespaltenem gp als Doppelband in der Elektrophorese bzw. im Immunoblot ist von anderen Autoren beschrieben worden. Dabei wurde die obere Bande als terminal mit Neuraminsäure-gekoppeltes gp identifiziert, das ein langsames Laufverhalten zeigt (366)(s.Abb. 78).

3.6 Terminale Glykosilierung des HIV-Glykoproteins

Zur Klärung, ob die oben beschriebene Doppelbande von gp160 in unserem System ebenfalls auf eine terminale Neuraminsäurekopplung zurückzuführen ist, wurde das RIPA-Protokoll durch einen Neuraminsäureverdau ergänzt (s. Abb. 57):

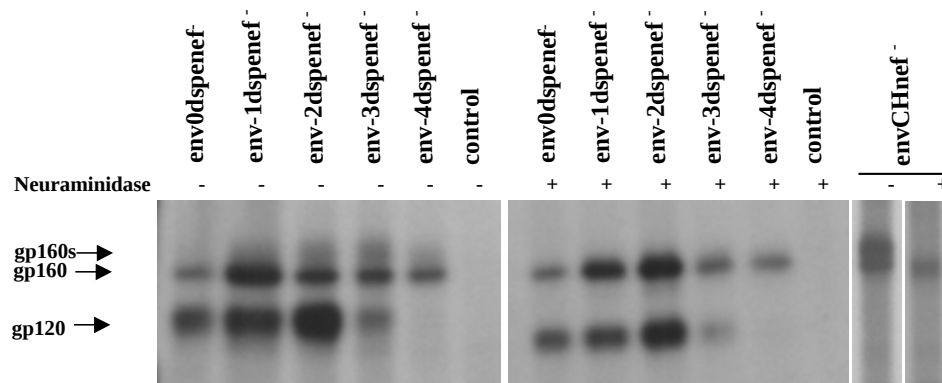


Abb. 57 RIPA-Analyse und Neuraminidase-Behandlung der Zellysate von Wildtyp und Deletionsmutanten. 40 h nach Transfektion wurden die Zellen für 2 h radioaktiv markiert und mit einem humanen HIV-positiven Serum immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden halbiert und ein Teil mit 10 mU Neuraminidase für 60 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt und exponiert. In den rechten äußeren Spalten wurde dieses Protokoll zum Vergleich mit der Chymotrypsinmutante envCHnef durchgeföhrt. gp160s = sialisierte Form des gp160

Dabei zeigte sich, daß die obere Bande in der Tat unter der Behandlung mit Neuraminidase verschwand, was am deutlichsten bei der nicht spaltbaren Mutante envCHnef zu sehen war. Ferner zeigte sich ein deutlicher shift des gp120 (s. Abb. 57, Mitte), was darauf schließen läßt, daß das im Zellysate nachweisbare gp120 terminal sialisiert ist und damit aus einem späten Schritt des Glykoproteintransports zur Zelloberfläche bzw. direkt von dieser stammt. Das im Zellysate nachweisbare gp160 dagegen zeigte keine Änderung des Laufverhaltens und muß damit aus einem früheren Schritt der Prozessierung stammen.

3.7 Transport von Glykoprotein mittels Mikrovessikel

Mit den vorangegangenen Experimenten wurde unterstrichen, daß die Deletion von N-terminalen Aminosäuren zur verminderten Spaltbarkeit des Glykoprotein führt. Damit blieb jedoch weiterhin der Widerspruch zu den Befunden des gp-capture-ELISA (s. Abb. 56), die erhöhte Mengen an zellfreiem Glykoprotein bei der Deletionsmutante env-4dspenf aufwiesen. Da wie bereits oben erwähnt der gp-capture ELISA nicht zwischen gp120 und dem gp160 unterscheiden kann, wurde der Überstand einer fraktionierten Zentrifugation unterzogen und das Sediment im Immunoblot untersucht:

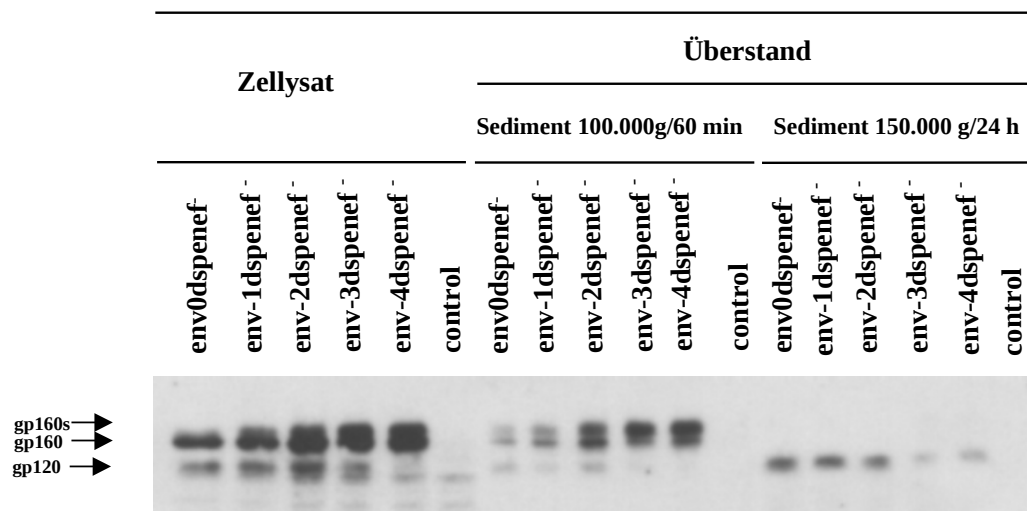


Abb. 58 Analyse der N-Terminus-Deletionsmutanten im Immunoblot mit einem anti-HIV-1 gp120 Mab. Links der Nachweis von Glykoprotein im Zellysat. Der Überstand der Transfektionen wurde anschließend einer fraktionierten Zentrifugation wie angegeben unterzogen und das Sediment im Immunoblot untersucht. gp160s = sialisierte Form des gp160

Dabei zeigte sich, daß überraschenderweise bereits nach einer Zentrifugation von 60 min bei 100.000 g ein Sediment zu finden war, in dem ungespaltenes Glykoprotein in signifikanten Mengen nachzuweisen war. Zwei weitere Phänomene sind dabei zu beachten: Mit zunehmender Deletion des N-Terminus – und damit mit abnehmender Spaltbarkeit des gp160 – nehmen die Mengen an nachweisbarem Glykoprotein zu. Zum zweiten ist zu sehen, daß dabei der Nachweis der oberen Bande – die sialisierte Form des gp160 – überproportional im Vergleich zum normalen gp160 ist. Der Überstand der ersten Zentrifugation wurde anschließend für 24 h bei 150.000 g zentrifugiert und im Immunoblot untersucht. Darin war das freie gp120, das von der Zelloberfläche durch shedding verloren gegangen ist, nachweisbar. Zu der oben genannten Interpretation, daß die N-Terminus-Deletionsmutanten zu einer verminderten Spaltbarkeit des Glykoproteins führen, passen die dabei abnehmenden Mengen an freiem gp120 bei den Mutanten env-3dspenf sowie env-4dspenf. Da der in Abb. 56 gezeigte gp-capture ELISA quasi die Summe der beiden in Abb. 58 gezeigten Zentrifugationsschritte nachweist, erklärt sich damit die dort gefundene Zunahme der Gesamtmenge an Glykoprotein.

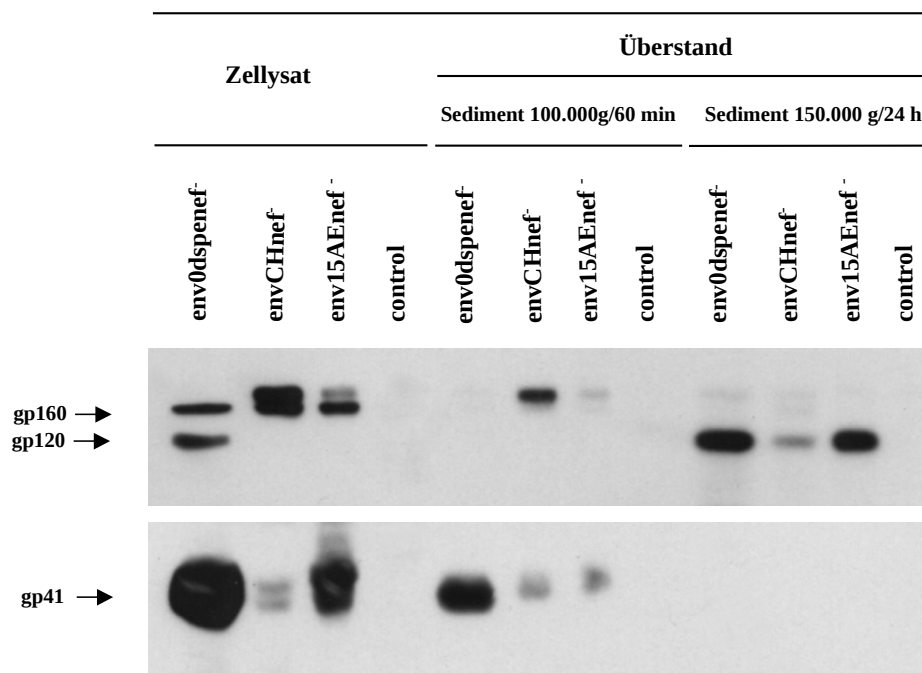


Abb. 59 Analyse der nicht-spaltbaren Mutante envCHnef sowie der Shedding-Mutante envAEnef im Immunoblot mit einem anti-HIV-1 gp120 Mab. Links der Nachweis von Glykoprotein im Zellysat. Der Überstand der Transfektionen wurde anschließend einer fraktionierten Zentrifugation wie angegeben unterzogen und das Sediment im Immunoblot untersucht.

Zum Vergleich für die gezeigten Phänomene wurden die nicht-spaltbare Mutante envCHnef sowie die shedding-Mutante env15AEnef mit derselben Methodik untersucht (s. Abb. 59). EnvCHnef zeigt im 1h/100.000 g Sediment selektiv nur die ungespaltene, sialinisierte Form des gp160 und stellt damit im Vergleich zu den vorangegangenen Konstrukten eine Maximalvariante eines nicht spaltbaren Glykoproteins dar. Dennoch sind auch bei diesem Konstrukt in der Analyse des 24h/150.000 g Sedimentes noch geringe Mengen an freiem gp120 nachzuweisen, d.h. daß auch bei dem Vorhandensein einer Chymotrypsin-Spaltstelle das Vorläuferprotein geringgradig gespalten wird. Die shedding-Mutante env15AEnef weist im Zellysat geringe Mengen an ungespaltenem Glykoprotein auf (s.Abb. 59, links), was darauf hinweist, daß der Aminosäureaustausch im N-Terminus auch die Spaltbarkeit etwas herabsetzt. Kleine Mengen des gp160 finden sich entsprechend in der 1h/100.000 g Fraktion. Die Reaktion mit dem gp41-Ak (s. Abb. 59, unten) zeigte deutlich geringere Mengen an gp in dieser Fraktion. Zur Interpretation einer shedding-Mutante passt jedoch, daß im 24h/150.000 g Sediment große Mengen an freiem Glykoprotein nachweisbar sind.

Unerwarteterweise fand sich beim Wildtyp env0dspenef im 1h/100.00 g Sediment kein gp120, dafür aber große Mengen an gp41 (s. Abb. 58, Mitte), die damit auch deutlich über den nachweisbaren Mengen von env15AEnef liegen.

Die Frage stellte sich, in welcher Form virales Glykoprotein vorliegen muß, damit es bereits in der ersten Fraktion sedimentieren kann. Aus der Literatur gab es Hinweise darauf, daß infizierte Zellen Mikrovesikel sezernieren, die Glykoprotein in ihrer Membran inseriert haben. Dazu wurden das oben gezeigte 1h/100.000 g Sediment einer Analyse in einem Sucrosegradienten unterzogen:

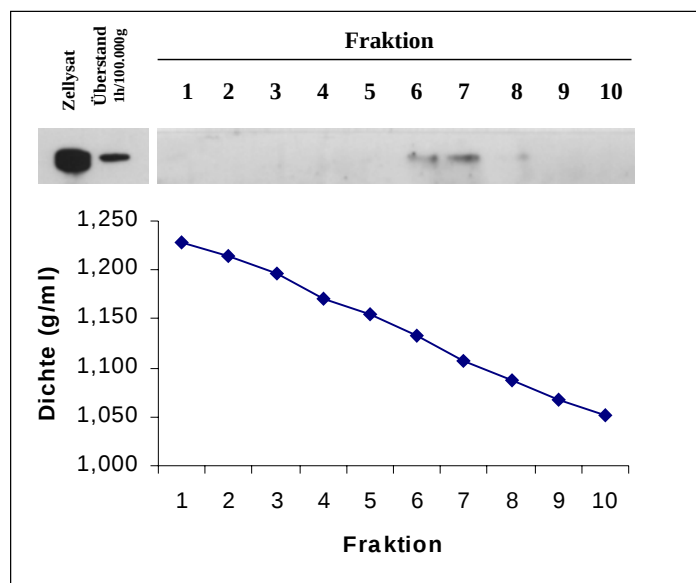


Abb. 60 Analyse der 1h/100.000 g Fraktion im Sucrosegradienten. Das Sediment wurde in 200 µl PBS gelöst und auf einen diskontinuierlichen Gradienten (60% Sucrose/PBS bis 20 % Sucrose/PBS) überschichtet. Nach einer Zentrifugation über 60 min bei 100.000 g wurden vom Boden des Röhrchens 10 Fraktionen mit jeweils 300 µl entnommen. 75 µl einer jeden Fraktion wurden mit 25 µl eines 4-fach konzentrierten SDS-PAGE-Probenpuffers gemischt und im Immunoblot untersucht. Die Sucrose-Konzentration der einzelnen Fraktionen wurde refraktometrisch (Zeiss Abbe-Refraktometer) bestimmt.

Wie in Abb. 60 zu sehen ist, konzentrieren sich die nachweisbaren Glykoproteine in den Fraktionen 6 und 7 (Sucrose-Dichte 1.11 – 1.13) und decken sich damit mit der Dichte, die andere Autoren bei Mikrovesikeln, die aus H9-Zellen stammten gefunden haben (89).

3.8 Glykosidase und Protease-Resistenz der Mikrovesikel

In Analogie zu dem oben gezeigten Neuraminidase-Verdau von Zellysat Abb. 57 wurde untersucht, ob das in den Mikrovesikeln vorhandene Glykoprotein ebenso empfindlich ist gegenüber dem Enzym. Für dieses Experiment wurde die Mutante env-3dspenef gewählt, weil sie nur partiell in ihrer Spaltbarkeit behindert ist und in den Analysen deshalb sowohl Mikrovesikel-gebundenes wie auch freies Glykoprotein aufgewiesen hatte.

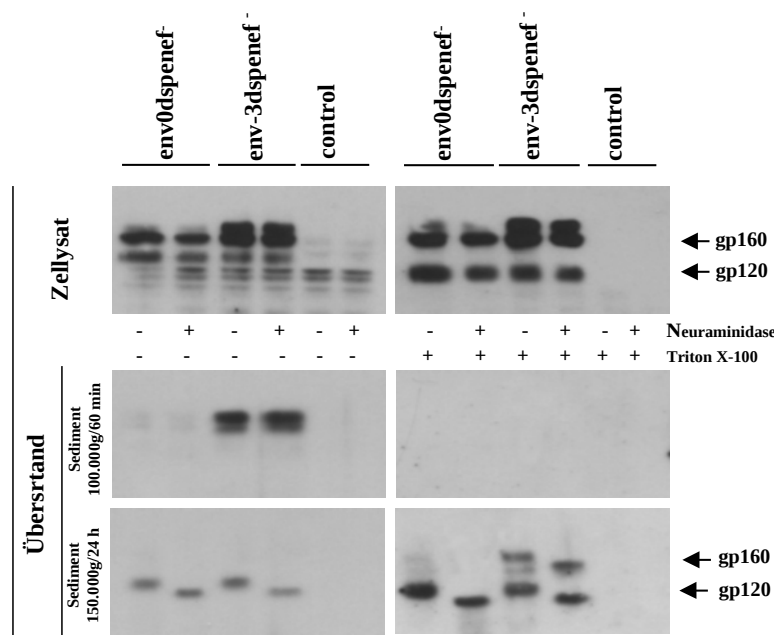


Abb. 61 Neuraminidase-Verdau der aus dem Zellkulturüberstand gewonnenen Fraktionen. Links wurde der Überstand direkt mit Neuraminidase versetzt (+) und anschließend fraktioniert zentrifugiert, rechts wurde dem Überstand zuvor 1% Triton X-100 (+) zugesetzt. Der Protein -Nachweis wurde mit einem anti-gp120-Mab im Immunoblot durchgeführt.

Dabei zeigte sich, daß unter Zusatz von 10 mU Neuraminidase/ml zum Zellkulturüberstand die darin vorhandenen Mikrovesikel bei der Mutante env-3dspenef nicht verdaut werden konnten (s.Abb. 61, links). Um zu zeigen, daß dies nicht auf mangelnder Aktivität der Neuraminidase beruhte, wurde aus demselben Ansatz das 24h/150.000 g Sediment gewonnen und analysiert. Dabei zeigte sich ein deutlicher shift des freien gp120 (s.Abb. 61, links unten), was auf eine intaktes Enzym schließen läßt. Ein anderes Bild ergibt sich, wenn man vor dem Neuraminidase-Verdau eine Lyse der Mikrovesikel mit Zusatz von 1% Triton X-100 durchführt: Wie bei der Sedimentationskonstanten von freiem Glykoprotein zu erwarten, findet man in der 1h/100.000 g Fraktion kein Protein, dafür jedoch in der 24h/150.000 g Fraktion (s.Abb. 61, rechts unten). Dabei zeigt sich oberhalb des verdauten freien Glykoproteins eine weitere Bande, deren Proteine aus den lysierten Mikrovesikeln stammen. Unter diesen experimentellen Umständen lassen sich die Glykoproteine mittels Neuraminidase verdauen. Ein Anschlußexperiment unter etwas modifizierten Umständen und unter 10-fach höherer Neuraminidasekonzentration reproduzierte die oben geschilderte Resistenz der nicht-lysierten Mikrovesikel (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Neuraminidase-Resistenz des ungespaltenen, in Mikrovesikel-verpackten Glykoproteins gezeigt war, wurde nachgeschaut, ob dieses Phänomen auch beim Wildtyp, bei dem nur gp41 in Mikrovesikeln nachweisbar (s.Abb. 59) war, zu finden ist. Dabei wurde die Analyse unter ähnlichen Bedingungen wie oben geschildert durchgeführt, jedoch die Proteinanalyse mit einem gp41-Ak vorgenommen.

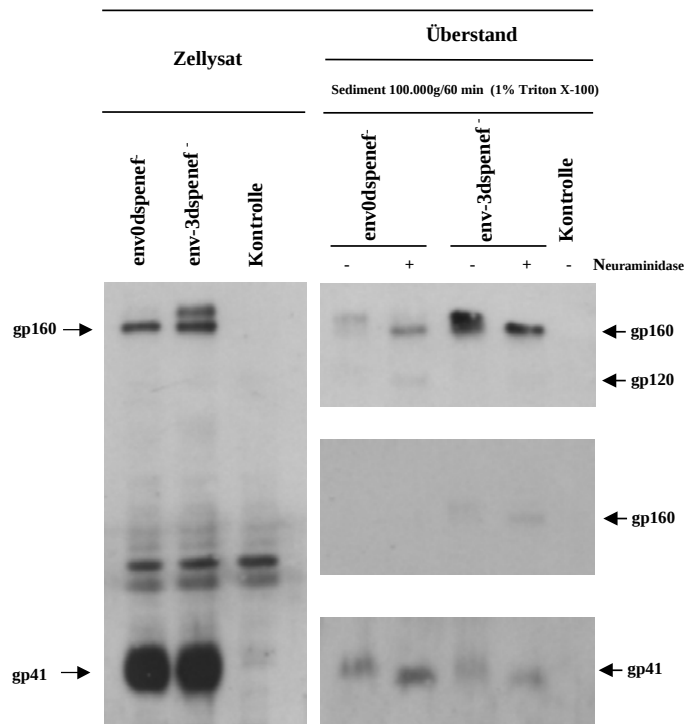


Abb. 62 Neuraminidase-Verdau der aus dem Zellkulturüberstand gewonnenen Fraktionen. Dem Zellkultur-Überstand wurde 1% Triton X-100 zugesetzt und ein Neuraminidase-Verdau durchgeführt. Anschließend wurde 1h bei 100.000 g zentrifugiert (rechts). Der Protein-Nachweis wurde mit einem anti-gp41-Mab im Immunoblot durchgeführt. Für den Immunoblot rechts oben wurde ein gp120-Ak eingesetzt.

Es zeigte sich, daß das gp41, wenn es aus den Mikrovesikeln mittels des Detergenz befreit ist, ebenfalls Neuraminidase-sensibel ist, was sich in einem Banden-shift des gp41 im Immunoblot ausdrückt. Ein vergleichbares Experiment unter Weglassen des Triton X-100 zeigte dann in Analogie zu den o.g. Experimenten eine Resistenz gegenüber der Neuraminidase.

In Erweiterung dieser Befunde kam es zu der Frage, ob die Neuraminidase-Resistenz der Mikrovesikel auch auf weitere Glycosidasen erweiterbar ist. Dazu wurden an präparierten Mikrovesikelfraktionen enzymatische Verdauungen mit N-glycosidase F (PNGaseF) sowie Endoglycosidase H unternommen:

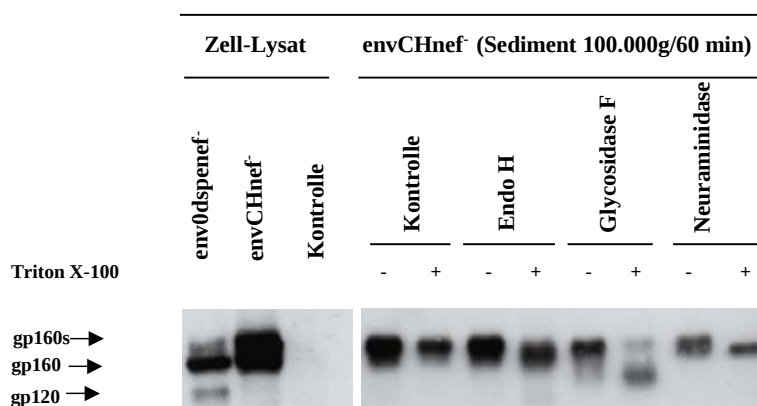


Abb. 63 Verdau von Mikrovesikeln aus ungespaltenem gp160, das aus der Chymotrypsin-Spaltmutante env0CHnef stammt mit EndoH, N-Glycosidase F sowie Neuraminidase mit und ohne Triton X-100 Lyse. Der Protein-Nachweis wurde mit einem anti-gp120-Mab im Immunoblot durchgeführt.

Dabei zeigte sich, daß ohne zuvorige Lyse der Mikrovessikel mit Triton-X 100 bei keinem der Enzyme ein Effekt zu sehen war, nach Detergenz-Behandlung jedoch in allen drei Fällen. Dabei führt das EndoH nur zu einem geringem shift im SDS-PAGE, was die Auffassung unterstützt, daß die Mikrovessikel aus einem Transportschritt jenseits der Mannose-Abkopplung stammen (s. 1.5.2). Die N-Glykosidase F, die alle Typen Asparagin-gebundener N-Glycanketten spaltet, führt nach Detergenzbehandlung zu einem deutlichen shift hin zu einem geringeren Molekulargewicht.

Bei dem letzten Experiment dieser Serie wurde die Frage gestellt, ob sie die oben beschriebene Resistenz gegenüber Glykosidasen auch auf ein weiteres Enzym, das Chymotrypsin, übertragen läßt. Dazu wurde die Chymotrypsin-Mutante envCHnef- verwendet und dem Kulturmedium exogen Chymotrypsin (10 µg/ml) zugesetzt. Die von den Erstbeschreibern dieser Mutante (234) beobachtete Wiederherstellung der Fusionskapazität von EnvCHnef unter Chymotrypsin konnte in unserem System nicht bestätigt werden: 40 h nach Transfektion war keine signifikante Zellfusion in den HeLa-T4⁺ - Zellen zu sehen. Bei der Analyse des Zellysats (s. oben) zeigten sich sowohl beim Wildtyp wie auch bei der Mutante unter Chymotrypsin geringere Mengen an Glykoprotein, was wahrscheinlich auf eine leicht toxische Wirkung des Enzyms auf die Zellen zurückzuführen ist. Dabei fällt bei envCHnef- ein überproportionaler Verlust der oberen Bande auf, deren Herkunft – wie oben beschrieben (s. 3.6) – der Zelloberfläche zuzuordnen ist. Bei der Chymotrypsinmutante war mittels des gp41-Antikörpers ein Abbauprodukt des gp160 zu erkennen, das bei ca. 80 kD einzuordnen ist und von uns nicht näher charakterisiert wurde.

Die Analyse in der fraktionierten Ultrazentrifugation bestätigte die zuvor bei der Neuraminidase beschriebene Resistenz der Mikrovessikel gegenüber Enzymen: Das Wildtyp-gp41 ließ sich nicht verdauen, wenn man Chymotrypsin nach der Kultivierung dem Medium zusetzte (s., dritte Abbildung von oben), ebenso das ungespaltene gp160 der Mutante (s. Abb. 64, zweite Abbildung von oben). Befindet sich dagegen Chymotrypsin während der Kultur im Medium, so ist beim Wildtyp überhaupt kein Protein in Mikrovessikeln zu finden, bei envCHnef sieht man nur Abbauprodukte (s. Abb. 64, dritte Abbildung von oben, Spur 5). Dies läßt darauf schließen, daß das Vorhandensein von Chymotrypsin in der Zellkultur das in der Zelloberfläche inserierte Glykoprotein nur solange verdauen kann, wie es noch nicht in Mikrovessikel inkorporiert ist.

