

Funktionelle Untersuchungen zur Rolle des
„transframe“-Proteins p6* bei der Replikation von HIV-1:
Bedeutung der Proteasespaltstellen von p6* für die
virale Maturation und Infektiosität

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III –
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Christine Ludwig aus Burghausen
Juni 2003

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen April 1999 und Juni 2003 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 5. Juni 2003

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

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. R. Baumann

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. H.R. Kalbitzer

Prof. Dr. R. Wagner

Prof. Dr. K. Kunzelmann

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig, ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

.....

Christine Ludwig

... auch in schweren Zeiten das Ziel
nie aus den Augen zu verlieren –
ist es nicht das, was eine Herausforderung
von einem Problem unterscheidet ?

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	V
Zusammenfassung.....	1
A Einleitung.....	4
A.1 Die Rolle der HIV-1 Protease bei der Virusmorphogenese.....	4
A.1.1 Replikationszyklus von HIV-1.....	4
A.1.2 Protease-vermittelte Ereignisse.....	7
A.1.3 Biosynthese der HIV-1 Protease.....	9
A.2 Biochemische Charakterisierung der HIV-1 Protease.....	10
A.2.1 Struktur und Stabilität.....	10
A.2.2 Katalytischer Mechanismus.....	14
A.2.3 Substratspezifität.....	15
A.3 Die HIV-1 Protease als Target für therapeutische Ansätze.....	17
A.4 Die Regulation der HIV-1 Protease.....	19
A.4.1 Regulation der Protease-Aktivierung.....	19
A.4.2 Prozessierung von Gag und Gag-Pol.....	21
A.4.3 Einfluss des „ <i>transframe</i> “-Proteins p6* auf die Protease-Aktivität.....	24
A.4.3.1 Strukturelle Charakterisierung von p6*.....	24
A.4.3.2 p6* als möglicher Inhibitor der viralen Protease.....	25
A.5 Zielsetzung der Arbeit.....	26
B Material und Methoden.....	28
B.1 Klonierungen und gentechnische Arbeiten.....	28
B.1.1 Bakterien.....	28
B.1.2 Oligonukleotide.....	29
B.1.3 Plasmide.....	30
B.1.3.1 Herstellung der „frameshift“-Reporterkonstrukte.....	30
B.1.3.2 Herstellung der prokaryontischen GST-p6*-Expressionsplasmide.....	32
B.1.3.3 Herstellung der Provirusmutanten.....	33
B.1.3.4 Herstellung der synthetischen HIV-1 Gene.....	34
B.1.4 Isolierung und Analyse genomischer DNA aus HIV-1 infizierten Lymphozyten.....	36
B.2 Proteine, Peptide und Antikörper.....	36
B.2.1 Expression und Reinigung von Proteinen.....	36
B.2.2 Synthetische Peptide.....	37
B.2.3 <i>In vitro</i> -Spaltung durch die HIV-1 Protease.....	38
B.2.3.1 Spaltung von GST-p6*-Fusionsproteinen durch die HIV-1 Protease.....	38
B.2.3.2 Spaltung von Peptiden durch die HIV-1 Protease.....	38
B.2.3.3 Spaltung von Gag-Vorläufern aus Viruspartikeln durch die HIV-1 Protease.....	39

B.2.4	Kontinuierlicher chromogener Protease-Aktivitätstest.....	39
B.2.5	Antikörper.....	39
B.2.5.1	Herstellung des Kaninchenantiseraums α -GST-p7.....	39
B.2.5.2	Antikörper für Western Blot-Analysen.....	40
B.3	Zellkulturtechniken und Infektionen.....	41
B.3.1	Verwendete Zelllinien.....	41
B.3.2	Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen.....	41
B.3.3	Infektion der Indikatorzelllinie HeLa-CD4-LTR- β Gal (Magi-Assay).....	42
B.3.4	Herstellung und Titration von HIV-1 Virusstocks.....	42
B.3.5	Langzeitkultur von HIV-1 infizierten Lymphozyten.....	43
B.4	Analyse der transienten Proteinexpression.....	43
B.4.1	Quantifizierung des HIV-1 Capsidantigens (p24-ELISA).....	43
B.4.2	„Frameshift“-Luciferasereporter Assay.....	44
B.4.3	Analyse der transienten Proteinexpression im Western Blot.....	44
B.4.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	45
C	Ergebnisse.....	46
C.1	Gesamtkonzept zur funktionellen Untersuchung der Proteasespaltstellen von p6* <i>in vitro</i> und im Kontext der viralen Replikation.....	46
C.1.1	Ausgangsüberlegungen.....	46
C.1.2	Mutagenese der Proteasespaltstellen von p6* im proviralen Kontext.....	47
C.1.2.1	Modifikation der N-terminalen Spaltstelle.....	47
C.1.2.2	Modifikation der internen Spaltstelle.....	48
C.1.2.3	Modifikation der C-terminalen Spaltstelle.....	49
C.1.3	Ergänzende <i>in vitro</i> -Testsysteme.....	50
C.2	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der modifizierten Proteasespaltstellen von p6*.....	51
C.2.1	Spaltung von synthetischen Oligopeptiden.....	51
C.2.2	Spaltung von rekombinanten GST-p6*-Fusionsproteinen.....	54
C.3	Einfluss von Modifikationen der cis-aktiven Elemente auf die „frameshift“-Effizienz.....	56
C.3.1	Herstellung der „frameshift“-Reporterkonstrukte.....	56
C.3.2	„Frameshift“-Luciferasereporter Assay.....	57
C.4	Einfluss der modifizierten C-terminalen p6*-Reste auf die Aktivität maturer HIV-1 Protease.....	58
C.4.1	Herstellung und Reinigung rekombinanter p6*-Proteine.....	58
C.4.2	Kontinuierlicher chromogener Protease-Aktivitätstest.....	61
C.5	Einfluss der modifizierten Proteasespaltstellen von p6* auf die virale Replikation.....	62
C.5.1	Herstellung der rekombinanten Proviren.....	62
C.5.2	Einfluss der Mutationen auf die Expression und intrazelluläre Prozessierung viraler Proteine.....	63
C.5.3	Einfluss der Mutationen auf die Zusammensetzung und Maturation freigesetzter Viren.....	64
C.5.3.1	Reifung der viralen Gag-Proteine.....	64
C.5.3.2	Reifung der viralen Pol-Proteine.....	66

C.5.4	Einfluss der Mutationen auf die Infektiosität der Viren.....	67
C.5.4.1	Replikation der p6*-Mutanten in humanen T-Lymphozyten.....	67
C.5.4.2	Infektiosität der p6*-Mutanten im Magi-Assay.....	68
C.5.5	Zusammenfassung.....	70
C.6	Herstellung von synthetischen HI-viralen Genen zur Untersuchung des Einflusses von p6* auf die Protease-Aktivität in Zellkultur.....	72
C.6.1	Gesamtkonzept.....	72
C.6.2	Herstellung von synthetischen Genen zur Rev-unabhängigen Expression von p6*- und Protease-Proteinen in Säugerzellen.....	72
C.6.2.1	Ausgangsüberlegungen.....	72
C.6.2.2	Herstellung der synthetischen HI-viralen Gene.....	73
C.6.3	Etablierung eines Protease-Aktivitätstests in Zellkultur.....	74
C.6.3.1	Expression der Protease-Varianten in Zellkultur.....	74
C.6.3.2	Quantifizierung der Protease-vermittelten Zytotoxizität durch Kotransfektion eines Reporterplasmids.....	75
C.6.3.3	Nachweis der Protease-Aktivität durch Spaltung eines natürlichen Substrats.....	76
C.6.4	Rev-unabhängige Expression der Vpr-Fusionsproteine in Säugerzellen.....	77
C.6.5	Kotransfektionsanalysen.....	80
C.6.5.1	Verpackung von Vpr-Fusionsproteinen in Viruspartikel.....	80
C.6.5.2	Einfluss der synthetischen Gene auf die Expression und Reifung viraler Proteine.....	81
C.6.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	82
D	Diskussion.....	83
D.1	Entwicklung eines Gesamtkonzepts zur funktionellen Untersuchung der Proteasespaltstellen von p6* <i>in vitro</i> und im Kontext der viralen Replikation.....	83
D.1.1	Ansätze zur Aufklärung von Spaltereignissen in Gag-Pol.....	83
D.1.2	Mutagenese der PR-Spaltstellen von p6* im viralen Kontext.....	84
D.2	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der modifizierten Proteasespaltstellen von p6*.....	85
D.2.1	Die Mutationen in p6* führen zu veränderten Hydrolyseraten bei der Spaltung von Peptidsubstraten.....	85
D.2.2	Verlässlichkeit von Algorithmen für die Vorhersage von Spaltereignissen.....	87
D.3	Einfluss von Modifikationen der <i>cis</i> -aktiven Elemente auf die „frameshift“-Effizienz.....	88
D.3.1	Bedeutung der <i>cis</i> -aktiven Elemente für die virale Replikation.....	88
D.3.2	Der Leserastersprung ist in allen p6*-Mutanten funktionell.....	89
D.4	Einfluss der modifizierten C-Termini von p6* auf die Aktivität maturer HIV-1 Protease.....	91
D.4.1	Die C-terminalen M5- und M6-Modifikationen von p6* wirken sich nicht signifikant auf die Inhibition der Protease-Aktivität aus.....	91
D.4.2	Vergleich der Inhibitionsanalysen mit früheren Ergebnissen.....	91

D.5	Einfluss der modifizierten Proteasespaltstellen von p6* auf die virale Replikation.....	92
D.5.1	Die internen csM2- und csM3-Mutationen haben keine erkennbare Auswirkung auf die Autoprozessierung der Protease.....	93
D.5.2	Die C-terminalen csM5- und csM6-Mutationen haben keinen Einfluss auf die Infektiosität rekombinanter Viren in Zellkultur.....	94
D.5.3	Die C-terminalen csM4 und csM7-Mutationen blockieren die Freisetzung der Protease und führen zur Produktion nicht-infektiöser Viruspartikel.....	95
D.5.4	Die csM1-Mutante weist einen Prozessierungsdefekt des Nukleocapsid-Proteins auf und repliziert verzögert in humanen Lymphozyten.....	96
D.6	Reihenfolge der Spaltereignisse in und um p6*.....	99
D.7	Herstellung von synthetischen HI-viralen Genen zur Untersuchung des Einflusses von p6* auf die Protease-Aktivität in Zellkultur.....	100
D.7.1	Effiziente Expression HI-viraler Proteine auf der Basis synthetischer Gene.....	101
D.7.2	Entwicklung von Testsystemen zum Nachweis von Aktivität und Zytotoxizität der HIV-1 Protease.....	102
D.7.3	Die Kopplung an Fusionspartner ermöglicht die Expression von p6* in Säugerzellen.....	103
D.7.4	Verpackung von negativ modulierenden Vpr-Fusionsproteinen in Viruspartikel.....	104
D.7.5	Die Koexpression der synthetischen Gene führt zur verminderten Freisetzung von Viruspartikeln aus transfizierten Zellen.....	105
D.7.6	Ausblick: Optimierung der p6*-Fusionsproteine für eine effiziente negativ-Modulation der HIV-1 Protease.....	106
E	Literaturverzeichnis.....	108
	Veröffentlichungen.....	129
	Lebenslauf.....	131
	Danksagung.....	132
F	Anhang.....	133
F.1	Oligonukleotide.....	133
F.2	Sequenzen synthetischer Gene.....	137
F.3	Sequenzen eukaryontischer Expressionsplasmide.....	139

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Ad5	Adenovirus 5
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	erworbenes Immundefizienz-Syndrom („acquired immunodeficiency syndrome“)
<i>amp</i>	Ampicillin-Resistenzgen
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ASF	alternativer Spleißfaktor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAF	„barrier-to-autointegration factor“
BLV	„bovine leukemia virus“
bp	Basenpaar
BSA	„bovine serum albumine“
C	carboxy
CA	Capsidprotein
ca.	circa
CD	Circulardichroismus
CDK	„cyclin dependent kinase“
CMV	Cytomegalie-Virus
CRS	<i>Cis</i> -aktive Repressor-Sequenzen
csM	„cleavage site“ Mutante
Da	Dalton
<i>dam</i>	Methylierungsdefekt in <i>E. coli</i> (<i>dam</i> -Methylase)
<i>dcm</i>	
DIS	„dimerization initiation site“
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ε	Extinktionskoeffizient
ECL	„enzyme chemoluminescence“
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
EIAV	„equine infectious anemia virus“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
Em.	„emission“ (Emission)
Env	Hüllprotein („envelope“)
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere
Exc.	„excitation“ (Anregung)
FDA	„US Food and Drug Administration“
FKS	fötales Kälberserum
fs	Leserastersprung („frameshift“)
g	Erdbeschleunigung (9,81 ms ⁻²) oder Gramm
G418	Geneticin
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GFP	„green fluorescent protein“
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
gp	Glykoprotein
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunden („hours“)

H ₂ O _{bid}	zweifach destilliertes Wasser
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus Typ-1
HIV-2	Humanes Immundefizienz-Virus Typ-2
HMGI	„high mobility group I“, Nicht-Histonprotein
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRP	Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“)
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus
HUSAR	„Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources“
IC	„inhibitory concentration“
IN	Integrase
INS	„inhibitory sequences“
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
IRES	„internal ribosomal entry site“
k	kilo (10 ³)
l	Liter
λ	Wellenlänge
<i>lacI</i>	Repressorgen des <i>lac</i> -Operons
<i>lacZ</i>	β-Galactosidasegen
LB	Luria Bertani
LTR	„long terminal repeat“
M	molar (Mol pro Liter)
μ	mikro (10 ⁶)
m	Meter oder milli (10 ⁻³)
MA	Matrixprotein
Magi	„multinuclear activation of a galactosidase indicator“
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
MAV	„Barely yellow draft virus“
min	Minuten
MLV	Maus-Leukämie-Virus
MMTV	„mouse mammary tumor virus“
moi	„multiplicity of infection“
MPLV	Myeloproliferatives Leukämie-Virus
MPMV	„Mason-Pfizer monkey virus“
MS	Massenspektrometrie
N	amino
n	nano (10 ⁻⁹)
NC	Nukleocapsidprotein
Nef	„negative regulator“
NES	„nuclear export signal“
Nle	Norleucin
NLS	„nuclear localisation signal“
NMR	kernmagnetische Resonanz („nuclear magnetic resonance“)
oD	optische Dichte
ori	Replikationsursprung, („origin“)
ox.	oxidiert
p	pico (10 ⁻¹²)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	Konzentration der H ⁺ -Ionen in einer Lösung
Phe(p-NO ₂)	para-Nitrophenylalanin
PIC	„preintegration complex“
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PR	Protease
PR [·]	funktionsdefiziente Protease
psi	Einheit für Druck

Ψ	(psi) Verpackungssequenz
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Pwo	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus woesei</i>
rER	rauhes Endoplasmatisches Reticulum
Rev	„regulator of expression of viral proteins“
RIMMH	Regensburger Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Ro 31-8959	Protease-Inhibitor Saquinavir von Roche
RP	„reverse-phase“
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	„rev responsive element“
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
sec	Sekunden
SIV	Affen-Immundefizienz-Virus („simian immunodeficiency virus“)
SRV	„simian acquired immunodeficiency virus“
STLV	„simian T-cell leukemia virus“
SV40	Simian Virus 40
syn	synthetisch
Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
Tat	„transactivator of transcription“
TB	„terrific broth“
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloracetat
TCID	„tissue culture infective dosis“
TM	„Trademark“
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
UV	ultraviolett
Vif	viraler Infektiositätsfaktor
Vpr	virales Protein R
Vpu	virales Protein U
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit („volume per volume“)
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit („weight per volume“)
w/w	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit („weight per weight“)
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

Kurzschreibweisen der Aminosäuren:

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

Kurzschreibweise der Basen:

Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Uracil	U

Zusammenfassung

Die Reifung der HI-viralen Strukturkomponenten und Enzyme in der späten Phase der Infektion ist an die Anwesenheit der viruseigenen Aspartat-Protease gebunden. Diese wird zunächst als Bestandteil des Gag-Pol-Polyproteins in Folge eines Leserastersprungs synthetisiert und anschließend durch schrittweise Autoprozessierung aus dem Vorläufer freigesetzt. Trotz detaillierter Kenntnisse über die Enzymstruktur und Substratspezifität der maturen HIV-1 Protease ist dennoch die stringente Regulation ihrer sequentiellen Aktivierung während des Replikationszyklus noch nicht vollständig aufgeklärt. In den letzten Jahren häuften sich Hinweise, dass das kleine, 68 Aminosäuren umfassende „transframe“-Protein p6* an der Regulation der Protease-Aktivität beteiligt sein könnte, da es durch seine Lage direkt aminoterminal der Protease den Propeptiden eukaryontischer Aspartat-Proteasen entspricht. Obwohl p6* bei verschiedenen HIV-1 Isolaten hochkonserviert ist, ist seine *in vivo* Funktion nach wie vor unbekannt. Dahingegen ergaben *in vitro* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass rekombinantes p6*-Protein die virale Protease konzentrationsabhängig und kompetitiv inhibiert. Allerdings bleibt weiterhin ungeklärt, welche Rolle eine korrekte Prozessierung von p6* für die virale Maturation und Infektiosität der resultierenden Viren spielt. Um die Bedeutung und Reihenfolge der Spaltungen in und um p6* im viralen Kontext aufzuklären, sollten daher im Rahmen dieser Arbeit verschiedene rekombinante Proviren mit Modifikationen der drei natürlichen Protease-Spaltstellen von p6* hergestellt werden. Anschließend sollte der Einfluss dieser Mutationen auf die virale Replikation in verschiedenen Zellkulturen analysiert werden.

Im Falle der aminoterminalen und internen Protease-Spaltstelle von p6* sollten distinkte Aminosäureaustausche zur Blockierung der Spaltungen im viralen Kontext führen, ohne dabei funktionelle Bereiche des überlappenden Gag-Leserahmens sowie die für den Leserastersprung essentiellen *cis*-aktiven Elemente der RNA zu zerstören. Aufgrund dieser Einschränkungen war somit nur jeweils eine Spaltstellenmodifikation möglich. Da die Mutation der internen Spaltstelle auf RNA-Ebene durch Reduzierung der Basenpaarung zur Destabilisierung der für den Leserastersprung notwendigen Haarnadelschleife führt, wurde in einer zusätzlichen Variante die Anzahl der Basenpaarungen wieder hergestellt. Um die natürliche Kinetik der Spaltung am Carboxyterminus von p6* zu verändern und somit die aminoterninale Freisetzung der Protease zu beeinflussen, wurde das carboxyterminale Tetrapeptid von p6* durch vier verschiedene Aminosäurekombinationen ersetzt, für die ein Algorithmus Spaltbarkeit ermittelt hatte. Desweiteren sollten diese Modifikationen die Bedeutung der vier carboxyterminalen p6*-Reste für die Regulation der Protease-Aktivität aufzeigen. So wurden schließlich 7 rekombinante, vom Provirus HX10 abgeleitete Virusmutanten durch „site directed“-Mutagenese für Zellkulturanalysen hergestellt.

Zusätzlich sollte die Etablierung unterschiedlicher *in vitro* Testsysteme eine selektive Bewertung der Mutationen erlauben. So wurden zunächst synthetische Oligopeptide, welche die modifizierten Spaltsequenzen repräsentieren, mit maturer HIV-1 Protease inkubiert, um veränderte Spaltkinetiken aufzuzeigen. Dabei stellte sich heraus, dass die aminoterminalen und internen Mutationen jeweils eine Zerstörung der entsprechenden Spaltstelle von p6* bewirkt hatten. Gleichzeitig waren jedoch alternative

Erkennungssequenzen für die Protease entstanden. Diese neuen Spaltstellen am Aminoterminus bzw. innerhalb von p6* zeigten allerdings stark veränderte Hydrolyseraten im Vergleich zu den ursprünglichen Spaltstellen. Von den vier Aminosäurekombinationen des carboxyterminalen p6*-Tetrapeptids führten entgegen der Vorhersage nur zwei zur Prozessierung der entsprechenden Spaltstelle im Peptidspaltexperiment, wobei die beiden modifizierten Substrate langsamer gespalten wurden als die Wildtypsequenz. Da die Mutationen der aminoterminalen und internen Spaltstelle von p6* Veränderungen der *cis*-aktiven Elemente auf RNA-Ebene bewirkten, sollte die Funktionalität des Leserastersprungs anhand eines „frameshift“-Luciferasereporterassay überprüft werden. Dieser Test ergab, dass der Leserastersprung in allen p6*-Mutanten funktionell ist, wobei die Varianten mit Modifikationen in der Haarnadelschleife geringe Abweichungen von der Wildtyp „frameshift“-Rate in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie zeigten. Der Einfluss der carboxyterminalen Veränderungen von p6* auf die virale Protease wurde sodann in einem spektrophotometrischen Protease-Aktivitätstest untersucht. Hierfür wurden rekombinante p6*-Proteine mit den entsprechenden C-Termini in Bakterien produziert und aufgereinigt und in Anwesenheit eines chromogenen Substrats mit maturaer HIV-1 Protease inkubiert. Ein Vergleich der Initialgeschwindigkeiten zeigte, dass die beiden modifizierten Tetrapeptide das inhibitorische Potential von p6* gegenüber der Protease im Vergleich zur Wildtypsequenz geringfügig steigern konnten.

Schließlich untersuchten wir den Einfluss der modifizierten Proteasespaltstellen von p6* auf die virale Replikation. Nach vergleichender Analyse der sieben Provirusmutanten in verschiedenen Zellkultursystemen zeigte sich, dass die Mutation der internen Proteasespaltstelle von p6* in den Varianten csM2 und csM3 keine erkennbare Auswirkung auf die Autoprozessierung der Protease sowie auf die Reifung der viralen Polyproteine hatte. Somit scheint der drastische Effekt, den diese Mutation bei *in vitro* Spaltanalysen in Gegenwart maturaer Protease bewirkte, nicht auf den komplexen viralen Kontext übertragbar zu sein, wo diese Spaltung vermutlich von der Vorläufer-assoziierten Protease durchgeführt wird. Im Gegensatz dazu führten die carboxyterminalen csM5- und csM6-Mutationen in p6* in Analogie zu den *in vitro* Experimenten zu einer leicht verzögerten Freisetzung am Aminoterminus der Protease, was allerdings keinen Einfluss auf die Infektiosität der entstehenden Viren in Zellkultur hatte. Somit scheint die Aminosäuresequenz des carboxyterminalen Tetrapeptids von p6* nach Abtrennung von der Protease nicht mehr kritisch für die weitere Reifung der Viren zu sein.

Ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Peptidspaltexperimenten verhinderten die carboxyterminalen csM4- und csM7-Mutationen von p6* auch im viralen Kontext die aminoterminal Freisetzung der Protease aus dem Vorläufer. Dies führte zur Entstehung unreifer, nicht-infektiöser Viren. Damit bestätigen wir die Berichte anderer Arbeitsgruppen, dass die aminoterminal Freisetzung der Protease absolut notwendig für die korrekte und vollständige Prozessierung der Gag-Vorläuferproteine und somit für die Infektiosität der resultierenden Viren ist. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Modifikation der aminoterminalen Spaltstelle von p6* in der Virusmutante csM1 keinen Einfluss auf die Autoprozessierung der Protease hatte. Allerdings war bei dieser Mutante eine verlangsamte Reifung des Nukleocapsidproteins zu beobachten, was zu einer verzögerten Replikation der entsprechenden Viren in humanen Lymphozyten führte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Mutationen der aminoterminalen Proteasespaltstelle

von p6* im viralen Kontext nicht möglich sind, ohne den überlappenden Gag-Leserahmen oder die konservierten *cis*-aktiven RNA-Elemente zu beeinflussen.

Da es bei der schrittweisen Aktivierung der Protease zu Proteaseintermediaten kommt, die vermutlich eine andere Substratspezifität besitzen als das mature Enzym, das wir für unsere *in vitro* Testsysteme verwendeten, ist eine Übertragbarkeit der *in vitro* erzeugten Daten auf die komplexe *in vivo* Situation nicht in jedem Fall gegeben. Allerdings ermöglichen unsere Mutationsanalysen der carboxyterminalen Spaltstelle durchaus Aussagen über die Reihenfolge der Spalttereignisse in und um p6*. Demnach wird zunächst die interne Spaltstelle von p6* intramolekular hydrolysiert. Anschließend erfolgt durch Abtrennung der Pol-Domänen die Freisetzung am Carboxyterminus der Protease, wobei ein p6*-Proteasevorläufer entsteht, der durchaus in der Lage ist, die Spalttereignisse in den Pol-Proteinen korrekt durchzuführen. Schließlich führt die letzte Spaltung am Aminoternus der Protease zur vollständigen Maturation des Enzyms, das nun alle weiteren Prozessierungsschritte in den Gag-Vorläuferproteinen vermitteln kann. Somit konnten wir aufgrund unserer Spaltstellenmodifikationen erstmals das letzte Intermediat bei der Autoprocessing der Protease in Viren sichtbar machen, ohne weitere Spalttereignisse zu beeinflussen.

Da sich eine Untersuchung der p6*-vermittelten Protease-Inhibition im komplexen viralen Kontext als schwierig erwies, sollte diese Hypothese in einem einfachen Zellkultursystem unter Ausschluss anderer potentiell modulierender viraler Proteine hinterfragt werden. Hierfür wurden verschiedene eukaryontische Expressionsplasmide hergestellt, die auf der Basis synthetischer Gene eine effiziente Rev-unabhängige Produktion verschiedener Protease- und p6*-Varianten in Säugerzellen erlauben. Anschließend konnten unter Verwendung der generierten Protease-Expressionsplasmide zwei unterschiedliche Testsysteme etabliert werden, mit denen sowohl zytotoxische Effekte der Protease in Zellkultur als auch deren Aktivität gegenüber natürlichen Substraten quantifiziert werden können. Mit Hilfe dieser Testsysteme kann künftig die Kontrollfunktion von p6* auf die HIV-1 Protease in virusinfizierten Zellen untersucht werden.

Ein weiteres Ziel war es, transdominant negative Protease- und p6*-Proteine herzustellen, die in Viruspartikel verpackt werden und dort durch Hemmung der viralen Protease mit der Prozessierung der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine interferieren. Um einen effizienten Transfer dieser Proteine in Viruspartikel zu ermöglichen, wurden Vpr-Fusionsproteine erzeugt, da das virale Vpr-Protein über Interaktion mit der p6Gag-Domäne in die knospenden Viren miteingebaut wird. Die Kopplung an den Fusionspartner Vpr ermöglichte dabei nicht nur einen effizienten Einbau der entsprechenden Genprodukte in knospende Viren, sondern auch erstmals den Nachweis der p6*-Expression in Säugerzellen. Schließlich führte die Koexpression der transdominant negativen synthetischen Protease- und p6*-Proteine zur reduzierten Freisetzung von Viruspartikeln aus mit Provirus transfizierten Zellen, wenngleich wir keinen Einfluss der mitverpackten Vpr-Fusionsproteine auf die Reifung Virus-assoziiierter Gag-Proteine beobachten konnten. Da sich p6* bereits *in vitro* als potenter Inhibitor der HIV-1 Protease erwies, soll nun in weiteren Studien die Wirkung von negativ modulierenden p6*-Varianten gegenüber der viralen Protease im Hinblick auf gentherapeutische Anwendungen mit dem Ziel einer intrazellulären Immunisierung optimiert werden.

A Einleitung

A.1 Rolle der HIV-1 Protease bei der Virusmorphogenese

A.1.1 Replikationszyklus von HIV-1

1980 beschrieb Robert C. Gallo mit dem HTLV („human T-cell leukemia virus“) das erste Retrovirus. Dieses kann beim Menschen Krebserkrankungen, nämlich T-Zell-Leukämien, verursachen. In den folgenden Jahren identifizierten die Arbeitsgruppen um Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris und Robert C. Gallo am National Institute of Health in Bethesda die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2 als Retroviren und Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS. Die seit nunmehr 20 Jahren voranschreitende Forschungsaktivität brachte viele Einzelheiten über die Molekularbiologie und Pathogenese retroviraler Infektionen ans Licht. Somit gehören die HI-Viren heute zu den bestuntersuchten Viren überhaupt.

Der Replikationszyklus von HIV-1 beginnt mit der Bindung von infektiösen Viruspartikeln (Abbildung A.2) an die Wirtszelle. Dies können T-Lymphozyten, Langerhanszellen oder Monocyten/Makrophagen sein. Dabei adsorbiert das als Trimer vorliegende Hüllprotein gp120 spezifisch an den CD4-Oberflächenrezeptor auf den Zielzellen (Dalglish *et al.*, 1984; Jameson *et al.*, 1988; Peterson & Seed, 1988; Arthos *et al.*, 1989). Die sich anschließende konformationelle Änderung des Hüllproteins ermöglicht eine weitere Bindung der nun exponierten V3-Domäne von gp120 an Chemokinrezeptoren wie beispielsweise CCR5 oder CXCR4 (Chapham & Weiss, 1997; Doranz *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996; Moore, 1997). Die Interaktion mit diesen Korezeptoren führt dann über den gp41-Anteil des Hüllproteins zur pH-unabhängigen Fusion der viralen mit der zellulären Membran (Sattentau & Moore, 1991; Wild *et al.*, 1994; Weissenhorn *et al.*, 1997) und erlaubt auf diese Weise den Eintritt des viralen Nukleoproteinkomplexes („Core“) in das Zytoplasma der Wirtszelle (Stein *et al.*, 1987; Perez *et al.*, 1992). Im Inneren der Zelle findet daraufhin das „uncoating“ statt. Dieser Prozess wird von der Phosphorylierung des Matrixproteins durch die MAP-Kinase (Cartier *et al.*, 1999) sowie zusätzlichen Aktionen von Cyclophilin A begleitet (Franke *et al.*, 1994). Außerdem scheinen die viralen Proteine Nef (Schaeffer *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2002) und Vif (Ohagen *et al.*, 2000) in dieser Phase die Stabilität des Capsids zu beeinflussen. Nach erfolgreichem „uncoating“ dockt der freigelegte Reverse Transkriptase-Komplex bestehend aus dem diploiden RNA-Genom, tRNA^{Lys} als „primer“, Matrixprotein (MA), Nukleocapsidprotein (NC), Vpr, Reverser Transkriptase (RT), Integrase (IN), sowie einigen zellulären Proteinen, an Aktinfilamente des Zytoskeletts an (Bukrinskaya *et al.*, 1998). Anschließend beginnt die Reverse Transkriptase (RT), das RNA-Genom in DNA umzuschreiben (zur Übersicht: Telesnitsky & Goff, 1997). Diese cDNA wird als Bestandteil des sogenannten Präintegrationskomplexes (PIC) vermutlich über Mikrotubuli (T. Hope, nicht-veröffentlichte Daten) aktiv in den Zellkern der Wirtszelle transportiert, wobei bisher nicht eindeutig geklärt ist, welche Komponente des PIC die Hauptrolle bei

diesem Transport übernimmt. So scheinen neben dem akzessorischen Protein Vpr (Popov *et al.*, 1998; Jenkins *et al.*, 1998; zur Übersicht: Fouchier *et al.*, 1999; Le Rouzic *et al.*, 2002) auch die virale IN (Bouyac-Bertoia *et al.*, 2001) und die Ausbildung einer „flap“-Struktur in der viralen cDNA während der reversen Transkription (Zennou *et al.*, 2000) diesbezüglich von Bedeutung zu sein. Im Kern angelangt, veranlasst die katalytische Aktivität der IN in Zusammenarbeit mit den Wirtsfaktoren HMGI (Y) und BAF (Chen *et al.*, 1998) den Einbau der viralen cDNA ins zelluläre Genom (Fujiwara *et al.*, 1988; Vink *et al.*, 1993), womit die frühe Phase des HI-viralen Lebenszyklus abgeschlossen ist.

Am Beginn der späten Phase wird zunächst von der U3-Region des 5'-LTR-Promotors der integrierten DNA (Abbildung A.1) die Transkription der viralen Gene eingeleitet. Dabei verlassen anfangs nur mehrfach gespleißte, nicht polyadenylierte RNAs den Zellkern. Ein Genprodukt dieser etwa 2-kb kurzen RNA-Spezies ist das regulatorische Protein Tat (Rice *et al.*, 1988). Dieser essentielle Transkriptionsaktivator kehrt über sein Kernlokalisierungssignal („nuclear localisation signal“, NLS) in den Zellkern zurück und bindet dort im 5'-LTR an eine ausgeprägte Sekundärstruktur, das sogenannte „transactivating response element“ (TAR) (Dingwall *et al.*, 1989; Weeks *et al.*, 1990). Nach Rekrutierung des zellulären Cyclin T1/CDK9-Komplexes (Herrmann & Rice, 1995; Wei *et al.*, 1998) durch Tat wird die RNA-Polymerase II CDK9-vermittelt hyperphosphoryliert, (Isel & Karn, 1999) wodurch die Transkriptionselongation effizient gefördert wird (zur Übersicht: Karn, 1999).

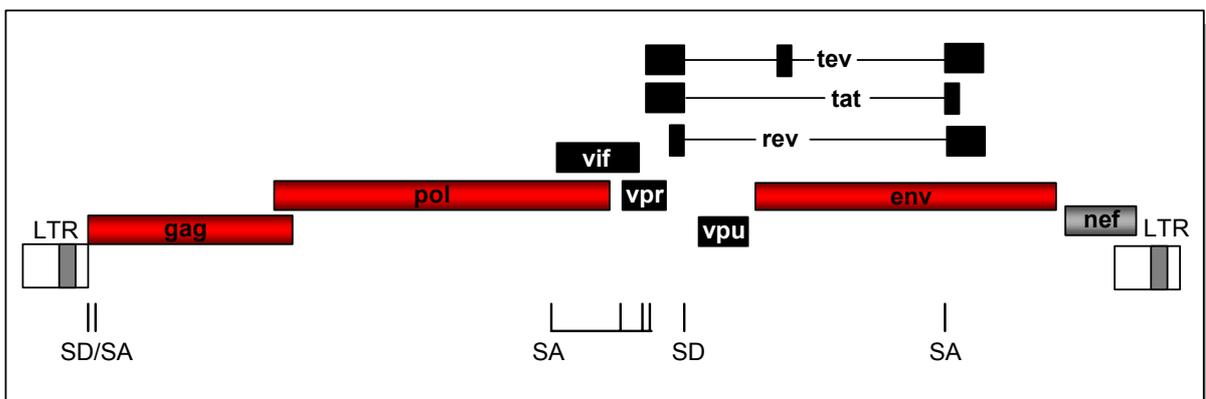


Abbildung A.1: Genomorganisation von HIV-1. Das etwa 9,6-kb umfassende provirale Genom enthält neun offene Leseraster und wird beidseitig von LTR- („long terminal repeat“) Regionen flankiert, die für die Transkriptionsinitiation und -termination essentiell sind. Drei der Leseraster kodieren für die Gag-, Pol- und Env-Proteine, die per definitionem Bestandteil aller Retroviren sind. Zusätzlich werden sechs akzessorische Proteine kodiert, von denen mindestens drei (Vpr, Vif und Nef) partiell in Viruspartikel verpackt werden. Wichtige transkriptionsregulatorische Funktionen werden von den Proteinen Tat und Rev wahrgenommen, während Vpu indirekt an der Assemblierung von Virionen beteiligt ist. Dahingegen scheint das Nef-Protein aufgrund seiner multifunktionellen Eigenschaften die zelluläre Umgebung für die HIV-Replikation zu optimieren.

Während die Proteine Tat, Rev und Nef bereits in der frühen Phase der Transkription durch die Translation der mehrfach gespleißten RNAs gebildet werden, die in Abwesenheit inhibitorischer Sequenzen (INS) rasch ins Zytoplasma gelangen, bleiben einfach- und ungespleißte RNAs, welche für die Strukturproteine, Enzyme und weitere

akzessorischen Komponenten kodieren, zunächst im Zellkern zurück, wo sie weiter prozessiert oder aber degradiert werden. Das unvollständige Spleißen dieser Transkripte ist vermutlich auf die Anwesenheit suboptimaler Spleißdonor- und Akzeptorstellen, sowie auf den inhibitorischen Einfluss von Rev durch dessen Interaktion mit dem alternativen Spleiß-Faktor ASF (Powell *et al.*, 1997) und dem damit assoziierten p32-Protein (Luo *et al.*, 1994) zurückzuführen. Erst wenn Rev oligomer an das sogenannte „rev responsive element“ (RRE) unvollständig gespleißter RNAs bindet und über sein Leucin-reiches Kernexportsignal („nuclear export signal“, NES) den zellulären Exportrezeptor Exportin-1 (Crm1) sowie RanGTP rekrutiert, gelangt dieser Komplex durch die Kernpore ins Zytoplasma (Cullen, 1998; zur Übersicht: Nilsson *et al.*, 2001). Nach hydrolytischer Umwandlung von RanGTP in RanGDP dissoziiert dieser Komplex, und Rev kehrt durch Bindung seines Arginin-reichen NLS an Importin- β wieder in den Zellkern zurück (Henderson *et al.*, 1997; zur Übersicht: Emerman & Malim, 1998; Ohno *et al.*, 1998; Pollard & Malim, 1998). In seiner Eigenschaft als „shuttle“-Protein ist Rev somit essentiell für die zeitliche Regulation der viralen Transkription.

Von der einfach gespleißten mRNA wird das Oberflächenprotein Env am rauhen endoplasmatischen Reticulum (rER) als Vorläuferprotein (gp160) translatiert, glykosyliert und im *trans*-Golgi von einer zellulären Furin-Protease in die externe Komponente gp120 und das Transmembranprotein gp41 gespalten (Dewar *et al.*, 1989; Decroly *et al.*, 1997; Hallenberger *et al.*, 1997). Diese Spaltprodukte werden als nicht-kovalent verknüpfte Trimere an die Zelloberfläche transportiert und dort über Wechselwirkung des zytoplasmatischen gp41-Anteils mit den MA-Proteinen der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine in die Zytoplasmamembran eingelagert (Yu *et al.*, 1992; Dorfman *et al.*, 1994; Freed *et al.*, 1995b; Cosson *et al.*, 1996; zur Übersicht: Wyatt & Sodroski, 1998; Vincent *et al.*, 1999; Wyma *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu Env werden die Gag- und Gag-Pol-Polyproteine an freien Ribosomen von den ungespleißten mRNA-Spezies translatiert (Swanstrom & Wills, 1997). Dabei wird unter Abspaltung des N-terminalen Methionins kotranslational ein Myristinsäurerest durch die zelluläre Myristyl-CoA-Acetyl Transferase angefügt (Gheysen *et al.*, 1989; Göttlinger *et al.*, 1989; Bryant & Ratner, 1990; Freed *et al.*, 1994), über den die Vorläuferproteine in der Zytoplasmamembran verankert werden. Der Transport entlang der Mikrotubuli wird dabei durch aminoternale Transportsignale im MA vermittelt (Fäcke *et al.*, 1993; Gallina *et al.*, 1994; Reil *et al.*, 1998). Vermutlich werden die posttranslationalen Modifikationen von Env durch Palmytylierung und von Gag/Gag-Pol durch Myristilierung auch benötigt, um die Proteinvorläufer in bestimmte Strukturen, die sogenannten „lipid rafts“ unterhalb der Zytoplasmamembran zu dirigieren, wo das „Assembly“ stattfindet (Vogt, 1996; Lee & Yu, 1998; Lee *et al.*, 1999; zur Übersicht: Campbell *et al.*, 2001). Die Oligomerisierung der Gag-Vorläufer wird durch bestimmte Domänen innerhalb der CA- und NC-Proteine vermittelt (Jowett *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1996). Nach Akkumulation von ca. 1500 bis 2000 Gag- und 70 bis 100 Gag-Pol-Molekülen unterhalb der Zytoplasmamembran, kommt es unter Beteiligung von Aktinfilamenten (Ott *et al.*, 1996; Rey *et al.*, 1996; Wilk *et al.*, 1999) und des p6-Proteins zur Ausstülpung und schließlich zum Abknospen der Partikel von der Zelloberfläche. Dabei scheint das zelluläre ATP-bindende Protein HP68 eine Schlüsselrolle bei der

Assemblierung unreifer Capside zu spielen (Zimmerman *et al.*, 2002), während für die endgültige Abschnürung der Virionen ein PTAP-Motiv im p6-Protein, die sogenannte „late domain sequence“ essentiell ist (Garnier *et al.*, 1999; Strack *et al.*, 2000). Diese wird von dem zellulären Protein TSG101 gebunden, das normalerweise Bestandteil der „vacuolar protein-sorting“ Maschinerie ist und mit Ubiquitin interagieren kann (Garrus *et al.*, 2001; Ver Plank *et al.*, 2001). Die Notwendigkeit dieser Interaktionen für das Knospen von Partikeln sind Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Außer den Gag- und Gag-Pol-Polyproteinen werden zudem auch je zwei Kopien der genomischen RNA mitverpackt. Dies wird durch spezifische Bindung der Verpackungssequenz (Ψ) innerhalb ungespleißter Transkripte an die Zinkfingerdomänen des NC-Proteins vermittelt (Gorelick *et al.*, 1990). Überdies kommt es durch Interaktion mit einer RT-Domäne zum Einbau von tRNA^{Lys}-Molekülen (Richter-Cook *et al.*, 1992; Barat *et al.*, 1993) und über Bindung an eine C-terminale Domäne (LXXLF) im p6-Protein zum Einbau einiger Vpr-Proteine (Checroune *et al.*, 1995; Kondo & Göttlinger, 1996; Müller *et al.*, 2000). Schließlich werden auch die viralen Proteine Vif und Nef, sowie das zelluläre Chaperon Cyclophilin A, eine Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase, die für die Infektiosität der meisten HIV-1 Isolate essentiell ist (Luban *et al.*, 1993; Franke *et al.*, 1994; Thali *et al.*, 1994; Braaten *et al.*, 1996a; Braaten *et al.*, 1996b), in Viruspartikeln gefunden.

A.1.2 Protease-vermittelte Ereignisse

Die Reifung der Virionen durch Spaltung der Vorläuferproteine Gag und Gag-Pol (A.4.2) in die einzelnen Strukturkomponenten, Enzyme und „spacer“ Proteine wird noch an der Wirtszellmembran durch die viruseigene Protease (PR) eingeleitet. Dabei haben Inhibitionsstudien gezeigt, dass die Verzögerung von Prozessierungsereignissen auch eine Verzögerung der Virusfreisetzung zur Folge hat (Kaplan *et al.*, 1994). Überdies sind Viren, in denen die PR durch Mutation des aktiven Zentrums inaktiviert wurde, nicht infektiös und weisen eine ungewöhnliche Morphologie auf (Kohl *et al.*, 1988; Göttlinger *et al.*, 1989; Peng *et al.*, 1989), wobei eine lineare Relation zwischen PR-Aktivität und Infektiosität der Viren zu bestehen scheint (Rosé *et al.*, 1995). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Gag-Pol-Vorläufern, die eine funktionsdefiziente PR beinhalten bei gleichzeitiger Expression von Gag zum intrazellulären Knospen der mutierten Virionen und somit zu einer defekten Reifung führt (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2002). Diese morphologische Maturation zu infektiösen Viren ist durch das Verschwinden eines elektronendichten Ringes unterhalb der Virushülle und der Entstehung einer elektronendichten, konischen Struktur im Zentrum des Virions gekennzeichnet (Abbildung A.2 und Gelderblom *et al.*, 1989). So geht mit der PR-vermittelten Reifung eine umfassende Destabilisierung der Viruspartikel einher, die bei Wiedereintritt der Viren in neue Zielzellen die Dissoziation des Capsids ermöglicht. In diesem Zusammenhang wurde auch berichtet, dass die proteolytische Prozessierung von Gag und Gag-Pol die Bindungsaffinität der viralen Proteine zur Phospholipidmembran verändert, was die Freisetzung der Virionen begünstigt (Scarlata *et al.*, 1998). Dabei geht die Prozessierung des Pr55-Vorläufers durch die PR offensichtlich mit einer Konformationsänderung im MA einher, wodurch sich die Lage des Myristinsäurerests

verändert und die Fähigkeit des MA zur Assoziation mit Membranen verlorengeht, da sie zu diesem Zeitpunkt nur noch auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht (Hermida-Matsumoto & Resh, 1999). Bei der Fusion von Viruspartikeln mit der Wirtszelle wird das MA durch die starke Verdünnung mit Zytosol so schneller von der Membran abdiffundieren und steht für weitere Aufgaben in der frühen Phase der Replikation zur Verfügung.

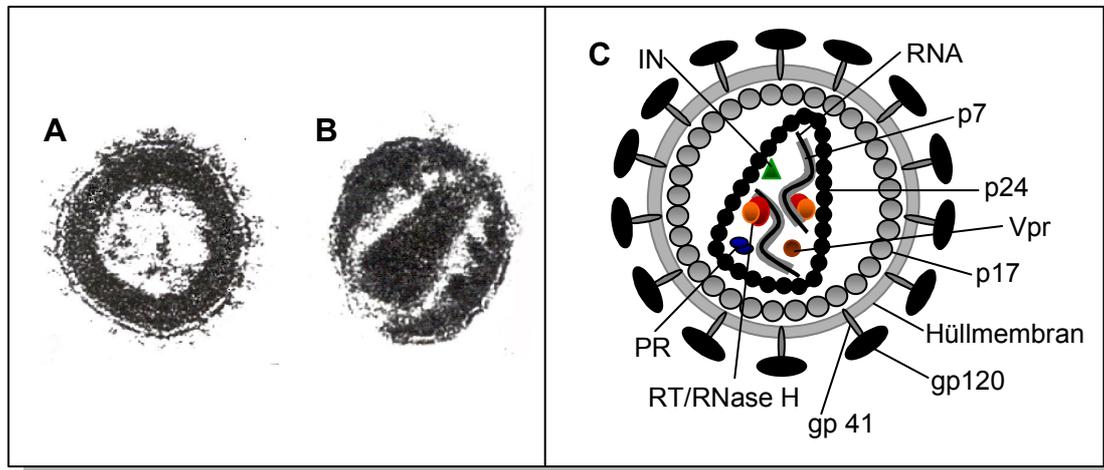


Abbildung A.2: Morphologie maturaer HI-Viren. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von immaturren (A) und maturaen (B) HI-Virionen mit dem von der Hüllmembran umgebenen konischen Capsid (H. Gelderblom, Robert Koch Institut, Berlin) und schematische Darstellung eines HI-Viruspartikels (C). Ein reifes Virion setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: Hüllmembran der Wirtszelle mit integrierten Oberflächenproteinen gp120 und gp 41, Matrixprotein (p17), Capsidprotein (p24), RNA-Genom mit Nukleocapsidprotein (p7), Vpr und die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT) mit RNase H, Protease (PR) und Integrase (IN). In Viren verpackte zelluläre Komponenten sind nicht dargestellt.

Darüber hinaus können der viralen PR auch weitere Spaltereignisse im viralen Kontext zugeschrieben werden. So wird unter anderem das Virus-assoziierte Vif-Protein spezifisch von der PR hydrolysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Vif-Mutationen, die diese Prozessierung verhindern, die Funktion des Proteins bei der Regulation der viralen Infektiosität beeinträchtigen (Khan *et al.*, 2002). Ferner konnte die Vorhersage, dass es sich auch bei dem viralen 27-kDa Nef-Protein um ein natürliches Substrat der PR handelt (Freund *et al.*, 1994), zunächst durch *in vitro*-Spaltung von rekombinantem Nef (Freund *et al.*, 1994; Gaedigk-Nitschko *et al.*, 1995) und schließlich durch den Nachweis der entsprechenden 18-kDa Spaltprodukte in infizierten Zellen bestätigt werden (Welker *et al.*, 1996). Entsprechend liegen etwa 50% der Partikel-assoziierten Nef-Moleküle als N-terminal verkürzte Fragmente vor. Diese Prozessierung von Nef durch die PR ist vermutlich an dessen Funktion in der frühen Phase der Infektion gekoppelt. So scheint die HI-virale PR nicht nur aufgrund der Prozessierung von Strukturkomponenten essentiell für die Reifung infektiöser Viruspartikel zu sein, sondern auch Virus-assoziierte Proteine für ihre Aufgaben in neu-infizierten Zellen vorzubereiten - wobei jedoch die PR selbst in den frühen Stadien der Infektion vermutlich keine Rolle spielt (Kaplan *et al.*, 1996).

Obwohl PR-Aktivität im Zytoplasma von infizierten Zellen beobachtet wurde, handelt es sich bei den Spaltungsprozessen, die letztendlich zu reifen, infektiösen Viren

führen, um späte Ereignisse, die wahrscheinlich erst während der Endphase der Knospung vor der Virusfreisetzung initiiert werden (Kaplan *et al.*, 1991). Dennoch kann eine im Zytoplasma bereits partiell aktivierte PR das zelluläre Umfeld für die virale Replikation positiv beeinflussen. So wurde kürzlich von der spezifischen Spaltung des eukaryontischen Initiationsfaktors eIF4G I durch die HIV-1 PR berichtet (Ventoso *et al.*, 2001), der für die Cap-abhängige Translation zellulärer mRNAs essentiell notwendig ist. Infolge der Inaktivierung von eIF4G I wird in infizierten Zellen die Proteinbiosynthese an HI-viralen RNAs in der G₂/M-Phase des Zellzyklus begünstigt, da diese RNAs im 5'-„leader“ eine IRES enthalten (Brasey *et al.*, 2003) und deren Translation folglich von diesem Faktor unabhängig ist (Perales *et al.*, 2003).

A.1.3 Biosynthese der HIV-1 Protease

Im Gegensatz zu RSV oder MAV, wo die PR Bestandteil der Gag-Region ist und in gleichen Mengen wie die übrigen Gag-Proteine synthetisiert wird, wird die PR bei HIV-1 in einem eigenen *pol*-Leserahmen kodiert. So entstehen bei der Translation der ungespleißten, genomischen 9-kb RNA die beiden Polyproteinvorläufer Gag- und Gag-Pol (Abbildung A.3 B).

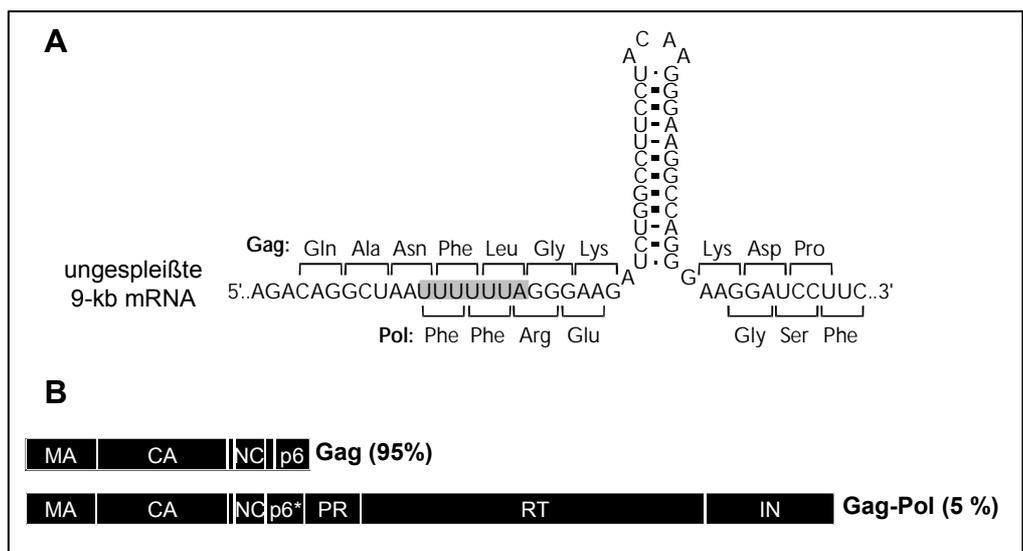


Abbildung A.3: Biosynthese der Gag- und Gag-Pol-Polyproteine. In der für das „spacer“-Protein p1 kodierenden Sequenz befindet sich ein Uridin-reicher Abschnitt, die sogenannte „slippery sequence“, auf die in einer Entfernung von 8 Nukleotiden eine Haarnadelstruktur folgt. Aufgrund dieser *cis*-aktiven Elemente kommt es in ca. 5% aller Translationsereignisse zu einer Leserasterverschiebung, wodurch das Stoppkodon am Ende des *gag*-Bereichs übersprungen und ein Gag-Pol-Durchleseprotein synthetisiert wird (A). Auf diese Weise entstehen neben den Gag-Vorläufern (MA-CA-p2-NC-p1-p6) auch die Gag-Pol Fusionsproteine (MA-CA-p2-NC-p6*-PR-RT-IN) im Verhältnis 20:1 (B).