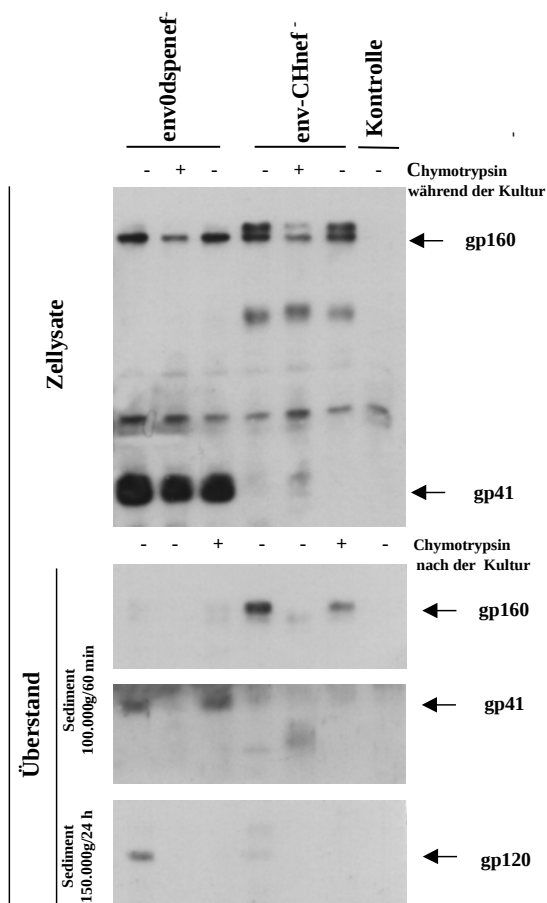


Abb. 64 Chymotrypsin-Einfluß auf den Wildtyp env0dspenf sowie die Chymotrypsin-Mutante envCHnef. In den Reihen 2 und 5 wurde 14 h nach Transfektion dem Kulturmedium 10 µg Chymotrypsin/ml zugesetzt. In den Reihen 3 und 6 geschah dies erst nach Beendigung der Kultur. Der Überstand wurde anschließend fraktioniert zentrifugiert (1 h/100.000 g sowie 24h/150.000g) und die Sedimente im Immunoblot untersucht. Die oberen drei Blots wurden mit einem gp41-Antikörper dargestellt, der unterste Blot mit einem gp120-Antikörper.

3.9 Deletionen im HIV-gp41-C-Terminus

3.9.1 Proteinexpression und Fusionsaktivität

Zur Untersuchung, welchen Einfluß Deletionen im gp41-C-Terminus auf die Fusionskapazität, Glykoproteintransport und Mikrovessikelnachweis haben, wurden die Konstrukte pSGpNLA1-Envdel1 und pSGpNLA1Envdel2 untersucht, die verschieden lange Deletionen im cytoplasmatisch-lokalisierten Bereich des gp41 beinhalten. Dabei zeigte sich nach Transfektion von pSGpNLA1-Envdel1, dem Konstrukt mit der größeren Deletion von 105 Aminosäuren, daß es eine überraschend hohe Fusionskapazität aufwies, die stärker war als die anderer im Labor vorhandener Voll-Längen-Env-Konstrukte wie z. B. dem pNLA1. Ungewöhnlicherweise waren auch ohne Kotransfektion mit einem Rev-kodierendem Konstrukt Fusionen deutlich zu sehen. Dies spiegelte sich auch beim Proteinnachweis im Immunoblot wieder (s. Abb. 65, Spuren 2 und 3). Das Konstrukt pSGpNLA1-Envdel 2 mit der kürzeren Deletion von 47 Aminosäuren dagegen glich in seinen Eigenschaften wieder den Wildtyp-Konstrukten.

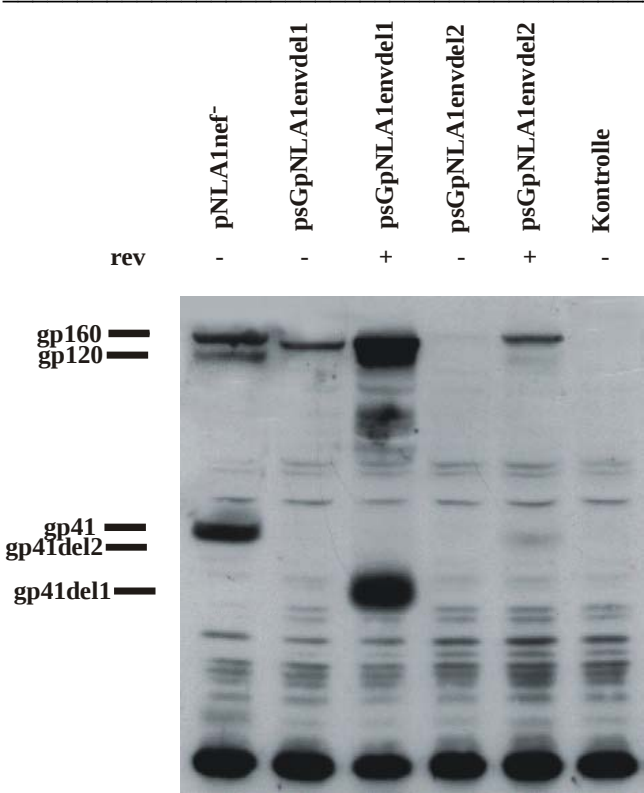


Abb. 65 Immunoblotanalyse des Wildtyp-Env-Konstruktes pNLA1nef sowie der gp41-C-Terminus-Mutanten psGpNLA1Envdel1 und psGpNLA1Envdel2 nach Transfektion ohne (-) und mit (+) Ko-Transfektion von Rev.

Zusammengefasst ergibt sich damit für diese Konstrukte folgende Aussage:

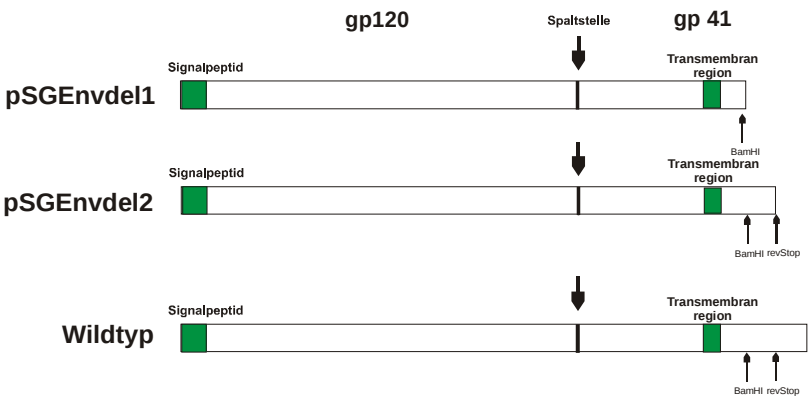


Abb. 66 Schema der gp41-C-Terminus-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp

Tab. 3 Eigenschaften der gp41-C-Terminus-Deletionsmutanten im Proteinnachweis und Fusionsaktivität

Rev-Zugabe	+		-	
	Protein im Immunoblot	Fusionsaktivität	Protein im Immunoblot	Fusionsaktivität
pSGenvdel 1	++++	++++	++	++
pSGenvdel 2	++	++	(+)	-

3.9.2 Env-mRNA-Nachweis

Zur Abklärung der Frage, ob die gesteigerte Env-Expression ihre Ursache in einer gesteigerten mRNA-Aktivität - z.B. durch eine erhöhte Stabilität der mRNA oder durch einen gesteigerten Kern-Zytoplasmatransport - hat oder in einem posttranslationalen Effekt, wurden die beiden Deletionsmutanten wie in den Vorprotokollen transfiziert, nach 30 Stunden eine Gesamt-RNA-Extraktion aus den transfizierten Zellen vorgenommen und mittels der real-time TaqMan PCR die Gesamtmenge an env-spezifischer RNA bestimmt (s. 2.6.4.) Zur Kontrolle wurde dabei das hGH-kodierende Plasmid pXGH5 kotransfiziert:

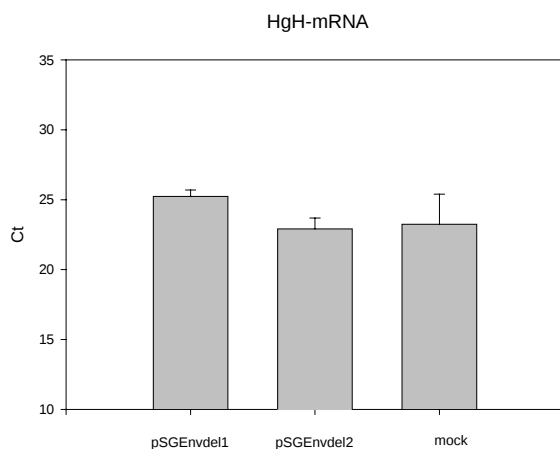
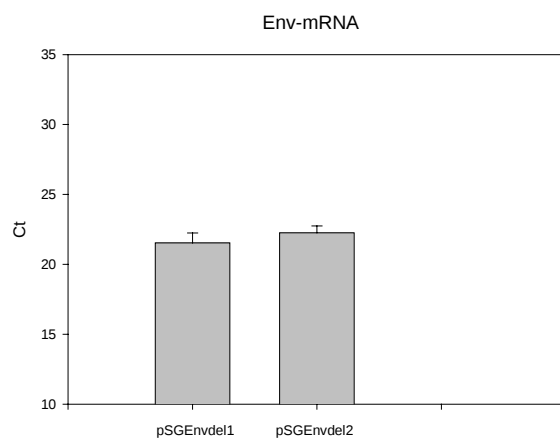


Abb.67 Nachweis von mRNA der gp41-C-Terminus Deletionsmutanten: die Konstrukte pSGpNLA1-Envdel1 und pSGpNLA1Envdel2 wurden im 3-fach -Ansatz transfiziert (+ mock-Transfektion als Negativkontrolle) und nach 30 h die Gesamt-RNA extrahiert. Als interne Kontrolle wurde das Plasmid pXGH5 kotransfiziert und die hGH-spezifische mRNA bestimmt (obere Grafik). Der maximale ΔCt der hGH-Kontrollen betrug 3,83 Zyklen. Der ΔCt -Wert jeder einzelnen Transfektion wurde zur Normierung des Ct-Wertes der Env-mRNA berücksichtigt (untere Grafik). Der normierte Mittelwert nach pSGpNLA1-Envdel1 -Transfektion betrug 21,53 Zyklen, nach pSGpNLA1-Envdel2 - Transfektion 22,25 Zyklen



Nach Normierung betrug der Mittelwert nach pSGpNLA1-Envdel1 -Transfektion 21,53 Zyklen, nach pSGpNLA1-Envdel2 - Transfektion 22,25 Zyklen. Die Differenz von ca. 0,7 Zyklen entspricht rechnerisch weniger als einem Faktor 2 und ist als nicht signifikant anzusehen. Damit ist die unterschiedliche Proteinexpression der beiden gp41-C-Terminus-Deletionsmutanten nicht auf unterschiedliche Mengen an Env-spezifischer mRNA zurückzuführen. Dies wurde bei mRNA-Nachweisen im Northern-Blot im eigenen Labor bestätigt (Daten nicht gezeigt).

3.9.3 Mikrovesikeltransport

Da die mRNA-Analyse der gp41-C-Terminus-Deletionsmutanten keine signifikanten Unterschiede hervorbrachten, erschien ein posttranslationaler Effekt als wahrscheinlicher für die unterschiedliche Proteinexpression zwischen Wildtyp-Env und der Mutante mit der größeren Deletion, dem pSGpNLA1-Envdel1-Vektor. Da die Menge an extrazellulär nachweisbaren Mikrovesikeln abhängig sein sollte von der Effektivität des posttranslationalen Proteintransports innerhalb der Zelle, wurden die Deletionsmutante sowie der Wildtyp gemeinsam nach Transfektion auf den Nachweis von Mikrovesikeln untersucht, wobei zum besseren Vergleich die Proteinmengen so angeglichen wurden, daß sich die intrazellulären Mengen ungefähr entsprachen:

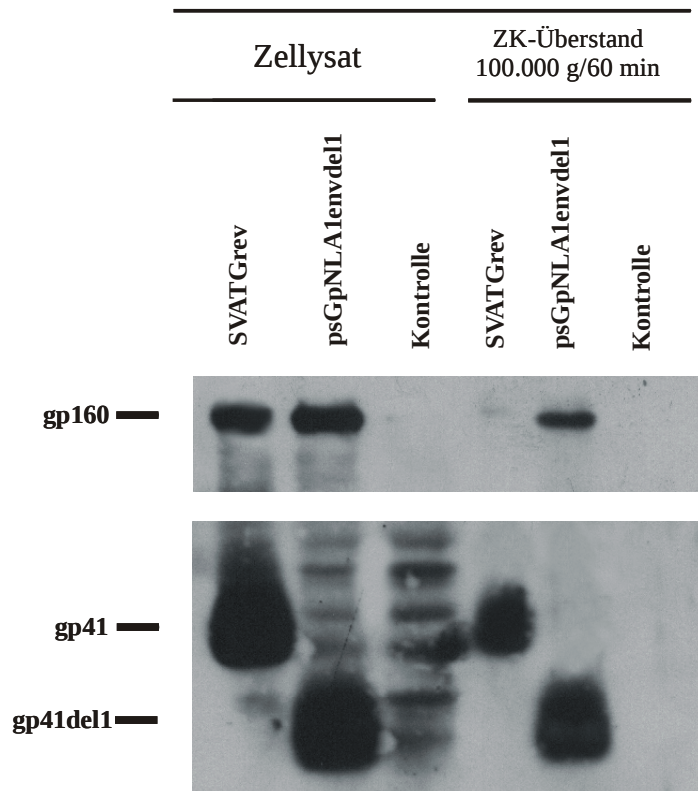


Abb. 68 Analyse des Wildtyp Env -Vektors SVATGrev sowie der gp41-C-Terminus-Deletionsmutanten pSGpNLA1-Envdel1 im Immunoblot mit einem anti-HIV-1 gp120 MAb und anti-gp41MAb. Links der Nachweis von Glykoprotein im Zellysat. Der Überstand der Transfektionen wurde anschließend einer Zentrifugation von 100.000 g/60min unterzogen und das Sediment im Immunoblot untersucht.

Dabei zeigte sich, daß die Menge an nachweisbaren Mikrovesikeln im 100.000g/60 min Sediment bei der Deletionsmutante gegenüber dem Wildtyp vergrößert erscheint: Die Menge an nachweisbarem gp41 (s. gp41del1 in der Abb. 68) in der Mikrovesikel-Fraktion verhält sich invers zur intrazellulären Menge im Vergleich Wildtyp zu Deletionsmutante, zusätzlich zeigten sich gegenüber Vorversuchen mit Wildtyp Env (vgl. Abb. 59) deutlich nachweisbare Mengen an gp160 in dieser Fraktion. Dies läßt auf einen insgesamt gesteigerten Transport von Glykoprotein zur Zelloberfläche schließen.

3.9.4 Spaltbarkeit des Glykoproteins

Der Wildtyp-Env-Vektor SVATGrev sowie die Mutante mit der größeren Deletion, der pSGpNLA1-Envdel1-Vektor, wurden in einem pulse-chase RIPA (s.u. 2.5.2) im Hinblick auf ihre Prozessierung vom Vorläuferprotein zu den gespaltenen Untereinheiten untersucht:

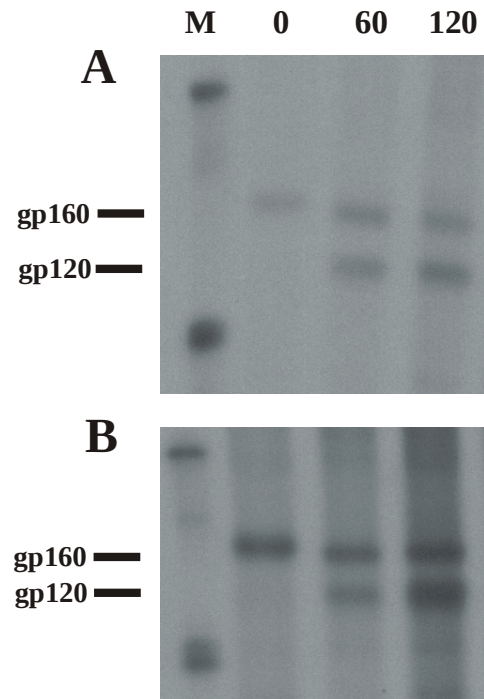


Abb. 69 Pulse-chase Analyse in der Radioimmunopräzipitation von HIV-1 Env-Wildtyp Vektor SVATGrev (A) sowie der gp41-C-Terminus-Deletionsmutanten pSGpNLA1-Envdel1 (B). 40 h nach Transfektion wurden die Zellen für 60 min mit ^{35}S -Methionin markiert und anschließend über insgesamt 120 min in Normalmedium gehalten. Zum Zeitpunkt 0, 60 und 120 min wurde jeweils eine Probe entnommen und mit einem HIV-1-positiven humanen Serum immunopräzipitiert.

Dabei war kein signifikanter Unterschied im processing des Glykoproteins zu erkennen: Nach einem chase von 60 min war in beiden Fällen das prozessierte Glykoprotein zu erkennen. Es ergab sich kein Hinweis darauf, daß bei der Mutante ein größerer Anteil von Vorläuferprotein gespalten wird, was die höhere Fusionsaktivität erklärt hätte. Darüberhinaus ist in beiden Ansätzen zu erkennen, daß nach dem "pulse" von 60 min das gp160 ein etwas höheres Molekulargewicht aufweist, was vermutlich auf die mannsoereichere Glykosylierung des gp160 im Endoplasmatischen Retikulum zurückzuführen ist (s.u. 1.5.2).

3.10 Einfluß von MA-Protein auf die Bildung von Mikrovesikeln

Da Hinweise darauf bestehen, daß bei der Virusreifung die zytoplasmatische Domäne des HIV-1-gp41 mit der N-terminalen Domäne aus dem gag-Bereich, dem MA-Protein interagieren, wurden Kotransfektionen mit einem MA-kodierenden Konstrukt vorgenommen. Damit letzteres effektiv MA exprimieren kann, wurden allen Transfektionen 0.1 µg des Plasmids pSGpNLArex (s. Abb. 26) zugesetzt.

Dabei zeigten sich unter der Kotransfektion mit MA keine signifikant geänderten Mengen an HIV-Proteinen in Mikrovesikeln: Sowohl das ungespaltene gp160 (s. Abb. 70, oben Mitte) als auch die Mengen an inkorporiertem gp41 (unten) waren in Anwesenheit von MA-Protein unverändert. Der Transport von Env-Glykoprotein auf die Zellmembran erscheint unverändert, da die Mengen an freiem Glykoprotein (s. Abb. 70, oben rechts) sich nicht signifikant unterscheiden. Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß das MA-Protein trotz seiner Interaktion mit Env die Inkorporation in Mikrovesikel nicht vermindert.



Abb. 70 Kotransfektionen von HIV-1 Env kodierenden Vektor pNLA1 (0,5 µg) mit steigenden Mengen (0,5 - 1,5 µg) MA-kodierenden Vektor pSGMARRE. Die Immunoblot-Analyse erfolgte mit einem gp120-Mab (oben) sowie mit einem gp41-Mab (unten).

3.11 Mikrovesikel-Nachweis als Werkzeug für die Kontrolle des Protein- transports

Abschließend stellte sich die Frage, ob der oben beschriebene Nachweis von Mikrovesikeln zum einem dazu dienen kann, generell bei Glykoproteinen die Frage zu klären, ob sie bis zur Zellmembran transportiert werden, zum zweiten, ob dieser Weg auch Proteinen offen steht, die zwar nicht als Glykoproteine in die Membran inserieren können, aber z.B. über eine Myristilinsäure in die Membran verankert sind. Für die Beantwortung der ersten Frage wurden HIV-1-Env-Proteine untersucht, in denen einzelne Teile deletiert sind, für die zweite Frage wurden zwei myristilierte HIV-1-Proteine untersucht, das Nef sowie das MA.

3.11.1 HIV-gp120-Deletionsmutanten

Im nachfolgenden Experiment wurden die auf der Grundlage eines SV40-Promotors konstruierten Env-Deletionsmutanten SVATGrev Δ 120 (Deletion des gp120 bis auf die C-terminalen 16 Aminosäuren), SVATGrev Δ 120B (wie SVATGrev Δ 120, aber 46 Aminosäuren des C-Terminus erhalten) sowie SVATGoligo (Deletion des V3-loops) untersucht. Da den ersten beiden Konstrukten das gp120 beinahe komplett fehlt, waren sie im Immunoblot nur mit dem gp41-Antikörper reaktiv (s.Abb. 71, unten).

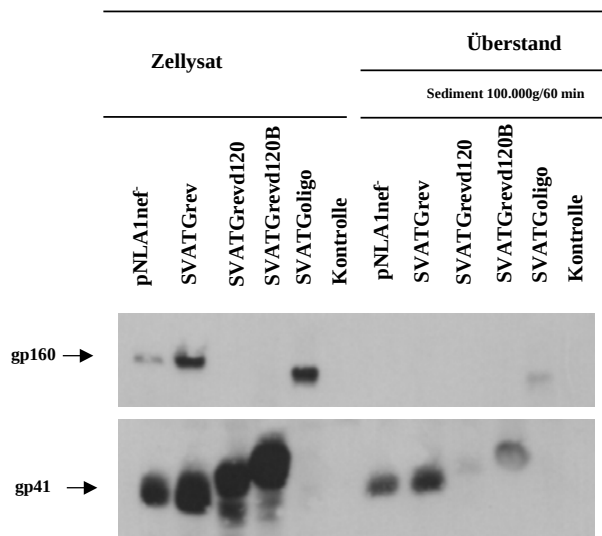


Abb. 71 Nachweis von Mikrovesikeln (Sediment 100.000 g/60 min) der Env-gp120-Deletionsmutanten. Der obere Blot wurden mit einem gp120-Antikörper dargestellt, der untere Blot mit einem gp41-Antikörper.

Die dabei vorhandenen Proteine entsprechen in ihrem Laufverhalten den zu erwartenden Größenunterschieden: SVATGrev Δ 120 = gp41 + 16 Aminosäuren, SVATGrev Δ 120B = gp41 + 46 Aminosäuren. SVATGoligo = gp120 – 34 Aminosäuren. Dabei sind deutliche Unterschiede zwischen den beiden gp120-Deletionsmutanten bezüglich der Mikrovesikelbildung zu sehen: SVATGrev Δ 120B führt zu einer gut nachweisbaren Fraktion, während bei SVATGrev Δ 120 nur Spuren zu erkennen sind (s.Abb. 71, unten, Spuren 9 und 10). Daraus läßt sich schließen, daß die zusätzlichen 30 Aminosäuren des ersten Konstrukts bewirken, daß dieses Protein in Mikrovesikel inkorporiert werden kann. Umgekehrt läßt sich für das Konstrukt SVATGrev Δ 120 sagen, daß es wahrscheinlich nicht die Zelloberfläche erreicht. Ähnliches gilt für das Konstrukt SVATGoligo, bei dem auch nur Spuren von Glykoprotein in der Mikrovesikelfraktion nachweisbar sind (s.Abb. 71, oben, Spur 11).

3.11.2 Nachweis von extrazellulärem HIV-Nef und MA

Hinweise darauf, daß das HIV-1 Nef-Protein auch extrazellulär zu finden ist, hatten wir bereits vor Jahren (2), als wir in der Radioimmunopräzipitation von Zellen, die mit nef-kodierenden Plasmiden transfiziert worden waren, aus dem Zellkulturüberstand das Protein nachweisen konnten:

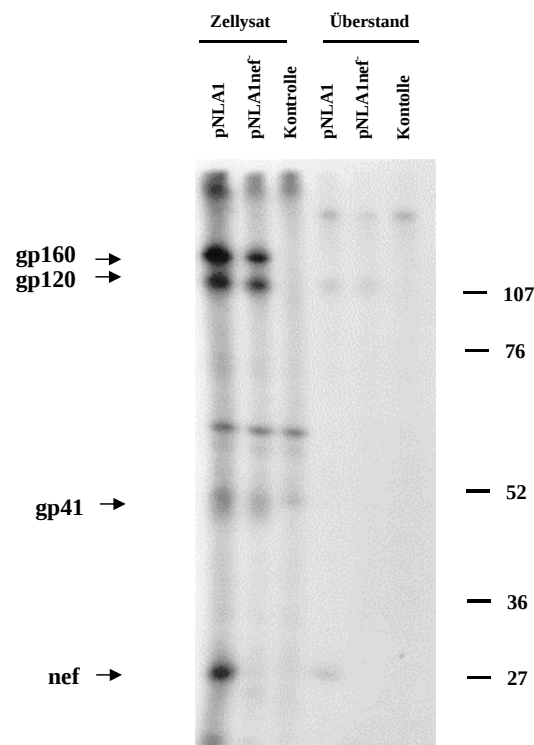


Abb. 72 Radioimmunopräzipitation zum Nachweis von HIV-1 Proteinen. HeLa-Zellen wurden mit den Plasmiden pNLA1 (nef-kodierend) bzw. pNLA1nef (nicht nef-kodierend) transfiziert. 40 Stunden nach Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen für 60 min in Methionin/Cystein-freiem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 μ Ci [35 S]Methionin-Cystein-Mix (Pro-MixTM, Amersham-Buchler, Braunschweig) über weitere 60 min ("pulse"). Das Medium samt Markierungsreagenz wurde entfernt, die Zellen mit Pufferlösung gewaschen und Dulbecco's MEM ohne Serumzusatz für weitere zwei Stunden zugegeben ("chase"). Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen lysiert. Zellysat und Zellkulturüberstand wurden mit einem humanen HIV-1 positiven Serum immunpräzipitiert.

Dies gelang im Nachfolgenden nicht nur mit dem Plasmid pNLA1, sondern auch mit Konstrukten, die ausschließlich für das HIV-1 nef kodierten. Darüberhinaus konnte auch in einem nef-capture-ELISA, der analog zu dem oben beschriebenen gp-capture-ELISA (s. Protein-capture-ELISA) konfiguriert war, extrazelluläres Nef nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In jüngeren Experimenten wurde untersucht, ob das Nef-Protein über Mikrovesikel aus der Zelle ausgeschleust werden kann:

Es wurden zwei Nef-kodierende Konstrukte untersucht: pSGTH4 kodiert für ein Nef-Protein, dem an Position 2 das Glycin fehlt und das deshalb nicht myristiliert werden kann im Gegensatz zu pSGYU2. Dabei zeigte sich, daß das Protein über mindestens zwei Wege aus der Zelle ausgeschleust wird. Während in der Mikrovesikelfraktion (1h/100.000g) nur bei pSGYU2 Protein nachweisbar ist, ist in der 24h/150.000 g Fraktion, die freies Protein nachweist, bei beiden Konstrukten Protein zu finden.