Während der Gag-Vorläufer die Strukturproteine MA, CA, p7 und das Linkerprotein p6 sowie die wenig charakterisierten „spacer“-Peptide p2 und p1 umfasst (Henderson *et al.*, 1992), werden im Gag-Pol-Vorläufer zusätzlich die enzymatischen Domänen PR, RT/RNaseH und IN angefügt. Diese C-terminale Erweiterung von Gag ist die Folge

einer Verschiebung des Leserasters in ca. 5% aller Translationsereignisse (Jacks *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1988). Dabei wird ein -1 Leserastersprung („frameshift“) durch zwei *cis*-wirkende Elemente auf der genomischen RNA induziert (Abbildung A.3 A). Durch die Ausbildung einer Haarnadelschleife („stem-loop“) im p1-Bereich verlangsamt sich die Proteinbiosynthese, und die translatierenden Ribosomen werden an der acht Nukleotide in 5'-Richtung lokalisierten Heptanukleotid- oder „slippery sequence“ angehalten. Diese Sequenzfolge (U UUU UUA) bedingt eine fehlerhafte Erkennung der Kodongrenzen durch die Ribosomen, wodurch sich das Leseraster um -1 verschiebt. In diesem Fall setzt sich die Translation mit der Synthese der Pol-Domänen p6* und PR anstelle der Gag-Domänen p1 und p6 fort (Parkin *et al.*, 1992; Reil *et al.*, 1993; Cassan *et al.*, 1994; Kollmus *et al.*, 1994; zur Übersicht: Brierley, 1995).

A.2 Biochemische Charakterisierung der HIV-1 Protease

A.2.1 Struktur und Stabilität

Proteasen bilden eine der größten und mannigfaltigsten Enzymfamilien und wurden ursprünglich als Verdauungsenzyme angesehen. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sie bei den unterschiedlichsten organischen Prozessen involviert sind. Dabei variieren Spaltmechanismus und Beschaffenheit des aktiven Zentrums bei den einzelnen PR-Spezies beträchtlich. Dies liefert die Basis für die Klassifizierung von PR in Serinproteasen, Cysteinproteasen oder Metalloproteasen (zur Übersicht: Barrett *et al.*, 1998). Die retroviralen PR zählen dahingegen zur weiteren Klasse der Aspartatproteasen (Asp-PR) (Meek *et al.*, 1989; Wlodawer *et al.*, 1989; Grant *et al.*, 1991). Diese Enzyme sind durch zwei katalytisch aktive Aspartatreste im aktiven Zentrum charakterisiert, von denen jeder in einer stark konservierten Region innerhalb einer eigenen Polypeptidkette zu liegen kommt. So konnte durch Sequenzanalysen verschiedener retroviraler PR ein D-T/S-G Motiv identifiziert werden, das dem Aminosäuretriplett im aktiven Zentrum der weitverbreiteten, zellulären Asp-PR entspricht (Toh *et al.*, 1985; Pearl & Taylor, 1987). Diese Verwandtschafts-Hypothese wurde durch Experimente gestützt, die zeigen konnten, dass die HIV-1 PR empfindlich gegenüber spezifischen Inhibitoren zellulärer Asp-PR ist (Katoh *et al.*, 1987). So wird sie beispielsweise durch das Peptidanalogen Pepstatin A, *in vitro* (Kräusslich *et al.*, 1988; Seelmeier *et al.*, 1988; Richards *et al.*, 1989) und *in vivo* (von der Helm *et al.*, 1989) gehemmt. Zur weitverbreiteten Klasse der zellulären Asp-PR werden unter anderem das Verdauungsenzym Pepsin, das blutdruckregulierende Renin, das Enzym Chymosin der Wiederkäuer oder die ubiquitären, lysosomalen PR Cathepsin D und E gezählt (zur Übersicht: Davies, 1990). Diese PR werden von einem Gen synthetisiert, das für zwei homologe Domänen mit ähnlicher Sequenz kodiert und vermutlich durch Genduplikation entstanden ist (Tang *et al.*, 1978). Dabei faltet sich das Polypeptid in eine Art Pseudodimer, wobei zwei Domänen in räumliche Nähe treten und zusammen das aktive Zentrum ausbilden. Die meisten dieser eukaryontischen PR haben ihr pH-Optimum im sauren Bereich. Im Gegensatz zu diesen fügen sich bei den retroviralen PR zwei gleiche Monomere

durch nichtkovalente Bindungen zu echten Homodimeren zusammen (Kato *et al.*, 1989; Wlodawer *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989a) (Abbildung A.4). Dabei sind deren Untereinheiten mit ca. 100 bis 130 Aminosäuren deutlich kleiner als die etwa 325 Aminosäuren umfassenden Domänen ihrer zellulären Verwandten. Des Weiteren sind retrovirale PR durch geringere enzymatische Aktivität gekennzeichnet. Dies wird dadurch bedingt, dass für die Ausbildung eines funktionellen, aktiven Zentrums jeweils zwei Untereinheiten benötigt werden und nur die dimere Form der PR vollständige Aktivität entfaltet. Trotz funktioneller und struktureller Gemeinsamkeiten weichen die Sequenzen von Asp-PR verschiedener Retroviren deutlich voneinander ab, wobei nur etwa ein Drittel ihrer Aminosäurereste identisch ist. Diese Reste akkumulieren hauptsächlich in drei kurzen, konservierten Sequenzabschnitten (Rao *et al.*, 1991) (Abbildung A.4), deren Mutation erwartungsgemäß mit dem Verlust der enzymatischen Aktivität einhergeht (Loeb *et al.*, 1989).

AS:	30	64	108
RSV:	<u>vyi</u> TaLL <u>D</u> SGADiTiis ... IhGIGGgip ... lGRDcLqglg ...		
MLV:	qpvTfLVD <u>T</u> Gaqhsvlt ... vqGatGskn ... llGRDlLt kl k ...		
MPMV:	kmfTgLiD <u>T</u> GADvTiik ... lrGIGqsnn ... lwGRDlLsqmk ...		
HIV:	klkeaLLD <u>T</u> GADdTvle ... igGIGGfik ... iiGRnlLtqig ...		
AS:	18	47	84

Abbildung A.4: Sequenzvergleich vier prototypischer retroviraler Proteasen. (Modifiziert nach Rao *et al.*, 1991 und Sonigo *et al.*, 1986.) Großbuchstaben kennzeichnen konservierte Reste, die in allen vier Sequenzen identisch sind. Der katalytisch aktive Asp-Rest ist jeweils unterstrichen. Bei den dargestellten Sequenzabschnitten handelt es sich um das Prag C-Isolat für RSV, das BH10-Isolat für HIV und das Moloney-Isolat für MLV. Die Nummerierung der Aminosäurereste ist für RSV (obere Zeile) sowie für HIV (untere Zeile) angegeben.

Das erste retrovirale Protein, dessen Struktur aufgeklärt wurde, war die PR von RSV (Miller *et al.*, 1989). Kurz darauf folgte auch die Strukturaufklärung der HIV-1 PR durch Röntgenkristallographie (Navia *et al.* 1989; Wlodawer *et al.*, 1989). Dabei zeigte sich, dass die Homodimere eine fast perfekte zweifach symmetrische Achse aufweisen und vornehmlich an drei verschiedenen Stellen miteinander interagieren (Abbildung A.5). Den Hauptbeitrag zur Stabilisierung des Dimers leistet dabei ein viersträngiges, antiparalleles β -Faltblatt, welches von den N- und C-Termini der beiden Untereinheiten ausgebildet und durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird (Weber, 1990). Überdies geht jeweils der N-Terminus der einen Untereinheit mit dem C-Terminus der anderen eine ionische Bindung ein (Wlodawer *et al.*, 1989). Dieser Bereich der Wechselwirkungen wird auch als „dimer interface“ bezeichnet, wobei sich Regionen, die besonders stark zur Dimer-Assoziation beitragen („hot spots“) mit Regionen, die fast unbeteiligt scheinen, abwechseln (Todd *et al.*, 1998). Dabei machen die amino- und carboxyterminalen Reste Cys₉₅, Thr₉₆, Leu₉₇, Asn₉₈, Phe₉₉ und Pro₁, Ile₃, Leu₅ zusammen etwa 75% der gesamten freien Energie des Dimers aus. Ferner scheint auch der hochkonservierte Rest Arg₈₇ innerhalb des Bereiches Gly₈₆-Arg₈₇-Asn/Asp₈₈ für die Dimer-Assoziation von Bedeutung zu sein (Ishima *et al.*, 2001).

Das aktive Zentrum der PR bildet sich an der Grenzfläche der beiden Untereinheiten aus, wobei die Wechselwirkung der beiden D_{25} - T_{26} - G_{27} -Sequenzen im aktiven Zentrum als „fireman's grip“ bezeichnet wird. Dabei kommt dem T-Rest jeweils eine wesentliche Rolle bei der Stabilisierung dieser Struktur zu (Davies *et al.*, 1990), da die Seitenkette des T_{26} der einen Untereinheit mit dem Amid der Hauptkette des T_{26} der anderen Untereinheit interagiert (Goldblum, 1990; Ido *et al.*, 1991). Eine ähnliche Wechselwirkung findet zwischen der Seitenkette des T_{26} und der Carbonyl-Hauptkette des L_{24} der anderen Untereinheit statt. Dieses komplexe Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen ist essentiell für die geometrische Ausbildung des aktiven Zentrums. Die einzig bekannte Sequenzabweichung im katalytischen Triplet von aktiven Asp-PR ist eine $T \rightarrow S$ Substitution, die bei den PR von Vogel-Retroviren, Foamy-Viren und einigen Retrotransposons von *Saccharomyces cerevisiae* vorkommt (Toh *et al.*, 1985). Dabei weist Serin eine ähnliche Hydroxyl-Seitenkette wie Threonin auf und ist somit die einzige andere Aminosäure, die die Ausbildung der „fireman's grip“-Struktur erlaubt. Dahingegen führt bereits die Mutation eines der beiden Asp-Reste zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms (Kohl *et al.*, 1988; Kottler *et al.*, 1988; Le Grice *et al.*, 1988; Mous *et al.*, 1988; Seelmeier *et al.*, 1988; Loeb *et al.*, 1989; Babe *et al.*, 1991; Kräusslich *et al.*, 1991). Trotz der relativ starren Geometrie des aktiven Zentrums (Zoete *et al.*, 2002) deuten neuere Untersuchungen an ungebundenen PR-Dimeren an, dass die Reste 23-26 im aktiven Zentrum äußerst anpassungsfähig und flexibel in Bezug auf Veränderungen der Substratstruktur zu sein scheinen (Kumar & Hosur, 2003). Dies kann zu der Tatsache beitragen, dass die HIV-virale PR in der Lage ist, so viele unterschiedliche Substrate zu spalten (Henderson *et al.*, 1988).

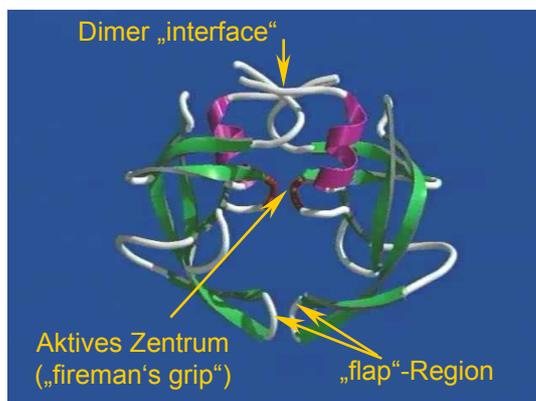


Abbildung A.5: Dreidimensionale Struktur der HIV-1 PR. Das Homodimer wird aus zwei identischen 11-kDa Untereinheiten gebildet, von denen jede 99 Aminosäuren umfasst. Die drei Interaktionsbereiche zwischen den Monomeren, die maßgeblich zur Stabilität des Dimers beitragen, sind durch Pfeile markiert.

Weitaus flexibler sind dahingegen die sogenannten „flaps“, bei denen zwei β -Haarnadelstrukturen (Reste 53-58) an der Oberfläche der beiden Untereinheiten miteinander in Kontakt treten und nach Substratbindung von einer offenen in eine geschlossene Konformation übergehen, wodurch sie den Zugang zum aktiven Zentrum verschließen (Gustchina & Weber, 1990). Dabei konnten thermodynamische Struktur-Analysen zeigen, dass dieser Bereich äußerst instabil ist und seine Konformation leicht durch die Einwirkung äußerer Einflüsse zerstört werden kann (York *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1995; Rick *et al.*, 1998; Todd *et al.*, 1998; Ishima *et al.*, 1999). Diese ausgeprägte Flexibilität der „flaps“ spielt vermutlich sowohl bei der Stabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes als auch bei der Katalyse selbst eine

Rolle (Nicholson *et al.*, 1995; Moody *et al.*, 1995; Todd *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu retroviralen Asp-PR besitzen die zellulären Enzyme nur eine „flap“-Region im aminoterminalen Bereich.

Eine weitere strukturelle Besonderheit der retroviralen Proteasen ist das sogenannte „two methyl-cluster“ Motiv. So sind bei der HI-viralen PR wie auch bei den entsprechenden Enzymen von HIV-2, SIV, RSV und EIAV mehr als 40% der Aminosäurereste Methylseitenketten, die bei der Ausbildung der stabilen Dimerstruktur vornehmlich in einem äußeren und einem inneren Bereich des Enzyms „clustern“ (Ishima *et al.*, 2001). Dahingegen überwiegen bei den zellulären Asp-PR die aromatischen Seitenketten. Weil Methylreste im Vergleich zu aromatischen Resten als besonders flexibel gelten, scheint dies ein Grund für die ausgeprägte Anpassungsfähigkeit der viralen PR-Spezies zu sein.

Da die Zerstörung der Dimer-Struktur mit dem gänzlichen Verlust der Enzymfunktion einhergeht (Zhang *et al.*, 1991; McPhee *et al.*, 1996; Rozzelle *et al.*, 1999), wurden neben den intrinsischen Eigenschaften auch Auswirkungen äußerer Einflüsse auf die Stabilität des Homodimers untersucht. So besitzt die HIV-1 PR bei einer Temperatur von 30 bis 34 °C die maximale freie Energie (Todd *et al.*, 1998) und zeigt maximale katalytische Aktivität in einem pH-Bereich zwischen 4 und 6 (Hyland *et al.*, 1990; Poorman *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu liegt das pH-Optimum von eukaryontischen Asp-PR mit Ausnahme von Renin (Inagami *et al.*, 1981) zwischen 2 und 4. Für diesen Unterschied ist vermutlich eine bei der HIV-1 PR fehlende Wasserstoffbrückenbindung zur Carboxylgruppe des Asp₂₅-Restes verantwortlich (Ido *et al.*, 1991), die bei fast allen zellulären Asp-PR vorhanden ist (Suguna *et al.*, 1987; Pearl & Blundell, 1984; Davies, 1990). Setzt man die HI-virale PR pH-Werten <4 aus, so führt dies über Protonierung einer enzymatischen Gruppe zur Entfaltung und Inaktivierung des Enzyms. Im Gegenzug führt deren Inkubation bereits bei relativ neutralen bis schwach alkalischen pH-Werten >7 zur Deprotonierung mehrerer Gruppen, wobei die Entfaltung des Enzyms in diesem Fall vermutlich auf Ladungsabstoßung von benachbarten Carboxylgruppen beruht (Grant *et al.*, 1992). Darüber hinaus ist die Stabilität des Enzyms auch von dessen Konzentration und der Zusammensetzung des Lösungsmittels abhängig (Jordan *et al.*, 1992). So führt die Erhöhung der Ionenstärke durch Salze zu einer stärkeren katalytischen Aktivität der PR. Während Szeltner & Polgar (1996) diese Wirkung auf die Stabilisierung des Dimers durch Hydratation zurückführten, konnten Porter *et al.* (2001) denselben Effekt mit polyanionischen Polymeren erzielen und leiteten daraus eine direkte Interaktion der Effektoren mit dem Enzym ab. Da die HIV-PR in wässriger Lösung frei dissoziieren und reassoziieren kann (Cheng *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1991), führt dies zur Einstellung eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts. Dabei ist die Dissoziation der Untereinheiten im Fall der HIV-1 PR mit einer Halbwertszeit von 30 min bei optimalen Bedingungen äußerst langsam (Darke *et al.*, 1994). Schließlich wird die Assoziation der Monomere zum aktiven Dimer auch durch die Bindung eines Substrats gefördert (Kuzmič *et al.*, 1993).

A.2.2 Katalytischer Mechanismus

In den vergangenen Jahren trugen verschiedene experimentelle Untersuchungen als auch *ab initio* Berechnungen zur Aufklärung des katalytischen Mechanismus der Substratspaltung durch die HIV-1 PR bei (Hyland *et al.*, 1991; Hyland *et al.*, 1991; Ido *et al.*, 1991; Rodriguez *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1996; Okimoto *et al.*, 1999; Okimoto *et al.*, 2000). Eine schematische Darstellung des Mechanismus ist in Abbildung A.6 gezeigt. Im freien Enzym teilen sich zunächst die beiden Asp-Reste im aktiven Zentrum ein Proton und ein Wassermolekül. Nach asymmetrischer Bindung des Substrats in das aktive Zentrum (Dreyer *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1989b) kommt es aufgrund der negativen Ladung zu einem nukleophilen Angriff des aktivierten Wassers auf die Carbonylgruppe des Substrats. Hierdurch entsteht ein tetrahydrales Intermediat, das in etwa den Übergangszustand der proteolytischen Reaktion wiedergibt. Dabei erfolgt die Protonen-Translokation zwischen den Asp-Resten gleichzeitig mit der Hydratation der Carbonylgruppe, womit die Symmetrie der beiden Asp-Reste aufgehoben wird. Diese Hydratation führt zu einer flexibleren Struktur des Substrats, das nun noch besser eingepasst werden kann. Daraufhin erfolgt ein simultaner Protonen-Austausch, wobei eine Hydroxylgruppe ein Proton auf das geladene Asp überträgt und das Stickstoff-Ionenpaar gleichzeitig ein Proton vom anderen Asp erhält. Dies führt schließlich zur Spaltung des Substrats, und der Ausgangszustand im aktiven Zentrum wird wieder hergestellt. Dabei haben jüngere Studien, die auf Berechnungen von freien Bindungsenergien basieren, gezeigt, dass vermutlich beide der Asp-Reste im aktiven Zentrum des freien Enzyms deprotoniert vorliegen (Smith *et al.*, 1996; Wang & Kollman, 2000). Dies steht im Widerspruch zu früheren Daten, die von der Protonierung eines Asp-Restes ausgegangen sind (Hyland *et al.*, 1991; Ido *et al.*, 1991). Da molekulardynamische Berechnungen ergaben, dass sowohl der koordinierte Protonen-Austausch als auch die Freisetzung der Produkte aus dem aktiven Zentrum schnelle Vorgänge sind (Rodriguez *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 1996), stellt wohl das erfolgreiche Aufeinandertreffen von Enzym und Substrat, das zur Hydratation der Carbonylgruppe führt, den geschwindigkeits-limitierenden Schritt der Reaktion dar.

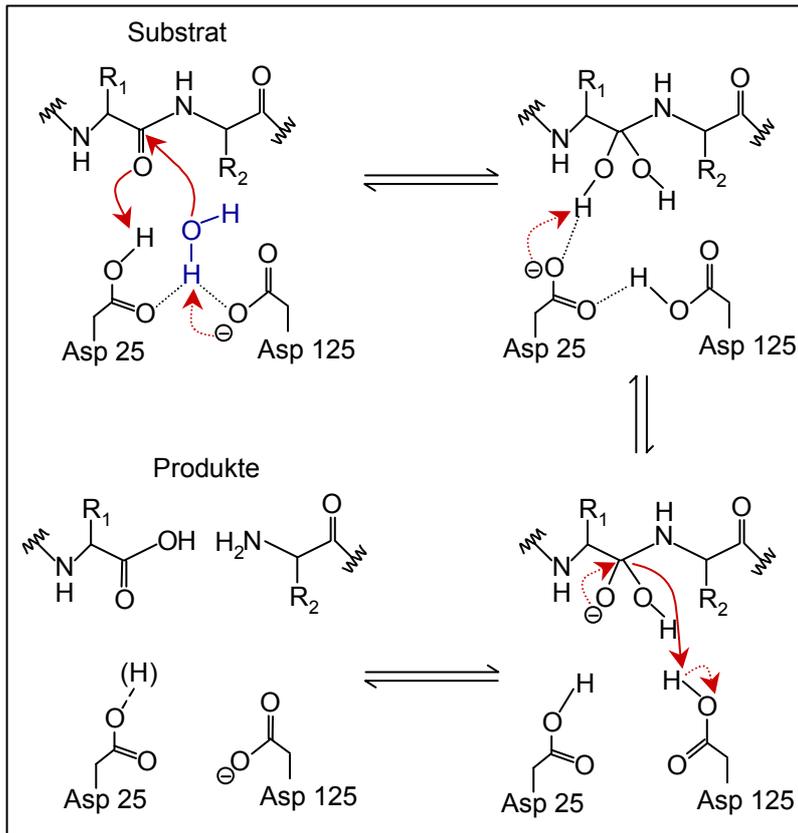


Abbildung A.6: Katalytischer Mechanismus der Substrathydrolyse durch die HIV-1 PR. Dargestellt ist der Angriff des aktivierten Wassers auf die Carbonylgruppe des Substrats (oben links), der tetrahedrale Übergangszustand (oben rechts) mit den simultanen Protonen-Translokationen (unten rechts), die zur Spaltung des Substrats führen. Nach Freisetzung der Produkte liegt entweder einer der beiden Asp-Reste protoniert oder beide unprotoniert vor (unten links).

A.2.3 Substratspezifität

Der Vergleich von natürlich vorkommenden Spaltsequenzen in HIV-1 und HIV-2 ließ vermuten, dass die PR keine spezielle Konsensussequenz für die Substraterkennung besitzt (Töszer *et al.*, 1991). Da die HI-virale PR im Gegensatz zu Cystein- oder Serinproteasen das Substrat nicht kovalent bindet, ist sie auf multiple Interaktionen mit Substratresten auf beiden Seiten der Spaltstelle angewiesen. So konnten röntgenkristallographische Untersuchungen von Komplexen gereinigter PR mit kleinen, peptidomimetischen Inhibitoren zeigen, dass die HIV-1 PR mit 8 Resten des Substrats im aktiven Zentrum in Kontakt tritt (zur Übersicht: Fitzgerald & Springer, 1991; Ringe, 1994; Wlodawer & Erickson, 1993; Wlodawer & Vondrasek, 1998). Dabei scheinen 7 Reste für die Erkennung der Spaltstelle nötig zu sein (Darke *et al.*, 1988; Kottler *et al.*, 1988; Blundell *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 1989). Obwohl es Hinweise gibt, dass 5-6 Reste (bis zur P2'-Position) für eine Spaltung ausreichen (Toth *et al.*, 1990; Töszer *et al.*, 1992; Hazebrouck *et al.*, 2001), tragen die äußeren Reste P4 und P3' wesentlich zur Effizienz der Substrathydrolyse bei (Töszer *et al.*, 1991; Töszer *et al.*, 1992; Griffiths *et al.*, 1992). Nach der Nomenklatur von Schechter & Berger (1967) werden die vier Substratreste aminoterminal der Spaltstelle mit P4 bis P1, die vier Aminosäuren carboxyterminal der Spaltstelle mit P1' bis P4' bezeichnet (Abbildung A.7). Die Seitenketten dieser Aminosäuren interagieren mit Regionen, sogenannten „subsites“ der PR, die analog mit S4 bis S4' benannt werden. Alle untersuchten peptidomimetischen Inhibitoren lagen in einer ausgestreckten β -Konformation im aktiven Zentrum der HIV-1 PR vor

(Blundell *et al.*, 1987; Suguna *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1989; zur Übersicht: Ringe *et al.*, 1994). In diesem Zustand zeigen die Seitenketten aufeinanderfolgender Aminosäurereste in entgegengesetzte Richtungen, so dass die Substratreste P4, P2, P1' und P3' hauptsächlich mit der einen Untereinheit der PR wechselwirken, während P3, P1, P2' und P4' bevorzugt die andere Hälfte kontaktieren.

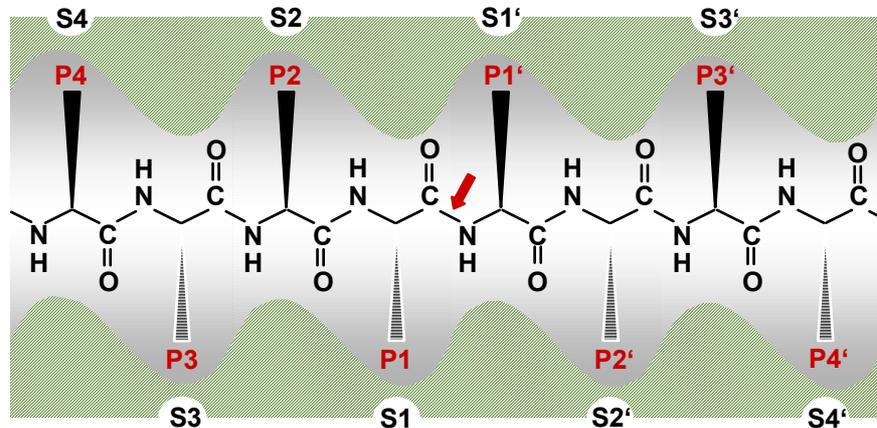


Abbildung A.7: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der HIV-1 Protease mit gebundenem Substrat. (Modifiziert nach Wlodawer & Erickson, 1993.) Die Substratbindungstasche ist grau unterlegt und die Seitenketten des Substrats, die mit den entsprechenden Resten der PR wechselwirken, sind rot markiert. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Bei den beobachteten Interaktionen handelt es sich vorwiegend um Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Peptidrückgrat des Substrats und verschiedenen Gruppen der PR. Weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hauptkettengruppen des Substrats und der „flap“-Region werden offensichtlich durch ein hochkonserviertes Wassermolekül vermittelt (Baca & Kent, 1993). Die Wechselwirkungen mit der Hauptkette des Substrats bewirken eine für das Erreichen des tetraedrischen Übergangszustandes geeignete Ausrichtung des Peptidrückgrats in der Substratbindungstasche. Die Auswahl der zu hydrolysierenden Spaltstelle erfolgt hingegen durch Interaktionen mit den Seitenketten des Substrats.