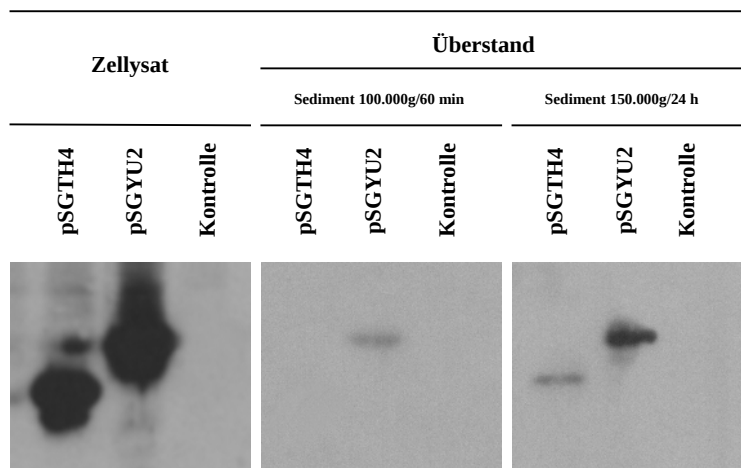


Abb. 73 Nachweis von Mikrovesikeln, die HIV-1 Nef –Protein enthalten. HeLa-T4⁺-Zellen wurden mit Nef-kodierenden Plasmiden transfiziert. Nach 40 h wurde aus dem Zellysat mit einem anti-Nef-Mab Protein im Immunoblot nachgewiesen. Der Überstand wurde fraktioniert zentrifugiert und das Sediment ebenfalls im Immunoblot analysiert.

Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob myristilierten Proteinen über die Membranverankerung auch in anderen Fällen die Möglichkeit gegeben ist, über Mikrovesikel ausgeschleust zu werden, wurde zum Abschluß das HIV-1 MA-Protein untersucht. Da auch dieses Protein an dem N-terminalen Glycin myristiliert ist, besteht auch bei ihm die Möglichkeit, daß es in Mikrovesikel inkorporiert wird:

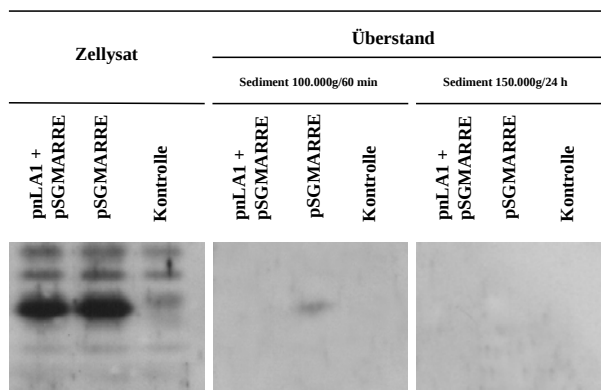


Abb. 74 Nachweis von MA-Protein in extrazellulären Mikrovesikeln. Der Nachweis wurde im Immunoblot mit einem anti-HIV-1 MA b(p17) durchgeführt. In der linken Spur ist eine Kotransfektion von pNL A1 (1 µg) und dem MA-kodierenden Konstrukt pSGMARRE (1 µg) zu sehen, in der mittleren Spur die Transfektion nur mit pSGMARRE (2 µg).

Dabei zeigte sich in der Tat, daß auch dieses Protein in der Lage ist, über Mikrovesikel die Zelle zu verlassen (s. Abb. 74). Im Gegensatz zum Nef-Protein konnte in der 24h/150.000 g Fraktion kein freies MA-Protein nachgewiesen werden, d.h. der oben beschriebene zweite Weg des Proteintransports trifft für das MA nicht zu. MA-Protein war in diesem Experiment nur nachzuweisen, wenn der MA-kodierende Vektor allein transfiziert wurde. Bei der Kotransfektion mit dem Env-kodierenden Vektor pNL A1 dagegen ist kein MA nachweisbar (s. Abb. 74, Mitte), was jedoch in anderen Experimenten schwach zu sehen war. Der Grund für diese Diskrepanz ist noch nicht geklärt.

4 Diskussion

4.1 Methodischer Ansatz

Für die meisten Experimente der vorliegenden Arbeit war die methodische Grundlage die transiente Expression von HIV-Proteinen, kodiert von subgenomischen Konstrukten, die mittels Transfektion in Zellkulturen eingeschleust wurden. Bei der Verwendung vom Konstrukt pNLA1 (324) als Ausgangsklon ist als grundsätzliche Einschränkung zu sehen, daß in diesem System durch das Fehlen der Expression von Gag- und Pol-Proteinen die Bildung infektiöser Partikel ausgeschlossen ist und damit nur ein Teil des natürlichen Ablaufs einer Infektion in der Zelle widergespiegelt werden kann. Es stellte sich aber heraus, daß solch ein Ansatz für die Beantwortung der Fragen zur Funktionalität des Env und seines Transports zur Zellmembran durchaus geeignet ist. Die Fusion benachbarter Zellen, die auf ihrer Oberfläche Glykoprotein exprimieren, ist in ihrem Ablauf weitgehend gleichzusetzen mit der Fusion von Virus- mit Zellmembran, wobei der erstgenannte Prozeß bereits im konventionellen Mikroskop zu verfolgen ist. Wie weiter unten ausführlicher dargestellt, erwies sich das Fehlen von Viruspartikelbildung bei dem Nachweis von Mikrovesikeln als methodischer Vorteil, da diese mit physikalischen Methoden praktisch nicht von Viruspartikeln zu trennen sind. Das gezielte Hinzufügen weiterer Virusproteine in den experimentellen Ansatz, wie in dieser Arbeit mit dem HIV-MA-Protein geschehen, machte es möglich, selektiv eine Interaktion zwischen zwei funktionell scheinbar völlig getrennten viralen Proteinen zu untersuchen. Weiterhin ist noch zu bedenken, daß man bei Arbeiten mit solchen subgenomischen Konstrukten einem erheblich geringeren Risiko im Vergleich zum Arbeiten mit infektiösem Wildvirus ausgesetzt ist. Um auf Einzelzellebene ein Einbringen von Fremd-DNA in einen Eukaryonten zu sichern, ist die Mikroinjektion die zwar aufwendigste, aber sicherste Methode. Als technische Verbesserung für die konventionelle Transfektion haben sich die in den letzten Jahren entwickelten Techniken mittels nicht-liposomaler Transfektionsreagenzien auf der Basis von Lipidgemischen erwiesen, die sich auch in der vorliegenden Arbeit durch hohe Effizienz und Reproduzierbarkeit bei einfachem Arbeitsprotokoll bewährt haben. Die Kotransfektion mit dem Luciferase-exprimierenden Plasmid pGL3 erwies sich dabei als geeignet, die Transfektionseffizienz zu bestimmen und bei der Berechnung der Fusionskapazität einzubeziehen. Die Anwendung der Real-time-PCR-Technik mit Hilfe der TaqMan-Sonden wie auch mit Einsatz von Sybr-Green erwies sich als neue Möglichkeit, quantitative mRNA-Bestimmungen mit vertretbarem Aufwand reproduzierbar durchzuführen.

4.2 Heterogenität von Wildisolaten

4.2.1 Zelltropismus

Für die erste Serie von Experimenten waren die Quelle des Ausgangsmaterials natürliche Patientenisolat, gewonnen aus Einsendematerial von HIV-Patienten der Universitätskliniken. Die dafür notwendige Anzucht in Lymphozytenkulturen zählt seit den 70-er Jahren des 20. Jahrhunderts zu den virologischen Techniken (s 1.1). Der direkte Nutzen dieses Bemühens war dabei für uns eine klinisch-diagnostische Fragestellung, nämlich die sich daran anschließende in vitro-Resistenzbestimmung von Patientenisolaten gegenüber dem Azidothymidin (AZT, Retrovir[®]), dem Dideoxyguanosin (ddI, Videx[®]) und weiteren antiretroviralen Substanzen. Wenn auch dieser Aspekt in der vorliegenden Arbeit nicht weiter ausgeführt wird, so hat er doch an anderen Stellen seinen Niederschlag gefunden (6, 8, 174).

Für die vorliegenden Fragestellungen ließen sich die Wildisolate kategorisieren auf der Basis ihrer biologischen Eigenschaften, nämlich dem Zelltropismus, der Replikationskinetik und der Eigenschaft, Synzytien zu induzieren, wie dies auch von anderen Autoren beschrieben ist (19, 63, 115, 303). In welchem Ausmaß diese Unterschiede prognostischen Wert haben, ist vielfach diskutiert worden. Aus der Korrelation mit klinischen Beobachtungen geht hervor, daß die stark cytopathogenen (SI)- und replikationsschnellen Isolate häufiger in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung nachzuweisen sind. Umgekehrt wurde gezeigt, daß frühe Serokonverter zumeist NSI-Isolate beherbergen (392). Von den SI-Isolaten wurde gezeigt, daß sie einen T-Zell-Tropismus haben im Gegensatz zu den NSI-Isolaten, die sich bevorzugt in Makrophagen (M-tropen) replizieren. Auffallend darüberhinaus ist, daß sich in Gewebeproben des zentralen Nervensystems von AIDS-Patienten bevorzugt die M-tropen Varianten finden, so daß ihnen sowohl in den frühen Stadien der Infektion (Eintritt in den Körper) sowie beim Fortschreiten der Infektion (Manifestation im ZNS) jeweils eine Schrittmacherfunktion zuzukommen scheint (212, 306, 349). Auf Rezeptorebene ließ sich durch die Entdeckung der Korezeptoren zeigen, daß dabei ein Wechsel vom CCR5 (Makrophage) zum CXCR4 (T-Lymphozyt) stattfindet.

Wie in dieser Arbeit gezeigt (s.Tab. 1), lassen sich SI-Isolate in Form von zellfreien Kulturüberständen auf nichtinfizierte, stimulierte PBL sowie auf HeLa-T4⁺ Zellen regelmäßig übertragen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die stimulierten PBLs eine Mischung von T-Lymphozyten und Makrophagen enthalten, in denen jedoch im Laufe der Kultur die Lymphozyten vorherrschend werden, wenn man nicht die Makrophagen durch selektive Kulturbedingungen anreichert. Dementsprechend zeigte sich bei den letzten Isolaten der Tab. 1,

daß sie sich nicht übertragen ließen auf frische PBL sowie auf die Zelllinie HeLa-T4⁺. Letztere ist von der Rezeptoranalyse als CD4⁺, CXCR4 einzustufen und damit nur für die T-lymphotropen Isolate empfänglich. Als nützliches Werkzeug erwies sich bei der weiteren Analyse der Gebrauch der PM1-Zellen (218), von denen man heute weiß, daß sie die Korezeptoren CXCR4 sowie CCR5 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dabei fanden wir in Übereinstimmung mit den Erstbeschreibern dieser Zelllinie, daß sich NSI-Isolate zwar auf diese Zellen übertragen lassen, jedoch für beide Klassen von Isolatn gilt, daß die Bildung von extensiven Synzytienbildungen nur in Ausnahmefällen (NSI402) auftritt. Mit dem Vorhandensein des geeigneten Korezeptors auf der Zelloberfläche ist zwar der Eintritt des Virus in die Zelle möglich, die Ausbildung von Syncytien ist damit jedoch keineswegs gesichert. Als ein weiteres nützliches Mittel erwies sich die Etablierung von primären Makrophagenkulturen für die Anzucht von Makrophagen-tropen Isolatn. Die Übertragung des Isolats NSI-499 z.B. gelang nach der primären Isolierung in PBLs nur in diesen Zellen und ermöglicht damit die Vermehrung des Virus für spätere Experimente. Das oben genannte Isolat NSI-402 ließ sich mit Hilfe der Makrophagen- und PM1-Passage als dual-trop klassifizieren. Möglicherweise kann die Tatsache, daß es in den PM1-Zellen beide Korezeptoren benutzen, verantwortlich sein für die effektive Replikation und Syncytienbildung in diesen Zellen. Unter der ersten Gruppe der SI-Isolate fand sich auch überraschenderweise das Isolat SI-165, das von uns von seinem Verhalten in der PBL-Kultur als typisches SI-Isolat eingestuft worden war, als dual-trop. Dies unterstreicht, daß eine saubere Zuordnung einzelner Isolate nur über eine methodisch klar definierte Korezeptor-Analyse möglich ist.

4.2.2 Variationen im Bereich um die Spaltstelle gp120/gp41

Von dieser letztgenannten Beobachtung ausgehend ist es berechtigt, nach weiteren Determinanten für die Fusionskapazität im Env-Bereich zu suchen. Eine Region, der wir uns dabei intensiv gewidmet haben, ist der Bereich der Spaltstelle zwischen der SU- und der TM-Einheit des HIV-1 Env. Grundlage für den Ansatz, in natürlichen Isolatn nach Varianten in dieser Region zu suchen, die die Fusionskapazität beeinflussen, ist die Beobachtung bei anderen Membranviren. Beim Influenzavirus (36) sowie bei Paramyxoviren (239) konnte gezeigt werden, daß subtile Mutationen in der Spaltstellenregion die Ausbreitung des Virus im Infizierten und damit seine Pathogenität direkt beeinflussen. Ähnliches wurde in den letzten Jahren beim Ebola-Virus, einem Mitglied der Filovirus-Familie gefunden, bei dem sich Wildvirus und der weitgehend apathogene Ebola-Reston-Stamm in der Spaltbarkeit ihres Glykoproteins unterscheiden (110). Beim HIV wurden diesbezüglich Experimente mit gezielter Mutagenese in der Spaltstellenregion durchgeführt, die die Notwendigkeit einer hohen Konserviertheit in dieser

Region für die Funktionalität des Glykoproteins zeigten (37, 154). Mutationen in dieser Region können dabei die Fusionskapazität und damit die Infektiosität des Virus komplett zerstören (86, 234, 366). Das Konsensus-Motiv für die Aminosäuren unmittelbar vor der Spaltstelle lautet dabei –K/R-X-K/R-R und ist in ähnlicher Form bei vielen Membranviren zu finden (355, 356, 357). Ein weiterer Grund für den Verlust der Fusionskapazität kann in der Struktur des der Spaltstelle unmittelbar benachbarten gp41-N-Terminus liegen. Studien mit gezielter Mutagenese zeigten, daß Mutationen im N-Terminus des gp41 zum Verlust der Assoziation nach der Spaltung in die Glykoprotein-Untereinheiten führen können, wenn in dieser hydrophoben Region polare Aminosäuren eingeführt werden (86, 124, 127).

Auf der Grundlage dieser Beobachtungen fragten wir uns, ob die Region sowohl C- wie auch N-terminal der Spaltstelle (Aminosäure 477-578 des Referens-Stammes) in natürlichen Isolaten die Fusionskapazität beeinflusst. Um andere Faktoren dabei auszuschließen, isolierten wir sie mittels PCR und banden sie in Form eines Kassettensystems in einen identischen Kontext ein. Dies war in unserem Fall ein HIV-Expressionsplasmid, das mittels Transfektion in die Zellen gebracht werden mußte. Dabei legten wir Wert auf die Einbeziehung von Isolaten, die sich nur passager in PBLs anzüchten ließen und von daher kaum als echtes Virusisolat anzusehen sind (s.Tab. 1, P498 und P499).

Zusammengefaßt kann dazu gesagt werden, daß der Phänotyp der Originalisolate nicht auf spezifische Variationen in der untersuchten Region zurückzuführen war. Die rekombinanten Plasmide zeigten nach Transfektion in die HeLa-T4+ Zellen überwiegend geringe Unterschiede bezüglich ihrer Fusionskapazität. Bei zwei Konstrukten zeigte sich jedoch eine signifikant verminderte Fusionskapazität, die zwar nicht mit dem Phänotyp des Originalisolats zu korrelieren war, aber aufgrund der Kenntnisse über die Struktur des HIV-gp41-N-Terminus zu erklären sind, wie im Nachfolgenden erläutert wird.

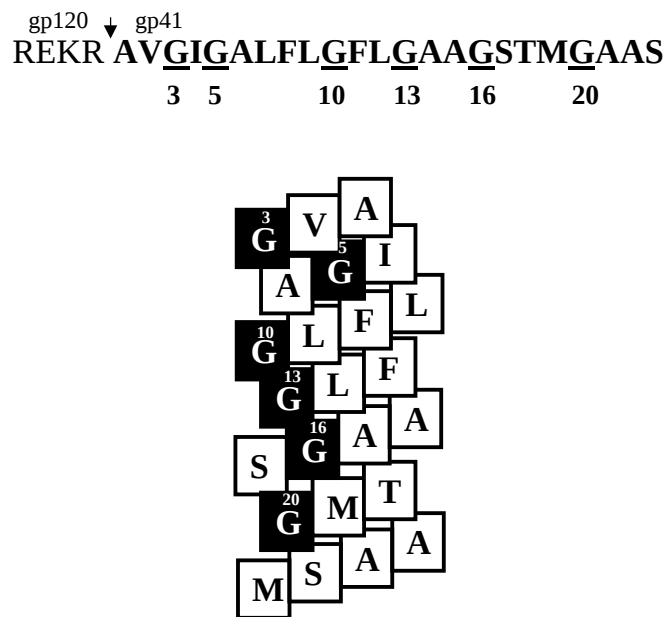


Abb. 75 Aminosäuresequenz des HIV-1 Fusionspeptides und die schematische Repräsentation der Sequenz als α -Helix. Zugrunde liegt die Sequenz des Plasmides pNLA1. Die Glycin-Positionen sind dabei in schwarz hervorgehoben (nach Delahunty et al. (86))

Vieles spricht dafür, daß die Fusionsdomäne des HIV (311, 312, 348) sowie die der Ortho- und Paramyxoviren (175) eine α -Helix als räumliche Struktur annimmt, wenn sie in die Lipid-Doppelmembran der Zielzelle inseriert (44, 229, 273). Dabei wird die Position der Glycine als kritisch angesehen, da sie prinzipiell als α -Helix-destabilisierend zu sehen sind (86, 209). Wie in Abb. 75 zu sehen ist, kommen bei der räumlichen Darstellung der Fusionsdomäne die Glycine alle auf einer Seite der α -Helix zu liegen, so daß man auch von einem "glycine-strip" spricht.

Derartige Glycinstreifen sind ebenfalls bei Transmembranregionen des MHC II Komplexes beschrieben worden (78). Beim N-Terminus des Simian Virus 5 (SV5) führt ein Austausch des Glycin zu Alanin in Position 3, 7, oder 12 zu einer gesteigerten Fusionsaktivität, jedoch zu einem verminderten Ausbreiten des Virus in der Zellkultur, was andeutet, daß eine Balance zwischen α -Helix-destabilisierenden Glycinen und stabilisierenden Aminosäuren wie Alanin notwendig ist (175). Darüberhinaus könnte der Glycin-Streifen auch an der Ausbildung der oligomeren Struktur von Fusionsdomänen beteiligt sein wie beim Influenza-Fusionspeptid beschrieben (156) oder an Interaktionen mit zellulären Faktoren (169). Wie die Sequenzen der Konstrukte in Tabelle 1 zeigen, ist die Konserviertheit des gp41-N-Terminus bei den ersten sieben Aminosäuren nur insofern gegeben, daß bei aller Variabilität der hydrophobe Charakter stets erhalten bleibt. Dabei besteht keine Notwendigkeit, das Glycin an Position 3 zu erhalten im

Gegensatz zu allen darauffolgenden Glycinen, die sich als hochkonserviert erwiesen. Dieser Punkt ist unterstützt durch das Auftauchen eines Prolins anstelle eines Glycins in Position 3 von zwei sequentiellen Isolaten eines Patienten (pSI-215 und pSI-440). Ein Prolin in dieser Region ist zuvor nur bei einem HTLV-I Isolat beschrieben worden (24), aber nicht in den bisher publizierten HIV-Sequenzen (249). Prolin kommt bei der Ausbildung von Sekundärstruktur in vielen Fällen die Funktion eines α -Helix-Brechers zu (209). Die Klone mit dem Prolin in Position 3 zeigten eine verminderte Fusionskapazität, die jedoch als wahrscheinlichste Ursache eine verminderte Spaltbarkeit des Glykoproteins hat. Als neuer Aspekt zeigte sich dabei, daß eine Mutation im N-Terminus des gp41 zu einer verminderten Spaltbarkeit führen kann, d.h. die Struktur des gp41-N-Terminus auch Einfluß nimmt auf die Effektivität der zelleigenen Protease beim Prozessieren des HIV-Env. In den oben genannten Arbeiten waren solche Phänomene nur bei Mutationen aminoterminal der Spaltstelle, d.h. im C-Terminus des gp120 beobachtet worden. Dieser Aspekt wird weiter unten bei der Beschreibung der gp41-Deletionsmutanten fortgeführt.

Die verminderte Fusionskapazität des Konstruktes pNSI-465 kann in Übereinstimmung mit anderen Autoren erklärt werden über eine verminderte Assoziation der Untereinheiten durch das Einführen einer polaren Aminosäure in den N-Terminus. Entscheidend ist dabei die Mutation in Position 1 (A→S). Der Hydrophobizitätsindex der ersten 14 Aminosäuren von pNSI-465 beträgt dabei 0.58 im Gegensatz zum Durchschnitt bei den anderen Plasmiden, der 0.69 ($\pm$ 0.046) betrug. Andere Autoren haben gezeigt, daß derartige Austausche zu einem völligen Verlust der Fusionskapazität führen können (125, 127). Wie weiter unten ausgeführt, konnten wir in unserem System mit dem Konstrukt env15A_{nef}, bei dem wir durch gezielte Mutagenese in Position 15 des N-Terminus eine Glutaminsäure eingeführt haben, ebenfalls keine Fusionsaktivität mehr nachweisen (s. Abb. 51).

Insgesamt zeigte sich bei dieser Analyse zur Variabilität des HIV-gp120-C sowie des gp41-N-Terminus ein ähnliches, aber nicht identisches Bild zu den bis dahin publizierten Sequenzen. Die hohe Variabilität in den sieben N-terminalen Aminosäuren wurde unterstrichen durch die Tatsache, daß es gelang, z.B. beim Isolat pNSI-146 allein vier verschiedene N-Termini unter sechs klonierten Sequenzen zu finden, d.h. im einzelnen Individuum finden sich gleichzeitig mehrere Quasispecies des HIV. Die Expression solcher Varianten konnte zeigen, wie sich subtile Mutationen auf die Fusionsaktivität und die Prozessierung des Glykoproteins auswirken kann.

4.2.3 Variabilitäten in der V3-Region

Eine weitere Determinante im Bereich des HIV-Env-Proteins, die die Fusogenität entscheidend beeinflussen kann, ist der Bereich der hypervariablen Region 3 im gp120, der V3-loop. Die Struktur des V3-loops kann den Zelltropismus des Isolats wesentlich mitbestimmen. Mit Hilfe von chimären Viren fand sich eine Region innerhalb des Env, die die V3-Domäne beinhaltet und den Makrophagen-Tropismus determiniert (241). Innerhalb des V3-loops reicht eine 20 Aminosäuren lange Region aus, um ein T-Zell-tropes Isolat zu einem Makrophagen-tropen Isolat zu verändern (178, 179). Später wurde gezeigt, daß sogar Punktmutationen im V3-loop den Tropismus beeinflussen können (181, 329). Weitere Mutationen zeigten, daß die Fusionsaktivität des HIV-Env beeinflusst werden konnte, ohne dabei die gp120-CD4 Bindung zu verändern (24, 128, 152, 260). Die meisten Arbeiten, die sich mit dieser Thematik beschäftigen, sind vor der Entdeckung der HIV-Korezeptoren 1996 durchgeführt worden. Wenn auch auf Rezeptorseite durch die Definition der Chemokinrezeptoren als Korezeptoren des HIV ein molekulares Korrelat für Zelltropismus gefunden wurde, so ist damit auf der Seite des viralen Glykoproteins noch keineswegs detailliert geklärt, an welchen Stadien des Viruseintritts in die Zelle einzelne Regionen des Proteins entscheidend für die Interaktion mit Rezeptor und Korezeptor und die nachfolgenden Schritte sind.

Schon bei früheren Arbeiten hatte sich gezeigt, daß mit dem Wechsel eines Isolats vom NSI- zum SI-Typ Ladungsänderungen im V3-loop auftreten können (83, 237, 238). Der Hydrophobizitätsindex des von diesen Autoren beschriebenen Ausgangsisolats betrug +9 und verschob sich beim Wechsel zu den SI-Isolaten durch das Einführen basischer Aminosäuren auf minimal +3. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die zwei SI-Isolate P127 und P134 für das V3-Kassetten-System verwendet (s. 3.3) um in Analogie zu der oben beschriebenen Analyse der Spaltstellenregion isoliert die V3-Region auf ihre Beeinflussung der Fusionsaktivität zu untersuchen. Gegenüber dem Wildtyp zeigten beide rekombinanten Konstrukte pV3-127 sowie pV3-134 eine verminderte Fusionsaktivität. Wie in der oben zitierten Arbeit korrelierte dies mit einer erhöhten Frequenz von basischen Aminosäuren im V3-loop und damit einem Hydrophobizitätsindex von 4,8 bzw. 4,9 gegenüber dem Laborstamm mit 7,8. Die Korezeptorenanalyse ergab für beide Isolate CXCR4+, CCR5-. Das dabei verwendete Kontrollplasmid SVATGoligo, das eine Deletion des kompletten V3-loop besitzt, zeigte keinerlei Fusionsaktivität. Dieses Konstrukt besitzt Ähnlichkeiten mit publizierten Mutanten (338), da ihm der V3-loop einschließlich der flankierenden Cysteine fehlt. In Übereinstimmung mit den Autoren fanden wir einen Verlust der Spaltbarkeit des Glykoproteins. In der späteren Analyse des Env-Transportes (s. 3.11.1) zeigte sich, daß bei dieser Mutante nach Transfektion

keine Neuraminsäuremodifikation des ungespaltenen Glykoproteins sowie keine Mikrovesikelbildung zu finden sind. Dies gibt Hinweise darauf, daß dieses Glykoprotein weder den terminalen Golgi-Apparat noch die Zelloberfläche erreicht, sondern vorzeitig dem intrazellulären Abbau zugeführt wird.

4.3 Gezielte Mutagenese in der Region um die Spaltstelle gp120/gp41

4.3.1 Deletionen im gp41 N-Terminus

Die bisher diskutierten Ergebnisse hatten als experimentellen Ansatz die Fragestellung, was in natürlich vorkommenden Isolaten an Variabilitäten in den genannten Env-Regionen zu finden ist und wie sich diese auf die Funktionalität des Glykoproteins auswirken. Zur weiteren Klärung der Frage, wie sich Mutationen C- und N-terminal der Spaltstellenregion auswirken, wurde eine gezielte Mutagenese spezifischer Aminosäurepositionen durchgeführt. Die dabei verwendete Technik der Verwendung von Oligonukleotid-Primern mit gewollten Fehlpaarungen zur Zielsequenz im Zusammenhang mit PCR-Techniken erwies sich dabei als effizient und gilt heute als Standardtechnik für die Bearbeitung solcher Fragestellungen.