Einerseits scheint die HIV-1 PR hochspezifisch nur eine limitierte Anzahl von Sequenzen in den Gag- und Gag-Pol-Polyproteinen zu spalten. Andererseits ist sie in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Peptide zu hydrolysieren, wobei kein einziger Aminosäurerest auf beiden Seiten der Spaltstelle klar definiert ist. Dennoch wurden nach Analyse der generell sehr hydrophoben Primärsequenzen aller viralen und nicht-viralen Substrate der PR zwei Hauptklassen von Erkennungssequenzen vorgeschlagen. Die erste Klasse umfasst Sequenzen vom Typ -Tyr(Phe)*Pro- und die zweite Klasse Sequenzen mit hydrophoben Resten um die Spaltstelle (Pettit *et al.*, 1991; Tözser *et al.*, 1992; Griffiths *et al.*, 1992), wobei die höchste Präferenz offensichtlich für die Substratreste P1, P2 und P2' besteht. Dabei ist die Aminosäure an der P1-Position eher groß und hydrophob, besitzt aber nie eine verzweigte Seitenkette am β -Kohlenstoffatom. Die Bindung von ausladenden Resten an der S1-„subsite“ der PR wird vermutlich durch eine „loop“-Struktur ermöglicht, die die Reste 78 bis 85 der PR-Untereinheiten umfasst (Stebbins *et al.*, 1997). Abhängig von der

Sequenzklasse ergeben sich verschiedene Präferenzen für die Reste P2 und P2'. So werden bei Spaltstellen mit Pro an der P1'-Position Asn in der P2-Position und eine β -verzweigte Aminosäure (Ile oder Val) in der Position P2' bevorzugt. Dahingegen fördert ein β -verzweigtes Val bei Anwesenheit von Glu oder Gln in P2 die Hydrolyse der hydrophoben Sequenzklasse (Griffiths *et al.*, 1992). Des Weiteren bevorzugen alle PR-Spaltstellen der natürlichen Substrate eine kleine Aminosäure an der P4-Position, während Lysinreste zwischen P2 und P2' gänzlich fehlen (zur Übersicht: Dunn *et al.*, 1994; Katz & Skalka, 1994; Tomasselli & Heinrikson, 1994).

Allerdings haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass die bisherige Aufteilung der Substrate in zwei Klassen angesichts der komplexen Substraterkennung nicht angemessen scheint und die Präferenz für bestimmte Reste an den Positionen P2-P2' vom gesamten Sequenzkontext abhängig ist (Boross *et al.*, 1999). Darüber hinaus wird die tatsächliche Spaltung von Substraten nicht nur durch deren Primärsequenz, sondern in wesentlichem Maße durch die Lage der Erkennungssequenz innerhalb der komplexen Proteinstruktur bestimmt. So treffen Vorhersagen über die Spaltbarkeit einer Sequenz nur zu, wenn die Spaltstelle innerhalb der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins in einer für die PR zugänglichen, gestreckten Konformation präsentiert wird. Im Gegenzug kann eine günstige Konformation die Spaltung einer sonst neutralen oder unvorteilhaften Sequenzfolge bewirken (Vogt *et al.*, 1996; Hazebrouck *et al.*, 2001).

A.3 Die HIV-1 Protease als Target für therapeutische Ansätze

Neben der Reversen Transkriptase wurde die Protease erstmals als potentiell Target für die AIDS-Therapie erkannt, als gezeigt werden konnte, dass eine Mutation des „frameshift“-Bereichs die für die Entstehung reifer HI-Virionen essentielle Prozessierung des Gag-Polyproteinvorläufers verhindert (Kramer *et al.*, 1986). Überdies liefert die PR auch in chronisch infizierten Zellen ein gutes Angriffsziel, während RT-Inhibitoren nur in akut infizierten Zellen wirksam sind (Lambert *et al.*, 1992). So wurden in den vergangenen Jahren basierend auf Strukturanalysen durch NMR und Kokristallisation sowie durch Computermodelle vor allem Substanzen entwickelt, die mit dem natürlichen Substrat um die Bindung ins aktive Zentrum konkurrieren, wobei sie den tetraedrischen Übergangszustand der Peptidhydrolyse imitieren, ohne jedoch selbst gespalten zu werden. Saquinavir war der erste PR-Inhibitor, der von der FDA zugelassen wurde und wird seit 1995 zu Therapie Zwecken eingesetzt. Derzeit befinden sich sechs verschiedene PR-Inhibitoren (Tabelle A.1) auf dem Markt und weitere Wirkstoffe werden in klinischen Studien getestet.

Mit Hilfe dieser PR-Inhibitoren konnte die HI-virale RNA-Plasmakonzentration rapide gesenkt werden, wobei ein gleichzeitiger Anstieg der CD4-positiven T-Helferzellen zu verzeichnen war. Nach anfänglichen Therapieerfolgen trat allerdings schon bald die Problematik der Resistenzbildung auf (Condra *et al.*, 1995; Jacobsen *et al.*, 1995; Markowitz *et al.*, 1995; Ridky *et al.*, 1995; Borman *et al.*, 1996), da das Enzym trotz seiner geringen Größe eine hohe Flexibilität bezüglich tolerierbarer Mutationen aufweist. Unter selektivem Druck können an 20 der 99 Aminosäurepositionen Mutationen auftreten, die die enzymatische Aktivität der PR nicht beeinflussen. Bei

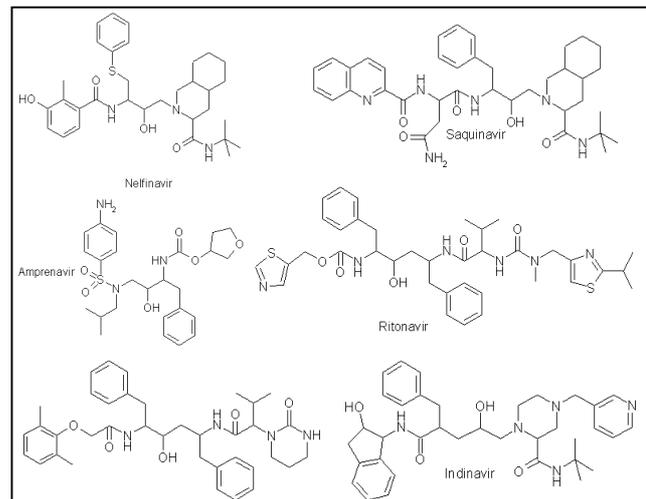
der Charakterisierung von PR-Resistenzmutanten (el-Farrash *et al.*, 1994) konnten auch einige Mutationen im aktiven Zentrum der PR lokalisiert werden, die wohl die Bindungsaffinität der gegenwärtig verwendeten, gegen das aktive Zentrum gerichteten Inhibitoren herabsetzen. Diese primären Resistenzvarianten sind zunächst in ihren replikativen Eigenschaften gegenüber dem Ausgangsvirus beeinträchtigt (Kuroda *et al.*, 1995). Dieser Selektionsnachteil wird sodann durch Auftreten von sekundären, kompensatorischen Mutationen ausgeglichen (zur Übersicht: Hirsch *et al.*, 1991; Schock *et al.*, 1996), so dass im Endeffekt eine PR-Spezies mit uneingeschränkter Aktivität entsteht, die jedoch keine Inhibitorsensitivität mehr besitzt. Für die Ausbildung der vollen Resistenz ist somit eine gewisse Mindestanzahl an Mutationen nötig. Viele dieser sekundären Modifikationen ausserhalb der PR-Domäne betreffen die PR-Spaltstellen der natürlichen Substrate (siehe auch A.4.2). Dabei wurde vornehmlich ein mit Inhibitorresistenzen assoziierter Polymorphismus der Spaltstellen zwischen p7-p1, p7-p6*, p1-p6 oder p2-p7 beobachtet (Erickson *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997; De Pasquale *et al.*, 1998; Côté *et al.*, 2001). Auf diese Weise kann eine eingeschränkte PR-Aktivität durch Heraufsetzen der Hydrolyserate an geschwindigkeitslimitierenden Spaltstellen kompensiert werden. Die Resistenzbildung ist eine Folge der natürlichen Mutationsrate des HI-Virus, die dadurch bedingt ist, dass die Replikation des Genoms weitgehend ohne Kontrolle des Nukleotideinbaus erfolgt. Dazu leistet zunächst die virale RT einen Beitrag, die keine Lesegenauigkeit besitzt (Battula & Loeb, 1976) und bei der Herstellung des DNA-Doppelstranges aus dem viralen RNA-Genom mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} falsche Basen in die neusynthetisierten Stränge einbaut. Überdies kommt es zu Deletionen oder Insertionen beim Strangtransfer während der reversen Transkription und zu Rekombinationsereignissen zwischen Genomfragmenten (Dougherty & Temin, 1988; Kulpa *et al.*, 1997; Zhuang *et al.*, 2002). Am stärksten trägt allerdings die zelluläre RNA-Polymerase II, die für die Entstehung der neuen RNA-Genome verantwortlich ist, zur hohen Mutationsrate bei. Sie verfügt über keine Korrekturmöglichkeit und arbeitet beim Nukleotideinbau mit einer relativ hohen Fehlerrate, was bei einer täglichen Freisetzung von 10^8 bis 10^9 Viren (Wei *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1995) zur Bildung neuer Quasispezies führt. Durch die Konfrontation der Viren mit Inhibitoren werden Resistenzmutanten schließlich positiv selektiert. Neben den oben beschriebenen synthetischen Peptidomimetika wurden in der Zwischenzeit auch andere nichtpeptidische Substanzen wie Haloperidol- und Porphyrin-Derivate entdeckt, die eine irreversible Inhibition der HIV-1 PR in *in vitro* Experimenten bewirkten (De Camp *et al.*, 1992; Salto *et al.*, 1994), sich jedoch teilweise als toxisch für die Zellen erwiesen (De Voss *et al.*, 1994). Während weiterhin nach neuen inhibitorischen Substanzen für die PR geforscht wird, wird derzeit hauptsächlich mit Kombinationstherapien gearbeitet, um durch gleichzeitiges Vorgehen gegen unterschiedliche Virus-Komponenten (z.B. RT und PR) das virale System so unter Druck zu setzen, dass ihm keine Zeit zur Resistenzentwicklung bleibt (Richman *et al.*, 1995).

Außerdem wird in jüngerer Zeit verstärkt an einem neuen Ansatz der PR-Inhibition gearbeitet, der auf der Überexpression von transdominant-negativen PR-Mutanten beruht. Bei dieser intrazellulären Immunisierungsstrategie sollen mutierte PR-Moleküle mit den viralen PR-Monomeren interagieren und so katalytisch inaktive Heterodimere ausbilden. Da diese transdominant-negativen PR-Varianten bereits bei der

Dimerisierung eingreifen, kommt es demnach gar nicht erst zur Ausbildung eines aktiven Enzyms, während synthetische PR-Inhibitoren, die gegen das aktive Zentrum gerichtet sind, nur an bereits vorhandenen PR-Dimeren angreifen können. So führt beispielsweise die Koexpression einer katalytisch inaktiven PR-Variante ($D_{25} \rightarrow N$) zusammen mit proviraler Wildtyp-DNA zur Freisetzung unreifer Viruspartikel mit überwiegend unprozessierten Gag- und Gag/Pol-Polyproteinen (Babe *et al.*, 1995). Entsprechende Erfolge konnten in der Vergangenheit auch durch die Überexpression eines PR-RT Fusionsproteins erzielt werden (Cherry *et al.*, 1998). Und sogar eine Inhibitor-resistente PR-Form konnte durch die Koexpression einer transdominant-negativen PR-Mutante blockiert werden (Junker *et al.*, 1996). Als sinnvoll haben sich in diesem Zusammenhang auch Aminosäureaustausche erwiesen, die eine bevorzugte Ausbildung von Heterodimeren bewirken (McPhee *et al.*, 1996). Basierend auf diesen Ansätzen sollen künftig Makromoleküle entworfen werden, die eine vielversprechende Alternative zu den oben beschriebenen kommerziell erhältlichen Substratanaloga darstellen.

Tabelle A.1: Zugelassene PR-Inhibitoren

Bezeichnungen:	Firma und FDA-Zulassung:
Saquinavir, Ro 31-8959, Invirase®	Roche, 1995 (Roberts <i>et al.</i> , 1990)
Ritonavir, ABT-538, Norvir®	Abbott, 1996 (Kempf <i>et al.</i> , 1995)
Indinavir, MK-639, Crixivan®	Merck, 1996 (Vacca <i>et al.</i> , 1994)
Nelfinavir, AG-1343, Viracept®	Agouron, 1997 (Kaldor <i>et al.</i> , 1997)
Amprenavir, ATB-538, Agenerase®	Glaxo Wellcome, 1999, (Kim <i>et al.</i> , 1995)
Lopinavir, ABT-378, Aluviran, Kaletra®	Abbott, 2000 (Sham <i>et al.</i> , 1998)



A.4 Die Regulation der HIV-1 Protease

A.4.1 Regulation der Protease-Aktivierung

Trotz detaillierter Kenntnisse der biochemischen Eigenschaften der HIV-1 PR und der Prozessierungsschritte, die letztendlich zur Maturation der Viren führen, ist der Mechanismus der Aktivierung dieses retroviralen Enzyms bisher nicht eindeutig geklärt. Um eine korrekte virale Reifung zu gewährleisten, muss die PR-Aktivierung sowohl räumlich als auch zeitlich stringent reguliert werden. Bei den Typ-C Retroviren und Lentiviren, die an der Zytoplasmamembran assemblieren, wird eine vorzeitige PR-Aktivierung vermutlich durch die limitierte Konzentration der Gag-Pol-Vorläufer im Zytoplasma verhindert. Da jedes Gag-Pol-Polyprotein nur eine PR-Domäne enthält, ist die Dimerisierung des gesamten Vorläufers Bedingung für die Ausbildung des aktiven Zentrums. Dabei scheinen verschiedene Regionen außerhalb der PR-Domäne

diesbezüglich einen Beitrag zu leisten (Bennett *et al.*, 1993; von Poblitzki *et al.*, 1993; Franke *et al.*, 1994; Katz & Skalka, 1994; Zybarth & Carter, 1995; Quillent *et al.*, 1996; Wan *et al.*, 1996; Gamble *et al.*, 1997; Bowzard *et al.*, 1998; Gatlin *et al.*, 1998). So führt in der späten Phase der Replikation die Ansammlung von Gag-Pol-Polyproteinen unter der Zytoplasmamembran durch häufigere Dimerisierungsereignisse zu einer Zunahme der PR-Aktivität. Dies scheint sinnvoll, da die PR nicht nur die natürlichen, viralen Substrate, sondern auch verschiedene zelluläre Proteine, wie Aktin, Calmodulin, Desmin, Vimentin, Troponin, Pro-Interleukin 1 β oder den NF- κ B-Vorläufer spaltet (Shoeman *et al.*, 1990; Tomasselli *et al.*, 1991; Rivière *et al.*, 1991; Tomasselli *et al.*, 1991) und somit bei frühzeitiger Aktivierung zytotoxische Effekte auslöst. Dabei wurde kürzlich berichtet, dass dieser PR-vermittelten Zellschädigung nekrotische (Blanco *et al.*, 2002) und nicht, wie bisher angenommen, apoptotische Prozesse (Strack *et al.*, 1996) zugrunde liegen. Desweiteren würde eine vorzeitige Aktivierung der PR zur Abtrennung wichtiger Transportsignale von den Polyproteinen führen und durch intrazelluläre Spaltung der Strukturkomponenten die Assemblierung und Freisetzung neuer Virionen verhindern (Kräusslich *et al.*, 1991; Park & Morrow *et al.*, 1991; Kräusslich *et al.*, 1992; Mergener *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1992; Karacostas *et al.*, 1993; Luukkonen *et al.*, 1995). Da Gag-Pol-Vorläufer dennoch im Zytoplasma mancher Zellen und in einigen *in vitro*-Systemen autoproteolytisch aktiv sind, müssen zusätzliche Mechanismen eine Rolle bei der Kontrolle der intrazellulären PR-Aktivität spielen (Kräusslich *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1990; Kaplan & Swanstrom, 1991). Hierfür scheint das ungleiche Verhältnis von Gag- zu Gag-Pol kritisch zu sein (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001). So könnten die mengenmäßig überwiegenden Gag-Proteine durch Interaktion mit den Gag-Pol-Vorläufern deren vorzeitige intrazelluläre Dimerisierung durch physikalische Separation verhindern. Tatsächlich wird die intrazelluläre PR-Aktivität *in trans* von carboxyterminalen Bereichen des CA-Proteins inhibiert (Gatlin *et al.*, 1998). Ferner scheinen zytosolische Komponenten die Aktivierung der PR durch reversible Oxidation zweier hochkonservierter Cysteine der PR (Cys₆₇ und Cys₉₅) zu verzögern (Davis *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1999).

Neben sterisch und biochemisch kontrollierten Prozessen spielen verschiedene virale Faktoren bei der zeitlichen Regulation der PR-Aktivierung eine Rolle. Vermutlich kommt auch dem akzessorischen Protein Vif, das während der späten Phase der Infektion hergestellt wird (Garrett *et al.*, 1991), eine Funktion bei der Kontrolle der PR-Aktivität zu. So wurde berichtet, dass Vif mit viralen „Core“-Strukturen assoziiert ist und entweder über Bindung an genomische RNA (Khan *et al.*, 2001) oder durch Interaktion mit Gag- und Gag-Pol-Vorläufern (Bardy *et al.*, 2001) spezifisch in Viruspartikel verpackt wird. Überdies konnten Sova und Mitarbeiter (2001) zeigen, dass Vif hauptsächlich in Partikeln mit unprozessiertem Gag und weniger in reifen Viren vorhanden ist. Auch konnte in zellfreien Systemen ein direkter inhibitorischer Einfluss von Vif auf die Autoprozessierung viraler Vorläufer beobachtet werden (Kotler *et al.*, 1997), wobei primär die Spaltstellen MA-CA und CA-NC vor Hydrolyse geschützt wurden (Bardy *et al.*, 2001). Zudem sind von Vif abgeleitete Peptide in der Lage, an die PR zu binden und sowohl die PR-vermittelte Hydrolyse synthetischer Peptide als auch die Produktion infektiöser Viren in infizierten Zellen zu inhibieren (Baraz *et al.*, 1998; Potash *et al.*, 1998; Friedler *et al.*, 1999; Blumenzweig *et al.*, 2002). Schließlich wurde auch der Nachweis erbracht, dass Vif *in vitro* spezifisch an den

Aminoterminus der PR (Reste 1-9) bindet und so vermutlich mit der Dimerisierung des Enzyms interferiert (Baraz *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Vif einen Beitrag zur Regulation der PR-Aktivität innerhalb reifender Virionen leistet oder in den frühen Stadien der Infektion die restliche PR-Aktivität eindämmt.

In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise, dass auch das kleine, 68 Aminosäuren umfassende p6*-Protein eine wichtige Rolle bei der Regulation der PR-Aktivierung spielen könnte. Dieses „transframe“-Protein wird im *pol*-Leserahmen kodiert und liegt im Gag-Pol-Vorläufer ähnlich dem Propeptid eukaryontischer Asp-PR direkt N-terminal vor der PR. Seine Funktion bei der Regulation der PR-Aktivität soll in einem eigenen Kapitel diskutiert werden (siehe A.4.3).

Während manche Faktoren eine frühzeitige Aktivierung der PR verhindern, wird ihre Aktivität zu späteren Zeitpunkten des Infektionszyklus aktiv gefördert. Offensichtlich tragen auch bestimmte Sekundärstrukturen in der genomischen RNA zu einer korrekten Prozessierung der Vorläuferproteine in den Viruspartikeln bei. So konnte gezeigt werden, dass Deletionen in der DIS-Region („dimerization initiation site“) die Gag-Prozessierung beeinträchtigen (Liang *et al.*, 1999). Außerdem ist die effiziente Spaltung des NC-p1-p6-Vorläufers von der Bindung des Polyproteins an virale RNA-Moleküle abhängig (Sheng *et al.*, 1997). Schließlich wurde auch beobachtet, dass die Anwesenheit der RT *in trans* eine Zunahme der PR-Aktivität bewirken kann (Goobar-Larsson *et al.*, 1996).

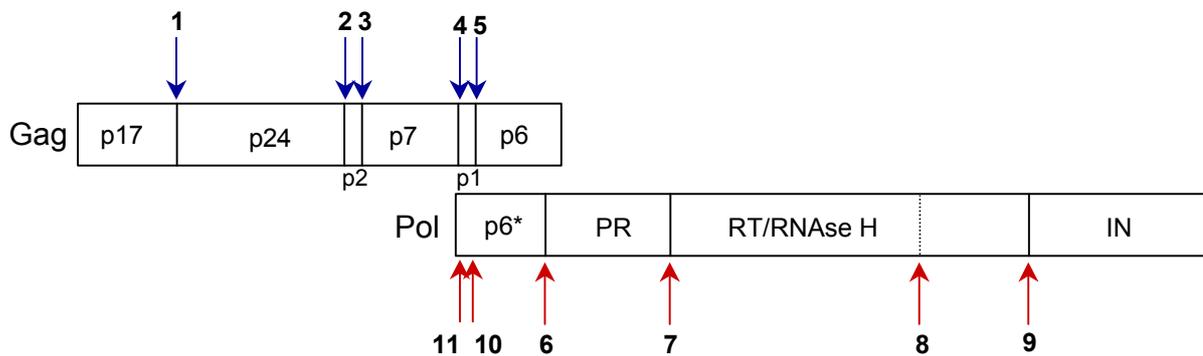
Zusammengenommen legen diese Daten eindrucksvoll dar, welche komplexen Wechselspiele zellulärer und viraler Komponenten nötig sind, um eine stringente Regulation der HIV-1 PR zu gewährleisten.

A.4.2 Prozessierung von Gag und Gag-Pol

Die Entstehung reifer, infektiöser Virionen ist an die vollständige Prozessierung der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine durch die HI-virale PR gekoppelt (Kohl *et al.*, 1988). Dabei muss die PR bis zu 12 völlig verschiedene Aminosäuresequenzen spezifisch erkennen und hydrolysieren (Moore *et al.*, 1993; Fitzgerald *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1992; Pearl & Taylor, 1987; Pettit *et al.*, 1993). Abbildung A.8 zeigt die Positionen der PR-Spaltstellen in Gag und Gag-Pol.

In den vergangenen Jahren haben verschiedene Mutationsanalysen zur Aufklärung der Prozessierungsreihenfolge in Gag- und Gag-Pol beigetragen (Kaplan *et al.*, 1993; Kräusslich *et al.*, 1995; Louis *et al.*, 1994; Pettit *et al.*, 1994; Pettit *et al.*, 1998; Wiegers *et al.*, 1998; Pettit *et al.*, 2003). Dabei ließen sich aus *in vitro*-Spaltexperimenten sehr unterschiedliche Kinetiken für die Hydrolyse der individuellen Spaltstellen dieser Polyprotein-Vorläufer ableiten (Kräusslich *et al.*, 1988; Erickson-Viitanen *et al.*, 1989; Tritch *et al.*, 1991; Konvalinka *et al.*, 1994; Pettit *et al.*, 1994). Die sequentielle Prozessierung des Gag-Vorläufers verläuft über definierte Intermediate, die vermutlich eine Rolle bei der Morphogenese der Virionen spielen, aber nicht mit der Struktur reifer Viren vereinbar sind. Die initiale Spaltung in Gag wird am C-Terminus des „spacer“-Peptids p2 eingeleitet und trennt ein N-terminales MA-CA-p2-Intermediat von einem C-terminalen p7(NC)-p1-p6-Polyprotein (Abbildung A.9 A). Dabei gilt p2 als

Regulator der sequentiellen Prozessierung, da es die Hydrolyserate an der Spaltstelle CA-p2 herabsetzt (Pettit *et al.*, 1994). Außerdem ist die Prozessierung zwischen p2 und NC kritisch für die RNA-Dimerisierung (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001). In einem folgenden Schritt wird der MA-Anteil N-terminal von CA-p2 und p6 C-terminal von p7-p1 abgetrennt. Diese sekundären Prozessierungen verlaufen ungefähr 10fach langsamer als die primäre Spaltung (Pettit *et al.*, 1994). Mit der aminoterminalen Freisetzung des CA-Proteins geht eine Konformationsänderung durch Umfaltung einer β -Haarnadelstruktur einher, die für die Ausbildung des reifen Capsids notwendig ist (Gitti *et al.*, 1996; von Schwedler *et al.*, 1998; Stemmler *et al.*, 2000). Bei der Freisetzung des p2-Peptids handelt es sich um ein spätes Ereignis, und C-terminal erweiterte CA-Spezies werden in Virionen mit reduzierter PR-Aktivität beobachtet (Mergener *et al.*, 1992; Rosé *et al.*, 1995). Diese tertiäre Spaltung ereignet sich mit etwa 400fach langsamerer Geschwindigkeit als die Hydrolyse zwischen p2 und p7 und scheint für die Kondensation des Capsids essentiell notwendig zu sein (Wiegers *et al.*, 1998). Somit übernimmt dieses „spacer“-Peptid die Funktion eines morphologischen Schalters bei der Virusmaturation (Fu *et al.*, 1993), da erst die Abtrennung von p2 dem CA-Protein erlaubt, seine reife Konformation einzunehmen (Gross *et al.*, 2000). Schließlich führt eine weitere Spaltung zur Abtrennung des „spacer“-Proteins p1 von NC. Allerdings liegen bisher keine genauen Kenntnisse über die Kinetik dieser Prozessierung am C-Terminus von p7 vor.



Spaltstelle	Sequenz
1	Ser-Gln-Asn-Tyr Pro-Ile-Val-Gln
2	Ala-Arg-Val-Leu Ala-Glu-Ala-Met
3	Ala-Thr-Ile-Met Met-Gln-Arg-Gly
4	Pro-Gly-Asn-Phe Leu-Gln-Ser-Arg
5	Arg-Gln-Ala-Asn Phe-Leu-Gly-Lys
6	Ser-Phe-Asn-Phe Pro-Gln-Ile-Thr
7	Thr-Leu-Asn-Phe Pro-Ile-Ser-Pro
8	Ala-Glu-Thr-Tyr Phe-Val-Asp-Gly
9	Arg-Lys-Ile-Leu Phe-Leu-Asp-Gly
10	Asp-Leu-Ala-Phe Leu-Gln-Gly-Lys
11	Arg-Gln-Ala-Asn Phe-Phe-Arg-Glu

Abbildung A.8: PR-Spaltstellen in den Gag- und Gag-Pol-Polypeptiden. Spaltstellen in Gag sind durch blaue Pfeile und Spaltstellen in Gag-Pol durch rote Pfeile markiert. Die Spaltstellen 1-10 wurden *in vivo* eindeutig identifiziert, während die Spaltung an Position 11 *in vivo* umstritten ist. Referenzen: 1–3, 5 (Henderson *et al.*, 1992), 4 (Henderson *et al.*, 1988, 1992; Wondrak *et al.*, 1993), 6 (Lillehoj *et al.*, 1988), 7 bis 9 (Lightfoote *et al.*, 1986), 10 (Phyllip *et al.*, 1992; Candotti *et al.*, 1994; Zybarth *et al.*, 1994; Almog *et al.*, 1996; Louis *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001;) und 11 (Paulus *et al.*, 1999; Paulus, C., Dissertation 1999; Louis *et al.*, 1999 und C.2).

Da alle Spaltungen in Gag-Pol von der viralen PR selbst durchgeführt werden, muss diese noch innerhalb des Polyproteins dimerisieren und aktiviert werden (Erickson *et al.*, 1989; Lapatto *et al.*, 1989; Navia *et al.*, 1989; Oroszlan *et al.*, 1990). Folglich werden die initialen Prozessierungen von der Vorläufer-assoziierten, unreifen PR ausgeführt. Eine intrinsische Aktivität von PR-Vorläufern wurde mehrfach bestätigt (Kotler *et al.*, 1992; Co *et al.*, 1994; Louis *et al.*, 1994; Zybarth *et al.*, 1994; Wondrak *et al.*, 1996; Louis *et al.*, 1999; Louis *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Pettit *et al.*, 2003). In Anwesenheit von PR-Inhibitoren konnte die Entstehung von distinkten Intermediaten bei Autolyse des viralen Gag-Pol-Vorläufers beobachtet werden, was auf eine ebenfalls geordnete Prozessierung von Gag-Pol hinweist (Abbildung A.9 B) (Lindhofer *et al.*, 1995; Speck *et al.*, 2000). Dabei zeigen neuere Studien, dass bestimmte Interaktionen innerhalb des PR „dimer interface“ nötig sind, um diesen geordneten Ablauf zu dirigieren (Pettit *et al.*, 2003). So findet auch in Gag-Pol die initiale Spaltung zwischen p2 und NC statt, wodurch die Intermediate MA-CA-p2 und das etwa 121-kDa Polyprotein NC-p6*-PR-RT-IN entstehen. Ein weiteres etwa 114-kDa Intermediat, das einer sehr raschen Proteolyse zu unterliegen scheint, umfasst die Proteine p6*(L₉-F₆₈)-PR-RT-IN. Dabei wurde offensichtlich das „transframe“-Protein p6* intern hydrolysiert (Abbildung A.8, Spaltstelle 10). Schließlich wird durch weitere Spaltung am C-Terminus der PR das Intermediat RT-IN freigesetzt. Die Trennung dieser beiden Enzyme scheint das letzte Ereignis bei der Prozessierung des Gag-Pol-Polyproteins zu sein. Bestätigt wurden diese Ergebnisse kürzlich von Pettit und Mitarbeitern (2003) durch Untersuchungen an einem *in vitro*-translatierten Gag-Pol-Vorläufer. Ungeklärt bleiben allerdings Zeitpunkt und Ausmaß der Spaltung am N-Terminus der PR. Da Lindhofer und Mitarbeiter ein p6*(L₉-F₆₈)-PR Intermediat nur in Anwesenheit von Inhibitor detektieren konnten, handelt es sich vermutlich um ein sehr kurzlebiges Zwischenprodukt. Allerdings wurde auch über dessen Anwesenheit in Virionen berichtet (Almog *et al.*, 1996). So schlägt ein derzeitiges Modell vor, dass zunächst am N-Terminus der PR intramolekular prozessiert wird, was mit einem Anstieg der enzymatischen Aktivität einhergeht (Louis *et al.*, 1994; Co *et al.*, 1994). Diese Spaltung kann abhängig vom pH-Wert entweder in einem Schritt oder in zwei Schritten über ein p6*-PR-Intermediat erfolgen (Louis *et al.*, 1999). Daraufhin werden alle weiteren sequentiellen Spaltungen am Carboxyterminus der PR sowie in Gag intermolekular durchgeführt (Tang & Hartsuck, 1995; Wondrak *et al.*, 1996). Konträre Daten lieferten auch bisherige Untersuchungen der C-terminalen Hydrolyse von p7. Im Gegensatz zum p7-Protein aus dem Gag-Vorläufer, dessen vollständige Freisetzung notwendig für die Entstehung infektiöser Partikel ist (Henderson *et al.*, 1988, 1992; Wondrak *et al.*, 1993; Pettit *et al.*, 2002), scheint das entsprechende Spaltprodukt aus dem Gag-Pol-Vorläufer in seiner endgültigen Form carboxyterminal um 8 Aminosäuren erweitert vorzuliegen (Chen *et al.*, 2001).

Während also die Vorläufer-assoziierte PR ausreichende Aktivität besitzt, um die ersten Spaltereignisse in Gag-Pol einzuleiten, wird für die weitere Maturation der Gag-Proteine die maximale Aktivität des reifen Enzyms benötigt. Daher muss die PR sowohl N- als auch C-terminal aus dem Vorläuferprotein freigesetzt werden (Bennet *et al.*, 1991; Hayakawa *et al.*, 1992; Zybarth *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1996; Tessmer & Kräusslich, 1998). Schließlich könnte die Autoproteolyse zwischen den Resten Leu₅ und Trp₆ innerhalb der PR-Domäne den finalen Schritt in der PR-assoziierten

Spaltkaskade darstellen (Rosé *et al.*, 1993). Dies hätte eine Auflösung der Tertiärstruktur der PR zur Folge, wodurch weitere Spaltungen der Strukturproteine vermieden würden.

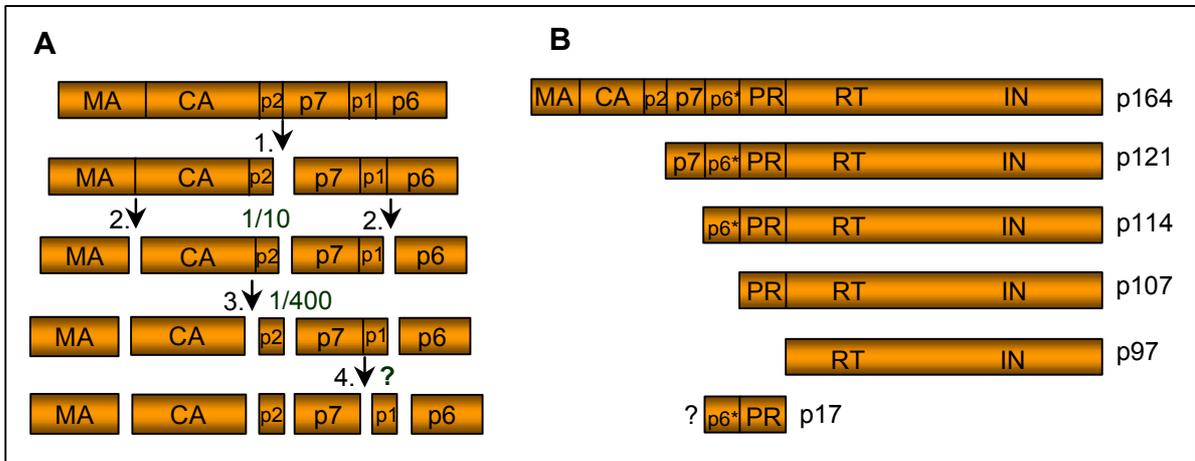


Abbildung A.9: Sequentielle Prozessierung der Gag- und Gag-Pol-Vorläuferproteine. Die Reihenfolge der Spaltungen in Gag (A) (modifiziert nach Pettit *et al.*, 1994, 1998) und Gag-Pol (B) (modifiziert nach Lindhofer *et al.*, 1995) ist von oben nach unten dargestellt. Die Größe von Intermediaten aus der Gag-Pol-Prozessierung ist rechts angegeben. Nähere Erläuterungen siehe Text.

A.4.3 Einfluss des „transframe“-Proteins p6* auf die Protease-Aktivität

A.4.3.1 Strukturelle Charakterisierung von p6*

Obwohl das „transframe“-Protein p6* bei verschiedenen HIV-1 Isolaten hochkonserviert ist, ist seine *in vivo* Funktion noch nicht ausreichend aufgeklärt. Um Aussagen über eine mögliche Wechselwirkung mit der HIV-1 PR treffen zu können, wurden am rekombinant hergestellten und aufgereinigten p6*-Protein Strukturuntersuchungen durchgeführt. Die Daten aus Fluoreszenz- und Cirkulardichroismus-Spektren wiesen allerdings auf ein wenig strukturiertes Polypeptid hin und zweidimensionale H¹-NMR-Techniken bestätigten das Fehlen einer stabilen Sekundär- oder Tertiärstruktur (Beissinger *et al.*, 1996). Bis auf die Tendenz zur Bildung einer α-Helix am N-Terminus zwischen den Aminosäuren 5 und 12 scheint das p6*-Protein weitgehend flexibel zu sein, was aber nicht ausschließt, dass es bei der Interaktion mit der PR zu einer Konformationsänderung kommt. Außerdem konnte von uns und von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass p6* eine interne PR-Schnittstelle zwischen Phe₈ und Leu₉ besitzt, die somit genau innerhalb der hochkonservierten CR1-Region in p6* liegt (Abbildung A.10). (Phylip *et al.*, 1992; Candotti *et al.*, 1994; Zybarth *et al.*, 1994; Almog *et al.*, 1996; Louis *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001). Des Weiteren ist die Abspaltung des „transframe“-Proteins vom Aminoterminus der PR unbedingt notwendig für die Entstehung infektiöser Viruspartikel (Tessmer & Kräusslich, 1998). Während die interne und C-terminale Spaltung von p6* *in vivo* nachgewiesen werden konnte, bleibt weiterhin ungeklärt, ob p6* am Aminoterminus prozessiert wird.

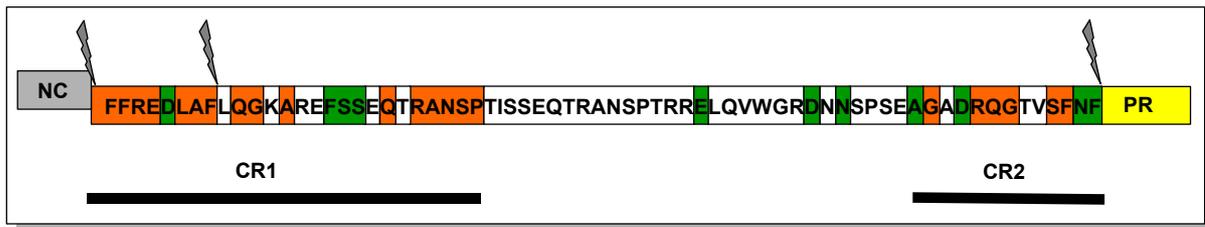


Abbildung A.10: Das „transframe“-Protein p6* mit den konservierten Bereichen CR1 und CR2. Aminosäuren, die in 9 verschiedenen HIV-1 Isolaten identisch sind, sind orange – und Reste, die funktionell konserviert sind, grün dargestellt. PR-Spaltstellen sind mit einem grauen Pfeil markiert.

A.4.3.2 p6* als möglicher Inhibitor der viralen Protease

Die ersten Hinweise auf eine Beteiligung des p6*-Proteins an der Regulation der HIV-1 PR lieferten *in vitro* Translationsexperimente, in denen die Deletion des p6*-Bereiches zu einer rascheren Autoprozessierung eines Gag-PR-Vorläufers führte (Partin *et al.*, 1991). Trotz intensiver Studien der letzten Jahre bleibt der molekulare Mechanismus der p6*-PR Interaktion allerdings weiterhin unverstanden und es wurden bereits verschiedene Wirkungsweisen von p6* diskutiert. Da das p6*-Protein durch seine Position im Vorläufer dem N-terminalen Prosegment zellulärer Asp-PR gleicht, wurde spekuliert, dass es sich ähnlich dem Pepsinogen-Propeptid um die PR wickelt und so die frühzeitige Prozessierung der Gag- und Gag-Pol-Vorläufer durch Maskierung des aktiven Zentrums und der Substratbindungstasche verhindert (Partin *et al.*, 1991). Auf der anderen Seite wurde ein Zusammenhang zwischen Autoprozessierung und Interaktion von p6*-PR Polypeptiden beobachtet, was darauf hindeutet, dass p6* mit der Dimerisierung der PR-Domänen in den Gag-Pol-Vorläufern interveniert und so die PR-Aktivierung beeinflusst (Zybarth & Carter, 1995). Unterstützt wird diese Hypothese auch durch Untersuchungen, in denen das synthetische Hexapeptid TVSFNF, das den C-terminalen Resten 63 bis 68 von p6* entspricht, *in vitro* als Dimerisierungsinhibitor der HIV-1 PR wirkt (Schramm *et al.*, 1993). Ein wiederum anderer Mechanismus der p6*-vermittelten PR-Regulation ergab sich aus einer Mutationsstudie, in der die N-terminale Freisetzung der PR aus dem Gag/Pol-Vorläufer blockiert wurde (Zybarth *et al.*, 1994). Bei der Autoprozessierung dieser PR-Mutante wurden alternative Spaltstellen in der p6*-Domäne genutzt, wodurch PR-Derivate mit verlängerten N-Termini entstanden. Diese p6*-PR Intermediate könnten durch Besetzthalten der Substratbindungstasche des PR-Vorläufers den Prozess der vollständigen Prozessierung verzögern. In diesem Modell verhindert also p6* nicht die Dimerisierung der PR-Domänen, sondern deren autokatalytische Aktivierung durch kompetitive Blockade des aktiven Zentrums. In Übereinstimmung damit wurde auch für das N-terminale Octapeptid Phe-Leu-Arg-Glu-Asp-Leu-Ala-Phe des p6*-Proteins, welches zwei PR „halfsites“ beinhaltet, eine pH-abhängige, kompetitive Inhibition der HIV-1 PR beschrieben (Louis *et al.*, 1998).

Da sich aus den strukturellen Daten kein Hinweis auf die Funktion des p6*-Proteins ableiten ließ, und die bisherigen Ergebnisse bezüglich der Wirkungsweise der PR-Inhibition widersprüchlich waren, wurden von unserer Arbeitsgruppe in der Vergangenheit weitere funktionelle Untersuchungen durchgeführt, um den molekularen Wirkmechanismus der p6*-PR Interaktion näher zu analysieren. Dazu

wurden in einem kontinuierlichen spektrophotometrischen PR-Aktivitätstest die Initialgeschwindigkeiten der Substrat-Spaltung in An- und Abwesenheit von p6* bestimmt. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die HIV-1 PR durch hochreines p6*-Protein in konzentrationsabhängiger Weise spezifisch inhibiert wird. Weiterführende kinetische Analysen sowie Quervernetzungsexperimente ergaben einen kompetitiven Mechanismus für die p6*-vermittelte PR-Regulation. Schließlich konnten wir aus Untersuchungen mit unterschiedlichen p6*-Mutanten ableiten, dass die vier C-terminalen Aminosäurereste des p6*-Proteins für die Hemmung der HIV-1 PR notwendig, jedoch alleine nicht ausreichend sind. Darüber hinaus muss diese Sequenz (S₆₅-F₆₆-N₆₇-F₆₈) frei zugänglich am äußersten C-Terminus von p6* liegen, um eine inhibitorische Wirkung zu entfalten (Paulus *et al.*, 1999).

Ausgehend von den bisherigen *in vitro* Befunden wurde ein Modell der p6*-vermittelten PR-Inhibition aufgestellt. Danach würde der durch die initiale, N-terminale Autoprocessing der HIV-1 PR freigesetzte C-Terminus von p6* das aktive Zentrum der PR so lange blockieren, bis die Gag- und Gag/Pol-Polyproteine in den knospenden Viruspartikeln eingeschlossen sind. Eine zusätzliche Funktion des p6*-Proteins könnte darin bestehen, nach abgeschlossener Virusmaturation die verbleibende Aktivität der HIV-1 PR einzudämmen, um eine unspezifische Degradation von viralen Proteinen zu verhindern. Diese Art der Produktinhibition wurde ebenfalls für das gag-kodierte p2-Protein vorgeschlagen, das die HIV-1 PR *in vitro* mit einer dem p6*-Protein vergleichbaren Effizienz hemmt (Misumi *et al.*, 1997). Um dieses Modell bestätigen zu können, müsste allerdings die Reihenfolge und Funktion der Spaltungen in und um p6* durch die PR im viralen Kontext eindeutig aufgeklärt werden.

A.5 Zielsetzung der Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen zur Struktur und Funktion des "transframe" Proteins p6* konnten erstmals zeigen, dass rekombinantes, hochreines p6*-Protein die HIV-1 Protease *in vitro* konzentrationsabhängig und kompetitiv inhibiert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass p6* während der viralen Replikation eine Rolle bei der zeitlichen und räumlichen Regulation der HIV-1 Protease spielt. Allerdings bleibt weiterhin ungeklärt, welche Funktion dem "transframe"-Protein als Substrat der Protease bei der korrekten Prozessierung des Gag-Pol-Vorläufers zukommt. Um die Bedeutung und Reihenfolge der Spalttereignisse in und um p6* für die virale Morphogenese aufzuklären, sollen Viren mit gezielten Mutationen in den drei natürlichen Proteasespaltstellen von p6* hergestellt werden. Der Einfluss dieser Mutationen auf die Expression und Prozessierung von viralen Proteinvorläufern sowie auf die Entstehung infektiöser Nachkommenviren sollte dann in verschiedenen Zellkulturen analysiert werden. Gleichzeitig sollten Einzelaspekte dieser Mutationen in geeigneten *in vitro* Testsystemen herausgearbeitet werden. Eine gesamtheitliche Interpretation der Ergebnisse aus *in vitro*- und Zellkultur-Studien soll schließlich zur Aufklärung der p6*-Prozessierung im viralen Kontext beitragen.

Des Weiteren soll die aus den früheren *in vitro* Studien abgeleitete Funktion des p6*-Propeptids in Zellkultur unter Ausschluss anderer potentiell modulierender, viraler

Proteine hinterfragt werden. Dazu sollten zunächst verschiedene Plasmidkonstrukte hergestellt werden, die auf der Basis synthetischer Gene eine effiziente Expression der zu untersuchenden Protease- und p6*-Proteine in Säugerzellen erlauben. Anschließend sollen Nachweissysteme etabliert werden, die eine quantitative Analyse der Protease-Aktivität sowie Zytotoxizität in Zellkultur zulassen. Mit Hilfe dieser Testsysteme soll dann in transienten Kotransfektionsexperimenten der modulierende Einfluss von p6* auf die Protease in virusinfizierten Zellen untersucht werden.

B Material und Methoden

B.1 Klonierungen und gentechnische Arbeiten

Soweit nicht anders vermerkt, wurden für Klonierungen in *Escherichia coli* (*E. coli*) Standardmethoden angewendet (Sambrook *et al.*, 1989). Restriktionsenzyme und T4 DNA Ligase wurden von Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach, Taunus) bezogen. Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten aus Plasmid-DNA sowie zum Reamplifizieren von PCR-Produkten wurden die *Ampli-Taq* DNA Polymerase und Nukleotide von Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet. Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden über *Nucleobond-Tip AX500* bzw. *AX100* Säulen (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde der *QIAquick Purification Kit* (Qiagen, Düren) verwendet. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt. Sequenzierungen zur Verifizierung von DNA-Abschnitten erfolgten nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) unter Verwendung eines automatischen Sequenziergerätes der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt). Alle übrigen Chemikalien waren kommerzielle Reagenzien von höchster Reinheit.

B.1.1 Bakterien und Nährmedien

Zu Klonierungszwecken und zur Amplifikation von „high copy“ Plasmiden wurde hauptsächlich der *E. coli* K-12 Stamm **DH5 α** (Life Technologies, Karlsruhe) verwendet. Gentechnische Arbeiten mit proviraler Plasmid-DNA wurden in den *E. coli*-Stämmen **SURE** (Stratagene, Heidelberg) und **GM2163** (New England Biolabs, Schwalbach, Taunus) durchgeführt. Für die Produktion der rekombinanten GST-Fusionsproteine wurden die *E. coli*-Stämme **M15[pREP4]** (Qiagen, Hilden) und **BL21** (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) eingesetzt. Transformationskompetente Bakterien wurden nach der RbCl-Methode hergestellt. Die verwendeten Bakterienstämme weisen den wie folgt angegebenen Genotyp auf.

- DH5 α :** F⁻ *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR1* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1* (Dieser Stamm ist zur Blau-Weiß Selektion positiver Transformanten geeignet; Hanahan, 1983.)
- SURE:** *uvrC*⁻ *umuC*⁻ *sbsC*⁻ *recI*⁻ (Durch seine verminderte Rekombinationsaktivität ist dieser Stamm besonders für die Amplifikation großer Plasmide geeignet.)
- GM2163:** F⁻ *dam-13::Tn9* *dcm-6* *hsdR2* *leuB6* *his-4* *thi-1* *ara-14* *lacY1* *galK2* *galT22* *xyf-5* *mtl-1* *rpsL136* *tonA31* *tsc-78* *supE44* McrA⁻ McrB⁻ (Dieser Stamm wird für Klonierungsarbeiten mit *dam*- und *dcm*-sensitiven Restriktionsenzymen verwendet.)

M15[pREP4]: *lac ara gal mtl* (Der vom Plasmid pREP4 kodierte *lac*-Repressor ermöglicht eine stringente Kontrolle der Proteinexpression; Villarejo & Zabin, 1974.)

BL21: F⁻ *ompT hsdS* (r_B , m_B) *gal* (Dieser Stamm liefert besonders hohe Proteinausbeuten.)

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in *Luria Bertani* (LB-) oder *Terrific Broth* (TB-) Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C. Zur Selektion der positiven Transformanten wurde entsprechend dem verwendeten Plasmid Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) zugesetzt.

B.1.2 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotidsequenzen sind im Anhang (F.1) angegeben. Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech AG (Ebersberg), Metabion (Martinsried) oder Invitrogen (Leek, Niederlande) bezogen. Oligonukleotide zur Herstellung synthetischer Gene sowie zur *in vitro*-Mutagenese waren HPLC („high pressure liquid chromatography“) gereinigt. Oligonukleotide für Sequenzierungen waren lediglich entsalzt. Zur Bestimmung der Konzentration von Oligonukleotiden wurde das Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich $\lambda = 230-300$ nm aufgenommen. Das Absorptionsmaximum bei 260 nm wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung für die Berechnung der Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz herangezogen. Für die Berechnung molarer Absorptionskoeffizienten wurde das Programm *GeneRunner* (Version 3.0) verwendet.

Alle Oligonukleotide für die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten synthetischen Gene wurden im GCG (*Genetics Computer Group*, Madison, Wisconsin, Version 10.0) unter Verwendung der Genbank-Sequenz des HIV-1 Isolates BH10 („accession number“: M15654) entworfen. Dabei wurden die relevanten Genabschnitte unter Beachtung des Leserahmens und natürlicher Start- und Stoppkodons für die optimale Expression in Säugerzellen in die jeweilige Aminosäure-Sequenz übersetzt. Für die anschließende Rückübersetzung wurde für jede Aminosäure das in Säugerzellen am häufigsten vorkommende Kodon eingesetzt. Die hierfür verwendete *Matrix-a* ist im Anhang (F.2, Tabelle F.1) angegeben. Daraufhin wurden die Gene so fragmentiert, daß alle Oligonukleotide in etwa die gleiche Länge aufwiesen und 20 Basen mit der Matrizen-DNA aus der vorhergehenden Reaktion überlappten, um eine sukzessive Verlängerung der Gene in aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen zu ermöglichen. Überdies wurden an den endständigen Oligonukleotiden für die nachfolgenden Klonierungen passende singuläre Schnittstellen und fünf zusätzliche beliebige Nukleotide angefügt, um die Funktionalität der Restriktionsenzyme bei den nachfolgenden Klonierungsarbeiten zu gewährleisten.

B.1.3 Plasmide

Detaillierte Gensequenzen sind im Anhang (F.2 - F.3) angegeben.

B.1.3.1 Herstellung der „frameshift“-Reporterkonstrukte

Sämtliche Luciferase-Reporterkonstrukte für eine quantitative Analyse der „frameshift“-Effizienz basieren auf dem Vektor *pGL2 Control* von Promega (Mannheim). Für das Einführen des „frameshift“-Signals aus dem Provirus HX10 wurde das „firefly“-Luciferasegen des *pGL2*-Vektors in Anlehnung an Reil und Hauser (1990) aminoterminal verlängert (Abbildung B.2). Hierfür wurden synthetische, teilweise überlappende Oligonukleotide (luc1 bis luc5, siehe F.1) in aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen mit Hilfe der *TaqPlusTM Precision Polymerase* (Stratagene, Heidelberg; siehe auch B.1.3.4) aufgefüllt. Das auf diese Weise generierte PCR-Produkt wurde an den flankierenden *HindIII* und *XbaI* Restriktionsschnittstellen verdaut und anschließend mit dem entsprechend linearisierten *pGL2 Control*-Vektor ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden kompetente Zellen des *E. coli* K-12 Stammes DH5 α transformiert. Die gewünschten Klone wurden nach alkalischer Schnelllyse durch Spaltung der gewonnenen Plasmid-DNA mit *HindIII* und *XbaI* identifiziert. Schließlich wurde die aminoternale Erweiterung der Luciferase um den „frameshift“-Bereich von HX10 durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden GL-f und GL-r (siehe F.1) bestätigt. Der so erzeugte Vektor *pGL-fswt* wurde dann mit Hilfe des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis-Kit* (Stratagene, Heidelberg) weiter modifiziert, um die Kontrollkonstrukte *pGL-fs Δ* und *pGL-fs0* sowie die von den Provirusmutanten abgeleiteten Varianten *pGL-fs1*, *pGL-fs2* und *pGL-fs3* zu erhalten. Die spezifischen Mutageneseoligonukleotide waren für *pGL-fs Δ* *fs- Δ a* und *fs- Δ b*, für *pGL-fs0* *fs-0a* und *fs-0b*, für *pGL-fs1* *fs-1a* und *fs-1b*, für *pGL-fs2* *fs-2a* und *fs-2b* und für *pGL-fs3* *fs-3a* und *fs-3b* (siehe F.1).