Ausgangspunkt für die nachfolgenden Diskussionspunkte waren sukzessive Deletionen der N-terminalen Aminosäuren des HIV-1 gp41. Vergleichbare Konstrukte waren in unserem Labor bereits früher beschrieben worden (289) mit dem entscheidenden Unterschied, daß die damals verwendeten Plasmide zusätzliche Mutationen am Codon 22 und 23 des N-Terminus aufwiesen, die sich auf zwei Ebenen der Expression auswirkten: Auf RNA-Ebene wurde dabei die Struktur des Rev-responsive-Element (RRE) beeinträchtigt (289) und damit die Expression herabgesetzt. Auf Proteinebene fand sich darüberhinaus, daß durch den Aminosäureaustausch an Position 22 (A→T) die Assoziation der Glykoproteinuntereinheiten gestört war und zu einem erhöhten Freisetzen von gp120 führte im Sinne einer "shedding-Mutante" (4). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Deletionen der ersten vier aminoterminalen Positionen wurden am Wildtyp-Env ohne die genannte zusätzliche Mutation durchgeführt und führte zu Konstrukten, die in ihrer Env-Expression unbeeinträchtigt waren.

Unter diesen neuen experimentellen Bedingungen zeigte sich, daß der Verlust der N-terminalen Aminosäuren zu einer Beeinträchtigung der Spaltbarkeit des Glykoproteins führt. Unsere ursprüngliche Absicht war gewesen, mit Hilfe dieser Deletionsmutanten in erster Linie Aufschlüsse über die Funktion des gp41 N-Terminus hinsichtlich seiner Fähigkeit, die Fusion benachbarter Membranen zu initiieren zu gewinnen. Für diesen Prozeß ist jedoch unbedingte Voraussetzung, daß das Vorläuferprotein gp160 effektiv gespalten wird, was mit zunehmender

Einkürzung des N-Terminus offensichtlich nicht mehr gegeben ist. Dies bedeutet, daß für den Verlust der Fusionsaktivität bei den Deletionsmutanten sich zwei Phänomene überlagern und experimentell kaum mehr zu trennen sind: Verlust der Funktionalität des N-Terminus als Fusionspeptid und Verlust der Spaltbarkeit des Vorläuferproteins. Für die Bedeutung des ersten Punktes spricht eine Studie, die mit Hilfe von Peptiden und künstlichen Vesikeln die Bedeutung der N-terminalen Aminosäuren für die Membranfusion untermauert hat (230). In der vorliegenden Arbeit lohnt sich in diesem Zusammenhang ein Blick auf die genauen Daten der Fusionsaktivität und den dazugehörigen Proteinnachweisen (s. Abb. 51 und Abb. 54). Der dramatische Verlust der Fusionsaktivität bei der Einkürzung des N-Terminus von -1 auf -2 Aminosäurepositionen (vgl. env-1-dspenef⁻ zu env-2-dspe-nef⁻) ist nicht begleitet von signifikanten Unterschieden im Nachweis der env-Spaltprodukte. Die Spaltbarkeit erscheint erst ab der Mutante env-3dspenef⁻ deutlich beeinträchtigt. Die Tatsache, daß der Verlust der ersten Position für die Funktion des Glykoproteins tolerabel ist, wird durch die Tatsache untermauert, daß sich in den publizierten Sequenzen (249) von natürlich vorkommenden Isolaten solche Deletionen finden lassen.

Die Serie der Deletionsmutanten erwies sich trotz der genannten Interpretationsprobleme bezüglich Spaltbarkeit und Fusionsaktivität in einem weiteren Zusammenhang als nützliches Werkzeug: In der Proteinanalyse zeigte sich neben dem bekannten gp160 ein zweites Protein mit einem etwas langsameren Laufverhalten, von dem wir zeigen konnten, daß es sich dabei um eine Fraktion von ungespaltenem gp160 handelt, die endständig mit Neuraminsäure gekoppelt ist. In der RIPA-Analyse und noch deutlicher in der Westernblotanalyse führt dies zum Phänomen einer Doppelbande. Ähnliche Doppelbanden beim Vorläuferprotein wurden von anderen Autoren beim HIV (126, 234, 366) sowie zuvor bei murinen Retroviren (129) beschrieben. Abgesehen von einer Publikation (234), die mittels Zelloberflächen-Iodinierung zeigen konnte, daß diese sialisierte Form des Glykoproteins auf der Zelloberfläche nachzuweisen ist, wurden keine systematischen Untersuchungen zu diesem Phänomen durchgeführt. Unsere vergleichenden Neuraminidase-Verdaus von Wildtyp und Spaltmutanten zeigten, daß im Falle des gespaltenen Glykoproteins beim Wildtyp nicht das gp160 eine Neuraminidase-Empfindlichkeit aufweist, dafür aber das gp120 und das gp41. Dies ist im nachfolgenden Schema verdeutlicht:

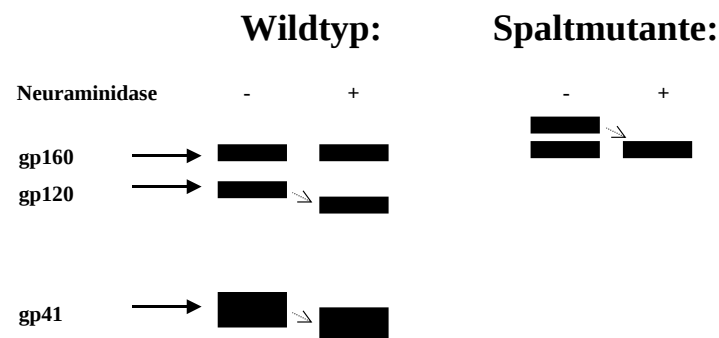


Abb. 76 Schema der Neuraminidase-Empfindlichkeit des HIV-Env beim Wildtyp sowie bei Spaltmutanten. In beiden Fällen ist ein shift von Proteinbanden erkennbar: Während sich beim Wildtyp das Laufverhalten der gp120 und gp41-Banden verändert, ist bei der Spaltmutante ein shift der oberen gp160 Bande zu erkennen, die sich dann mit dem nicht sialisierten gp160 überdeckt.

Die bei den Spaltmutanten vorhandene obere Bande stellt damit das Gegenstück zu dem beim Wildtyp nachzuweisenden Produkten gp120 und gp41 dar. Umgekehrt läßt sich aus der Tatsache, daß das beim Wildtyp nachzuweisende gp160 nicht neuraminidase-empfindlich ist, schließen, daß es aus einem früheren Prozessierungsschritt stammt und vermutlich im frühen bis mittleren Golgi-Komplex lokalisiert ist (s. auch Abb. 78).

4.3.2 Proteinexport mittels Mikrovesikel

Ein überraschendes und zuerst widersprüchlich erscheinendes Ergebnis der Experimente mit den N-Terminus-Deletionsmutanten war die Tatsache, daß trotz Zeichen einer verminderten Spaltbarkeit die extrazellulären Mengen an HIV-Glykoprotein vergrößert waren. Der Verlust der N-terminalen Aminosäuren des gp41 führt per se zu einer Verminderung der Hydrophobizität des Fusionspeptids und hätte damit als Folge ein erhöhtes shedding von gp120 von der Zelloberfläche zur Folge haben können, vergleichbar mit der oben diskutierten Mutante pNSI-465 (s.4.2.2). Dabei wäre jedoch die effiziente Spaltung des Vorläuferproteins die Voraussetzung, die aber in diesem Fall nachweislich gestört erscheint. In der Tat gab die RIPA-Analyse des Zellextraktes zusammen mit der des freien Glykoproteins keine Hinweise auf ein erhöhtes shedding bei den Deletionsmutanten. Der Vergleich mit zwei für diesen Zweck konstruierten Mutanten, der nicht spaltbaren Mutante envCHnef und der shedding Mutante env15Anef unterstützen den Befund, daß die Deletionsmutante env-3-dspenef als ein in seiner Spaltbarkeit partiell gehemmtes Glykoprotein exprimiert.

Die fraktionierte Zentrifugation des Zellkulturüberstands brachte hervor, daß das ursprünglich im Glykoprotein-capture-ELISA nachgewiesene Protein aus zwei Quellen stammte: neben dem freien Glykoprotein fand es sich in Mikrovesikel gebunden. Andere Autoren (28, 145) haben Mikrovesikel als Quelle für Kontaminationen von scheinbar gereinigten Viruspräparationen beschrieben, die verschiedene Membranproteine zellulärer Herkunft, jedoch kein HIV-gp120 enthielten. Wir konnten bei den Spaltmutanten nachweisen, daß das ungespaltene Glykoprotein – in Mikrovesikel verpackt – effektiv aus der Zelle ausgeschleust wird, so daß der Nettoexport von Glykoprotein gegenüber dem Wildtyp sogar erhöht ist. Umgekehrt ist von anderen gezeigt, daß ungespaltenes Glykoprotein weniger effektiv in Viruspartikel inkorporiert wird (37, 97). In unseren Experimenten war eindeutig zu sehen, daß das in den Mikrovesikeln zu findende Glykoprotein sialisiert war, da es im Laufverhalten bei der Proteinanalyse der oberen Fraktion der beschriebenen Doppelbande entsprach. Daraus läßt sich schließen, daß das ungespaltene Glykoprotein sowohl bei den Deletionsmutanten wie auch bei der Spaltmutante envCHnef ("Chymotrypsin-Mutante") die Zelloberfläche erreicht, d.h. der vorgesehene Transportweg nicht durch die Aminosäureveränderungen gestört ist. Zum zweiten ist zu sehen, daß Voraussetzung für die Verpackung in Mikrovesikel das Erreichen des terminalen Golgi-Komplexes ist, in dem Neuraminsäure endständig gekoppelt wird. Dies wird weiterhin dadurch gestützt, daß wir eine weitgehende EndoH-Resistenz des in Mikrovesikel verpackten Glykoproteins zeigen konnten, was darauf schließen läßt, daß die Proteine den terminalen Golgi-Komplex passiert haben müssen. Umgekehrt läßt sich der Nachweis von Mikrovesikeln und/oder sialisiertem Protein für die Beantwortung der Frage nutzen, ob ein mutiertes Glykoprotein in seinem Transport gestört ist. Ein interessanter Unterschied ergab sich bei dem Vergleich der beiden Deletionsmutanten SVd120 und SVd120B. Die bei der letzteren Mutante vorhandenen zusätzlichen Aminosäuren des gp120 C-Terminus bewerkstelligen offenbar, daß das Glykoprotein seinen Weg bis zur Zelloberfläche durchläuft und deshalb in der Mikrovesikelfraktion nachzuweisen ist.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Wirtszellproteinen nachgewiesen, die spezifisch in Viruspartikel inkorporiert werden. Dazu zählen das Cyclophilin A im Nukleokapsidbereich sowie der HLA Klasse II Komplex in der Membran (17, 121, 122, 256, 257, 336). Einige dieser Befunde wurden im Nachhinein relativiert, nachdem sich zeigte, daß Mikrovesikel als Kontaminationen von gereinigten Viruspräparationen gefunden werden können, da sie bei den üblichen Dichtgradientenschritten gemeinsam mit Viruspartikeln sedimentieren (15, 28, 337) (s. Abb. 77). Dabei lag der Akzent auf der Kontamination mit zellulären Proteinen, während gleichzeitig die Mikrovesikel als annähernd frei von gp120 beschrieben wurden (28), was suggeriert, die Mikrovesikel seien frei von viralem Glykoprotein.

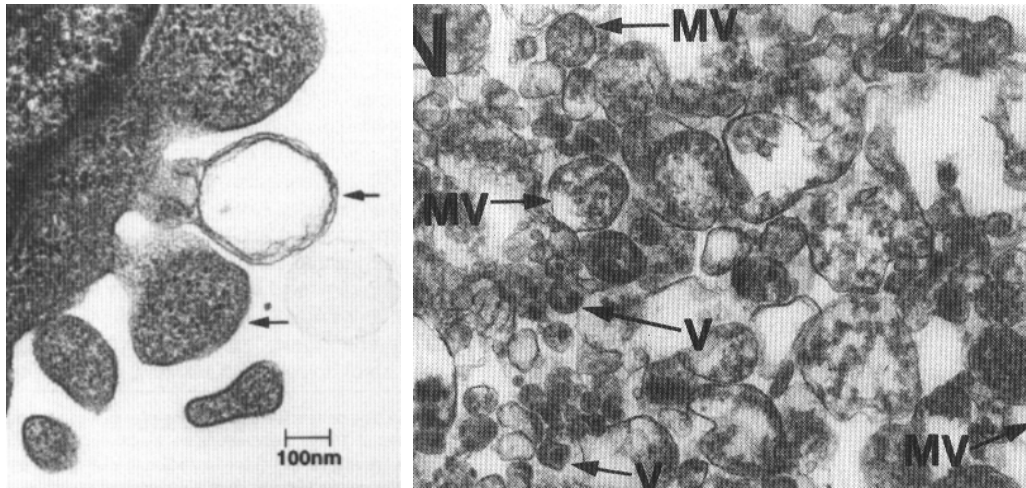


Abb. 77 Elektronenmikroskopische Darstellung von Mikrovesikeln. Links: Zelloberfläche mit sich ablösenden Mikrovesikeln (Pfeile) unterschiedlicher Dichte. Rechts: Sucrose-Gradient-gereinigte HIV-1 Partikel (V), die mit Mikrovesikeln (MV) kontaminiert sind. Aus Bess et al. (28).

Wie wir deutlich zeigen konnten, war in den von den HeLa-Zellen gebildeten Mikrovesikeln bei den nicht spaltbaren Mutanten das HIV-Glykoprotein als Vorläuferprotein nachweisbar und darüberhinaus beim Wildtyp relevante Mengen an gp41. Dabei dürfte es experimentell schwierig werden, zu unterscheiden, ob beim Wildtyp die gp120-Domäne sekundär verloren gegangen ist ("shedding") oder ob sich Mikrovesikel bevorzugt an den Bereichen der Zelloberfläche bilden, an denen sich HIV-Glykoprotein befindet, von dem das gp120 bereits dissoziiert ist. Um diesen Punkt zu klären, untersuchten wir das Verhalten der Mutante env15AEnef, die durch Störung der Assoziation der gp-Untereinheiten zu einem erhöhten shedding führt (127). Die Tatsache, daß diese Mutante eine eher geringere Menge an Mikrovesikeln produziert, spricht eher für einen sekundären Verlust des gp120 beim Wildtyp, der erst stattfindet, wenn sich die Mikrovesikel im Extrazellulärraum befinden.

Der Weg des viralen Glykoproteins bis zum Einbau in die Mikrovesikel ist in der Abb. 78 schematisch dargestellt für den Wildtyp sowie für eine nicht spaltbare Mutante:

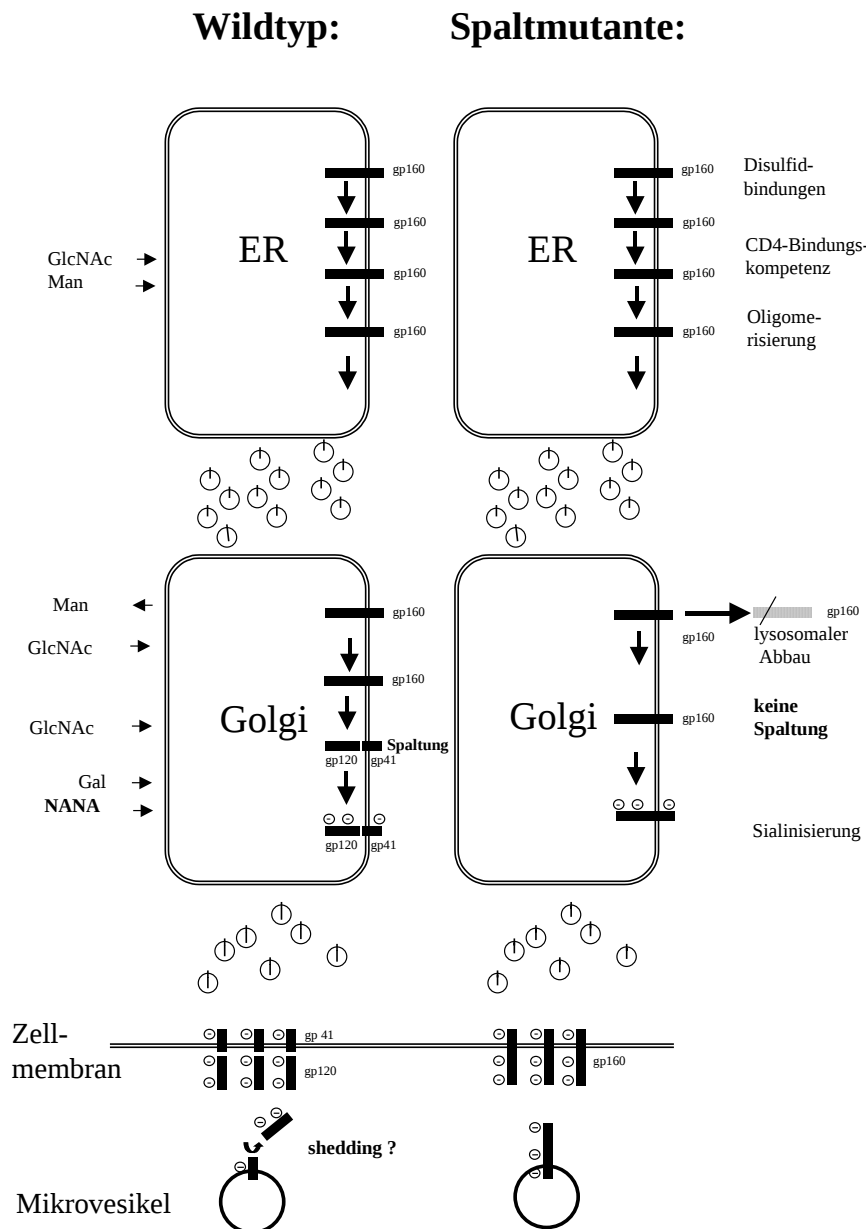


Abb. 78 Transport des HIV-Env-Wildtyps (links) und einer nicht spaltbaren Mutante (rechts). Zum besseren Verständnis sind die Mikrovesikel unten in der Abbildung vergrößert dargestellt. Generell verlaufen die Wege von Wildtyp und Spaltmutanten in gleicher Form durch die Zelle, ein Unterschied besteht im Golgi-Apparat, in dem bei der Mutante die Spaltung des Vorläuferproteins ausbleibt. Die Möglichkeit einer reversen Orientierung der Glykoproteine in den Mikrovesikeln wie unten diskutiert (s.u. 4.3.3) ist in der grafischen Darstellung der Mikrovesikel nicht berücksichtigt.

Dies macht deutlich, daß die Transportwege des Wildtyps und der nicht spaltbaren Glykoproteinmutante sich prinzipiell nicht unterscheiden. In beiden Fällen befindet sich in den gebildeten Mikrovesikeln Glykoprotein, das endständig mit Neuraminsäure gekoppelt ist. Die quantitativen Vergleiche, wieviel Glykoprotein sich in Form von Mikrovesikeln und wieviel in freier Form außerhalb der Zelle befinden, zeigte dabei, daß beide Fraktionen ungefähr gleich groß erscheinen. Damit ist gezeigt, daß es neben den bisher bekannten Wegen des Exports von viralem Glykoprotein aus der Zelle noch einen zweiten effektiven Weg gibt. Dies könnte eine Erklärung sein für frühere Arbeiten am SIV (318), die mit Hilfe von Zelloberflächenbiotinylierungen und dem Messen von freiem Glykoprotein und Zelloberflächenprotein gearbeitet hatten und bereits einen alternativen Transportweg postulierten.

4.3.3 Glycosidaseresistenz der Mikrovesikel

Ein überraschender Befund ergab sich bezüglich der Testung von zuckerspaltenden Enzymen, wie der Neuraminidase, PNGase F sowie EndoH auf die Empfindlichkeit des Env-Proteins, sofern es in Mikrovesikeln vorliegt. Native Mikrovesikel im Zellkulturüberstand zeigten sich nur gegenüber den Enzymen empfindlich, wenn sie zuvor mit einem Detergenz lysiert worden waren. Dies konnten wir zum einen bei den Spaltmutanten am ungespaltenen Glykoprotein gp160 zeigen, zum anderen beim gp41 des Wildtyps. Die partiell in ihrer Spaltbarkeit gehemmte Mutante env-3dspene^f erwies sich dabei als hilfreich, da man mit ihr im selben Ansatz die Neuraminidase-Resistenz der Mikrovesikel und die Empfindlichkeit des freien dissoziierten gp120 nachweisen konnte, was die Funktionsfähigkeit der Neuraminidase als Enzym beweist.

Um einen Erklärungsansatz für dieses Phänomen zu finden, ist ein Einblick in Arbeiten der jüngsten Zeit über die oligomeren Strukturen viraler Glykoproteine hilfreich. Wie bereits oben dargestellt (s. 1.5.3), weisen die meisten Daten der letzten Jahre darauf hin, daß das HIV-Glykoprotein als Trimer von gp120-gp41 Heterodimeren in der Membran vorliegt. Bei diesem Modell erkennt man strukturelle Gemeinsamkeiten mit anderen fusionsaktiven viralen Glykoproteinen wie dem des Moloney murine leukemia virus (107), des Influenza Virus (49) und des Ebola-Virus (351). In jüngster Zeit wurde für die retroviralen Foamy-Viren ebenfalls in der Elektronenmikroskopie eine trimere Form des Glykoproteins gezeigt, wobei diese Trimere sich darüberhinaus in hexameren Clustern anordnen (364). Obwohl sich das HIV-Glykoprotein Untersuchungen mittels Röntgen-Kristall-Analyse weitgehend entzieht, hat man auf der Grundlage von Antikörper-Bindungsstudien und den vorhandenen Daten über atomare Struktur plausible Modelle für das postulierte Trimer gefunden (204, 374). Dabei ergibt sich für die

Lokalisation der Zuckerseitenketten im Trimer eine klare Verteilung zugunsten der nach außen gerichteten Bereiche des Proteins, wie in Abb. 79 dargestellt:

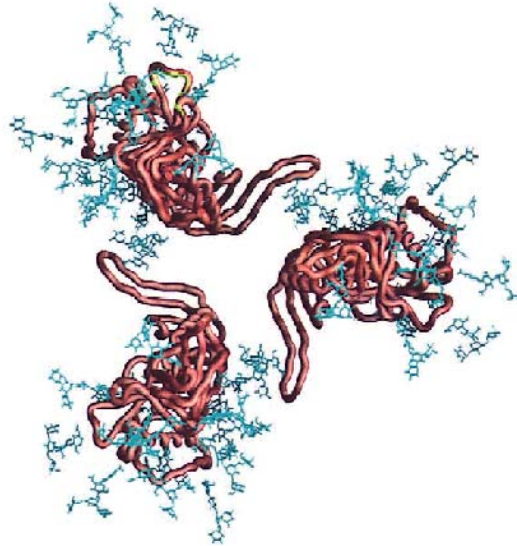


Abb. 79 Modell des HIV-gp120 in trimerer Form in der Perspektive von oben (Virusmembran). In Blau zu sehen die Zuckerseitenketten (aus (59)).

Daraus ist zu schließen, daß das HIV-Glykoprotein, wenn es in seiner natürlichen Form vorliegt, durchaus für die Glycosidasen zugänglich sein sollte. Umgekehrt ist aus der Tatsache, daß das ungespaltene Protein nicht den Glucosidasen zugänglich ist, anzunehmen, daß es in einer veränderten räumlichen Struktur vorliegt. Ungespaltene Glykoprotein wird nur ineffektiv in Viruspartikel eingebaut (97). Die Spaltung des HIV-Glykoproteins ist damit Voraussetzung für einen Einbau in reifende Viruspartikel, was darauf schließen läßt, daß dabei ein distinkter Umbau im Protein stattfindet, der bei der Virusmaturation diese Differenzierung zuläßt.

Für die zweite Komponente des Glykoproteinkomplexes, die TM-Domäne gp41 konnten wir ebenfalls eine Glycosidase- und Proteaseresistenz zeigen, wenn sie in Mikrovessikeln vorliegt. Dabei fällt auf, daß in diesen Mikrovessikeln keine oder meist nur geringe Mengen an gp120 nachweisbar sind. Bindung des HIV-Env an den Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung im Glykoprotein, die in einer Dissoziation des gp120-Komplexes endet (164, 195, 242), was aber in Abhängigkeit von Isolaten auch spontan ohne Rezeptorbindung geschieht. Im Anschluß daran ist es nach Ansicht mehrerer Autoren zu erwarten, daß das gp41 in den oben beschriebenen fusionsaktiven Status übergeht (60, 352), der als thermostabil und protease-resistent charakterisiert ist. Das gp41 besitzt nur vier Glykosilierungsstellen, von denen drei in dem

Bereich zwischen den α -helikalen Regionen liegen, die vierte in der C-terminalen α -Helix (s. Abb. 13). Bei der Ausbildung der coiled coil-Struktur kann es dabei durchaus sein, daß in dieser dichtgepackten Struktur die Zuckerseitenketten nicht mehr für die Glycosidasen zugänglich sind. In diesem fusionsaktiven Zustand ist darüberhinaus ein Wechsel von Intra-zu Interketten-Disulfidbindungen zwischen den gp41-Ektodomänen beschrieben (353), der zum Verlust der Reaktivität eines monoklonalen Antikörpers führt, der die Disulfidschleife im gp41 erkennt (s. Abb. 13). Dies alles läßt auf drastische Konformationsänderungen im gp41 schließen, wenn es in den fusionsaktiven Zustand übergeht. Dieselben Autoren postulieren auch, daß auch Teile des ungespaltenen Vorläuferproteins gp160 in den fusionaktiven Zustand übergehen, was sicherlich auch zu Konformationsänderungen im Gesamtprotein führt, die eine Erklärung für die oben diskutierte Glycosidasen - und Proteaseresistenz der Spaltmutanten-Proteine darstellen könnte.

Eine andere überraschende, aber einfache Interpretation der ausgeprägten Glycosidaseresistenz von nativen Mikrovesikeln ist die Möglichkeit, daß das in den Vesikeln inkorporierte Proteinmolekül in der Lipid-Doppelmembran revers orientiert ist, d.h. daß der eigentlich cytoplasmatische Teil des gp41 nach außen ragt. Von den ca. 30 Glykosilierungsstellen im gesamten HIV-1 Env, sind - wie oben erläutert - nur vier in der extrazellulären und keine in der cytoplasmatischen Domäne des gp41 lokalisiert:

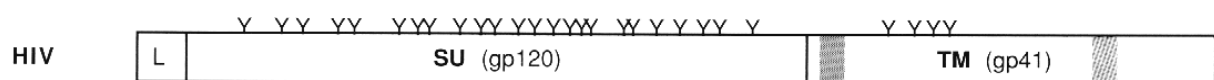


Abb. 80 Schematische Darstellung des HIV-1 Env-Glykoproteins. Mit "Y" gekennzeichnet sind die potentiellen Glykosilierungsstellen im gp120 sowie dem gp41-Bereich (nach Coffin et al., *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Press 1997).

Dies könnte erklären, warum das in den Mikrovesikeln enthaltene Glykoprotein erst nach Lyse mit einem Detergenz für zuckerspaltende Enzyme zugänglich ist, was allerdings nicht in vollem Einklang mit den Ergebnissen des Chymotrypsin-Verdau (s. Abb. 64) zu bringen ist, denn dieses Enzym sollte durchaus in der Lage sein, das ihm zugängliche Protein zu verdauen. Für eine reverse Orientierung des Glykoproteins sprechen jedoch wiederum Arbeiten über B-Lymphozyten (276, 278), in denen antigen-präsentierende Vesikel beschrieben werden, die von MHC II angereicherten Zell-Kompartimenten stammen sollen sowie Arbeiten in HEP-2 Zellen (342, 343), die multivesikuläre Zellkörper beschreiben, welche Vesikel - in dem Fall Exosomen genannt - exportieren. Von beiden Formen ist mit Hilfe von Immunogold-Färbungen aus Kryoschnitten gezeigt, daß sie die luminal Domäne des MHC II - Komplexes auf ihrer Oberfläche präsentieren. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in unserem augenblicklichen

Status der Arbeiten die Frage nach der räumlichen Orientierung der Mikrovesikel-Proteine noch nicht abschließend zu beantworten ist.

4.3.4 Interaktion des HIV-Env mit MA-Proteinen

Die retroviralen Env-Glykoproteine werden während des budding-Prozesses an der Zellmembran der infizierten Zelle in neue Viruspartikel inkorporiert. Auf der anderen Seite sind beim aus dem gag-Bereich stammenden MA-Protein Membran-bindende Domänen beschrieben worden (54, 185, 313, 345, 389, 390, 391), die unter anderem über die N-terminale Myristilierungsstelle gefördert wird. Diese beiden Befunde legen die Vermutung nahe, daß es während des Reifungsprozesses zu einer Interaktion zwischen dem Env und dem MA kommen kann. Dabei ist zu betonen, daß Lentiviren einzigartig unter den Retroviren mit der Eigenschaft sind, daß ihr Env-Protein eine bemerkenswert lange cytoplasmatische Domäne hat (vgl. Abb. 7). Sie beträgt beim HIV-1 und HIV-2 ca. 150 Aminosäuren (249), während sie bei anderen Typ C oder D Retroviren nur ca. 20-40 Aminosäuren lang ist (177, 267, 314). Es gibt mehrere Hinweise darauf, daß das MA-Protein direkt die Inkorporation von Env in Viruspartikel fördert (s. 1.4).

Unsere Befunde, daß Kotransfektionen von Env-exprimierenden und MA-exprimierenden Vektoren zu einer unveränderten Menge an Env-inkorporierten Mikrovesikeln führen (s. Abb. 70) und daß das MA-Protein ebenfalls in Mikrovesikeln nachweisbar ist, legen die Wahrscheinlichkeit nahe, daß Env und MA-Protein gemeinsam in die Vesikel inkorporiert werden, wie dies auch in reifen Viruspartikeln geschieht. Zum anderen gibt es Hinweise darauf, daß ungespaltenes Glykoprotein - wie es in der vorliegenden Arbeit bei der Chymotrypsin-Mutante nachgewiesen werden kann, zwar in Viruspartikel inkorporiert wird (366), daß dies jedoch ein ineffektiver Prozeß ist (97). Zieht man zusätzlich in Erwägung, daß wir zeigen konnten, daß ungespaltenes Glykoprotein als nicht funktionsfähiges Protein gesteigert in Mikrovesikel verpackt wird (s. Abb. 56 und Abb. 58), während Env-Protein, das die SU-Domäne verloren hat, vermindert in diese inkorporiert wird, ergibt sich daraus ein Modell, wie in der virusinfizierten Zelle die Inkorporation von Env-Protein in Viruspartikel versus Mikrovesikel gesteuert wird (s. Abb. 81).

Danach stellt die Inkorporation von Env-Protein in Mikrovesikel in der infizierten Zelle einen Weg dar, wie sie nicht-funktionsfähige Env-Proteine beseitigen kann. Haben sich Env und MA an der Membran nicht zusammengefunden, wird der Weg in den intrazellulären Abbau gefördert. Ungespaltenes Glykoprotein dagegen hat auch die Möglichkeit, über Mikrovesikel-Export die Zelle zu verlassen. Aus der Sicht des Virus stellt dies einen Vorteil dar, da auf diese Weise die Inkorporation von funktionsfähigem Env in die Viruspartikelreifung gefördert wird, während die Mikrovesikelbildung biologisch eine Sackgasse beinhaltet.

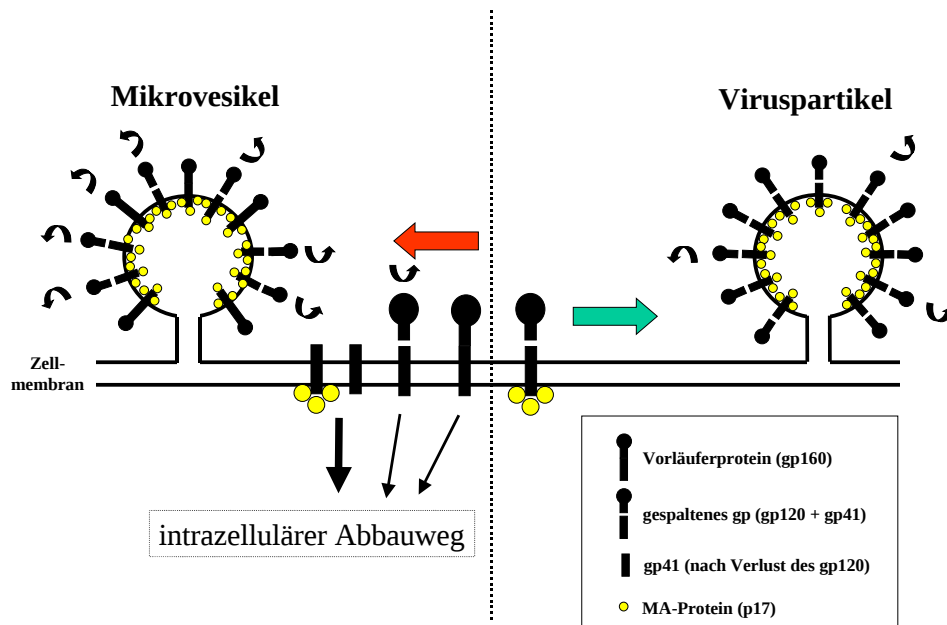


Abb. 81 Modell für die Steuerung von Env-Protein in den Weg der Virusbildung bzw. der Mikrovesikelbildung. Gespaltenes, mit MA-Protein assoziiertes Glykoprotein wird überwiegend in die sich neu formierenden Viruspartikel gelenkt, kann aber ebenso in Mikrovesikel eingebaut werden. Der Anteil an ungespaltenem und damit nicht funktionsfähigem Glykoprotein geht verstärkt in die Mikrovesikelbildung und wird auf diese Weise aus der Zelle beseitigt. In den Mikrovesikeln findet eine verstärkte Dissoziation des gp120 statt, die im Viruspartikel nur zu geringerem Teil geschieht. Ein Großteil des synthetisierten Glykoproteins geht in den intrazellulären Abbauweg und wird damit weder in Viruspartikel noch Mikrovesikel inkorporiert.

4.4 HIV-gp41-C-Terminus-Deletionen

Spontane Deletionen im gp41-Carboxy-Terminus wurden in HIV-1-chronisch infizierten Zellkulturen beobachtet. Dabei fand sich ein gesteigerter Proteintransport innerhalb der Zelle, jedoch ein verminderter Einbau von Glykoprotein in Viruspartikel, was möglicherweise mit den Interaktionen des Env mit dem Matrixprotein bei der Virusmaturation zusammenhängt (77, 95, 106, 158, 224, 258, 376, 383). Darüberhinaus gibt es auch Hinweise, daß diese Deletionen die Virusreplikation nach Eintritt in die Wirtszelle behindern (134, 383). Beim SIV, das in humanen Zellen kultiviert wurde, finden sich vorzeitige Stopkodons im Kodierungsbereich des cytoplasmatischen Teil des Glykoproteins mit vergleichbaren Auswirkungen auf den Proteintransport in der Zelle, was jedoch in dem Fall zu einer gesteigerten Infektiosität führt (57, 165, 279, 319, 320, 393).

Unsere Experimente zeigen, daß ein C-terminal-trunkiertes Env-Protein nach transienter Transfektion in Eukaryonten zu einem deutlich gesteigerten Proteinnachweis im Immunoblot führt, was zu der ungewöhnlichen Situation führt, daß auch ohne Rev-Zugabe eine Fusionsaktivität der Konstrukte nachzuweisen ist. Die hohe Aktivität wurde vermutlich dadurch mitverursacht, daß die Expression in einem Vektor erfolgte, der intronhaltige mRNAs erzeugt,

die durch eine erhöhte Stabilität und damit verbesserte Expression gekennzeichnet sind (153, 161, 217). Verlängert man diesen cytoplasmatischen Schwanz um ca 60 Aminosäuren, so ist dieser Effekt weitgehend wieder aufgehoben, so daß weitere Deletions-Experimente erfolgen sollen, um die expressionsvermindernde Region im gp41 exakter zu charakterisieren. Bisher konnten dabei Effekte auf mRNA-Ebene nicht nachgewiesen werden, der gesteigerte Nachweis von extrazellulären Env-haltigen Mikrovesikeln jedoch läßt auf einen posttranslationalen Mechanismus schließen im Sinne eines gesteigerten Glykoproteintransports zur Zelloberfläche. Dies wird unterstützt durch eine Arbeit der letzten Zeit, die zwei Aminosäurebereiche im cytoplasmatischen Bereich des gp41 beschreibt, die die Oberflächenexpression vermindern (50). Die Kenntnisse über die Beeinflussung von Expression durch diese cytoplasmatischen Regionen könnte von großer Bedeutung für jede Form von gentherapeutischen Ansätzen sein, die sich retroviraler Vektoren bedient.

4.5 Weitere in Mikrovesikel inkorporierte HIV-Proteine

Wie weiter oben bereits angedeutet (s.Abb. 1), sind außer den bekannten Strukturproteinen des HIV in kleineren Mengen akzessorische virale Proteine im reifen Viruspartikel nachgewiesen worden, vor allem das Vpr (74, 214, 263, 384, 385, 386). Dabei litten frühe Arbeiten oft unter dem Mangel, daß gereinigte Viruspräparationen kontaminiert waren mit Mikrovesikeln, die aus infizierten Zellen stammen (28, 145). Darüberhinaus zeigte sich, daß virale Proteine über weitere nicht bekannte Mechanismen aus der Zelle sezerniert werden können. So wurden Berichte über die Inkorporation des akzessorischen Proteins Vif in das reife Viruspartikel (35, 53, 119, 188, 211) später relativiert, als eine Arbeitsgruppe mit Hilfe eines Dichtegradienten (Iodixanol, OptiPrep[®]) zeigen konnte, daß nach Transfektion von Vif-kodierenden-Vektoren das Protein in Abwesenheit von Viruspartikelbildung von der Zelle sezerniert wird; gleichzeitig erwiesen sich gereinigte Viruspräparationen als nahezu frei von Vif (89).

Nachdem wir in unserem System die Mikrovesikel als effektiven Transportweg von viralem Glykoprotein beschrieben hatten, stellte sich die Frage, ob dieser Weg auch für den Export vom HIV-1-Nef eine Rolle spielen könnte. Wir hatten bereits vor Jahren in Radioimmunopräzipitationen von Zelllysaten und Zellkulturüberständen über relevante Mengen an extrazellulären Nef berichten können (2). Zudem war wie oben beschrieben (s. 1.3) Nef in Mengen von 50-70 Molekülen pro Viruspartikel nachgewiesen worden. Dabei ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden verwendeten Nef-exprimierenden Vektoren pSGTH4 und pSGYU2. Die beiden Konstrukte waren bewußt gewählt worden, da sie sich

bezüglich ihrer Eigenschaft, myristiliert zu werden, unterscheiden. Die Struktur der Myristilinsäure ist in Abb. 82 dargestellt:

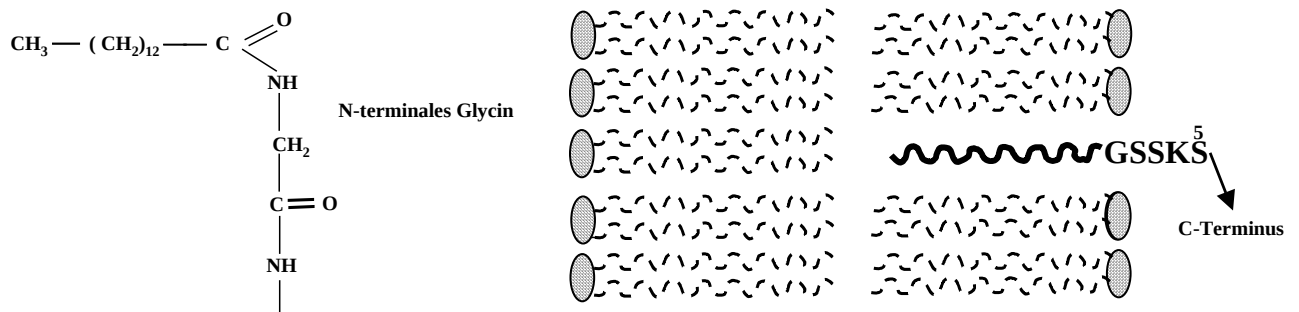


Abb. 82 Links: Chemische Struktur der Myristilinsäure, an ein N-terminales Glycin einer Polypeptidkette gebunden. Rechts: Integration eines myristilierten Proteins in eine Zellemban (nach (151)).

Myristilierung und Palmitilierung stellen zwei post-translationale Modifikationen viraler und eukaryontischer Proteine dar, bei denen diese alkyliert werden (151). Damit wird es cytosolischen Proteinen ermöglicht, sich in Membranen zu verankern, was ansonsten nur den für den Export bestimmten Glykoproteinen ermöglicht ist, die ihren Weg durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Komplex nehmen (s. Abb. 78). Die Konsensus-Sequenz für das Myristilierungssignal ist dabei Met-Gly-X-X...Ser/Thr, wobei nach dem initialen Entfernen des Met in Position 1 die Fettsäure über eine Amidbindung an die freie Aminogruppe des Glycins an Position 2 gehängt wird. Beim HIV-Matrix-Protein (MA, p17) ist diese Modifikation essentiell; Mutationsanalysen haben ergeben, daß beim Fehlen der Myristilinsäure das budding des Viruspartikels blockiert ist (48, 148).

Aufgrund von Mutationsanalysen an dem Glycin in Position 2 des HIV-1-Nef wurde gezeigt, daß die Myristilierung es dem Protein ermöglicht, sich in der Zelle an Membranen und an das Zytoskelett zu binden (186, 252, 380). Darüberhinaus findet man es aber auch im Zellkern (120, 191). Ein weiterer für das Nef-Protein beschriebener Effekt, die Herunterregulierung des intrazellulären CD4-Komplexes in der Zelle ist ebenfalls von dem Vorhandensein der Myristilierung abhängig (163). In Abhängigkeit von der verwendeten Nef-Variante und dem Expressionssystem fanden sich steigernde, vermindernde oder nicht signifikante Effekte des Nef auf die produzierte Virusmenge (12, 29, 64, 84, 162, 193, 253, 335). Die meisten der dabei gezeigten Effekte setzen die Myristilierung des Nef voraus. Zusammenfassend läßt sich dazu

sagen, daß zahlreiche funktionelle Domänen des Nef beschrieben sind, die daraus resultierende Bedeutung des Nef für den Replikationszyklus des Virus jedoch weiterhin unklar ist. Ähnliches gilt für die Bedeutung des Nef bezüglich der Pathogenese: Bei einigen Patienten mit nicht-fortschreitender HIV-Infektion ("long-term non-progressive carrier") fand man trunkierte Formen des nef-Gens, was auf eine mögliche Rolle des Nef für die Entwicklung des Krankheitsbilds AIDS schließen läßt (194, 228, 270).

Unsere Beobachtungen zeigen, daß das HIV-1 Nef-Protein in relevanten Mengen extrazellulär nachzuweisen ist. Der Transport aus der Zelle heraus wird nach unseren bisherigen Ergebnissen über zwei Wege ermöglicht: Zum einen fanden wir es in Analogie zu den Befunden beim HIV-1-Env als in Mikrovesikel verpackte Proteine, sofern an Position 2 ein Glycin vorhanden war (3.11.2), darüber hinaus aber auch ein von der Myristilierung unabhängiger Weg. Der erste Weg erscheint dabei plausibel durch die Tatsache, daß es die Myristilierung dem Protein ermöglicht, sich an Membranen zu binden (s.Abb. 82), und auf diese Weise bei der Vesikelausschleusung an der Zelloberfläche mit exportiert zu werden. Für eine Erklärung des zweiten, von der Membranbindung unabhängigen Wegs, ist ein Vergleich mit dem HIV-1-Tat-Protein hilfreich: Vom HIV-1-Tat ist gezeigt, daß es neben seiner bekannten intrazellulären Wirkung auf die virale Genexpression und Replikation (s. 1.2) auch extrazellulär nachweisbar ist und von anderen Zellen aufgenommen werden kann (105, 123, 167, 227). Von anderen Autoren ist gezeigt, daß dieser Export nicht durch Brefeldin A, einer Substanz, die den vesikulären Transport zwischen endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Komplex unterbindet, gehemmt werden kann (61). Dies schließt für den Tat-Transport den klassischen sekretorischen Transportweg aus, wofür dem Protein auch die N-terminale Signal-Sequenz (33) fehlt. Es ist ebenfalls nicht inhibierbar durch Methylamin, einer Substanz die den endozytotisch/exozytotischen Transportweg hemmt (231). Unter dem Strich bleibt damit für das Tat ein noch nicht vollständig geklärter, jedoch nicht "Leader"-gesteuerter Transportweg, wie er ähnlich im Zusammenhang mit Fibroblasten growth factor (FGF) als Reaktion auf einen Hitze-Schock der Zelle beschrieben ist (330).

Vergleichbare Untersuchungen wie oben geschildert sind für unsere Befunde bezüglich des Nef-Transportes vonnöten, um zu zeigen, daß dieses akzessorische HIV-Protein ebenfalls diesen ungewöhnlichen Weg aus der Zelle heraus nimmt. Zur Zeit werden dazu durch gezielte Mutagenese Nef-Mutanten mit vorhandener oder deletierter Myristilierungsstelle hergestellt, um die beiden oben geschilderten Transportwege qualitativ und quantitativ voneinander abgrenzen zu können. In zukünftigen Experimenten wollen wir der Frage nachgehen, ob in Analogie zum HIV-1 Tat das extrazelluläre Nef von anderen Zellen aufgenommen werden kann und somit eine transzelluläre Wirkung besitzen kann.

4.6 Rolle extrazellulärer HIV-Proteine für die Pathogenese der HIV-Infektion und Impfstoffentwicklung

Schon früh nach der Entdeckung des HIV und der Feststellung, daß Teile des HIV-Glykoproteins nach Erscheinen auf der Zelloberfläche abdissoziieren können und somit in freier Form extrazellulär vorkommen, stellte sich die Frage, ob dieser Mechanismus für die Pathogenese der AIDS-Erkrankung von Bedeutung sein könnte. Dabei wurde in zahlreichen in vitro-Systemen mit inaktiviertem, nicht replikationsfähigem Virus sowie mit rekombinantem Glykoprotein gp160, gp120 oder gp41 Effekte gesehen. Frühe Studien zeigten, daß gp120 die mitogen-induzierte proliferative Antwort inhibieren konnte über eine Interferenz mit dem CD4-MHC-Komplex (226, 305). Diese Inhibition erfolgt möglicherweise über eine Interferenz mit intrazellulären Signalketten, über eine Blockierung der Phosphoinositol 4,5,-Biphosphat Hydrolyse sowie der Ca^{2+} Mobilisation (67). Während diese Versuche in stimulierten Zellen unternommen wurden, zeigte sich in ruhenden T-Zellen und mononukleären Zellen, daß gp120 dort die intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel anheben kann (200). Weiterhin zeigte sich, daß das Virus oder einige seiner Strukturkomponenten die Chemotaxis der Monozyten herabsetzen kann (269), was eine der Ursachen für das Auftreten von opportunistischen Infektionen im ZNS von AIDS-Patienten (u.a. zerebrale Toxoplasmose, Kryptokokken-Meningitis, progressive multifokale Leukoenzephalopathie, primäre ZNS-Lymphome) sein könnte (62, 240, 265). Andere Arbeiten haben einen exzitatorischen Effekt von gp120 und HIV auf Makrophagen gezeigt (307).

Die Erforschung der HIV-Erkrankung fokussierte sich unter anderem auf die bis heute ungeklärte Frage, wie es im zentralen Nervensystem (ZNS) zur Entwicklung der HIV-assoziierten Enzephalopathie kommen kann. In Patienten mit derartigen Manifestationen korrelieren die neurologischen Schäden mit dem Nachweis von HIV im ZNS (171, 198, 363). Die histologischen Veränderungen bestehen dabei vor allem in Astrogliose, Mirkogliaknoten, Riesenzellbildung durch Zellfusionen und diffuser Demyelinisierung (132). Als Eintrittsort für das Virus werden infizierte Makrophagen gesehen, die im ZNS zur Mikroglia gehören (321). Dort könnte freies HIV-Glykoprotein mitverantwortlich sein für die neurologischen Schäden, die im Laufe der Erkrankung gewöhnlich zunehmen. In Hippocampus-Kulturen von Mäusen konnte gp120 einen Zelltod der Neuronen erzeugen, ohne das Vorhandensein von replikationsfähigem Virus (45, 51). Dabei könnten noch andere HIV-Proteine unterstützend wirken. Im ZNS von Ratten stimulierte das HIV-Tat-Protein die Apoptose, wenn es in die Substantia nigra injiziert wurde (266).

Der HIV-Eintritt in das ZNS ist begleitet von Anstiegen der dort vorhandenen Zytokin-Level wie auch von Komplementfaktoren (317). Studien bezüglich der IL-1 Reaktivität im Temporallappen von HIV-Infizierten zeigten einen deutlichen Anstieg von IL-1 β -reaktiven Astrozyten sowie IL-1 enthaltender Mikroglia. An den oben genannten histologischen Veränderungen im ZNS sind IL-1 sowie der tumor necrosis factor (TNF- α) beteiligt. Beide Zytokine werden von Makrophagen, Mikroglia sowie Astrozyten produziert und sind in AIDS-Patienten erhöht (118, 130, 143, 144). Merrill et al. haben gezeigt, daß nicht-replikatives HIV in neonatalen Rattengeweben IL-1 sowie TNF- α induzieren kann (236). In derselben Arbeit zeigten sie, daß dieser Effekt auch mit rekombinanten Proteinen des HIV-Glykoproteins zu erzeugen ist, jedoch nur mit gp160 und gp41, nicht aber mit rekombinantem gp120. Andererseits waren diese Effekte sowohl mit gp120-Antikörpern wie auch mit einigen gp41-Antikörpern aufzuheben, was die Autoren darauf schließen läßt, daß das gp120 in irgendeiner Weise in seiner Struktur verändert sein muß, um den Zytokin-produzierenden Effekt aufzuweisen. Arbeiten mit rekombinantem gp41 (extrazelluläre Domäne, aa565-674) in Monozyten, Astrozyten sowie Neuronen haben dosis- und zeitabhängig eine 10-fache Hochregulation der IL-10-Sekretion gezeigt (316).

Im Hinblick auf die hier vorliegende Arbeit heißt das, daß neben dem freien, abdissoziierten HIV-1 gp120 die in Mikrovesikel verpackten Glykoproteine von pathogenetischer Bedeutung sein könnten. Die Effekte in den zuletzt zitierten Arbeiten waren durch rekombinantes gp160 sowie gp41 hervorgerufen. Wie von uns gezeigt, ist es der infizierten Zelle durchaus möglich, gp41 in Form von Mikrovesikeln effektiv auszuschleusen, was dann potentiell auf andere Zellen z.B. im ZNS einen Effekt ausüben könnte. Da auch ein Teil des Glykoproteins ungespalten auf der Zelloberfläche erscheint, kann damit auch gp160 in zellfreier Form vorliegen wie mit unseren nicht-spaltbaren Mutanten gezeigt wurde. Darüberhinaus haben auch wir Anzeichen dafür, daß diese Form von Glykoprotein modifiziert sein muß, da sie eine ungewöhnliche Resistenz gegenüber Glykosidasen aufweist. Im Weiteren würde es sich anbieten, einerseits weiter an der Strukturaufklärung des Glykoproteins, in der es in Mikrovesikeln vorliegt, zu arbeiten, andererseits zu überprüfen, inwiefern es biologische Effekte ausüben kann, wenn es in dieser Form z. B. auf Zellen des ZNS trifft. Dieser experimentelle Ansatz kommt nach unserer Ansicht dem pathogenetischen Geschehen im ZNS näher als das Arbeiten mit in Hefen rekombinant hergestelltem Env-Protein oder der Verwendung von Peptiden.

Dieser Punkt ist über die Erforschung von Grundlage hinaus von Bedeutung für die weitere Entwicklung von therapeutischen Impfstoffen. Die meisten der bisher erfolglos verlaufenen Immunisierungsstudien der letzten Jahre wurden mit rekombinanten Proteinen durchgeführt.

Dabei wurden Versuche unternommen, mit rekombinantem gp120 (11, 22, 72, 150, 189) sowie mit nicht spaltbarem, rekombinanten gp160 zu immunisieren (101, 116, 142). Diese großen Proteine gelangen jedoch nach Aufnahme in die antigen-präsentierenden Zellen nicht in den für die Bildung von cytotoxischen T-Lymphocyten (CTL) wichtigen HLA Klasse I-Weg, sondern werden über den Klasse II Weg präsentiert, wobei sie überwiegend Antikörper und CD4⁺-T-Zellen induzieren. In den letzten Jahren wurden deshalb Strategien entwickelt, über intramuskuläre Applikation von DNA-Vakzinen, die für HIV-Proteine kodieren, die Induktion von CTL zu induzieren (40, 219). Die dabei erfolgende Expression von Glykoprotein gleicht in mancher Hinsicht dem von uns verwendeten Vektor/Zellkultursystem, und der dabei in der vorliegenden Arbeit gezeigte Proteinexport aus der Zelle in Form von Mikrovesikeln ist ebenfalls bei solchen Strategien zu erwarten. In diesem Zusammenhang wäre es wünschenswert, weitere Detailkenntnisse über das Ausmaß und die räumlichen Strukturen der in Mikrovesikel verpackten Proteinmoleküle zu gewinnen. Das Wissen darum, wie gezielte Mutationen im Env-Molekül dabei Einfluß haben auf die intrazellulären Transportwege ist ebenfalls essentiell. So konnten wir zeigen, daß sowohl Mutationen wie z.B. die Verhinderung der Spaltbarkeit des Glykoproteins wie auch Deletionen im C-Terminus des gp41 die Effektivität des Vesikeltransports aus der Zelle heraus erhöhen. Offen bleibt dabei die Frage, ob derartig verpackte Virusproteine eine spezifische Immunantwort erzeugen und inwiefern sich diese modulierend auf die Abwehr des Organismus gegen das Virus auswirkt.