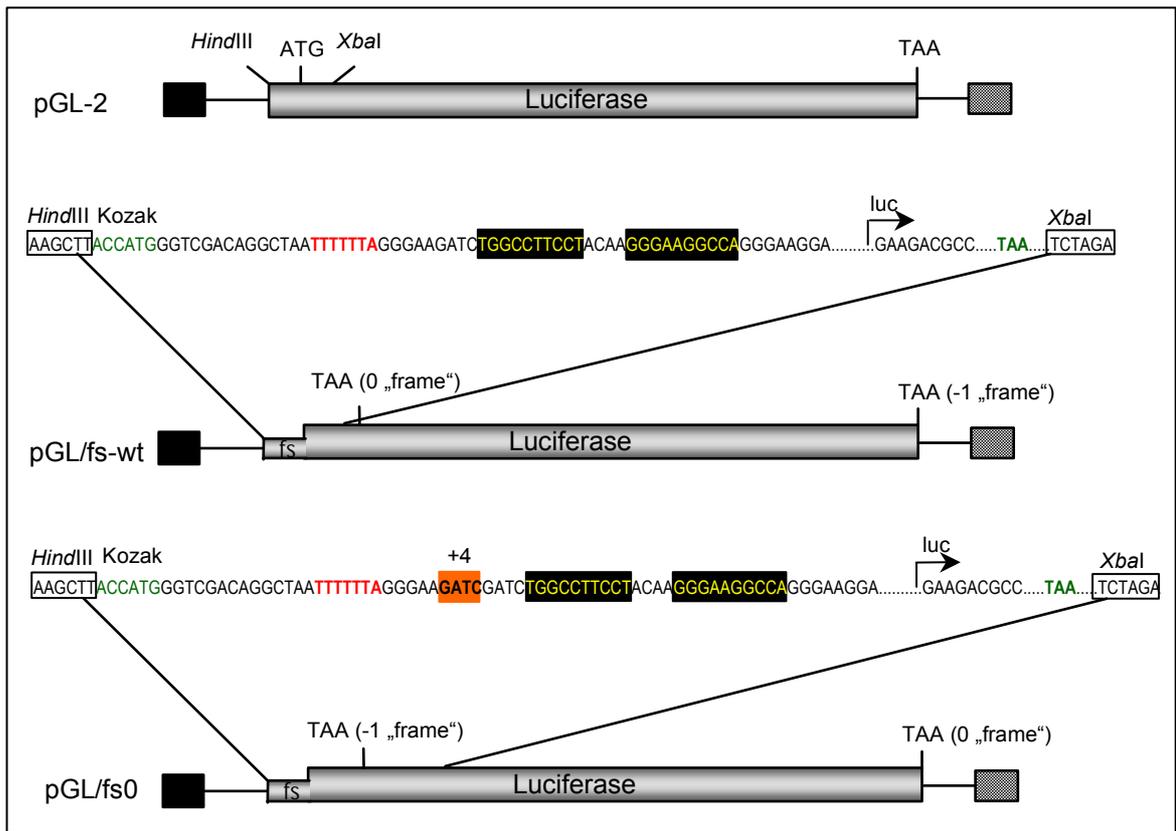


Abbildung B.2: Klonierung der „frameshift“-Reporterkonstrukte pGL-fswt und pGL-fs0. Ausgehend vom Vektor *pGL2 Control* (oben), wurde das „firefly“-Luciferasegen um den „frameshift“-Bereich von pHX10 aminoterminal verlängert (Reil & Hauser, 1990). Die Luciferase-Expression des resultierenden Vektors pGL-fswt (Mitte) ist daher abhängig von einem -1 Leserastersprung. Durch Insertion von vier zusätzlichen Nukleotiden wird der ursprüngliche Leseraster im Vektor pGL-fs0 (unten) wieder hergestellt. Luciferase wird in diesem Fall nur exprimiert, wenn kein Leserastersprung stattfindet. Dahingegen hat ein -1 Leserastersprung die Synthese eines verkürzten, nicht-funktionellen Enzyms zur Folge. Start- und Stoppcodons sind grün und die Heptanukleotidsequenz rot dargestellt. Der „stem-loop“-Bereich ist schwarz und die zusätzlich eingefügten Nukleotide orange unterlegt. Der Übergang zur Luciferasesequenz ist durch einen Pfeil markiert. Für die Klonierung genutzte Restriktionsschnittstellen sind eingerahmt. Der SV40 „early promoter“ ist durch eine schwarze Box und das SV40-Polyadenylierungssignal durch eine karierte Box dargestellt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Das Kontrollkonstrukt pGL-fsHX wurde über Fusions-PCR hergestellt (Abbildung B.3 und Ho *et al.*, 1989). Dabei diente der Vektor pGL-fswt als Matrize. Als äußere „primer“ wurden die Oligonukleotide fs-HXa und fs-HXd (siehe F.1) verwendet. Die mutierte Sequenz wurde durch die Oligonukleotide fs-HXb und fs-HXc (siehe F.1) eingeführt. Das Fusionsprodukt wurde an den flankierenden Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XbaI* gespalten und mit dem entsprechend linearisierten Vektor pGL-fswt ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurden kompetente Zellen *des E. coli* K-12 Stammes DH5 α transformiert. Die positiven Klone wurden nach alkalischer Schnelllyse durch Restriktionsverdau der gewonnenen Plasmid-DNA mit *HindIII* und *XbaI* identifiziert. Die Region zwischen den Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XbaI* wurde für alle „frameshift“-Reporterkonstrukte durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden GL-f

und GL-r (siehe F.1) verifiziert. Sämtliche „frameshift“-Reporterplasmide wurden im *E. coli* K-12 Stamm DH5 α vermehrt.

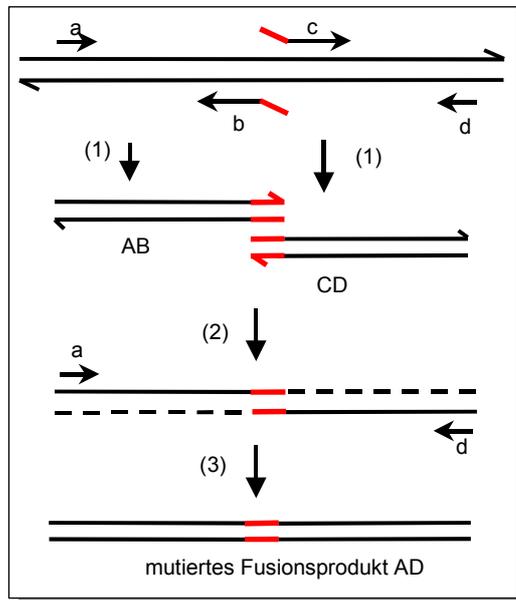


Abbildung B.3: Schematische Darstellung der ortsgerichteten Mutagenese durch Fusions-PCR. Zunächst werden in separaten PCR-Ansätzen zwei Teilfragmente (AB und CD) der zu mutierenden Sequenz generiert (1). Jeder Ansatz enthält dabei ein flankierendes Oligonukleotid, das an das eine Ende der Zielsequenz bindet (Oligonukleotid a oder d) und ein internes Oligonukleotid (b oder c), das sich neben der Mutationsstelle anlagert und über sein nicht paarendes 5'-Ende die gewünschten Mutationen einführt. Durch die Verwendung von teilweise komplementären internen Mutageneseoligonukleotiden erhalten die beiden Teilfragmente AB und CD überlappende Enden, über die sie in einer zweiten PCR fusioniert werden können. Nach Denaturierung können die Einzelstränge der

benachbarten Teilfragmente über ihre komplementären Enden paaren und so zum Teil als „primer“ für die *Taq* Polymerase fungieren (2). Das Resultat dieser „primer“-Verlängerung ist ein mutiertes Fusionsprodukt (3), welches anschließend in Anwesenheit des Oligonukleotidpaares a/d amplifiziert wird.

B.1.3.2 Herstellung der prokaryontischen GST-p6*-Expressionsplasmide

Für die Produktion von rekombinanten GST-Fusionsproteinen wurden die Vektoren pGEX-KG/p6*, pGEX-KG/p6gag und pGEX-KG/p7 freundlicherweise von Christina Paulus (Herstellung siehe Dissertation, 1999) zur Verfügung gestellt. In diesen prokaryontischen Expressionsplasmiden sind die Gene für p6*, p6gag und p7 des HIV-1 Isolates BH10 direkt an das Gen für Glutathion S-Transferase (GST) fusioniert (Abbildung B.4 und Guan & Dixon, 1991).

Für die spezifische Mutagenese des p6*-Gens wurden folgende Oligonukleotidpaare (siehe F.1) unter Verwendung des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis-Kit* (Stratagene, Heidelberg) mit pGEX-KG/p6* als Matrize nach Herstellerangaben eingesetzt: GEX-2a und GEX-2b für die Herstellung von pGEX-p6*M2, 3a und 3b für die Herstellung von pGEX-p6*M3 und GEX-6a und 6b für die Herstellung von pGEX-p6*M5 und p6*M6. Der Vektor pGEX-p6*M5 wurde in einem zweiten Mutageneseschritt, ausgehend von pGEX-p6*M6, mit dem zusätzlichen Oligonukleotidpaar GEX-5a und 5b generiert. Mit den PCR-Ansätzen wurden kompetente Zellen des *E. coli* K-12 Stammes DH5 α transformiert. Klone mit der jeweils gewünschten Mutation wurden nach alkalischer Schnelllyse durch Restriktionsverdau der gewonnenen Plasmid-DNA mit *EcoRI* und *BamHI* identifiziert. Die Nukleotidsequenzen aller rekombinanten pGEX-Plasmide wurden durch Sequenzierung im Bereich der Fremdgene mit dem Oligonukleotid GEX-f (siehe F.1) verifiziert.

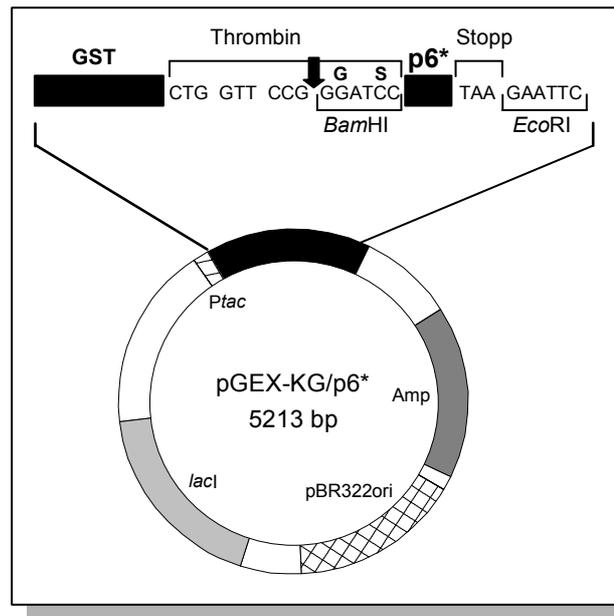


Abbildung B.4: Schematische Darstellung des prokaryontischen Expressionsplasmids pGEX-KG/p6*. Die p6*-kodierende Region des HIV-1 Isolates BH10 wurde mit einem zusätzlichen Stoppkodon über die endständigen Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI in pGEX-KG kloniert. Amp, Ampicillin-Resistenzgen; GST, Glutathion S-Transferase-Gen; *lac*I, Repressor-Gen des *lac*-Operons; pBR322ori, DNA-Replikationsursprung von pBR322; *Ptac*, regulierbares *trp/lac* Promotor/Operator-Element (die Transkription von diesem Promotor kann mit Isopropyl- β -D-Thiogalactosid induziert werden).

B.1.3.3 Herstellung der Provirusmutanten

Alle in dieser Arbeit verwendeten Provirusmutanten basieren auf dem Plasmid pHX10 (Ratner *et al.*, 1987), das ein komplettes infektiöses HIV-1 Provirus mit Sequenzabschnitten der Isolate HXB2 und BH10 enthält. Um gezielte Mutationen in die p6*-Gensequenz von HIV-1 einzuführen, wurde zunächst das Plasmid plin8/Gag Δ Pst (Wagner, 1984) als Matrize verwendet. Dieser prokaryontische Expressionsvektor enthält die gesamte Gag-Sequenz und eignet sich besser zur Mutagenese als ein Volllänge-Provirus. Sämtliche Mutageneseschritte wurden mit dem *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung folgender Oligonukleotidpaare (siehe F.1) durchgeführt: Die spezifischen Mutageneseoligonukleotide waren für csM1 1a und 1b, für csM2 2a und 2b, für csM3 3a und 3b, für csM4 4a und 4b, für csM5 5a und 5b und für csM6 6a und 6b. Mit den mutierten Plasmiden plin/p6*csM1 - csM6 wurden kompetente Zellen des *E. coli* K-12 Stammes DH5 α transformiert. Die gewünschten Klone wurden nach alkalischer Schnelllyse (Birnoim und Doly, 1979) durch Charakterisierungsverdau der gewonnenen Plasmid-DNA mit *Spe*I und *Eco*RI identifiziert. Die spezifischen Mutationen in der p6*-codierenden Region wurden durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden S1, S2 und S3 (siehe F.1) verifiziert.

Die Provirusmutanten pHX/p6*csM1 – p6*csM6 wurden nach Umtransformation der Plasmid-DNA in den *E. coli* K-12 Stamm GM2163 (*dam*⁻, *dcm*⁻) durch Ersetzen des *Spe*I-*Bcl*I-Fragments von pHX10 durch die entsprechenden Abschnitte aus plin8/p6*csM1 - csM6 generiert (Abbildung B.1). Die Nukleotidsequenzen sämtlicher

Provirusklone wurden im Bereich zwischen den Schnittstellen für *SpeI* und *BclI* mit den Oligonukleotiden S1, S2, S3 und S4 (siehe F.1) verifiziert. Die Vermehrung der proviralen Mutanten zur Gewinnung von Plasmid-DNA erfolgte in den *E. coli* K-12 Stämmen SURE oder GM2163. Der Provirusklon pHX/p6*csM7 wurde freundlicherweise von Christina Paulus (Herstellung siehe Dissertation, 1999; Konstrukt pHX10/p6*M8) zur Verfügung gestellt.

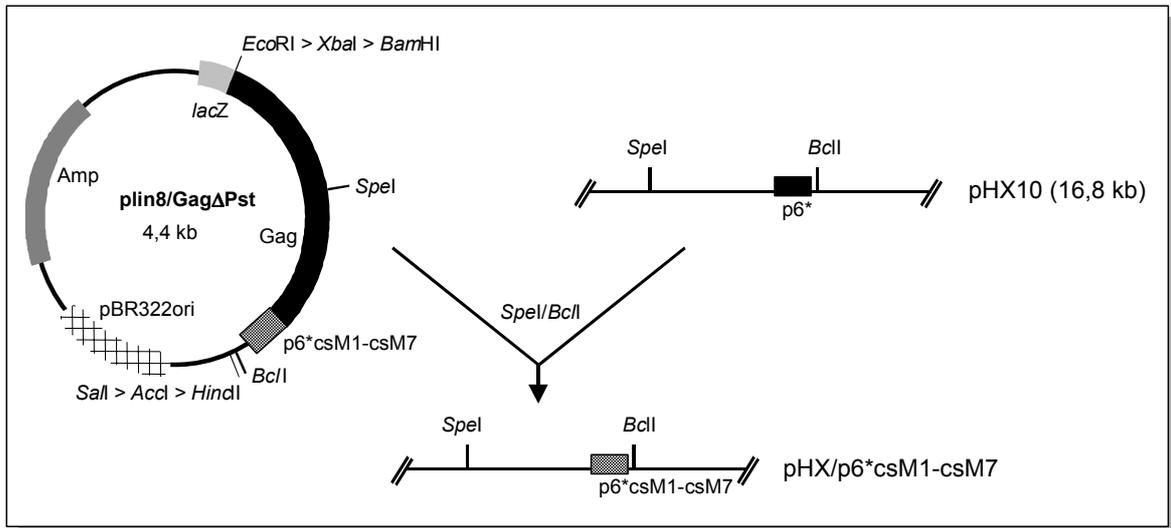


Abbildung B.1: Klonierung der Provirusmutanten pHX/p6*csM1-csM7. Amp, Ampicillin-Resistenzgen; Gag, Gen für das Gruppenspezifische Antigen von HIV-1_{BH10}; GagΔPst, Gen für Gruppenspezifisches Antigen von HIV-1_{BH10} mit Deletion der *PstI*-Schnittstelle; *lacZ*, β -Galactosidasegen des *lac*-Operons; pBR322ori, DNA-Replikationsursprung von pBR322. Weitere Erläuterungen siehe Text.

B.1.3.4 Herstellung der synthetischen HIV-1 Gene

Alle in dieser Arbeit verwendeten HIV-1 spezifischen Gen- und Aminosäuresequenzen sind von dem Klon BH10 des französischen HIV-1 Subtyp B Isolats LAI/III („accession number:“ M15654) abgeleitet. Die vollständigen Sequenzen der synthetischen Gene sind im Anhang (F.2) aufgeführt.

Die Herstellung der synthetischen Gene erfolgte in aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen durch sukzessive Verlängerung von partiell überlappenden Oligonukleotiden (siehe F.1) mit Hilfe der *TaqPlusTM Precision Polymerase* (Stratagene, Heidelberg). Dieses PCR-System besteht aus einem Gemisch zweier thermostabiler DNA-Polymerasen mit unterschiedlichen Eigenschaften, deren Vorteile bei der PCR-Reaktion kombiniert werden: Während sich die *cloned Pfu*-Polymerase aufgrund ihrer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität („proof reading“) durch eine besonders niedrige Fehlerrate bei der Amplifikation auszeichnet, bewirkt die *Taq2000TM*-Polymerase eine auch für längere Fragmente geeignete Extension durch eine fünffach höhere Polymerisationsgeschwindigkeit zugunsten höherer PCR-Produktausbeuten. Die Zusammensetzung eines 50 μ l PCR-Ansatzes und die Reaktionsbedingungen für die PCR-Zyklen sind in Tabelle B.1 angegeben.

Die spezifischen Oligonukleotide für die Herstellung der synthetischen Gene waren für synp6* Nr.1-6, für synPR Nr.11-18 und für synVpr(pre) Nr.25-30. Für die Generierung von (EGFP-)synp6* wurde Oligonukleotid Nr.5 durch Nr.7 - und für synPR Oligonukleotid Nr.13 durch Nr.19 und Nr.15 durch Nr.20 ersetzt. Des Weiteren wurden für die Erzeugung des kovalenten Dimers synPR-PR beim ersten PR-Monomer Oligonukleotid Nr.18 durch Nr.20 und beim zweiten PR-Monomer die Oligonukleotide Nr.17 und Nr.18 durch Nr.15 und Nr.16 ersetzt. Für die Herstellung von synVpr wurde statt des Oligonukleotids Nr.30 das Oligonukleotid Nr.31 in die PCR eingesetzt.

Tabelle B.1: PCR-Ansatz

Komponenten	Volumen	PCR-Bedingungen:	Temperatur	Zeit
H ₂ O _{dest}	9,5 µl	1. Denaturierung	95°C	1 min
dNTPs (je 2,5 mM)	5 µl	2. „primer-annealing“	70°C	1 min
„primer“ F (50 ng/µl)	5 µl		65°C	1 min
„primer“ R (50 ng/µl)	5 µl		60°C	1 min
Matrize (250 ng/µl); bei 1. PCR: H ₂ O _{dest})	0,5 µl		55°C	1 min
bei 70°C zugefügt		3. Polymerisation	68°C	2 min
H ₂ O _{dest}	14,5 µl	4. Denaturierung*	95°C	30 sec
Dimethylsulfoxid	5 µl	„primer-annealing“	55°C	1 min
10-fach Puffer	5 µl	Polymerisation	68°C	2 min
TaqPlus™ Precision Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	5. Elongation	68°C	3 min

* Wiederholung von Schritt 4: 7mal

Die gewonnenen synthetischen Gene wurden in einer weiteren PCR-Reaktion mit der *Pfu*-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) oder mit der *Pwo*-Polymerase (AGS GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben reamplifiziert, um PCR-Produkte mit glatten Enden für die Ligation in die *SrfI*-Schnittstelle des Plasmids *pPCR-Script™Amp SK(+)* (Stratagene, Heidelberg) zu generieren. Mit den Ligationsansätzen wurden kompetente Zellen *des E. coli* K-12 Stammes DH5α transformiert, welcher die Selektion der gewünschten rekombinanten Klone durch Blau-Weiß-Differenzierung ermöglicht. Nach alkalischer Schnelllyse und entsprechendem Restriktionsverdau der gewonnenen Plasmid-DNA wurden die Nukleotidsequenzen der rekombinanten Plasmide durch Sequenzierung im Bereich der synthetischen Fremdgene mit dem Oligonukleotid -21M13 (siehe F.1) verifiziert.

Schließlich wurden die synthetischen Gene für die Expression in Säugerzellen unter einer CMV-Promotor/Enhancer-Einheit in das Plasmid *pcDNA3.1 (+)* (Invitrogen, Leek, Niederlande) umklontiert. Dabei wurden die synthetischen Gene synPR, synPR' und synp6* über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI in den jeweils gleichermaßen geschnittenen *pcDNA3.1 (+)*-Vektor ligiert. Das synthetische Gen (EGFP-)synp6* wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Eco*RI in den Vektor *pEGFP-C1* (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA) umgesetzt. Zur Erzeugung des kovalenten PR-Dimers synPR-PR wurden die beiden Monomere mit *Bam*HI/*Nhe*I bzw. *Nhe*I/*Eco*RI aus den entsprechenden *pPCR-Script™Amp SK(+)*-Konstrukten isoliert und gleichzeitig in den *Bam*HI/*Eco*RI gespaltenen *pcDNA3.1 (+)*-Vektor ligiert. Die synthetischen Gene synVpr und synVpr(pre) wurden über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Xho*I aus dem entsprechenden *pPCR-Script™Amp SK(+)*-Vektor isoliert und in den *Bam*HI/*Xho*I verdauten Vektor *pcDNA3.1 (+)* ligiert. Zur

Herstellung der Fusionsgene synVpr-synp6*, synVpr-synPR und synVpr-EGFP wurden die Gene synp6*, synPR und EGFP der Konstrukte pPCR-Script/synp6*, pPCR-Script/synPR und *pEGFP-C1* mit den Oligonukleotiden Nr.9 und Nr.10 (synp6*), Nr.23 und Nr.24 (synPR) und Nr.32 und Nr.33 (EGFP) (siehe F.1) amplifiziert und in die *XhoI*-Schnittstelle des pcDNA3/synVpr(pre)-Vektors ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurden kompetente Zellen des *E. coli* K-12 Stammes DH5 α transformiert. Nach alkalischer Schnelllyse und entsprechendem Charakterisierungsverdau der gewonnenen Plasmid-DNA wurden die rekombinanten *pcDNA3.1 (+)*-Expressionsplasmide mit Hilfe der Oligonukleotide T7 und Sp6 (siehe F.1) und die rekombinanten pEGFP-C1-Plasmide mit Hilfe des Oligonukleotids 282 (siehe F.1) im Bereich der synthetischen Gene sequenziert.

B.1.4 Isolierung und Analyse genomischer DNA aus HIV-1 infizierten Lymphozyten

Zur Untersuchung genomisch integrierter viraler DNA wurde die genomische DNA aus HIV-1 infizierten Lymphozyten (B.3.5) mit dem *QIAamp Blood Mini Kit* (Qiagen, Düren) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurde der gesamte *gag*-Bereich des integrierten Provirus mit Hilfe der Oligonukleotide S1 und S5 (siehe F.1) unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) in einer PCR-Reaktion mit 25 Zyklen amplifiziert. Das gewonnene PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *BclI* gespalten und in den ebenso verdauten Vektor *plin8/Gag Δ Pst* (Abbildung B.1) ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurden kompetente Zellen des *E. coli* K-12 Stammes GM2163 transformiert. Nach alkalischer Schnelllyse und entsprechendem Charakterisierungsverdau der gewonnenen Plasmid-DNA wurde der gesamte *gag*-Bereich zwischen *SpeI* und *BclI* mit Hilfe der Oligonukleotide S1 und S2 (siehe F.1) sequenziert. Die Sequenzen wurden sodann im HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, Biocomputing Service Group, DKFZ, Heidelberg) eingelesen und mit der HX10 Wildtyp-Sequenz verglichen, um Mutationen zu lokalisieren.

B.2 Proteine, Peptide und Antikörper

B.2.1 Expression und Reinigung von Proteinen

Die rekombinanten p6*, p6gag- und p7-Proteine wurden im *E. coli* Stamm M15[pREP4] (GST-p6gag und -p7) bzw. im *E. coli* Stamm BL21(GST-p6*M2, -p6*M3, -p6*M5 und -p6*M6) exprimiert. Die Produktion erfolgte nach 1:10 Verdünnung einer Übernachtskultur des jeweiligen Expressionsklons in einem Gesamtkulturvolumen von 9,6 l LB_{Kana/Amp} (*E. coli* M15) bzw. LB_{Amp} (*E. coli* BL21). Die Induktion des *lac*-Operons und somit die Produktion des jeweiligen Fusionsproteins wurde bei oD = 0,9 - 1,0 durch Zugabe von 1 mM Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG) (Roth, Karlsruhe) eingeleitet. Nach 5 h wurden die Zellen abzentrifugiert (3000 \times g, 10 min), in 1/100 Kulturvolumen NETN-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Nonidet P-40 (w/v)) resuspendiert, mit 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid

(PMSF) (Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz) versetzt und bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Bakteriensuspension dreimal 2 min mit *einem Branson Sonifier 450* (G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd) bei einem „output“ von 50 sonifiziert. Alternativ wurde der Zellaufschluss in einer French-Press (*French Pressure Cell Press*, Amico SLM, Spectronic Unicam, Rochester, USA) zweimal bei 18000 psi durchgeführt. Unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (4°C , $27000\times g$, 30 min), und das jeweilige Fusionsprotein wurde über den GST-Anteil an eine mit NETN (0,5% Magermilch) äquilibrierte *Glutathion Sepharose 4B* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aus dem löslichen Anteil des Rohlysats über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4°C gebunden. Die Glutathion Sepharose mit den gebundenen Fusionsproteinen wurde abzentrifugiert ($3000\times g$, 15 min) und viermal mit einem großen Volumen NETN-Puffer sowie zweimal mit zehn Bettvolumen PBS (10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 8,0) gewaschen.

Fusionsproteine, die für Spaltanalysen mit rekombinanter HIV-1 Protease (GST-p6*wt und die Varianten GST-p6*M2 und M3) eingesetzt wurden bzw. zur Immunisierung eines Kaninchens dienen (GST-p7), wurden durch Zugabe von reduziertem Glutathion (*Bulk GST Purification Module*, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) 15 min bei RT nach Herstellerangaben von der Affinitätsmatrix eluiert und anschließend durch Zentrifugation (siehe oben) von der Sepharose getrennt. Der Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt und die Eluate vereinigt. Anschließend wurden die Proteinlösungen über Konzentratoren (*Centriplus YM-3*, Centrifugal Filter Devices, Millipore, Eschborn) eingeeengt.