5 Zusammenfassung

Das HIV-1 Envelope-Protein spielt eine entscheidende Rolle in der frühen Phase der Virusreplikation, wenn sich das Viruspartikel an den Rezeptor der Zielzelle anheftet und eine Verschmelzung von Virus- und Zellmembran eingeleitet wird. Als integrales Membranprotein wird es in der virusinfizierten Zelle im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und kotranslational modifiziert. Auf seinem Weg zur Zelloberfläche bildet es Oligomere, wird in großem Ausmaß glykosiliert und im terminalen Golgi-Komplex in zwei Untereinheiten gespalten, die über nicht-kovalente Bindungen miteinander assoziiert bleiben. Für seine Funktion sind diese Modifikationen notwendig und in dieser Form findet man es in der Membran von neugebildeten Viruspartikeln, nachdem diese die Zelle verlassen haben. Ein Teil der Untereinheiten dissoziiert spontan von der virusinfizierten Zelle wie auch vom Viruspartikel, so daß freies Glykoprotein (gp120) extrazellulär zu finden ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die für die Membranfusion entscheidende Domäne des Glykoproteins, nämlich der hydrophobe N-Terminus der membranständigen Domäne, mit Hilfe rekombinanter, subgenomischer Konstrukte analysiert. Dabei wurde zuerst in natürlich vorkommenden Patientenisolaten nach Variationen in dieser Region und deren Auswirkungen auf die Fusionsaktivität geschaut. Es zeigte sich, daß trotz hoher Aminosäurevariabilität der hydrophobe Charakter des N-Terminus sowie die Glycin-Positionen erhalten bleiben, es aber einige Mutationen gibt, die die Fusionsaktivität beeinflussen. Dies kann über eine Verminderung der Spaltbarkeit des Vorläuferproteins sowie über eine Störung der Assoziation der Untereinheiten nach der Spaltung erfolgen. In einem weiteren Ansatz wurden mittels gezielter Mutagenese Deletionen im N-Terminus durchgeführt. Obwohl dabei die beiden putativen Spaltstellen des Vorläuferproteins nicht direkt mutiert wurden, zeigte sich, daß mit zunehmender Deletion die Spaltbarkeit herabgesetzt wurde.

Desweiteren zeigte sich, daß es neben der oben genannten spontanen Dissoziation von Glykoprotein in den Extrazellulärraum noch einen weiteren Weg gibt, mit dessen Hilfe die Zelle das HIV-Env sezernieren kann. Es fanden sich extrazelluläre Mikrovesikel, in die Glykoproteinmoleküle inkorporiert sind. Dies geschieht besonders effektiv mit nicht gespaltenem Env und mit Env-Mutanten, die eine Deletion im C-terminalen Bereich des gp41, der jenseits der Zellmembran cytoplasmatisch lokalisiert ist, aufweisen. Durch Analyse der Zuckerseitenketten der Glykoproteine konnten Hinweise auf die Zellkompartimente, aus denen sie stammen, gewonnen werden. Das in den Mikrovesikeln vorliegende Glykoprotein

zeichnet sich weiterhin durch eine ungewöhnliche Resistenz gegenüber zuckerspaltenden Enzymen sowie Proteasen aus, was auf eine gegenüber dem Viruspartikel veränderte räumliche Struktur oder auf eine reverse Orientierung in der Membran schließen läßt. Darüberhinaus zeigte sich, daß der Transport über Mikrovesikel es auch noch weiteren HIV-Proteinen, die keine Glykoproteine sind, sondern in der infizierten Zelle zytosolisch vorliegen, ermöglicht, die Zelle zu verlassen, vor allem, wenn sie membranverankert vorliegen.

Abschließend wird diskutiert, welche Funktion der Export von Proteinen über Mikrovesikel für die virusinfizierte Zelle bzw. für die Virusmaturation haben könnte. Desweiteren wird die Bedeutung der verschiedenen Formen von zellfreiem Glykoprotein für die Pathogenese der HIV-Erkrankung insbesondere im zentralen Nervensystem sowie für die Impfstrategien, die rekombinantes Env beinhalten, erläutert.

6 Literatur

1. **Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson, and M. A. Martin.** 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, O.** Extracellular Nef. Presentation on Elmau Meeting: HIV-membrane -proteins, Elmau, December 4th-8th, 199 . 1996.
Abstract
3. **Adams, O., H. Schaal and A. Scheid.** Functional analysis of HIV-1 glycoproteins with deletions in gp120. Tenth International Conference on AIDS, Yokohama . 1994.
Abstract
4. **Adams, O., H. Schaal A. Scheid.** A mutation in the N-terminus of HIV-1 gp41 resulting in the dissociation of gp120 and gp41. GfV-Konferenz/AIDS-Tagung,Hamburg . 1997.
Abstract
5. **Adams, O. and H.Schaal, A. Scheid.** Variability among natural isolates of HIV-1 at the gp41/gp120 cleavage site. VIII.International Conference on AIDS, Amsterdam . 1992.
Abstract
6. **Adams, O. and S.Mauss.** 1999. Antiretrovirale Wirkmechanismen und zukünftige Entwicklungen *In* E. S. M. H. J. Wolf (ed.), Die antiretrovirale Behandlung der HIV-Erkrankung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
7. **Adams, O., H. Schaal, and A. Scheid.** 2000. Natural Variation in the Amino Acid Sequence around the HIV Type 1 Glycoprotein 160 Cleavage Site and Its Effect on Cleavability, Subunit Association, and Membrane Fusion. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**:1235-1245.
8. **Adams, O. H. Jablonowski and S.Mauss, M Karimi A. Scheid.** Drug resistance of HIV-isolates from patients on long-term AZT or successive AZT/ddI treatment. IXth International Conference on AIDS, Berlin . 1993.
Abstract
9. **Adams, O. and A. Scheid.** Einfluss des HIV-gp41 N-Terminus auf die Funktionalität des Glykoproteins. 7.Deutscher AIDS-Kongress, Essen . 1999.
Abstract
10. **Adams, O. a. A. S.** 2001. Stepwise deletion of the HIV-1 gp41 N-terminus leads to an export of microvesicles that contain uncleaved Env-glycoproteins. *AIDS Research and Human Retroviruses* **17**:1345-1356.
11. **Ahearne, P. M., T. J. Matthews, H. K. Lyerly, G. C. White, D. P. Bolognesi, and K. J. Weinhold.** 1988. Cellular immune response to viral peptides in patients exposed to HIV. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **4**:259-267.

12. **Ahmad, N. and S. Venkatesan.** 1988. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR [published erratum appears in Science 1988 Oct 7;242(4875):242]. Science **241**:1481-1485.
13. **Alam, J. and J. L. Cook.** 1990. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. Anal. Biochem. **188**:245-254.
14. **Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. Science **272**:1955-1958.
15. **Allan, D., M. M. Billah, J. B. Finean, and R. H. Michell.** 1976. Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular (Ca²⁺). Nature **261**:58-60.
16. **Arthur, L. O., J. W. J. Bess, R. G. Urban, J. L. Strominger, W. R. Morton, D. L. Mann, L. E. Henderson, and R. E. Benveniste.** 1995. Macaques immunized with HLA-DR are protected from challenge with simian immunodeficiency virus. J. Virol. **69**:3117-3124.
17. **Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., R. C. 2. Sowder, R. E. Benveniste, D. L. Mann, J. C. Chermann, and L. E. Henderson.** 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines [see comments]. Science **258** :1935-1938.
18. **Asjo, B., J. Albert, F. Chiodi, and E. M. Fenyo.** 1988. Improved tissue culture technique for production of poorly replicating human immunodeficiency virus strains. J. Virol. Methods **19**:191-196.
19. **Asjo, B., L. Morfeldt-Manson, J. Albert, G. Biberfeld, A. Karlsson, K. Lidman, and E. M. Fenyo.** 1986. Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. Lancet **2**:660-662.
20. **Baltimore, D.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. Nature **226**:1209-1211.
21. **Barre Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler Blin, F. Vezinet Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science **220**:868-871.
22. **Belshe, R. B., B. S. Graham, M. C. Keefer, G. J. Gorse, P. Wright, R. Dolin, T. Matthews, K. Weinhold, D. P. Bolognesi, and R. Spoto.** 1994. Neutralizing antibodies to HIV-1 in seronegative volunteers immunized with recombinant gp120 from the MN strain of HIV-1. NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network [see comments]. JAMA **272**:475-480.
23. **Bender, W. and N. Davidson.** 1976. Mapping of poly(A) sequences in the electron microscope reveals unusual structure of type C oncornavirus RNA molecules. Cell **7**:595-607.

-
24. **Bergeron, L., N. Sullivan, and J. Sodroski.** 1992. Target cell-specific determinants of membrane fusion within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 third variable region and gp41 amino terminus. *J. Virol.* **66**:2389-2397.
 25. **Bernstein, H. B. and R. W. Compans.** 1992. Sulfation of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* **66**:6953-6959.
 26. **Bernstein, H. B., S. P. Tucker, S. R. Kar, S. A. McPherson, D. T. McPherson, J. W. Dubay, J. Lebowitz, R. W. Compans, and E. Hunter.** 1995. Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41. *J. Virol.* **69**:2745-2750.
 27. **Berson, J. F., D. Long, B. J. Doranz, J. Rucker, F. R. Jirik, and R. W. Doms.** 1996. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol.* **70**:6288-6295.
 28. **Bess, J. W. J., R. J. Gorelick, W. J. Bosche, L. E. Henderson, and L. O. Arthur.** 1997. Microvesicles are a source of contaminating cellular proteins found in purified HIV-1 preparations. *Virology* **230**:134-144.
 29. **Binninger, D., J. Ennen, D. Bonn, S. G. Norley, and R. Kurth.** 1991. Mutational analysis of the simian immunodeficiency virus SIVmac nef gene. *J. Virol.* **65**:5237-5243.
 30. **Bird, C., P. A. Gleeson, A. Ramsay, P. Li, and J. McCluskey.** 1992. Stable expression of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in transfected L cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:1999-2009.
 31. **Blacklow, S. C., M. Lu, and P. S. Kim.** 1995. A trimeric subdomain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Biochemistry* **34**:14955-14962.
 32. **Blindt, R.** 1998. Untersuchung zur Rolle des V3-Loops des HIV-1-Glykoproteins als Pathogenitätsdeterminante. Dissertationsarbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie.
 33. **Blobel, G. and B. Dobberstein.** 1975. Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J. Cell Biol.* **67**:852-862.
 34. **Boom, R., C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen, and N. J. van der.** 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**:495-503.
 35. **Borman, A. M., C. Quillent, P. Charneau, C. Dauguet, and F. Clavel.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *J. Virol.* **69**:2058-2067.
 36. **Bosch, F. X., W. Garten, H. D. Klenk, and R. Rott.** 1981. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza viruses. *Virology* **113**:725-735.
 37. **Bosch, V. and M. Pawlita.** 1990. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 env gene product proteolytic cleavage site. *J. Virol.* **64**:2337-2344.

-
38. **Bou Habib, D. C., G. Roderiquez, T. Oravec, P. W. Berman, P. Lusso, and M. A. Norcross.** 1994. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J. Virol.* **68**:6006-6013.
 39. **Boyd, M. T., G. R. Simpson, A. J. Cann, M. A. Johnson, and R. A. Weiss.** 1993. A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J. Virol.* **67**:3649-3652.
 40. **Boyer, J. D., A. D. Cohen, S. Vogt, K. Schumann, B. Nath, L. Ahn, K. Lacy, M. L. Bagarazzi, T. J. Higgins, Y. Baine, R. B. Ciccarelli, R. S. Ginsberg, R. R. MacGregor, and D. B. Weiner.** 2000. Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. *J. Infect. Dis.* **181**:476-483.
 41. **Braaten, D., C. Aberham, E. K. Franke, L. Yin, W. Phares, and J. Luban.** 1996. Cyclosporine A-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants demonstrate that Gag encodes the functional target of cyclophilin A. *J. Virol.* **70**:5170-5176.
 42. **Brand, C. M. and J. J. Skehel.** 1972. Crystalline antigen from the influenza virus envelope. *Nat. New Biol.* **238**:145-147.
 43. **Brand, D., K. Srinivasan, and J. Sodroski.** 1995. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 entry in the CDR2 loop of the CD4 glycoprotein. *J. Virol.* **69**:166-171.
 44. **Brasseur, R., B. Cornet, A. Burny, M. Vandenbranden, and J. M. Ruyschaert.** 1988. Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **4**:83-90.
 45. **Brenneman, D. E., G. L. Westbrook, S. P. Fitzgerald, D. L. Ennist, K. L. Elkins, M. R. Ruff, and C. B. Pert.** 1988. Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. *Nature* **335**:639-642.
 46. **Brody, B. A. and E. Hunter.** 1992. Mutations within the env gene of Mason-Pfizer monkey virus: effects on protein transport and SU-TM association. *J. Virol.* **66**:3466-3475.
 47. **Brody, B. A., M. G. Kimball, and E. Hunter.** 1994. Mutations within the transmembrane glycoprotein of Mason-Pfizer monkey virus: loss of SU-TM association and effects on infectivity. *Virology* **202**:673-683.
 48. **Bryant, M. and L. Ratner.** 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:523-527.
 49. **Bullough, P. A., F. M. Hughson, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1994. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion [see comments]. *Nature* **371**:37-43.
 50. **Bultmann, A., W. Muranyi, B. Seed, and J. Haas.** 2001. Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that inhibit cell surface expression. *J. Virol.* **75**:5263-5276.

-
51. **Buzy, J., D. E. Brenneman, C. B. Pert, A. Martin, A. Salazar, and M. R. Ruff.** 1992. Potent gp120-like neurotoxic activity in the cerebrospinal fluid of HIV- infected individuals is blocked by peptide T. *Brain Res.* **598**:10-18.
 52. **Cairns, J. S. and M. P. D'Souza.** 1998. Chemokines and HIV-1 second receptors: the therapeutic connection. *Nat. Med.* **4**:563-568.
 53. **Camaur, D. and D. Trono.** 1996. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J. Virol.* **70**:6106-6111.
 54. **Cannon, P. M., S. Matthews, N. Clark, E. D. Byles, O. Iourin, D. J. Hockley, S. M. Kingsman, and A. J. Kingsman.** 1997. Structure-function studies of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein, p17. *J. Virol.* **71**:3474-3483.
 55. **Capon, D. J. and R. H. Ward.** 1991. The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:649-78:649-678.
 56. **Carr, C. M. and P. S. Kim.** 1993. A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell* **73**:823-832.
 57. **Chakrabarti, L., M. Emerman, P. Tiollais, and P. Sonigo.** 1989. The cytoplasmic domain of simian immunodeficiency virus transmembrane protein modulates infectivity. *J. Virol.* **63**:4395-4403.
 58. **Chambers, P., C. R. Pringle, and A. J. Easton.** 1990. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **71**:3075-3080.
 59. **Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-273.
 60. **Chan, D. C. and P. S. Kim.** 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**:681-684.
 61. **Chang, H. C., F. Samaniego, B. C. Nair, L. Buonaguro, and B. Ensoli.** 1997. HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *AIDS* **11**:1421-1431.
 62. **Chao, C. C., B. M. Sharp, C. Pomeroy, G. A. Filice, and P. K. Peterson.** 1991. Effects of morphine addiction on the pathogenesis of murine toxoplasmosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **288**:223-227.
 63. **Cheng-Mayer, C., D. Seto, M. Tateno, and J. A. Levy.** 1988. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* **240**:80-82.
 64. **Cheng Mayer, C., P. Iannello, K. Shaw, P. A. Luciw, and J. A. Levy.** 1989. Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. *Science* **246**:1629-1632.
 65. **Chesebro, B., K. Wehrly, J. Nishio, and S. Perryman.** 1992. Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J. Virol.* **66**:6547-6554.

-
66. **Chesebro, B., K. Wehrly, J. Nishio, and S. Perryman.** 1996. Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J. Virol.* **70**:9055-9059.
 67. **Chirmule, N., H. Goonewardena, S. Pahwa, R. Pasiaka, and V. S. Kalyanaraman.** 1995. HIV-1 envelope glycoproteins induce activation of activated protein-1 in CD4+ T cells. *J. Biol. Chem.* **270**:19364-19369.
 68. **Chiu, I. M., A. Yaniv, J. E. Dahlberg, A. Gazit, S. F. Skuntz, S. R. Tronick, and S. A. Aaronson.** 1985. Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature* **317**:366-368.
 69. **Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski.** 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**:1135-1148.
 70. **Choppin, P. W., C. D. Richardson, D. C. Merz, and A. Scheid.** 1981. Functions of surface glycoproteins of myxoviruses and paramyxoviruses and their inhibition. *Ciba. Found. Symp.* **80**:252-269.
 71. **Clavel, F., D. Guetard, F. Brun Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343-346.
 72. **Clements-Mann, M. L., K. Weinhold, T. J. Matthews, B. S. Graham, G. J. Gorse, M. C. Keefer, M. J. McElrath, R. H. Hsieh, J. Mestecky, S. Zolla-Pazner, J. Mascola, D. Schwartz, R. Siliciano, L. Corey, P. F. Wright, R. Belshe, R. Dolin, S. Jackson, S. Xu, P. Fast, M. C. Walker, D. Stablein, J. L. Excler, J. Tartaglia, and E. Paoletti.** 1998. Immune responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 induced by canarypox expressing HIV-1MN gp120, HIV-1SF2 recombinant gp120, or both vaccines in seronegative adults. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *J. Infect. Dis.* **177**:1230-1246.
 73. **Clements, G. J., M. J. Price-Jones, P. E. Stephens, C. Sutton, T. F. Schulz, P. R. Clapham, J. A. McKeating, M. O. McClure, S. Thomson, and M. Marsh.** 1991. The V3 loops of the HIV-1 and HIV-2 surface glycoproteins contain proteolytic cleavage sites: a possible function in viral fusion? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**:3-16.
 74. **Cohen, E. A., G. Dehni, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* **64**:3097-3099.
 75. **Conte, M. R. and S. Matthews.** 1998. Retroviral matrix proteins: a structural perspective. *Virology* **246**:191-198.
 76. **Copeland, C. S., R. W. Doms, E. M. Bolzau, R. G. Webster, and A. Helenius.** 1986. Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. *J. Cell Biol.* **103**:1179-1191.
 77. **Cosson, P.** 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J.* **15**:5783-5788.

-
78. **Cosson, P. and J. S. Bonifacino.** 1992. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. *Science* **258**:659-662.
 79. **Cullen, B. R.** 1992. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol. Rev.* **56**:375-394.
 80. **Cullen, B. R., J. Hauber, K. Campbell, J. G. Sodroski, W. A. Haseltine, and C. A. Rosen.** 1988. Subcellular localization of the human immunodeficiency virus trans-acting art gene product. *J. Virol.* **62**:2498-2501.
 81. **Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-767.
 82. **Dayton, A. I., J. G. Sodroski, C. A. Rosen, W. C. Goh, and W. A. Haseltine.** 1986. The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**:941-947.
 83. **de Jong, J. J., J. Goudsmit, W. Keulen, B. Klaver, W. Krone, M. Tersmette, and A. de Ronde.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. *J. Virol.* **66**:757-765.
 84. **de Ronde, A., B. Klaver, W. Keulen, L. Smit, and J. Goudsmit.** 1992. Natural HIV-1 NEF accelerates virus replication in primary human lymphocytes. *Virology* **188**:391-395.
 85. **Decroly, E., S. Benjannet, D. Savaria, and N. G. Seidah.** 1997. Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *FEBS Lett.* **405**:68-72.
 86. **Delahunty, M. D., I. Rhee, E. O. Freed, and J. S. Bonifacino.** 1996. Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical glycine residues. *Virology* **218**:94-102.
 87. **Delwart, E. L., G. Mosialos, and T. Gilmore.** 1990. Retroviral envelope glycoproteins contain a "leucine zipper"-like repeat [comment]. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**:703-706.
 88. **Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 [see comments]. *Nature* **381**:661-666.
 89. **Dettenhofer, M. and X. F. Yu.** 1999. Highly purified human immunodeficiency virus type 1 reveals a virtual absence of Vif in virions. *J. Virol.* **73**:1460-1467.
 90. **Distler, O., P. W. McQueen, M. L. Tsang, C. Byrne, B. A. Neilan, L. Evans, R. Penny, D. A. Cooper, and S. F. Delaney.** 1995. Characterization of the V3 region of HIV-1 isolates from Sydney, Australia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**:423-425.
 91. **Distler, O., P. W. McQueen, M. L. Tsang, L. A. Evans, L. Hurren, C. Byrne, R. Penny, D. A. Cooper, and S. F. Delaney.** 1995. Primary structure of the V3 region of

- gp120 from sequential human immunodeficiency virus type 1 isolates obtained from patients from the time of seroconversion. *J. Infect. Dis.* **172**:1384-1387.
92. **Doms, R. W., R. A. Lamb, J. K. Rose, and A. Helenius.** 1993. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193**:545-562.
93. **Dong, J. Y., J. W. Dubay, L. G. Perez, and E. Hunter.** 1992. Mutations within the proteolytic cleavage site of the Rous sarcoma virus glycoprotein define a requirement for dibasic residues for intracellular cleavage. *J. Virol.* **66**:865-874.
94. **Doranz, B. J., Z. H. Lu, J. Rucker, T. Y. Zhang, M. Sharron, Y. H. Cen, Z. X. Wang, H. H. Guo, J. G. Du, M. A. Accavitti, R. W. Doms, and S. C. Peiper.** 1997. Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **71**:6305-6314.
95. **Dorfman, T., F. Mammano, W. A. Haseltine, and H. G. Gottlinger.** 1994. Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **68**:1689-1696.
96. **Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton.** 1996. HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5 [see comments]. *Nature* **381**:667-673.
97. **Dubay, J. W., S. R. Dubay, H. J. Shin, and E. Hunter.** 1995. Analysis of the cleavage site of the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein: requirement of precursor cleavage for glycoprotein incorporation. *J. Virol.* **69**:4675-4682.
98. **Earl, P. L. and B. Moss.** 1993. Mutational analysis of the assembly domain of the HIV-1 envelope glycoprotein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**:589-594.
99. **Earl, P. L., B. Moss, and R. W. Doms.** 1991. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **65**:2047-2055.
100. **Egan, M. A., L. M. Carruth, J. F. Rowell, X. Yu, and R. F. Siliciano.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *J. Virol.* **70**:6547-6556.
101. **Egan, M. A., W. A. Pavlat, J. Tartaglia, E. Paoletti, K. J. Weinhold, M. L. Clements, and R. F. Siliciano.** 1995. Induction of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T lymphocyte responses in seronegative adults by a nonreplicating, host-range-restricted canarypox vector (ALVAC) carrying the HIV-1MN env gene. *J. Infect. Dis.* **171**:1623-1627.
102. **Einfeld, D. A. and E. Hunter.** 1994. Expression of the TM protein of Rous sarcoma virus in the absence of SU shows that this domain is capable of oligomerization and intracellular transport. *J. Virol.* **68**:2513-2520.
103. **Einfeld, D. A. and E. Hunter.** 1997. Mutational analysis of the oligomer assembly domain in the transmembrane subunit of the Rous sarcoma virus glycoprotein. *J. Virol.* **71**:2383-2389.

-
104. **Eisenberg, D., R. M. Weiss, and T. C. Terwilliger.** 1982. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* **299**:371-374.
 105. **Ensoli, B., L. Buonaguro, G. Barillari, V. Fiorelli, R. Gendelman, R. A. Morgan, P. Wingfield, and R. C. Gallo.** 1993. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J. Virol.* **67**:277-287.
 106. **Facke, M., A. Janetzko, R. L. Shoeman, and H. G. Krausslich.** 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.
 107. **Fass, D., R. A. Davey, C. A. Hamson, P. S. Kim, J. M. Cunningham, and J. M. Berger.** 1997. Structure of a murine leukemia virus receptor-binding glycoprotein at 2.0 angstrom resolution. *Science* **277**:1662-1666.
 108. **Favaro, J. P. and S. J. Arrigo.** 1997. Characterization of Rev function using subgenomic and genomic constructs in T and COS cells. *Virology* **228**:29-38.
 109. **Felber, B. K., M. Hadzopoulou Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland, and G. N. Pavlakis.** 1989. rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:1495-1499.
 110. **Feldmann, H., V. E. Volchkov, V. A. Volchkova, and H. D. Klenk.** 1999. The glycoproteins of Marburg and Ebola virus and their potential roles in pathogenesis. *Arch. Virol. Suppl.* **15**:159-69:159-169.
 111. **Felser, J. M., T. Klimkait, and J. Silver.** 1989. A syncytia assay for human immunodeficiency virus type I (HIV-I) envelope protein and its use in studying HIV-I mutations. *Virology* **170**:566-570.
 112. **Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven- transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* **272**:872-877.
 113. **Fenouillet, E. and J. C. Gluckman.** 1992. Immunological analysis of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein proteolytic cleavage. *Virology* **187**:825-828.
 114. **Fenouillet, E. and I. M. Jones.** 1995. The glycosylation of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein (gp41) is important for the efficient intracellular transport of the envelope precursor gp160. *J. Gen. Virol.* **76**:1509-1514.
 115. **Fenyo, E. M., L. Morfeldt Manson, F. Chiodi, B. Lind, A. Von Gegerfelt, J. Albert, E. Olausson, and B. Asjo.** 1988. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J. Virol.* **62**:4414-4419.
 116. **Ferrari, G., W. Humphrey, M. J. McElrath, J. L. Excler, A. M. Duliege, M. L. Clements, L. C. Corey, D. P. Bolognesi, and K. J. Weinhold.** 1997. Clade B-based HIV-1 vaccines elicit cross-clade cytotoxic T lymphocyte reactivities in uninfected volunteers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:1396-1401.