Um die rekombinanten Proteine vom GST-Anteil abzuspalten, wurden die Ansätze nach Herstellerangaben 2 h bei Raumtemperatur mit Thrombin (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkubiert. Die Proteine des Überstandes wurden durch Gelfiltration über eine *Superdex 30-Säule* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 4°C mit 20 mM Natriumphosphat (pH 8, 0,3 ml/min.) weiter aufgereinigt. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und durch Ultrafiltration mit *Centriplus-3*-Konzentratoren (Millipore, Eschborn) aufkonzentriert. Die Reinigungsschritte wurden nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970; Schägger & von Jagow, 1987) durch Coomassie- bzw. Silberfärbung der Proteine (Sambrook *et al.*, 1989) oder durch Western Blot-Analyse mit p6*- oder p6- bzw. p7-spezifischen polyklonalen Kaninchenantisera (siehe B.2.5) verfolgt. Die Konzentration der Proteinlösungen wurde durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt. Die Extinktionskoeffizienten der Proteine wurden nach der Methode von Gill & von Hippel (1989) bestimmt.

B.2.2 Synthetische Peptide

Das chromogene Substrat Lys-Ala-Arg-Val-Nle-Phe(*p*-NO₂)-Glu-Ala-Nle-NH₂ (Richards *et al.*, 1990) stammte von der Firma Bachem Biochemica (Heidelberg). Alle unmodifizierten Peptide wurden von Dr. Georg Arnold (Genzentrum, Martinsried) bezogen. Die chemische Zusammensetzung und Reinheit der synthetischen Peptide

wurde durch ESI-MS (Fenn *et al.*, 1989) überprüft. Das chromogene Proteasesubstrat wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$, die unmodifizierten Peptide in Dimethylsulfoxid gelöst. Die Konzentration von Peptidlösungen wurde von der Firma ARS (Universität Bern) durch quantitative Analyse der Aminosäurezusammensetzung bestimmt.

B.2.3 In vitro-Spaltung durch die HIV-1 Protease

Rekombinante HIV-1 Protease für Prozessierungsstudien war affinitätsgereinigt und wurde von Bachem Biochemica (Bubendorf, Schweiz) bezogen.

B.2.3.1 Spaltung von GST-p6*-Fusionsproteinen durch die HIV-1 Protease

Die Spaltung der gereinigten Fusionsproteine GST-p6*wt, -p6*M2 und -p6*M3 durch rekombinante Protease erfolgte in einem Gesamtvolumen von 200 μl mit je 10 μg Fusionsprotein und 570 nM aktive PR-Dimere für 1 bis 48 h bei 25°C in 100 mM Natriumacetat, pH 5,0, 4 mM EDTA und 5 mM Dithiothreitol. Die Spaltprodukte wurden nach Zugabe von Natrium-Deoxycholat (Endkonzentration = 0,5 mg/ml) und Fällung mit Trichloracetat (TCA, Endkonzentration = 10%) durch SDS-PAGE über ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (45% Methanol, 10% Essigsäure, 0,25% *Coomassie Brilliant Blue R-250*) nachgewiesen.

Für die Sequenzierung des C-terminalen Spaltproduktes wurden die Spaltansätze nach Fällung mit TCA (s. oben) über ein 17%iges SDS-Polyacrylamidgel (Schägger & von Jagow, 1987) aufgetrennt und auf PVDF-Membran (*WestranS*, Porengröße 0,2 μm , Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Die Spaltprodukte wurden durch Anfärbung mit *Sypro[®] Ruby protein blot stain* (MoBiTec, Göttingen) nach Herstellerangaben und anschließender UV-Detektion bei 300 nm sichtbar gemacht und markiert. Der automatische Edman-Abbau zur Bestimmung der sieben aminoterminalen Aminosäurereste wurde mit dem *Procise Protein Sequencing System* der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt.

B.2.3.2 Spaltung von Peptiden durch die HIV-1 Protease

Peptide wurden in einer Konzentration von 140 μM bei 25°C in 100 mM Natriumacetat, pH 5,0, 4 mM EDTA, 5 mM Dithiothreitol und 0,3% Dimethylsulfoxid (v/v) gespalten. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 450 nM Proteasedimer (Gesamtprotein) gestartet und mit Trifluoracetat (Endkonzentration: 0,1% (v/v)) abgestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem linearen Acetonitrilgradienten (0-50% (v/v) in 0,1% Trifluoracetat (v/v)) innerhalb von 20 min bei einer Flussrate von 0,2 ml/min über eine *$\mu\text{RPC C2/C18 SC 2.1/10-Säule}$* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetrennt und bei 215 nm detektiert. Die Spaltprodukte wurden gesammelt und durch ESI-MS (Fenn *et al.*, 1989) und Gasphasensequenzierung identifiziert. Der Substratumsatz wurde mit äußeren Standards aus den integrierten „peak“-Flächen berechnet.

B.2.3.3 Spaltung von Gag-Vorläufern aus Viruspartikeln durch die HIV-1 Protease

Aufkonzentrierte Viruspartikel (siehe B.4.1) in PBS wurden 1:50 mit Protease-Testpuffer (100 mM Natriumacetat, pH 5,0, 1 M NaCl, 4 mM EDTA, 5 mM Dithiothreitol, 0,1% Triton X-100 (w/v)) verdünnt und durch Vortexen aufgeschlossen. Anschließend wurden die Ansätze für 2 h bei 37°C mit rekombinanter HIV-1 Protease (250 nM) inkubiert und das Gesamtcapsidantigen wurde im ELISA quantifiziert (B.4.1).

B.2.4 Kontinuierlicher chromogener Protease-Aktivitätstest

Die Aktivität rekombinanter HIV-1 Protease wurde in einem kontinuierlichen spektrophotometrischen Test durch Messung der Absorptionsabnahme bei 295 nm, die mit der Spaltung des chromogenen Substrates Lys-Ala-Arg-Val-Nle-Phe(*p*-NO₂)-Glu-Ala-Nle-NH₂ (B.2.2) einhergeht, bestimmt. Die Messungen wurden in einem UVIKON 930-Spektrophotometer mit Rührvorrichtung und temperierbarem Küvettenhalter (Kontron Instruments, Neufahrn) in Quarzküvetten mit einer Schichttiefe von 9,5 mm in einem Gesamtvolumen von 1,8 ml durchgeführt. Die Tests erfolgten bei 25°C und pH 5,0 in 100 mM Natriumacetat, 4 mM EDTA und 5 mM Dithiothreitol. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Enzym zu einer Endkonzentration von 40 nM gestartet. Die Reaktionsverläufe wurden über 4 min aufgezeichnet, wobei 600 Datenpunkte gesammelt wurden. Die Anfangsrate wurde mit Hilfe der Software des Spektrophotometers aus der negativen Steigung der Absorptionsänderung während der linearen Phase der Reaktion ermittelt. Um den inhibitorischen Einfluss von p6gag bzw. p6*-Varianten auf die PR-Aktivität zu ermitteln, wurden dem Ansatz die zu untersuchenden Proteine in steigenden Konzentrationen (0 - 60 µM) zugegeben.

B.2.5 Antikörper

B.2.5.1 Herstellung des Kaninchenantiseraums α -GST-p7

Für die Herstellung des polyklonalen Antiserums α -GST-p7 wurde ein Kaninchen (Inst. für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, LMU München) dreimal im Abstand von vier Wochen mit 200 µg gereinigtem GST-p7 Protein intramuskulär immunisiert. Zur Verstärkung der Immunantwort wurde das Antigen bei der ersten Immunisierung in komplettem Freund'schen Adjuvans (Sigma, Deisenhofen) und bei der Nachimmunisierung in inkomplettem Freund'schen Adjuvans (Sigma, Deisenhofen) emulgiert. Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurde das Kaninchen durch Herzpunktion entblutet und aus dem Vollblut wurde Serum gewonnen (Harlow & Lane, 1988), das aliquotiert bei -20°C gelagert wurde. Das α -GST-p7 Serum wurde sowohl zum Nachweis von rekombinantem p7-Protein als auch zum Nachweis viraler p7-Intermediate im Western Blot-Verfahren (Abbildung B.5) verwendet.

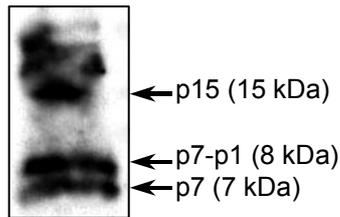


Abbildung B.5: Western Blot-Analyse von viralen p7-Proteinen mit α -GST-p7 Serum. Viruspartikel aus dem Überstand von $7,5 \times 10^7$ mit Virusstock BH10 infizierten MT-4 Lymphozyten ($moi = 0,1$) wurden durch ein 20%iges Saccharosekissen aufkonzentriert, in PBS resuspendiert und über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Matures p7-Protein sowie die

Prozessierungsintermediate p15 (p7-p1-p6) und p7-p1 wurden sodann im Western Blot mit einer 1:100 Verdünnung des α -GST-p7 Serums nachgewiesen und über Chemilumineszenz detektiert. Die entsprechenden Banden konnten nur in Überständen infizierter Zellen nachgewiesen werden und sind somit p7-spezifisch. Relevante p7-Banden sind durch Pfeile markiert.

B.2.5.2 Antikörper für Western Blot-Analysen

Die transiente Proteinexpression wurde im Western Blot (B.3.4) mit Hilfe geeigneter Antikörperverdünnungen (siehe Tabelle B.2) in TTBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl, 0,05% Tween-20) bzw. TTBS + 3% Magermilch nachgewiesen.

Tabelle B.2: Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Quelle/Herkunft:	Verdünnung:	Beschreibung:
13/5	Wolf <i>et al.</i> , 1990	1:500	Maus, monoklonal (p24/55 _{III_B} , aa 147-154)
16/4/2	Wolf <i>et al.</i> , 1990	1:2000	Maus, monoklonal (p24/55 _{III_B} , aa 307-336)
3-H-7	Niedrig <i>et al.</i> , 1989	1:500	Maus, monoklonal (p17 _{III_B} , aa113-122)
α -GST-p7	s. B.2.3.1	1:100	Kaninchen, polyklonal (rek. GST-p7)
α -GST-p6	C. Paulus (Diss., 1999)	1:100	Kaninchen, polyklonal (rek. GST-p6)
α -p6*	C. Paulus (Diss., 1999)	1:200	Kaninchen, polyklonal (rek. p6*)
α -Vpr	U. Schubert	1:1000	Kaninchen, polyklonal
4F8	P. Chandra	1:500	Maus, polyklonal (rek. RT)
ARP 419*	S. Ranjibar	1:400	Kaninchen, polyklonal (HIV-1 _{BRU} IN, aa 718-733)
ARP 413*	D. Bailey/M. Page	1:400	Schaf, polyklonal (rek. HIV-1 gp120 PR)
Sekundäre Antikörper	Quelle/Herkunft:	Verdünnung/Anwendung:	
α -mouse-AP	Bio-Rad, München	1:2000 chromogene AP-Färbung	
α -mouse-HRP	Dako, Hamburg	1:2000 HRP-Färbung, 1:10000 ECL	
α -rabbit-AP	Dako, Hamburg	1:2000 chromogene AP-Färbung	
α -rabbit-HRP	Pierce, Perbio, Bonn	1:2000 HRP-Färbung, 1:10000 ECL	
α -sheep-HRP	Dako, Hamburg	1:2000 HRP-Färbung, 1:10000 ECL	

* Die Antiseren ARP419 sowie ARP413 wurden vom AIDS Research and Reference Reagent Programm, Division of AIDS, NIAID, NIH bezogen.

Die Antikörper-Antigen-Komplexe wurden entweder über Alkalische Phosphatase (AP)-konjugierte sekundäre Antikörper mit AP-Substrat (Roche, Mannheim) in AP-Färbepuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) oder über Meerrettich-Peroxidase („horse radish peroxidase“ = HRP)-konjugierte sekundäre Antikörper durch Chemilumineszenz unter Verwendung des *ECL-Femto* Substrates (Pierce, Rockford, USA) nach Herstellerangaben nachgewiesen. Die HRP-Enzym/Substrat-vermittelte Lichtreaktion wurde durch Autoradiographie mit Hilfe von Blaulicht-sensitiven Filmen (*Kodak Biomax-MR*, Aldrich, Steinheim) detektiert.

B.3 Zellkulturtechniken und Infektionen

Sämtliche Zellkulturmedien und Zusätze waren von PAN Biotech GmbH (Aidenbach), Invitrogen (GIBCO™, Karlsruhe) oder SIGMA (Deisenhofen). Alle verwendeten Chemikalien waren speziell für Zellkulturen getestet. Kulturgefäße für Zellen wurden von BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

B.3.1 Verwendete Zelllinien

Alle Säugerzelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die adhärent wachsende, p53-negative humane Lungenkarzinomzelllinie **H1299** (Mitsudomi *et al.*, 1992) wurde in Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (*DMEM*) mit L-Glutamin, D-Glucose (4,5 mg/ml), Natriumpyruvat, 10% inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) gezogen. Ebenso wurden die adhärent wachsenden Ad5/SV40-transformierten humanen Nierenepithelzellen **293T** sowie die murinen embryonalen Fibroblastenzellen **Balb/c 3T3** kultiviert, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe T. Dobner (RIMMH) zur Verfügung gestellt wurden. H1299 Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1 : 10 und 293T sowie Balb/c 3T3 Zellen im Verhältnis 1:5 subkultiviert (Ausubel *et al.*, 1987).

Der humane, CD4-positive T-Zellklon **CEM-4** (Foley *et al.*, 1965) war von P. R. Clapham, AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. Die humane T-Zelllinie **MT-4** trägt das menschliche T-Zell-Leukämievirus Typ I (HTLV) und wurde durch Kokultivierung von Nabelschnur-Leukocyten und leukämischen Zellen aus Patienten mit adulter T-Zell Leukämie gewonnen (Koyanagi *et al.*, 1984). Dieser humane, CD4-positive T-Zellklon war Bestand der Arbeitsgruppe (RIMMH). Beide HIV-1 permissiven Suspensionszelllinien wurden in *RPMI* 1640 mit L-Glutamin, 10% inaktiviertem FKS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei Zelldichten von 2×10^5 bis 1×10^6 pro ml kultiviert. Während sich MT-4 Zellen besonders gut infizieren lassen und zu hohen Titern replizieren, waren CEM-4 Zellen in der Regel unempfindlicher in Bezug auf Transfektionsmethoden.

Die adhärent wachsende, CD4-positive, humane Cervixkarzinomzelllinie **HeLa-CD4-LTR-β-Gal** (Kimpton & Emerman, 1992) exprimiert unter der Kontrolle des HIV-1 LTR-Promotors β-Galactosidase. Diese HIV-1 Indikatorzellen waren von M. Emerman, AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. Sie wurden in *DMEM* mit L-Glutamin, D-Glucose (4,5 mg/ml), Natriumpyruvat, 10% inaktiviertem FKS, G418 (0,2 mg/ml), Hygromycin B (0,1 mg/ml), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) gezogen. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:15 subkultiviert (Ausubel *et al.*, 1987).

B.3.2 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen

$1,5 \times 10^6$ bzw. $2,5 \times 10^5$ H1299 oder 293T Zellen wurden in Petrischalen (Fläche: 58,95 cm²) bzw. 6-Napf-Schalen (Fläche: 9,6 cm²) ausgesät und 24 h später durch

Calciumphosphat-Präzipitation (Graham & van der Eb, 1973) mit max. 45 µg (Petrischalen) bzw. mit max. 15 µg (6-Napf-Schalen) Plasmid-DNA transfiziert. Zellen und Kulturüberstände wurden 48 bzw. 72 h *post transfectionem* geerntet.

5×10^6 logarithmisch wachsende CEM-4 bzw. MT-4 Zellen wurden mit Hilfe von *FugeneTM 6 Transfection reagent* (Boehringer, Mannheim) mit 1 µg Provirusplasmid nach Herstellerangaben transfiziert. Über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen wurden alle 48 h Proben entnommen und die Kulturen mit einem Volumen Medium verdünnt. Produktive Infektionen wurden durch Quantifizierung des Capsidantigens im Kulturmedium (B.4.1) identifiziert.

B.3.3 Infektion der Indikatorzelllinie HeLa-CD4-LTR-β-Gal (Magi-Assay)

Zur Bestimmung des Virustiters auf der Indikatorzelllinie HeLa-CD4-LTR-β-Gal wurden die Überstände transfizierter H1299 Zellen zunächst 10 min bei $300 \times g$ vorzentrifugiert und die Gesamtmengen an Partikel-assoziiertem Capsidantigen bestimmt (B.4.1). 8×10^4 HeLa-CD4-LTR-β-Gal Zellen wurden in 48-Napf-Platten (Fläche: 0,75 cm²) ausgesät und 48 h später in Duplikaten mit unterschiedlichen Verdünnungen der Kulturüberstände infiziert. 48 h *post infectionem* wurden die Zellen fixiert, mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-gal) gefärbt und die blauen Zellkerne in jeder Vertiefung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt (Kimpton & Emerman, 1992).

B.3.4 Herstellung und Titration von HIV-1 Virusstocks

Zur Herstellung von HIV-1 Virusstocks wurden 5×10^6 sich logarithmisch teilende MT-4 Zellen abzentrifugiert ($300 \times g$, 8 min) und mit 500 µl eines hochtitrigen Virusstocks (HIV-1 Isolat IIIB, „multiplicity of infection“ (moi) = 0,05) resuspendiert. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und bei 37°C inkubiert. Alle 48 h wurden die Kulturen 1:1 mit Medium verdünnt. Die Kontrolle der Virusproduktion erfolgte durch Quantifizierung des Capsidantigens im Kulturmedium (B.4.1) und durch Bestimmung der Lebendzellzahl. Nachdem ca. 30% der Zellen abgestorben waren, wurde der virushaltige Kulturüberstand geerntet und in einer zweiten Infektionsrunde auf frische MT-4 Zellen gegeben. Dabei wurden die höchsten Titer infektiöser HI-Viren nach einer Woche *post infectionem* erzielt, wenn die Zellen einen deutlichen zytopathischen Effekt zeigten. Die virushaltigen Überstände wurden geerntet und von den Zellen durch Zentrifugation getrennt ($300 \times g$, 10 min). Anschließend wurden die Überstände 1:1 mit inaktiviertem FKS versetzt und bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung des HIV-Titers wurden je 5×10^4 MT-4 Zellen in einem Volumen von 100 µl Medium in 48-Napf-Schalen ausgesät und mit 100 µl einer seriellen Virusstock-Verdünnung infiziert. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag mit 200 µl Medium aufgefüllt. Dann wurden jeden zweiten Tag 60% des Kulturüberstandes gegen frisches Medium ersetzt. 7 Tage *post infectionem* wurde die Virusproduktion durch Quantifizierung des Capsidantigens im Kulturmedium

(B.4.1) bestimmt. Mit jeder Verdünnung des Virusstocks wurden jeweils 10 unabhängige Infektionen durchgeführt. Der reziproke Wert der Verdünnung, bei der in 5 von 10 Ansätzen 7 Tage nach Infektion eine Virusreplikation nachweisbar war, ergab den Virustiter des Stocks, ausgedrückt in 50% Gewebekultur-infektiosen Dosen (50% „tissue culture infective dosis“ = TCID₅₀).

B.3.5 Langzeitkultur von HIV-1 infizierten Lymphozyten

Zur Analyse der Reversionsrate von proviralen Mutanten in Zellkultur wurden CEM-4 Lymphozyten wie in B.3.2 beschrieben mit Provirus-DNA transfiziert. Alle 48 h wurden Proben entnommen und zur Kontrolle der angehenden Infektion in den p24-ELISA (B.4.1) eingesetzt. Um die Infektion über einen längeren Zeitraum (ca. fünf Wochen) aufrechtzuerhalten, wurden den Ansätzen nach visueller Kontrolle des zytopathischen Effekts ca. alle 5 - 6 Tage neue Zellen zugegeben. Nach ca. drei weiteren Tagen wurde die Hälfte der infizierten Zellen aus den Kulturen entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Die geernteten Zellen wurden abzentrifugiert (300 × g, 10 min), zweimal mit PBS gewaschen und bei –20°C weggefroren.

B.4 Analyse der transienten Proteinexpression

B.4.1 Quantifizierung des HIV-1 Capsidantigens (p24-ELISA)

Um die Menge an HIV-1 Capsidprotein in Zelllysaten zu bestimmen, wurden transfizierte H1299 Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) gewaschen, in eiskaltem PBS abgekratzt, 10 min bei 300 × g abzentrifugiert, in PBS resuspendiert und in den HIV-1 ELISA (siehe unten) eingesetzt. Alle Proben wurden so verdünnt, dass die Messwerte im linearen Bereich der Eichkurve lagen.

Um die Menge an HIV-1 Capsidprotein im Kulturmedium zu quantifizieren, wurden die Überstände 10 min bei 300 × g vorzentrifugiert, filtriert (Porengröße: 0,45 µm) und in den HIV-1 p24-ELISA eingesetzt.

Um selektiv Partikel-assoziiertes Capsidantigen im Kulturmedium zu bestimmen, wurden extrazelluläre Virionen in vorzentrifugierten (300 × g, 10 min) und filtrierten (Porengröße: 0,45 µm) Kulturüberständen durch 2 ml 20% Saccharose (w/w) in PBS zentrifugiert (150000 × g, 120 min, 4°C), über Nacht in PBS resuspendiert und in den HIV-1 p24-ELISA eingesetzt.

Um das Gesamtcapsidantigen extrazellulärer Virionen unter Berücksichtigung unprozessierter Gag- und Gag-Pol Vorläufer zu bestimmen, wurden die aufkonzentrierten Viruspartikel, wie in B.2.3.3 beschrieben, mit rekombinanter HIV-1 Protease nachprozessiert.

Zur Quantifizierung des Capsidantigens in Zelllysaten und Kulturüberständen wurden 96-well *MaxiSorb* Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) mit je 100 µl einer 1:300 Verdünnung des p24-spezifischen Antikörpers M01 in 0,1M Carbonatpuffer (pH 9.5)

über Nacht (4°C) beschichtet. Anschließend wurden die Proben sowie der p24-Standard seriell (10⁻⁰ ng/ml) in Verdünnungspuffer (1% BSA in PBS) verdünnt und je 100 µl dieser Verdünnungen nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer (0,05% Tween-20 in PBS) auf die Platte gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (6×) wurden je 100 µl einer 1:20000 Verdünnung des zweiten, biotinylierten p24-spezifischen Antikörpers 37G12 in Verdünnungspuffer zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach erneutem Waschen (10×) wurden 100 µl einer 1:10000 Verdünnung des Streptavidin-HRP-Konjugats (Roche, Mannheim) zugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurden die Mikrotiterplatten abermals gewaschen (10×). Die Antikörper-Antigen-Komplexe wurden unter Verwendung von je 100 µl TMB-Substratlösung (BD, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers detektiert. Die Adsorption wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die verwendeten p24-spezifischen Antikörper M01 und 37G12 (biotinyliert) sowie der p24-Standard wurden von PolyImmun (Wien, Österreich) bezogen.

B.4.2 „Frameshift“-Luciferasereporter Assay

H1299 Zellen wurden 48 h *post transfectionem* mit 3 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl 1 × *CCLR lysis buffer* (Promega, München) nach Herstellerangaben aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile wurden pelletiert (12000 × g, 2 min, 4°C) und der Gesamtproteingehalt des Zelllysates wurde mit Hilfe des *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, München) bestimmt. Der Luciferase Assay (*Luciferase Assay System*, Promega, Mannheim) wurde mit 100 µg Gesamtprotein nach Herstellerangaben durchgeführt und die Lichtreaktion durch Zugabe von je 100 µl Luciferin gestartet. Die Luciferaseaktivität wurde durch Messung der Lichtemission über einen Zeitraum von 10 sec im Luminometer *Lumat 9501* (Berthold, Bad Wildbach) quantifiziert.

B.4.3 Analyse der transienten Proteinexpression im Western Blot

Transfizierte H1299 Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) gewaschen, in eiskaltem PBS abgekratzt, 10 min bei 300 × g abzentrifugiert und in RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% SDS (w/v), 1% Nonidet P-40 (w/v), 0,5% Natriumdesoxycholat (w/v) nach Zusatz von Proteaseinhibitoren (*Complete Minis*, Roche, Mannheim) 20 min auf Eis lysiert. Unlösliche Bestandteile des Zelllysates wurden 30 min bei 10000 × g und 4°C abzentrifugiert. Die Gesamtproteinmenge des Überstandes wurde mit dem *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Proben wurden mit einem Volumen 2 × Probenpuffer (Laemmli, 1970 bzw. Schägger & von Jagow, 1987) versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. 100 - 150 µg Gesamtprotein wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Laemmli, 1970 oder Schägger & von Jagow, 1987), auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern (B.2.5.2) analysiert.

Extrazelluläre virale Partikel in vorzentrifugierten ($300\times g$, 10 min) und filtrierten (Porengröße: $0,45\ \mu\text{m}$) Kulturüberständen transfizierter H1299 Zellen wurden durch 2 ml 20% Saccharose (w/w) in PBS zentrifugiert ($150000\times g$, 120 min, 4°C) und über Nacht in PBS resuspendiert. Das Gesamtcapsidantigen in den Proben wurde bestimmt (B.4.1), und identische Mengen an viralen Proteinen wurden wie oben beschrieben über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit den entsprechenden Antikörpern (B.2.5.2) analysiert.

B.4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Zum Nachweis des autofluoreszierenden ($\text{Exc}_{471}/\text{Em}_{503}$) 28-kDa Proteins GFP („green fluorescence protein“) bzw. der GFP-Fusionsproteine wurden die Zellen direkt auf sterile Deckgläschen in 6-Napf-Schalen ausgesät und entsprechend transfiziert (B.3.2). Für die Immunfluoreszenz wurde nach 48 h Stunden der Zellrasen mehrmals mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend auf dem Deckgläschen mit je $500\ \mu\text{l}$ einer 2% Paraformaldehyd (PFA in PBS)-Lösung fixiert (10 min, RT) und nachfolgend mit 0,5% TritonX-100 in PBS permeabilisiert (15 min, RT). Nach einer terminalen Fixierung mit 4% PFA in PBS (10 min, RT) wurden die Zellkerne für mindestens 30 min (37°C , lichtgeschützt) unspezifisch mit DAPI (1:1000, Roche, Mannheim) in Verdünnungspuffer (1% BSA in PBS) angefärbt. Anschließend wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und mit dem Zellrasen nach unten luftblasenfrei mit $20\ \mu\text{l}$ Eindeckelmedium (24% (w/v) Glycerin, 9,6% (w/v) Polyvinylalkohol, 2,5% (w/v) DABCO, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) auf Objekträger aufgelegt und getrocknet (4°C , lichtgeschützt). Die Fluoreszenzmikroskopie wurde unter Verwendung der entsprechenden Anregungs- und Sperrfilter an einem *LEICA-DMR* Mikroskop (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) durchgeführt (Vergrößerung: 40-100fach) und mit Hilfe der *Meta-View-Software* bearbeitet.