-
117. **Fisher, A. G., M. B. Feinberg, S. F. Josephs, M. E. Harper, L. M. Marselle, G. Reyes, M. A. Gonda, A. Aldovini, C. Debouk, R. C. Gallo, and et al.** 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**:367-371.
 118. **Fontana, A., F. Kristensen, R. Dubs, D. Gerns, and E. Weber.** 1982. Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. *J. Immunol.* **129**:2413-2419.
 119. **Fouchier, R. A., J. H. Simon, A. B. Jaffe, and M. H. Malim.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins. *J. Virol.* **70**:8263-8269.
 120. **Franchini, G., M. Robert-Guroff, J. Ghayeb, N. T. Chang, and F. Wong-Staal.** 1986. Cytoplasmic localization of the HTLV-III 3' orf protein in cultured T cells. *Virology* **155**:593-599.
 121. **Franke, E. K. and J. Luban.** 1995. Cyclophilin and gag in HIV-1 replication and pathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **374**.
 122. **Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions [see comments]. *Nature* **372**:359-362.
 123. **Frankel, A. D. and C. O. Pabo.** 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**:1189-1193.
 124. **Freed, E. O., E. L. Delwart, G. L. J. Buchsacher, and A. T. Panganiban.** 1992. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:70-74.
 125. **Freed, E. O. and D. J. Myers.** 1992. Identification and characterization of fusion and processing domains of the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **66**:5472-5478.
 126. **Freed, E. O., D. J. Myers, and R. Risser.** 1989. Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J. Virol.* **63**:4670-4675.
 127. **Freed, E. O., D. J. Myers, and R. Risser.** 1990. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:4650-4654.
 128. **Freed, E. O., D. J. Myers, and R. Risser.** 1991. Identification of the principal neutralizing determinant of human immunodeficiency virus type 1 as a fusion domain. *J. Virol.* **65**:190-194.
 129. **Freed, E. O. and R. Risser.** 1987. The role of envelope glycoprotein processing in murine leukemia virus infection. *J. Virol.* **61**:2852-2856.
 130. **Frei, K., C. Siepl, P. Groscurth, S. Bodmer, C. Schwerdel, and A. Fontana.** 1987. Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur. J. Immunol.* **17**:1271-1278.

-
131. **Furuta, R. A., C. T. Wild, Y. Weng, and C. D. Weiss.** 1998. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41 [published erratum appears in Nat Struct Biol 1998 Jul;5(7):612]. *Nat. Struct. Biol.* **5**:276-279.
 132. **Gabuzda, D. H. and M. S. Hirsch.** 1987. Neurologic manifestations of infection with human immunodeficiency virus. Clinical features and pathogenesis. *Ann. Intern. Med.* **107**:383-391.
 133. **Gabuzda, D. H., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, T. Dorfman, W. A. Haseltine, and J. Sodroski.** 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4⁺ T lymphocytes. *J. Virol.* **66**:6489-6495.
 134. **Gabuzda, D. H., A. Lever, E. Terwilliger, and J. Sodroski.** 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* **66**:3306-3315.
 135. **Gallaher, W. R.** 1987. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* **50**:327-328.
 136. **Gallaher, W. R., J. M. Ball, R. F. Garry, M. C. Griffin, and R. C. Montelaro.** 1989. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses [see comments]. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**:431-440.
 137. **Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic.** 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:865-867.
 138. **Garcia, J. V., J. Alfano, and A. D. Miller.** 1993. The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 Nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4. *J. Virol.* **67**:1511-1516.
 139. **Gaynor, R. B.** 1995. Regulation of HIV-1 gene expression by the transactivator protein Tat. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **193**:(-).
 140. **Gething, M. J., K. McCammon, and J. Sambrook.** 1986. Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. *Cell* **46**:939-950.
 141. **Geyer, H., C. Holschbach, G. Hunsmann, and J. Schneider.** 1988. Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120. *J. Biol. Chem.* **263**:11760-11767.
 142. **Girard, M., B. Meignier, F. Barre Sinoussi, M. P. Kieny, T. Matthews, E. Muchmore, P. L. Nara, Q. Wei, L. Rimsky, K. Weinhold, and et al.** 1995. Vaccine-induced protection of chimpanzees against infection by a heterologous human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **69**:6239-6248.
 143. **Giulian, D., J. Woodward, D. G. Young, J. F. Krebs, and L. B. Lachman.** 1988. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J. Neurosci.* **8**:2485-2490.

-
144. **Giulian, D., D. G. Young, J. Woodward, D. C. Brown, and L. B. Lachman.** 1988. Interleukin-1 is an astroglial growth factor in the developing brain. *J. Neurosci.* **8**:709-714.
 145. **Gluschankof, P., I. Mondor, H. R. Gelderblom, and Q. J. Sattentau.** 1997. Cell membrane vesicles are a major contaminant of gradient-enriched human immunodeficiency virus type-1 preparations. *Virology* **230**:125-133.
 146. **Gonda, M. A., F. Wong Staal, R. C. Gallo, J. E. Clements, O. Narayan, and R. V. Gilden.** 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* **227**:173-177.
 147. **Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon.** 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.
 148. **Gottlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 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.
 149. **Goudsmit, J., C. Debouck, R. H. Melen, L. Smit, M. Bakker, D. M. Asher, A. V. Wolff, C. J. J. Gibbs, and D. C. Gajdusek.** 1988. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85** :4478-4482.
 150. **Graham, B. S., M. C. Keefer, M. J. McElrath, G. J. Gorse, D. H. Schwartz, K. Weinhold, T. J. Matthews, J. R. Esterlitz, F. Sinangil, and P. E. Fast.** 1996. Safety and immunogenicity of a candidate HIV-1 vaccine in healthy adults: recombinant glycoprotein (rgp) 120. A randomized, double-blind trial. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *Ann. Intern. Med.* **125**:270-279.
 151. **Grand, R. J.** 1989. Acylation of viral and eukaryotic proteins. *Biochem. J.* **258**:625-638.
 152. **Grimaila, R. J., B. A. Fuller, P. D. Rennert, M. B. Nelson, M. L. Hammarskjold, B. Potts, M. Murray, S. D. Putney, and G. Gray.** 1992. Mutations in the principal neutralization determinant of human immunodeficiency virus type 1 affect syncytium formation, virus infectivity, growth kinetics, and neutralization. *J. Virol.* **66**:1875-1883.
 153. **Gruss, P., C. J. Lai, R. Dhar, and G. Khoury.** 1979. Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**:4317-4321.
 154. **Guo, H. G., F. M. Veronese, E. Tschachler, R. Pal, V. S. Kalyanaraman, R. C. Gallo, and M. S. Reitz, Jr.** 1990. Characterization of an HIV-1 point mutant blocked in envelope glycoprotein cleavage. *Virology* **174**:217-224.
 155. **Gurtler, L. G., P. H. Hauser, J. Eberle, A. von Brunn, S. Knapp, L. Zekeng, J. M. Tsague, and L. Kaptue.** 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.* **68**:1581-1585.

-
156. **Guy, H. R., S. R. Durell, C. Schoch, and R. Blumenthal.** 1992. Analyzing the fusion process of influenza hemagglutinin by mutagenesis and molecular modeling. *Biophys. J.* **62**:95-97.
 157. **Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**:662-669.
 158. **Haffar, O. K., D. J. Dowbenko, and P. W. Berman.** 1991. The cytoplasmic tail of HIV-1 gp160 contains regions that associate with cellular membranes. *Virology* **180**:439-441.
 159. **Hallenberger, S., V. Bosch, H. Angliker, E. Shaw, H. D. Klenk, and W. Garten.** 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**:358-361.
 160. **Hallenberger, S., M. Moulard, M. Sordel, H. D. Klenk, and W. Garten.** 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.
 161. **Hamer, D. H. and P. Leder.** 1979. Splicing and the formation of stable RNA. *Cell* **18**:1299-1302.
 162. **Hammes, S. R., E. P. Dixon, M. H. Malim, B. R. Cullen, and W. C. Greene.** 1989. Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:9549-9553.
 163. **Harris, M. P. and J. C. Neil.** 1994. Myristoylation-dependent binding of HIV-1 Nef to CD4. *J. Mol. Biol.* **241**:136-142.
 164. **Hart, T. K., R. Kirsh, H. Ellens, R. W. Sweet, D. M. Lambert, S. R. J. Petteway, J. Leary, and P. J. Bugelski.** 1991. Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:2189-2193.
 165. **Hasegawa, A., H. Tsujimoto, N. Maki, K. Ishikawa, T. Miura, M. Fukasawa, K. Miki, and M. Hayami.** 1989. Genomic divergence of HIV-2 from Ghana. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**:593-604.
 166. **Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman.** 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.
 167. **Helland, D. E., J. L. Welles, A. Caputo, and W. A. Haseltine.** 1991. Transcellular transactivation by the human immunodeficiency virus type 1 tat protein. *J. Virol.* **65**:4547-4549.
 168. **Helseth, E., U. Olshevsky, C. Furman, and J. Sodroski.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* **65**:2119-2123.

-
169. **Henderson, L. A. and M. N. Qureshi.** 1993. A peptide inhibitor of human immunodeficiency virus infection binds to novel human cell surface polypeptides. *J. Biol. Chem.* **268**:15291-15297.
 170. **Hill, C. P., D. Worthylake, D. P. Bancroft, A. M. Christensen, and W. I. Sundquist.** 1996. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:3099-3104.
 171. **Ho, D. D., T. R. Rota, R. T. Schooley, J. C. Kaplan, J. D. Allan, J. E. Groopman, L. Resnick, D. Felsenstein, C. A. Andrews, and M. S. Hirsch.** 1985. Isolation of HTLV-III from cerebrospinal fluid and neural tissues of patients with neurologic syndromes related to the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* **313**:1493-1497.
 172. **Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:7276-7280.
 173. **Holschbach, C., J. Schneider, and H. Geyer.** 1990. Glycosylation of the envelope glycoprotein gp130 of simian immunodeficiency virus from sooty mangabey (*Cercocebus atys*). *Biochem. J.* **267**:759-766.
 174. **Horneff, G., O. Adams, and V. Wahn.** 1998. Pilot study of zidovudine-lamivudine combination therapy in vertically HIV-infected antiretroviral-naïve children. *AIDS* **12**:489-494.
 175. **Horvath, C. M. and R. A. Lamb.** 1992. Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J. Virol.* **66**:2443-2455.
 176. **Hosaka, M., M. Nagahama, W. S. Kim, T. Watanabe, K. Hatsuzawa, J. Ikemizu, K. Murakami, and K. Nakayama.** 1991. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **266**:12127-12130.
 177. **Hunter, E., E. Hill, M. Hardwick, A. Bhowan, D. E. Schwartz, and R. Tizard.** 1983. Complete sequence of the Rous sarcoma virus env gene: identification of structural and functional regions of its product. *J. Virol.* **46**:920-936.
 178. **Hwang, S. S., T. J. Boyle, H. K. Lyerly, and B. R. Cullen.** 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**:71-74.
 179. **Hwang, S. S., T. J. Boyle, H. K. Lyerly, and B. R. Cullen.** 1992. Identification of envelope V3 loop as the major determinant of CD4 neutralization sensitivity of HIV-1. *Science* **257**:535-537.
 180. **Innis, M. A., D. H. Gelfand, and J. Sninsky.** 1990. PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California 92101.
 181. **Ivanoff, L. A., J. W. Dubay, J. F. Morris, S. J. Roberts, L. Gutshall, E. J. Sternberg, E. Hunter, T. J. Matthews, and S. R. Petteway, Jr.** 1992. V3 loop region of the HIV-1 gp120 envelope protein is essential for virus infectivity. *Virology* **187**:423-432.

-
182. **Ivey-Hoyle, M., R. K. Clark, and M. Rosenberg.** 1991. The N-terminal 31 amino acids of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein gp120 contain a potential gp41 contact site. *J. Virol.* **65**:2682-2685.
183. **Ji, H., W. Shu, F. T. Burling, S. Jiang, and M. Lu.** 1999. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the gp41 core: role of a conserved hydrophobic cavity in membrane fusion. *J. Virol.* **73**:8578-8586.
184. **Jiang, S., K. Lin, N. Strick, and A. R. Neurath.** 1993. Inhibition of HIV-1 infection by a fusion domain binding peptide from the HIV-1 envelope glycoprotein GP41. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**:533-538.
185. **Jorgensen, E. C., F. S. Pedersen, and P. Jorgensen.** 1992. Matrix protein of Akv murine leukemia virus: genetic mapping of regions essential for particle formation. *J. Virol.* **66**:4479-4487.
186. **Kaminchik, J., R. Margalit, S. Yaish, H. Drummer, B. Amit, N. Sarver, M. Gorecki, and A. Panet.** 1994. Cellular distribution of HIV type 1 Nef protein: identification of domains in Nef required for association with membrane and detergent-insoluble cellular matrix. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:1003-1010.
187. **Kammler, S.** 1997. Untersuchungen zum Einfluß der frühen HIV-1 Proteine Rev und Nef auf die env-Genexpression. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
188. **Karczewski, M. K. and K. Strebel .** 1996. Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J. Virol.* **70**:494-507.
189. **Keefer, M. C., B. S. Graham, M. J. McElrath, T. J. Matthews, D. M. Stablein, L. Corey, P. F. Wright, D. Lawrence, P. E. Fast, K. Weinhold, R. H. Hsieh, D. Chernoff, C. Dekker, and R. Dolin.** 1996. Safety and immunogenicity of Env 2-3, a human immunodeficiency virus type 1 candidate vaccine, in combination with a novel adjuvant, MTP- PE/MF59. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**:683-693.
190. **Kido, H., A. Fukutomi, and N. Katunuma.** 1991. A novel membrane-bound serine esterase in human T4(+)-lymphocytes is a binding protein of envelope glycoprotein gp120 of HIV-1. *Biomed. Biochim. Acta* **50**:781-789.
191. **Kienzle, N., M. Bachmann, W. E. Muller, and N. Muller Lantzsch.** 1992. Expression and cellular localization of the Nef protein from human immunodeficiency virus-1 in stably transfected B-cells. *Arch. Virol.* **124**:123-132.
192. **Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag.** 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry [see comments]. *Nat. Med.* **4**:1302-1307.
193. **Kim, S., K. Ikeuchi, R. Byrn, J. Groopman, and D. Baltimore.** 1989. Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:9544-9548.

-
194. **Kirchhoff, F., T. C. Greenough, D. B. Brettler, J. L. Sullivan, and R. C. Desrosiers.** 1995. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection [see comments]. *N. Engl. J. Med.* **332**:228-232.
 195. **Kirsh, R., T. K. Hart, H. Ellens, J. Miller, S. A. J. Petteway, D. M. Lambert, J. Leary, and P. J. Bugelski.** 1990. Morphometric analysis of recombinant soluble CD4-mediated release of the envelope glycoprotein gp120 from HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**:1209-1212.
 196. **Kjems, J. and P. A. Sharp.** 1993. The basic domain of Rev from human immunodeficiency virus type 1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *J. Virol.* **67**:4769-4776.
 197. **Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-768.
 198. **Koenig, S., H. E. Gendelman, J. M. Orenstein, M. C. Dal Canto, G. H. Pezeshkpour, M. Yungbluth, F. Janotta, A. Aksamit, M. A. Martin, and A. S. Fauci.** 1986. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* **233**:1089-1093.
 199. **Koot, M., I. P. Keet, A. H. Vos, R. E. de Goede, M. T. Roos, R. A. Coutinho, F. Miedema, P. T. Schellekens, and M. Tersmette.** 1993. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4⁺ cell depletion and progression to AIDS [see comments]. *Ann. Intern. Med.* **118**:681-688.
 200. **Kornfeld, H., W. W. Cruikshank, S. W. Pyle, J. S. Berman, and D. M. Center.** 1988. Lymphocyte activation by HIV-1 envelope glycoprotein. *Nature* **335**:445-448.
 201. **Kornfeld, R. and S. Kornfeld.** 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:631-64:631-664.
 202. **Kotov, A., J. Zhou, P. Flicker, and C. Aiken.** 1999. Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J. Virol.* **73**:8824-8830.
 203. **Kozarsky, K., M. Penman, L. Basiripour, W. Haseltine, J. Sodroski, and M. Krieger.** 1989. Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **2**:163-169.
 204. **Kwong, P. D., R. Wyatt, Q. J. Sattentau, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson.** Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus [In Process Citation]. *J. Virol.* 2000. Feb. ;74. (4.):1961.-72. **74**:1961-1972.
 205. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
 206. **Lazarowitz, S. G. and P. W. Choppin.** 1975. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology* **68**:440-454.

-
207. **Leamnson, R. N., M. H. Shander, and M. S. Halpern.** 1977. A structural protein complex in Moloney leukemia virus. *Virology* **76**:437-439.
 208. **Leonard, C. K., M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, and T. J. Gregory.** 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **265**:10373-10382.
 209. **Levitt, M.** 1978. Conformational preferences of amino acids in globular proteins. *Biochemistry* **17**:4277-4285.
 210. **Li, W. H., M. Tanimura, and P. M. Sharp.** 1988. Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* **5**:313-330.
 211. **Liu, H., X. Wu, M. Newman, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and J. C. Kappes.** 1995. The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J. Virol.* **69**:7630-7638.
 212. **Liu, Z. Q., C. Wood, J. A. Levy, and C. Cheng Mayer.** 1990. The viral envelope gene is involved in macrophage tropism of a human immunodeficiency virus type 1 strain isolated from brain tissue. *J. Virol.* **64**:6148-6153.
 213. **Lu, M., S. C. Blacklow, and P. S. Kim.** 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* **2**:1075-1082.
 214. **Lu, Y. L., P. Spearman, and L. Ratner.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J. Virol.* **67**:6542-6550.
 215. **Luban, J., K. L. Bossolt, E. K. Franke, G. V. Kalpana, and S. P. Goff.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73**:1067-1078.
 216. **Luciw, P. A.** 1996. Human Immunodeficiency Viruses and their Replication, p. 1881-1952. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, and et al. (eds.), *Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia.
 217. **Luo, M. and R. Reed.** 1999. Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:14937-14942.
 218. **Lusso, P., F. Cocchi, C. Balotta, P. D. Markham, A. Louie, P. Farci, R. Pal, R. C. Gallo, and M. S. Reitz, Jr.** 1995. Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4⁺ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J. Virol.* **69**:3712-3720.
 219. **MacGregor, R. R., J. D. Boyer, R. B. Ciccarelli, R. S. Ginsberg, and D. B. Weiner.** 2000. Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow-up data [letter; comment]. *J. Infect. Dis.* **181**:406.

-
220. **Maddon, P. J., A. G. Dalglish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-348.
221. **Malim, M. H. and B. R. Cullen.** 1993. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol. Cell Biol.* **13**:6180-6189.
222. **Malim, M. H., J. Hauber, R. Fenrick, and B. R. Cullen.** 1988. Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* **335**:181-183.
223. **Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen.** 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.
224. **Mammano, F., F. Salvatori, S. Indraccolo, A. De Rossi, L. Chieco-Bianchi, and H. G. Gottlinger.** 1997. Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4⁺ cells. *J. Virol.* **71**:3341-3345.
225. **Manegold, C., C. Krempe, H. Jablonowski, L. Kajala, M. Dietrich, and O. Adams.** 2000. Comparative evaluation of two branched-DNA human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification assays with lower detection limits of 50 and 500 copies per milliliter. *J. Clin. Microbiol.* **38**:914-917.
226. **Mann, D. L., F. Lasane, M. Popovic, L. O. Arthur, W. G. Robey, W. A. Blattner, and M. J. Newman.** 1987. HTLV-III large envelope protein (gp120) suppresses PHA-induced lymphocyte blastogenesis. *J. Immunol.* **138**:2640-2644.
227. **Marcuzzi, A., J. Weinberger, and O. K. Weinberger.** 1992. Transcellular activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in cocultured lymphocytes. *J. Virol.* **66**:4228-4232.
228. **Mariani, R., F. Kirchhoff, T. C. Greenough, J. L. Sullivan, R. C. Desrosiers, and J. Skowronski.** 1996. High frequency of defective nef alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **70**:7752-7764.
229. **Martin, I., F. Defrise-Quertain, V. Mandieau, N. M. Nielsen, T. Saermark, A. Burny, R. Brasseur, J. M. Ruyschaert, and M. Vandenbranden.** 1991. Fusogenic activity of SIV (simian immunodeficiency virus) peptides located in the GP32 NH2 terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**:872-879.
230. **Martin, I., H. Schaal, A. Scheid, and J. M. Ruyschaert.** 1996. Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer. *J. Virol.* **70**:298-304.
231. **Maxfield, F. R., M. C. Willingham, P. J. Davies, and I. Pastan.** 1979. Amines inhibit the clustering of alpha2-macroglobulin and EGF on the fibroblast cell surface. *Nature* **277**:661-663.

-
232. **McClure, M. O., M. Marsh, and R. A. Weiss.** 1988. Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *EMBO J.* **7**:513-518.
233. **McClure, M. O., M. A. Sommerfelt, M. Marsh, and R. A. Weiss.** 1990. The pH independence of mammalian retrovirus infection. *J. Gen. Virol.* **71 (Pt 4)**:767-773.
234. **McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, and I. L. Weissman.** 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**:55-67.
235. **McNearney, T., Z. Hornickova, R. Markham, A. Birdwell, M. Arens, A. Saah, and L. Ratner.** 1992. Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:10247-10251.
236. **Merrill, J. E., Y. Koyanagi, J. Zack, L. Thomas, F. Martin, and I. S. Chen.** 1992. Induction of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in brain cultures by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **66**:2217-2225.
237. **Milich, L., B. Margolin, and R. Swanstrom.** 1993. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J. Virol.* **67**:5623-5634.
238. **Milich, L., B. H. Margolin, and R. Swanstrom.** 1997. Patterns of amino acid variability in NSI-like and SI-like V3 sequences and a linked change in the CD4-binding domain of the HIV-1 Env protein. *Virology* **239**:108-118.
239. **Millar, N. S., P. Chambers, and P. T. Emmerson.** 1988. Nucleotide sequence of the fusion and haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle disease virus, strain Ulster: molecular basis for variations in pathogenicity between strains. *J. Gen. Virol.* **69**:613-620.
240. **Mintz, M.** 1994. Clinical comparison of adult and pediatric NeuroAIDS. *Adv. Neuroimmunol.* **4**:207-221.
241. **Moore, J. P. and P. L. Nara.** 1991. The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection. *AIDS* **5 Suppl 2**:S21-S33.
242. **Moore, J. P. and J. Sodroski.** 1996. Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *J. Virol.* **70**:1863-1872.
243. **Morgan, D. A., F. W. Ruscetti, and R. Gallo.** 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **193**:1007-1008.
244. **Morikawa, Y., E. Barsov, and I. Jones.** 1993. Legitimate and illegitimate cleavage of human immunodeficiency virus glycoproteins by furin. *J. Virol.* **67**:3601-3604.
245. **Morrison, H. G., F. Kirchhoff, and R. C. Desrosiers.** 1995. Effects of mutations in constant regions 3 and 4 of envelope of simian immunodeficiency virus. *Virology* **210**:448-455.

-
246. **Morrison, T. G. and L. J. Ward.** 1984. Intracellular processing of the vesicular stomatitis virus glycoprotein and the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Virus Res.* **1**:225-239.
247. **Munoz-Barroso, I., S. Durell, K. Sakaguchi, E. Appella, and R. Blumenthal.** 1998. Dilation of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41. *J. Cell Biol.* **140**:315-323.
248. **Murakami, T., T. Hattori, and K. Takatsuki.** 1991. A principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 interacts with proteinase-like molecule(s) at the surface of Molt-4 clone 8 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1079**:279-284.
249. **Myers, G., B. Korber, B. H. Hahn, K. T. Jeang, J. W. Mellors, F. E. McCutchan, L. E. Henderson, and G. N. Pavlakis.** 1995. Human Retroviruses and AIDS. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA.
250. **Nakayama, K., T. Watanabe, T. Nakagawa, W. S. Kim, M. Nagahama, M. Hosaka, K. Hatsuzawa, K. Kondoh-Hashiba, and K. Murakami.** 1992. Consensus sequence for precursor processing at mono-arginyl sites. Evidence for the involvement of a Kex2-like endoprotease in precursor cleavages at both dibasic and mono-arginyl sites. *J. Biol. Chem.* **267**:16335-16340.
251. **Neumann, P., M. O'Shaughnessy, R. Remis, C. Tsoukas, D. Lepine, and M. Davis.** 1990. Laboratory evidence of active HIV-1 infection in Canadians with hemophilia associated with administration of heat-treated factor VIII. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **3**:278-281.
252. **Niederman, T. M., W. R. Hastings, and L. Ratner.** 1993. Myristoylation-enhanced binding of the HIV-1 Nef protein to T cell skeletal matrix. *Virology* **197**:420-425.
253. **Niederman, T. M., B. J. Thielan, and L. Ratner.** 1989. Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:1128-1132.
254. **Ono, A., M. Huang, and E. O. Freed.** 1997. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 matrix revertants: effects on virus assembly, Gag processing, and Env incorporation into virions. *J. Virol.* **71**:4409-4418.
255. **Ostertag, W., G. Roesler, C. J. Krieg, J. Kind, T. Cole, T. Crozier, G. Gaedicke, G. Steinheider, N. Kluge, and S. Dube.** 1974. Induction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by Friend virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**:4980-4985.
256. **Ott, D. E., L. V. Coren, D. G. Johnson, R. C. Sowder, L. O. Arthur, and L. E. Henderson.** 1995. Analysis and localization of cyclophilin A found in the virions of human immunodeficiency virus type 1 MN strain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**:1003-1006.

-
257. **Ott, D. E., L. V. Coren, B. P. Kane, L. K. Busch, D. G. Johnson, R. C. Sowder, E. N. Chertova, L. O. Arthur, and L. E. Henderson.** 1996. Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* **70**:7734-7743.
258. **Otteken, A., P. L. Earl, and B. Moss.** 1996. Folding, assembly, and intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein analyzed with monoclonal antibodies recognizing maturational intermediates. *J. Virol.* **70**:3407-3415.
259. **Otteken, A. and B. Moss.** 1996. Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin. *J. Biol. Chem.* **271**:97-103.
260. **Page, K. A., S. M. Stearns, and D. R. Littman.** 1992. Analysis of mutations in the V3 domain of gp160 that affect fusion and infectivity. *J. Virol.* **66**:524-533.
261. **Palker, T. J., M. E. Clark, A. J. Langlois, T. J. Matthews, K. J. Weinhold, R. R. Randall, D. P. Bolognesi, and B. F. Haynes.** 1988. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:1932-1936.
262. **Pandori, M. W., N. J. Fitch, H. M. Craig, D. D. Richman, C. A. Spina, and J. C. Guatelli.** 1996. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J. Virol.* **70**:4283-4290.
263. **Paxton, W., R. I. Connor, and N. R. Landau.** 1993. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J. Virol.* **67**:7229-7237.
264. **Perez, L. G. and E. Hunter.** 1987. Mutations within the proteolytic cleavage site of the Rous sarcoma virus glycoprotein that block processing to gp85 and gp37. *J. Virol.* **61**:1609-1614.
265. **Peterson, P. K., G. Gekker, C. C. Chao, R. Schut, T. W. Molitor, and H. H. Balfour, Jr.** 1991. Cocaine potentiates HIV-1 replication in human peripheral blood mononuclear cell cocultures. Involvement of transforming growth factor- beta. *J. Immunol.* **146**:81-84.
266. **Pinegin, B. V., M. Z. Saidov, T. L. Scheltsyna, D. I. Gabrilovich, and R. M. Khaitov.** 1993. Peripheral blood neutrophils from HIV-1-infected individuals are armed with factors that cause inhibition of their migration in response to specific antigens. *Immunol. Lett.* **36**:13-17.
267. **Pinter, A. and W. J. Honnen.** 1983. Topography of murine leukemia virus envelope proteins: characterization of transmembrane components. *J. Virol.* **46**:1056-1060.
268. **Pinter, A., W. J. Honnen, S. A. Tilley, C. Bona, H. Zaghoulani, M. K. Gorny, and S. Zolla-Pazner.** 1989. Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **63**:2674-2679.
269. **Poli, G., B. Bottazzi, R. Acero, L. Bersani, V. Rossi, M. Introna, A. Lazzarin, M. Galli, and A. Mantovani.** 1985. Monocyte function in intravenous drug abusers with lymphadenopathy syndrome and in patients with acquired immunodeficiency syndrome: selective impairment of chemotaxis. *Clin. Exp. Immunol.* **62**:136-142.

-
270. **Premkumar, D. R., X. Z. Ma, R. K. Maitra, B. K. Chakrabarti, J. Salkowitz, B. Yen-Lieberman, M. S. Hirsch, and H. W. Kestler.** 1996. The nef gene from a long-term HIV type 1 nonprogressor. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**:337-345.
271. **Purcell, D. F. and M. A. Martin.** 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* **67**:6365-6378.
272. **Putterman, D., R. B. Pepinsky, and V. M. Vogt.** 1990. Ubiquitin in avian leukosis virus particles. *Virology* **176**:633-637.
273. **Rafalski, M., J. D. Lear, and W. F. DeGrado.** 1990. Phospholipid interactions of synthetic peptides representing the N- terminus of HIV gp41. *Biochemistry* **29**:7917-7922.
274. **Rana, S., G. Besson, D. G. Cook, J. Rucker, R. J. Smyth, Y. Yi, J. D. Turner, H. H. Guo, J. G. Du, S. C. Peiper, E. Lavi, M. Samson, F. Libert, C. Liesnard, G. Vassart, R. W. Doms, M. Parmentier, and R. G. Collman.** 1997. Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation. *J. Virol.* **71**:3219-3227.
275. **Rao, Z., A. S. Belyaev, E. Fry, P. Roy, I. M. Jones, and D. I. Stuart.** 1995. Crystal structure of SIV matrix antigen and implications for virus assembly. *Nature* **378**:743-747.
276. **Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, and H. J. Geuze.** 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**:1161-1172.
277. **Ravot, E., J. Lisiewicz, and F. Lori.** 1999. New uses for old drugs in HIV infection: the role of hydroxyurea, cyclosporin and thalidomide. *Drugs* **58**:953-963.
278. **Riberdy, J. M., R. R. Avva, H. J. Geuze, and P. Cresswell.** 1994. Transport and intracellular distribution of MHC class II molecules and associated invariant chain in normal and antigen-processing mutant cell lines. *J. Cell Biol.* **125**:1225-1237.
279. **Ritter, G. D., Jr., M. J. Mulligan, S. L. Lydy, and R. W. Compans.** 1993. Cell fusion activity of the simian immunodeficiency virus envelope protein is modulated by the intracytoplasmic domain. *Virology* **197**:255-264.
280. **Rizzardi, G. P., M. Vaccarezza, B. Capiluppi, G. Tambussi, A. Lazzarin, and G. Pantaleo.** 2000. Cyclosporin A in combination with HAART in primary HIV-1 infection. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **14**:79-81.
281. **Robey, W. G., B. Safai, S. Oroszlan, L. O. Arthur, M. A. Gonda, R. C. Gallo, and P. J. Fischinger.** 1985. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV- III with sera from AIDS patients. *Science* **228**:593-595.
282. **Roth, J.** 1987. Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **906**:405-436.

-
283. **Rous, P.** 1979. A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl) by Peyton Rous, M.D., Experimental Medicine for Sept. 1, 1910, vol. 12, pp.696- 705. J. Exp. Med. **150**:738-753.
284. **Ruscetti, F. W., D. A. Morgan, and R. C. Gallo.** 1977. Functional and morphologic characterization of human T cells continuously grown in vitro. J. Immunol. **119**:131-138.
285. **Rusche, J. R., K. Javaherian, C. McDanal, J. Petro, D. L. Lynn, R. Grimaia, A. Langlois, R. C. Gallo, L. O. Arthur, P. J. Fischinger, and et al.** 1988. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus- infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope, gp120 [published errata appear in Proc Natl Acad Sci U S A 1988 Nov;85(22):8697 and Proc Natl Acad Sci U S A 1989 Mar; 86(5):1667]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **85**:3198-3202.
286. **Ryser, H. J., E. M. Levy, R. Mandel, and G. J. DiSciullo.** 1994. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **91**:4559-4563.
287. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
288. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **74**:5463-5467.
289. **Schaal, H., M. Klein, P. Gehrman, O. Adams, and A. Scheid.** 1995. Requirement of N-terminal amino acid residues of gp41 for human immunodeficiency virus type 1-mediated cell fusion. J. Virol. **69**:3308-3314.
290. **Schawaller, M., G. E. Smith, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1989. Studies with crosslinking reagents on the oligomeric structure of the env glycoprotein of HIV. Virology **172**:367-369.
291. **Scheid, A., L. A. Caliguri, R. W. Compans, and P. W. Choppin.** 1972. Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association of both hemagglutinating and neuraminidase activities with the larger SV5 glycoprotein. Virology **50**:640-652.
292. **Scheid, A. and P. W. Choppin.** 1974. Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. Virology **57**:475-490.
293. **Scheid, A. and P. W. Choppin.** 1975. Activation of cell fusion and infectivity by proteolytic cleavage of a Sendai virus glycoprotein. In "Proteases and Biological Control" (E. Reich, D. B. Rifkin, and E. Shaw, eds.) pp. 645-659, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, N. Y.
294. **Scheid, A. and P. W. Choppin.** 1977. Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses. Virology **80**:54-66.
295. **Scheid, A., M. Hsu, and P. W. Choppin.** 1980. Role of paramyxovirus glycoproteins in the interactions between viral and cell membranes. Soc. Gen. Physiol. Ser. **34**:119-130.

-
296. **Schellekens, P. T., M. Tersmette, M. T. Roos, R. P. Keet, F. de Wolf, R. A. Coutinho, and F. Miedema.** 1992. Biphasic rate of CD4+ cell count decline during progression to AIDS correlates with HIV-1 phenotype [see comments]. *AIDS* **6**:665-669.
 297. **Schreiber, M., C. Wachsmuth, H. Muller, S. Odemuyiwa, H. Schmitz, S. Meyer, B. Meyer, and J. Schneider-Mergener.** 1997. The V3-directed immune response in natural human immunodeficiency virus type 1 infection is predominantly directed against a variable, discontinuous epitope presented by the gp120 V3 domain. *J. Virol.* **71**:9198-9205.
 298. **Schubert, U., S. Bour, R. L. Willey, and K. Strebel.** 1999. Regulation of virus release by the macrophage-tropic human immunodeficiency virus type 1 AD8 isolate is redundant and can be controlled by either Vpu or Env. *J. Virol.* **73**:887-896.
 299. **Schuitemaker, H., M. Koot, N. A. Kootstra, M. W. Dercksen, R. E. de Goede, R. P. van Steenwijk, J. M. Lange, J. K. Schattenkerk, F. Miedema, and M. Tersmette.** 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytopathic to T-cell-tropic virus population. *J. Virol.* **66**:1354-1360.
 300. **Schuitemaker, H., N. A. Kootstra, R. E. de Goede, F. de Wolf, F. Miedema, and M. Tersmette.** 1991. Monocytopathic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. *J. Virol.* **65**:356-363.
 301. **Schwartz, O., A. Dautry Varsat, B. Goud, V. Marechal, A. Subtil, J. M. Heard, and O. Danos.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces accumulation of CD4 in early endosomes. *J. Virol.* **69**:528-533.
 302. **Schwartz, O., V. Marechal, O. Danos, and J. M. Heard.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J. Virol.* **69**:4053-4059.
 303. **Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1989. Rapidly and slowly replicating human immunodeficiency virus type 1 isolates can be distinguished according to target-cell tropism in T- cell and monocyte cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:7200-7203.
 304. **Seillier-Moiseiwitsch, F., B. H. Margolin, and R. Swanstrom.** 1994. Genetic variability of the human immunodeficiency virus: statistical and biological issues. *Annu. Rev. Genet.* **28**:559-96:559-596.
 305. **Shalaby, M. R., J. F. Krowka, T. J. Gregory, S. E. Hirabayashi, S. M. McCabe, D. S. Kaufman, D. P. Stites, and A. J. Ammann.** 1987. The effects of human immunodeficiency virus recombinant envelope glycoprotein on immune cell functions in vitro. *Cell Immunol.* **110**:140-148.
 306. **Sharpless, N. E., W. A. O'Brien, E. Verdin, C. V. Kufta, I. S. Chen, and M. Dubois Dalcq.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 tropism for brain microglial cells is determined by a region of the env glycoprotein that also controls macrophage tropism. *J. Virol.* **66**:2588-2593.

-
307. **Shrikant, P., D. J. Benos, L. P. Tang, and E. N. Benveniste.** 1996. HIV glycoprotein 120 enhances intercellular adhesion molecule-1 gene expression in glial cells. Involvement of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and protein kinase C signaling pathways. *J. Immunol.* **156**:1307-1314.
308. **Sinangil, F., A. Loyter, and D. J. Volsky.** 1988. Quantitative measurement of fusion between human immunodeficiency virus and cultured cells using membrane fluorescence dequenching. *FEBS Lett.* **239**:88-92.
309. **Skehel, J. J., P. M. Bayley, E. B. Brown, S. R. Martin, M. D. Waterfield, J. M. White, I. A. Wilson, and D. C. Wiley.** 1982. Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**:968-972.
310. **Skehel, J. J. and D. C. Wiley.** 1998. Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* **95**:871-874.
311. **Slepushkin, V. A., S. M. Andreev, M. V. Sidorova, G. B. Melikyan, V. B. Grigoriev, V. M. Chumakov, A. E. Grinfeldt, R. A. Manukyan, and E. V. Karamov.** 1992. Investigation of human immunodeficiency virus fusion peptides. Analysis of interrelations between their structure and function. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:9-18.
312. **Slepushkin, V. A., G. V. Kornilaeva, S. M. Andreev, M. V. Sidorova, A. O. Petrukhina, G. R. Matsevich, S. V. Raduk, V. B. Grigoriev, T. V. Makarova, and V. V. Lukashov.** 1993. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) penetration into target cells by synthetic peptides mimicking the N-terminus of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Virology* **194**:294-301.
313. **Soneoka, Y., S. M. Kingsman, and A. J. Kingsman.** 1997. Mutagenesis analysis of the murine leukemia virus matrix protein: identification of regions important for membrane localization and intracellular transport. *J. Virol.* **71**:5549-5559.
314. **Sonigo, P., C. Barker, E. Hunter, and S. Wain Hobson.** 1986. Nucleotide sequence of Mason-Pfizer monkey virus: an immunosuppressive D-type retrovirus. *Cell* **45**:375-385.
315. **Speck, R. F., K. Wehrly, E. J. Platt, R. E. Atchison, I. F. Charo, D. Kabat, B. Chesebro, and M. A. Goldsmith.** 1997. Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J. Virol.* **71**:7136-7139.
316. **Speth, C., B. Joebstl, M. Barcova, and M. P. Dierich.** 2000. HIV-1 envelope protein gp41 modulates expression of interleukin-10 and chemokine receptors on monocytes, astrocytes and neurones. *AIDS* **14**:629-636.
317. **Speth, C., G. Stockl, I. Mohsenipour, R. Wurzner, H. Stoiber, C. Lass-Flörl, and M. P. Dierich.** 2001. Human immunodeficiency virus type 1 induces expression of complement factors in human astrocytes. *J. Virol.* **75**:2604-2615.
318. **Spies, C. P. and R. W. Compans.** 1993. Alternate pathways of secretion of simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* **67**:6535-6541.

-
319. **Spies, C. P. and R. W. Compans.** 1994. Effects of cytoplasmic domain length on cell surface expression and syncytium-forming capacity of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Virology* **203**:8-19.
320. **Spies, C. P., G. D. Ritter, Jr., M. J. Mulligan, and R. W. Compans.** 1994. Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein alters the conformation of the external domain. *J. Virol.* **68**:585-591.
321. **Stefano, G. B., T. V. Bilfinger, and G. L. Fricchione.** 1994. The immune-neuro-link and the macrophage: postcardiotomy delirium, HIV- associated dementia and psychiatry. *Prog. Neurobiol.* **42**:475-488.
322. **Stein, B. S. and E. G. Engleman.** 1990. Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **265**:2640-2649.
323. **Stein, B. S., S. D. Gowda, J. D. Lifson, R. C. Penhallow, K. G. Bensch, and E. G. Engleman.** 1987. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* **49**:659-668.
324. **Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks, and M. A. Martin.** 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**:728-730.
325. **Sullivan, N., Y. Sun, J. Li, W. Hofmann, and J. Sodroski.** 1995. Replicative function and neutralization sensitivity of envelope glycoproteins from primary and T-cell line-passaged human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.* **69**:4413-4422.
326. **Sutton, R. B., D. Fasshauer, R. Jahn, and A. T. Brunger.** 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution [see comments]. *Nature* **395**:347-353.
327. **Sweet, R. W., A. Truneh, and W. A. Hendrickson.** 1991. CD4: its structure, role in immune function and AIDS pathogenesis, and potential as a pharmacological target. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**:622-633.
328. **Szilvay, A. M., K. A. Brokstad, S. O. Boe, G. Haukenes, and K. H. Kalland.** 1997. Oligomerization of HIV-1 Rev mutants in the cytoplasm and during nuclear import. *Virology* **235**:73-81.
329. **Takeuchi, Y., M. Akutsu, K. Murayama, N. Shimizu, and H. Hoshino.** 1991. Host range mutant of human immunodeficiency virus type 1: modification of cell tropism by a single point mutation at the neutralization epitope in the env gene. *J. Virol.* **65**:1710-1718.
330. **Tarantini, F., S. Gamble, A. Jackson, and T. Maciag.** 1995. The cysteine residue responsible for the release of fibroblast growth factor-1 residues in a domain independent of the domain for phosphatidylserine binding. *J. Biol. Chem.* **270**:29039-29042.
331. **Temin, H. M. and S. Mizutani.** 1992. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. 1970 [classical article]. *Biotechnology* **24**:51-6:51-56.
332. **Tersmette, M., G. R. de, B. J. Al, I. N. Winkel, R. A. Gruters, H. T. Cuypers, H. G. Huisman, and F. Miedema.** 1988. Differential syncytium-inducing capacity of human

- immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS- related complex. *J. Virol.* **62**:2026-2032.
333. **Tersmette, M., R. A. Gruters, W. F. de, G. R. de, J. M. Lange, P. T. Schellekens, J. Goudsmit, H. G. Huisman, and F. Miedema.** 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J. Virol.* **63**:2118-2125.
334. **Tersmette, M., J. M. Lange, R. E. de Goede, F. de Wolf, J. K. Eeftink-Schattenkerk, P. T. Schellekens, R. A. Coutinho, J. G. Huisman, J. Goudsmit, and F. Miedema.** 1989. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* **1**:983-985.
335. **Terwilliger, E., J. G. Sodroski, C. A. Rosen, and W. A. Haseltine.** 1986. Effects of mutations within the 3' orf open reading frame region of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) on replication and cytopathogenicity. *J. Virol.* **60**:754-760.
336. **Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski, and H. G. Gottlinger.** 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions [see comments]. *Nature* **372**:363-365.
337. **Trams, E. G., C. J. Lauter, N. J. Salem, and U. Heine.** 1981. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **645**:63-70.
338. **Travis, B. M., T. I. Dykers, D. Hewgill, J. Ledbetter, T. T. Tsu, S. L. Hu, and J. B. Lewis.** 1992. Functional roles of the V3 hypervariable region of HIV-1 gp160 in the processing of gp160 and in the formation of syncytia in CD4+ cells. *Virology* **186**:313-317.
339. **Trkola, A., T. Dragic, J. Arthos, J. M. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. J. Maddon, and J. P. Moore.** 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co- receptor CCR-5 [see comments]. *Nature* **384**:184-187.
340. **Uchiyama, T., J. Yodoi, K. Sagawa, K. Takatsuki, and H. Uchino.** 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**:481-492.
341. **van't Wout, A. B., N. A. Kootstra, G. A. Mulder-Kampinga, L. N. Albrecht-van, H. J. Scherpbier, J. Veenstra, K. Boer, R. A. Coutinho, F. Miedema, and H. Schuitemaker.** 1994. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J. Clin. Invest.* **94**:2060-2067.
342. **van Deurs, B., P. K. Holm, L. Kayser, and K. Sandvig.** 1995. Delivery to lysosomes in the human carcinoma cell line HEp-2 involves an actin filament-facilitated fusion between mature endosomes and preexisting lysosomes. *Eur. J. Cell Biol.* **66**:309-323.
343. **van Deurs, B., P. K. Holm, L. Kayser, K. Sandvig, and S. H. Hansen.** 1993. Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes. *Eur. J. Cell Biol.* **61**:208-224.

-
344. **Vanden Haesevelde, M., J. L. Decourt, R. J. De Leys, B. Vanderborght, G. Van der Groen, H. van Heuverswijn, and E. Saman.** 1994. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J. Virol.* **68**:1586-1596.
345. **Verderame, M. F., T. D. Nelle, and J. W. Wills.** 1996. The membrane-binding domain of the Rous sarcoma virus Gag protein. *J. Virol.* **70**:2664-2668.
346. **Veronese, F. D., A. L. DeVico, T. D. Copeland, S. Oroszlan, R. C. Gallo, and M. G. Sarngadharan.** 1985. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* **229**:1402-1405.
347. **von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken, and D. Trono.** 1993. Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J. Virol.* **67**:4945-4955.
348. **Voneche, V., D. Portetelle, R. Kettmann, L. Willems, K. Limbach, E. Paoletti, J. M. Ruyschaert, A. Burny, and R. Brasseur.** 1992. Fusogenic segments of bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:3810-3814.
349. **Watkins, B. A., H. H. Dorn, W. B. Kelly, R. C. Armstrong, B. J. Potts, F. Michaels, C. V. Kufta, and M. Dubois-Dalcq.** 1990. Specific tropism of HIV-1 for microglial cells in primary human brain cultures. *Science* **249**:549-553.
350. **Weis, W. I. and R. H. Scheller.** 1998. Membrane fusion. SNARE the rod, coil the complex [news; comment]. *Nature* **395**:328-329.
351. **Weissenhorn, W., A. Carfi, K. H. Lee, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1998. Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol. Cell* **2**:605-616.
352. **Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41 [see comments]. *Nature* **387**:426-430.
353. **Weissenhorn, W., S. A. Wharton, L. J. Calder, P. L. Earl, B. Moss, E. Aliprandis, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1996. The ectodomain of HIV-1 env subunit gp41 forms a soluble, alpha-helical, rod-like oligomer in the absence of gp120 and the N-terminal fusion peptide. *EMBO J.* **15**:1507-1514.
354. **Welker, R., H. Kottler, H. R. Kalbitzer, and H. G. Krausslich.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* **219**:228-236.
355. **White, J., M. Kielian, and A. Helenius.** 1983. Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Q. Rev. Biophys.* **16**:151-195.
356. **White, J. M.** 1990. Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu. Rev. Physiol.* **52**:675-97:675-697.
357. **White, J. M.** 1992. Membrane fusion. *Science* **258**:917-924.

-
358. **Wild, C., J. W. Dubay, T. Greenwell, T. J. Baird, T. G. Oas, C. McDanal, E. Hunter, and T. Matthews.** 1994. Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:12676-12680.
359. **Wild, C., T. Greenwell, and T. Matthews.** 1993. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion [letter]. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**:1051-1053.
360. **Wild, C., T. Greenwell, D. Shugars, L. Rimsy-Clarke, and T. Matthews.** 1995. The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure [letter]. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**:323-325.
361. **Wild, C., T. Oas, C. McDanal, D. Bolognesi, and T. Matthews.** 1992. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:10537-10541.
362. **Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, and T. J. Matthews.** 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:9770-9774.
363. **Wiley, C. A., R. D. Schrier, J. A. Nelson, P. W. Lampert, and M. B. Oldstone.** 1986. Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:7089-7093.
364. **Wilk, T., F. de Haas, A. Wagner, T. Rutten, S. Fuller, R. M. Flugel, and M. Lochelt.** 2000. The intact retroviral env glycoprotein of human foamy virus is a trimer [In Process Citation]. *J. Virol.* **74**:2885-2887.
365. **Willey, R. L., J. S. Bonifacino, B. J. Potts, M. A. Martin, and R. D. Klausner.** 1988. Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:9580-9584.
366. **Willey, R. L., T. Klimkait, D. M. Frucht, J. S. Bonifacino, and M. A. Martin.** 1991. Mutations within the human immunodeficiency virus type 1 gp160 envelope glycoprotein alter its intracellular transport and processing. *Virology* **184**:319-329.
367. **Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* **66**:7193-7200.
368. **Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* **66**:226-234.
369. **Wills, J. W. and R. C. Craven.** 1991. Form, function, and use of retroviral gag proteins [editorial]. *AIDS* **5**:639-654.
370. **Wilson, I. A., J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* **289**:366-373.

-
371. **Witte, O. N., A. Tsukamoto-Adey, and I. L. Weissman.** 1977. Cellular maturation of oncornavirus glycoproteins: topological arrangement of precursor and product forms in cellular membranes. *Virology* **76**:539-553.
372. **Wodrich, H., A. Schambach, and H. G. Krausslich.** Multiple copies of the Mason-Pfizer monkey virus constitutive RNA transport element lead to enhanced HIV-1 Gag expression in a context-dependent manner. *Nucleic. Acids. Res.* 2000. Feb. 15. ;28. (4.):901. -910. **28**:901-910.
373. **Wu, L., N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski.** 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5 [see comments]. *Nature* **384**:179-183.
374. **Wyatt, R. and J. Sodroski.** 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**:1884-1888.
375. **Xue, D., D. A. Robinson, B. K. Pannone, C. J. Yoo, and S. L. Wolin.** 2000. U snRNP assembly in yeast involves the La protein. *EMBO J.* **19**:1650-1660.
376. **Yang, C. and R. W. Compans.** 1996. Palmitoylation of the murine leukemia virus envelope glycoprotein transmembrane subunits. *Virology* **221**:87-97.
377. **Yin, L., D. Braaten, and J. Luban.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 replication is modulated by host cyclophilin A expression levels. *J. Virol.* **72**:6430-6436.
378. **Yoshida, M., I. Miyoshi, and Y. Hinuma.** 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**:2031-2035.
379. **Yoshida, M., M. Seiki, K. Yamaguchi, and K. Takatsuki.** 1984. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**:2534-2537.
380. **Yu, G. and R. L. Felsted.** 1992. Effect of myristoylation on p27 nef subcellular distribution and suppression of HIV-LTR transcription. *Virology* **187**:46-55.
381. **Yu, X., Q. C. Yu, T. H. Lee, and M. Essex.** 1992. The C terminus of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is involved in early steps of the virus life cycle. *J. Virol.* **66**:5667-5670.
382. **Yu, X., X. Yuan, Z. Matsuda, T. H. Lee, and M. Essex.** 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J. Virol.* **66**:4966-4971.
383. **Yu, X., X. Yuan, M. F. McLane, T. H. Lee, and M. Essex.** 1993. Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J. Virol.* **67**:213-221.
384. **Yu, X. F., M. Matsuda, M. Essex, and T. H. Lee.** 1990. Open reading frame vpr of simian immunodeficiency virus encodes a virion-associated protein. *J. Virol.* **64**:5688-5693.

-
385. **Yu, X. F., Q. C. Yu, M. Essex, and T. H. Lee.** 1991. The vpx gene of simian immunodeficiency virus facilitates efficient viral replication in fresh lymphocytes and macrophage. *J. Virol.* **65**:5088-5091.
386. **Yuan, X., Z. Matsuda, M. Matsuda, M. Essex, and T. H. Lee.** 1990. Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion- associated protein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**:1265-1271.
387. **Zapp, M. L. and M. R. Green.** 1989. Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* **342**:714-716.
388. **Zapp, M. L., T. J. Hope, T. G. Parslow, and M. R. Green.** 1991. Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:7734-7738.
389. **Zhou, W., L. J. Parent, J. W. Wills, and M. D. Resh.** 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* **68**:2556-2569.
390. **Zhou, W., L. J. Parent, J. W. Wills, and M. D. Resh.** 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* **68**:2556-2569.
391. **Zhou, W. and M. D. Resh.** 1996. Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J. Virol.* **70**:8540-8548.
392. **Zhu, T., H. Mo, N. Wang, D. S. Nam, Y. Cao, R. A. Koup, and D. D. Ho.** 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* **261**:1179-1181.
393. **Zingler, K. and D. R. Littman.** 1993. Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein increases env incorporation into particles and fusogenicity and infectivity. *J. Virol.* **67**:2824-2831.

7 Danksagung:

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie (Direktor Prof. Dr. Ulrich Hadding) in der Virologie durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Professor Andreas Scheid, der auf dem Gebiet der Virus-Glykoproteinforschung Pioniertätigkeit geleistet hat und stets bemüht war, seinen Mitarbeitern einen klaren analytischen und kritischem Umgang mit wissenschaftlichen Fakten zu vermitteln. Auch wenn es ihm nicht mehr gegönnt war, die Fertigstellung dieser Arbeit zu erleben, so finden sich seine Einflüsse an vielen Stellen der Resultate und Diskussionen.

Allen Mitarbeitern der Virologie möchte ich danken für das freundliche Klima, im dem eine solche Arbeit nur gedeihen kann. Die Tatsache, daß ein guter Teil von ihnen schon seit vielen Jahren der Virologie die Treue hält, spricht neben dem Interesse an dieser dynamischen Wissenschaft für den Teamgeist der Abteilung.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Professor Dr. Ulrich Hadding, der mich vor allem in der Schlußphase dieser Arbeit unterstützt hat.

Nicht zuletzt möchte ich Veronika danken, die meinen Weg bis zur Fertigstellung dieser Arbeit über all die Jahre begleitet und trotz der damit verbundenen zeitlichen und sonstigen Entbehrungen unterstützt hat