C Ergebnisse

C.1 Gesamtkonzept zur funktionellen Untersuchung der Protease-spaltstellen von p6* *in vitro* und im Kontext der viralen Replikation

C.1.1 Ausgangsüberlegungen

Während der viralen Maturation wird das „transframe“-Protein p6* selbst von der Protease (PR) aus dem Gag-Pol-Vorläufer freigesetzt. Eine spezifische Spaltung von p6* durch die PR wurde in vorangegangenen *in vitro*-Experimenten durch die Spaltung von Dekamerpeptiden mit rekombinanter HIV-1 PR verifiziert. Danach konnten drei Spaltstellen identifiziert werden, die von der PR mit unterschiedlicher Kinetik hydrolysiert werden (siehe Tabelle C.1 und Dissertation von C. Paulus, 1999). Diese PR-Spaltstellen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, wobei auch zusätzliche Spaltereignisse in p6* diskutiert werden (Partin *et al.*, 1991; Phylip *et al.*, 1992; Zybarth *et al.*, 1994; Almog *et al.*, 1996; Tessmer & Kräusslich, 1998; Louis *et al.*, 1999; Pettit *et al.*, 2003). Allerdings bleibt sowohl die tatsächliche Nutzung aller Spaltstellen *in vivo* als auch die Reihenfolge der Spaltereignisse im Kontext der viralen Maturation nach wie vor ungeklärt. In den vergangenen Jahren führten Prozessierungsexperimente verschiedener Arbeitsgruppen mit verkürzten PR-Vorläufern abhängig von den gewählten Versuchsbedingungen (Temperatur, pH-Wert usw.) zu unterschiedlichen Aussagen bezüglich Effizienz und Reihenfolge der Spaltungen in und um p6* (Partin *et al.*, 1991; Lindhofer *et al.*, 1995; Almog *et al.*, 1996; Louis *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001). Daher bleibt eine vollständige Übertragbarkeit einzelner *in vitro*-Studien auf die tatsächliche Situation im Virus zweifelhaft.

Tabelle C.1: Relative Hydrolyseraten der Proteasespaltstellen in und um p6*

Spaltstelle	Sequenz	rel. Hydrolyserate
(1) N-terminal p7-p6* (70%)	ERQAN*FLRED	1.0
N-terminal p7-p6* (30%)	ERQAN*FFRED	2.3
(2) intern p6*-p6*	EDLAF*LOGKT	6.3
(3) C-terminal p6*-PR	VSFNF*PQITL	409.2

Die beiden Varianten der N-terminalen PR-Spaltstelle (1) entstehen bei der Synthese des Gag-Pol Polyproteins, abhängig von der Position des Leserastersprungs im Verhältnis 7:3 und wurden als Dekamerpeptide in einem Spaltexperiment mit rekombinanter Protease am langsamsten prozessiert. Dahingegen wurde die C-terminale Spaltstelle (3) bis zu 400fach schneller hydrolysiert (Paulus, C., 1999).

Um zu untersuchen, welche Bedeutung eine korrekte Prozessierung von p6* durch die HIV-1 PR für die virale Replikation hat, wurde ein gesamtheitliches Konzept zur Mutagenese der natürlichen PR-Spaltstellen von p6* entworfen. Dieses sollte sowohl klar definierbare *in vitro*-Analysen als auch Zellkultur-Experimente mit Virusmutanten beinhalten. Ziel war es dabei, die ursprüngliche Prozessierungskinetik der Spaltungen

entweder drastisch zu verändern oder aber die Spaltstellen durch Einführen bestimmter Aminosäuren vollständig zu zerstören.

C.1.2 Mutagenese der Proteasespaltstellen von p6* im proviralen Kontext

Bei der gezielten Mutagenese der p6*-Sequenz im Kontext eines vollständigen Provirus galt es Folgendes zu beachten:

1. Modifikationen der für p6* kodierenden Nukleinsäuresequenz haben Veränderungen des überlappenden gag-Leserahmens zur Folge. Dies betrifft ausschließlich die Sequenzen von p1 und p6 (Abbildung C.1). Um die Gag-Aminosäuresequenz und darin liegende funktionelle Bereiche nicht zu zerstören, wurden Punktmutationen bevorzugt, die im gag-Leserahmen jeweils nur die „wobble“-Position des Kodons betrafen und somit dort zu keinem Aminosäureaustausch führten.
2. Um die Kinetik der Spaltereignisse zu verändern, sollten neue Erkennungssequenzen für die HIV-1 PR erzeugt werden, die im Vergleich zur Originalsequenz entweder langsamer oder schneller hydrolysiert werden. Um Aussagen über die Spaltbarkeit von Substraten treffen zu können, wurde ein Algorithmus verwendet, der die Wahrscheinlichkeit errechnet, mit der eine beliebige, acht Aminosäuren lange Peptidsequenz von der HIV-1 PR gespalten wird (Chou *et al.*, 1996). Dabei werden auch Positionen einzelner Aminosäuren zueinander innerhalb der PR-Erkennungssequenz berücksichtigt. Nach der hierfür erstellten Formel errechnet sich für spaltbare Peptide ein positiver und für nicht-spaltbare ein negativer Δ -Wert.

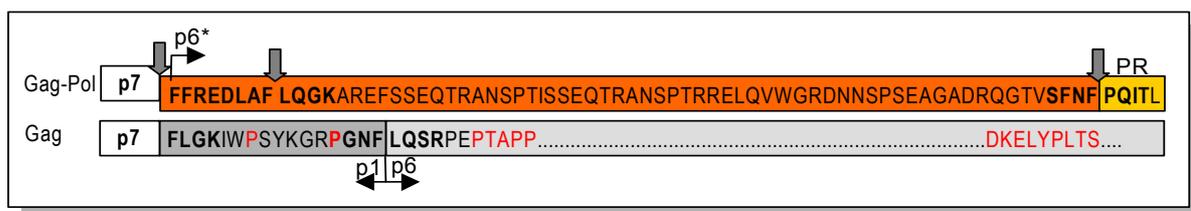


Abbildung C.1: Das „transframe“-Protein p6* und überlappende Gag-Bereiche. Die Aminosäuresequenz von p6* ist orange und alle Gag-Bereiche sind grau bzw. weiß unterlegt. Aminosäurereste um PR-Spaltstellen sind fett gedruckt und funktionelle Bereiche in Gag rot dargestellt. Die drei natürlichen PR-Spaltstellen von p6* sind durch Pfeile markiert.

C.1.2.1 Modifikation der N-terminalen Spaltstelle

Die Schwierigkeit, den N-Terminus von p6* zu verändern, besteht in der starken Konservierung der zugrunde liegenden RNA-Sekundärstruktur und in der Überlagerung von funktionellen Gag- und Gag-Pol-Bereichen. Es scheint somit unmöglich, die N-terminale PR-Spaltstelle von p6* im proviralen Kontext zu modifizieren, ohne gleichzeitig die den Leserastersprung induzierende Heptanukleotidsequenz oder aber die PR-Spaltstelle zwischen p7 und p1 des Gag-Leserahmens zu verändern. Daher wurde ein Kompromiss erarbeitet, dessen erste

Austausch von Phenylalanin (F) gegen Valin (V) zur Folge hat. Die Gag-Sequenz bleibt dabei unangetastet (Abbildung C.3 C). Allerdings wird durch diese Mutation eine Basenpaarung im „stem-loop“ zerstört. Daher wurde zusätzlich eine zweite Variante kreiert, die durch eine weitere Punktmutation auf der gegenüberliegenden Seite des „stem-loop“ die ursprüngliche Basenpaarung wieder herstellt (siehe Abbildung C.3 B), um die Stabilität der Sekundärstruktur zu gewährleisten. Auch diese Mutation hatte keine Veränderung der Gag-Sequenz (siehe Abbildung C.3 C), sondern lediglich die Mutation eines nicht-konservierten p6*-Restes zur Folge. Schließlich sollte der Einbau der β -verzweigten Aminosäure V an der Position P1 der Erkennungssequenz (Abbildung C.3 D) eine Zerstörung der ursprünglichen PR-Spaltstelle bewirken (Pettit *et al.*, 1991; Poorman *et al.*, 1991; Tözser *et al.*, 1992) und dadurch deren Notwendigkeit für die virale Replikation aufzeigen.

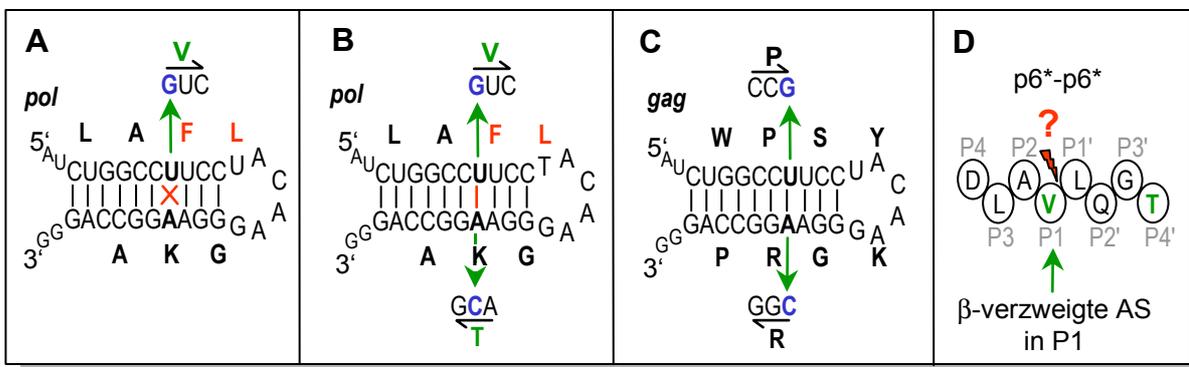


Abbildung C.3: Modifikation der internen PR-Spaltstelle von p6*. Dargestellt sind die beiden Austausche im „stem-loop“-Bereich der genomischen RNA mit der dazugehörigen Aminosäuresequenz des *pol*- (A und B) bzw. des *gag*-Leserahmens (C). Die Position der Aminosäureaustausche innerhalb der PR-Erkennungssequenz ist gezeigt (D). Die ursprüngliche PR-Spaltstelle ist rot markiert. Punktmutationen sind blau – und daraus folgende Aminosäureaustausche grün dargestellt. Aminosäuren sind jeweils über bzw. unter der zweiten Base des zugehörigen Kodons notiert. Nähere Erläuterungen siehe Text.

C.1.2.3 Modifikation der C-terminalen Spaltstelle

Weitaus mehr Möglichkeiten zum Aminosäureaustausch bot die C-terminale PR-Spaltstelle, da in diesem Bereich keine *cis*-aktiven RNA-Elemente vorliegen. Dabei lag das Hauptaugenmerk auf den vier konservierten C-terminalen Aminosäureresten von p6*, die maßgeblich an der beobachteten Inhibition der PR-Aktivität beteiligt zu sein scheinen (Paulus *et al.*, 1999). Durch deren gezielte Mutation sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Prozessierungskinetik dieser Spaltstelle auf die Regulation der PR-Aktivität hat bzw. wie wichtig in diesem Zusammenhang die Beschaffenheit der nach Spaltung freigesetzten vier C-terminalen Aminosäurereste für die Inhibition der PR ist.

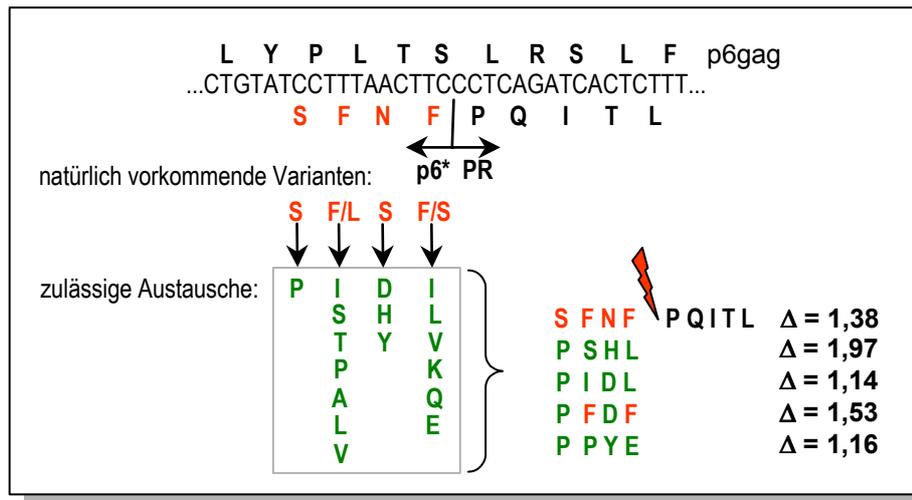


Abbildung C.4: Mögliche Aminosäureaustausche am C-Terminus von p6*. Die Wildtyp-Sequenz und die bei verschiedenen Isolaten vorkommenden natürlichen Aminosäurevariationen sind rot dargestellt. Sämtliche zulässige Austausche sind grün markiert. Für die ausgewählten Aminosäurekombinationen sind die nach dem Chou-Algorithmus errechneten Δ -Werte angegeben. Aminosäuren sind jeweils über bzw. unter der zweiten Base des zugehörigen Kodons notiert. Nähere Erläuterungen siehe Text.

So wurde unter Berücksichtigung der natürlich vorkommenden Varianten der p6*-„halfsite“ für jede der vier Positionen die durch den überlappenden Gag-Leserahmen limitierte Anzahl möglicher Aminosäureaustausche bestimmt (Abbildung C.4 A). Für die sich daraus ergebenden 448 Kombinationsmöglichkeiten wurden sodann mit Hilfe des Chou-Algorithmus die Wahrscheinlichkeiten für eine Spaltung durch die HIV-1 PR berechnet. Da sich für Sequenzen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit gespalten werden ein positiver Δ -Wert errechnet, wurden mehrere Aminosäurekombinationen mit ausschließlich positiven Δ -Werten ausgewählt.

C.1.3 Ergänzende *in vitro*-Testsysteme

Schwerpunkt der Untersuchungen sollte die Analyse der mutierten Proviren in verschiedenen Zellkultursystemen sein. Um Einzelaspekte der proviralen Modifikationen auch *in vitro* zu charakterisieren, wurden reduktionistische Testsysteme ausgearbeitet. Ein Schema der experimentellen Vorgehensweise ist in Abbildung C.5 dargestellt. Zunächst sollten kinetische Effekte der veränderten PR-Spaltstellen durch *in vitro*-Prozessierung von entsprechenden Peptiden oder Volllängeproteinen mit rekombinanter HIV-1 PR erfasst werden. Daneben galt es, die Funktionalität der modifizierten *cis*-aktiven Elemente in einem „frameshift“-Reporterassay zu überprüfen. Schließlich sollte der inhibitorische Einfluss der mutierten C-terminalen p6*-Reste auf die HIV-1 PR in einem PR-Aktivitätstest herausgearbeitet werden.

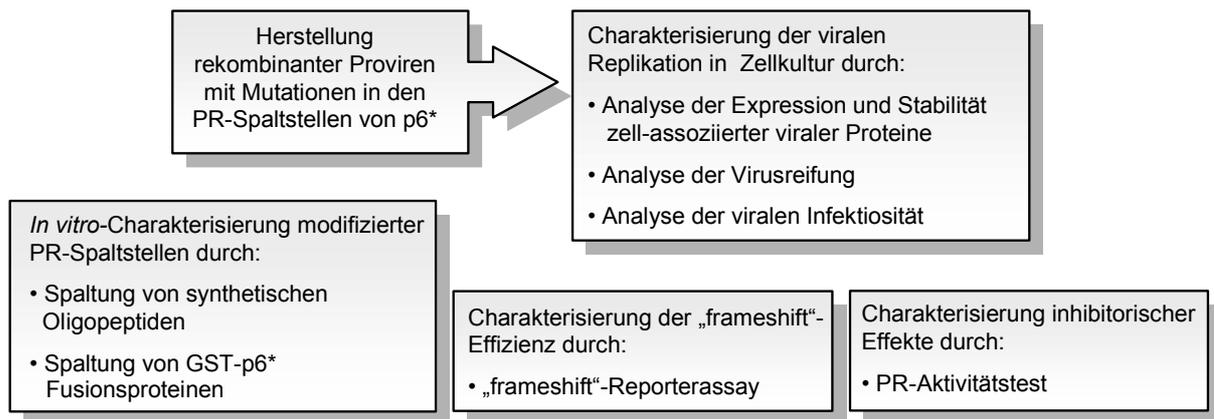


Abbildung C.5: Experimentelle Vorgehensweise bei der Analyse der PR-Spaltstellen von p6*. Erläuterungen siehe Text.

C.2 *In vitro*-Charakterisierung der modifizierten Proteasespaltstellen von p6*

C.2.1 Spaltung von synthetischen Oligopeptiden

Um zu testen, ob die modifizierten PR-Spaltstellen von p6* von der HIV-1 PR gespalten werden, wurden Wildtyp- und mutierte p6*-Sequenzen in Form synthetischer Decapeptide für 48 h mit rekombinanter HIV-1 PR inkubiert und die Spaltprodukte über RP-HPLC und Massenspektrometrie identifiziert. In allen Ansätzen mit spaltbaren Peptidsubstraten konnten jeweils nur ein N- und ein C-terminales Spaltprodukt detektiert werden. Im Falle des Wildtyp-Peptids P_n wurde jedoch im HPLC-Chromatogramm nur das C-terminale Spaltprodukt registriert, da das N-terminale Fragment hydrophil ist und nicht an die Säulenmatrix bindet (A.1 in C.6). Die Sequenzierung der Spaltprodukte ergab, dass die eingeführten Mutationen in den meisten Fällen zu einer Veränderung des Spaltprofils führten. So bewirkte die Mutation der N-terminalen Spaltstelle eine Verschiebung der Hydrolysestelle im Peptid P₁ um zwei Aminosäurereste Richtung C-Terminus (A.2 in Abbildung C.6) im Vergleich zum Wildtyp-Peptid P_n (A.1 in C.6). Ebenso führten die beiden Mutationen innerhalb der internen PR-Spaltstelle von p6* in den Peptiden P₂ und P₃ (B.2 und B.3 in C.6) im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz P_i (B.1 in C.6) zur Verschiebung der Hydrolysestelle um zwei Aminosäurereste, die jedoch in diesem Falle in N-terminaler Richtung erfolgte. Dagegen lieferten die Modifikationen der vier C-terminalen Aminosäurereste von p6* nach *in vitro*-Spaltung unterschiedliche Ergebnisse. So konnten die beiden Peptidsubstrate P₄ und P₇ (C.4 und C.5 in C.6) auch nach 48 h Reaktionszeit nicht von der HIV-1 PR hydrolysiert werden. Im Gegensatz dazu wurden die Peptide P₅ und P₆ (C.2 und C.3 in C.6) von der PR an gleicher Position gespalten wie das Wildtyp-Peptid P_c (C.1 in C.6). Weitere Spaltexperimente, die in der Gegenwart von 5 µM PR-Inhibitor Ro 31-5989 durchgeführt wurden, zeigten, dass alle Spaltereignisse allein auf die enzymatische Aktivität der HI-viralen PR zurückzuführen waren (nicht gezeigt). Überdies wurden alle Spaltprodukte durch

Gasphasensequenzierung bestätigt. Die zum Teil vorhandenen Doppelbanden von Edukten bzw. Produkten sind vermutlich auf partielle Abspaltung der Schutzgruppen von den Peptiden zurückzuführen. So waren bei einigen Edukten bereits Doppelbanden in HPLC-Analysen der ungespaltenen Kontrollansätze vorhanden (nicht gezeigt).

Wie aus den Chromatogrammen ersichtlich, wurden die Peptidsubstrate unterschiedlich effizient gespalten. So war in einigen der Ansätze auch nach einer Reaktionszeit von 48 h noch ungespaltenes Restedukt vorhanden. Um die Kinetik der einzelnen Spaltungen genauer zu analysieren, wurde der Substratumsatz in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bestimmt. Abbildung C.7 zeigt den zeitlichen Verlauf der Spaltungen für die Wildtyp-Peptide und die jeweils modifizierten Sequenzen.

Dabei zeigte sich, dass das N-terminale Peptidsubstrats P1 (A.2 in C.7) innerhalb von Sekunden vollständig umgesetzt wurde, während die Spaltung des entsprechenden Wildtyp-Peptids nur über einen Zeitraum von mehreren Stunden erfolgte (A.1 in C.7). Im Gegensatz dazu führten die Mutationen der internen Spaltstelle im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz (B.1 in C.7) zu einem verzögerten Umsatz der beiden Peptidsubstrate P2 und P3 (B.2 in C.7), wobei P2 wiederum etwas langsamer hydrolysiert wurde als P3. Ebenso wurden die beiden C-terminalen Peptidsubstrate P5 und P6 (C.1 und C.2 in C.7) langsamer umgesetzt als das Wildtyp-Peptid (C.1 in C.7). Dabei fiel auf, dass P6 mit ähnlicher Anfangsrate gespalten wurde wie das Wildtyp-Peptid, die Hydrolyserate jedoch nach ca. 30% Umsatz stark abfiel, was sich in einem flacher werdenden Kurvenverlauf ausdrückt.

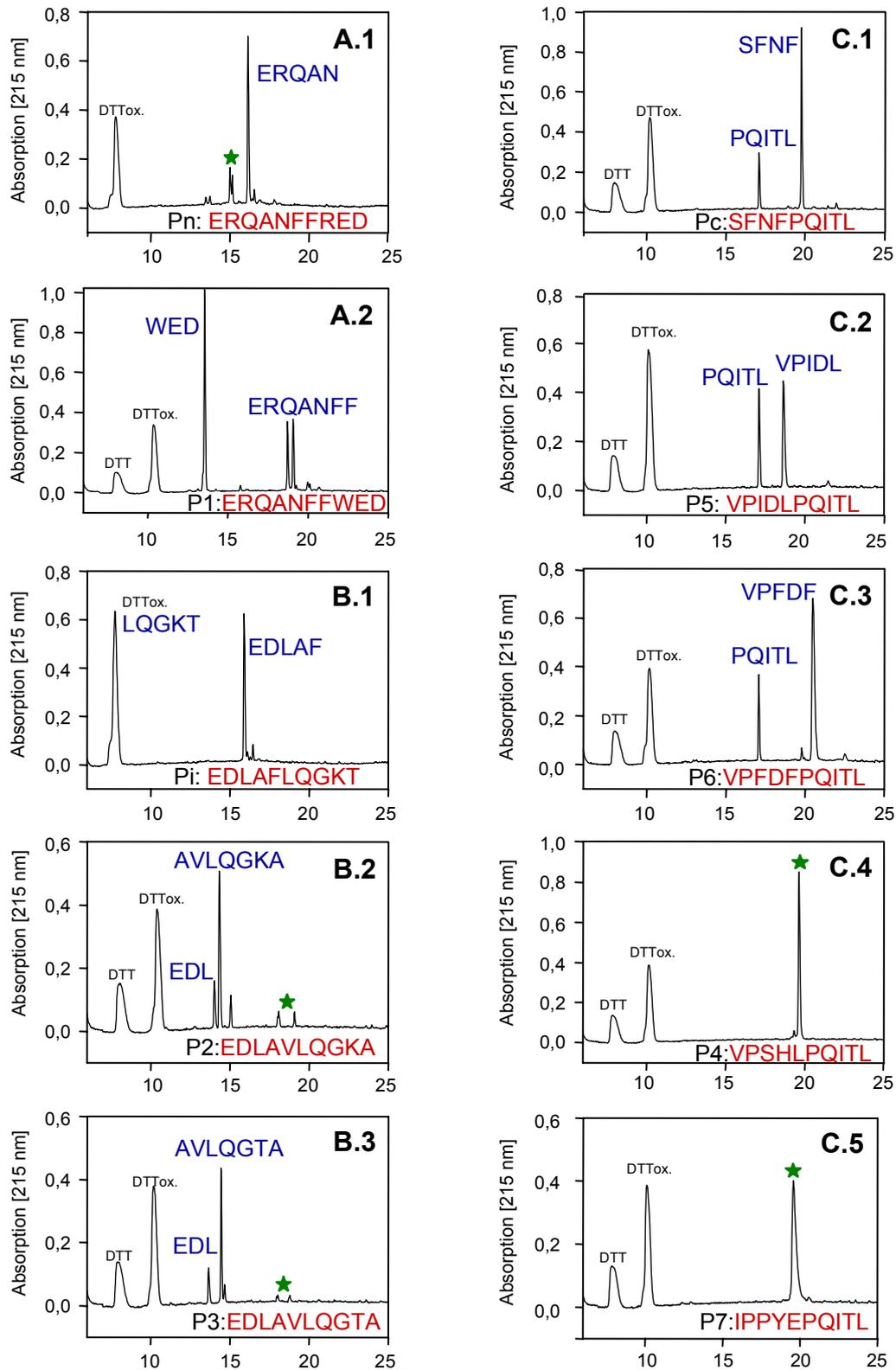


Abbildung C.6: Hydrolyse der synthetischen Oligopeptide P1-P8 im Vergleich zu den Wildtyp-Sequenzen. Je 14 pmol der Decapeptide wurden, wie in B.2.3.2 beschrieben, für 48 h mit rekombinanter HIV-1 PR gespalten und die Ansätze über RP-HPLC analysiert. Das Edukt ist rot und die Spaltprodukte sind blau dargestellt. Ungespaltenes Restprodukt ist jeweils mit einem grünen Stern markiert. Auf der x-Achse ist die Retentionszeit in min aufgetragen. Die mit DTT bzw. DTTox. bezeichneten Ausschläge stammen von Dithiothreitol bzw. oxidiertem Dithiothreitol in Testpuffer. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Zusammenfassend lieferte die Spaltung der synthetischen Oligopeptide nicht in jedem Fall das erwartete Ergebnis. Während die Mutationen der N-terminalen und internen PR-Spaltstellen von p6* im Decapeptid zu einer Verschiebung der ursprünglichen Hydrolysestelle führten, wurden zwei der C-terminalen Varianten trotz Berechnung eines positiven Δ -Wertes nach Chou (siehe C.1.2.3) *in vitro* nicht von der PR als Substrat erkannt.

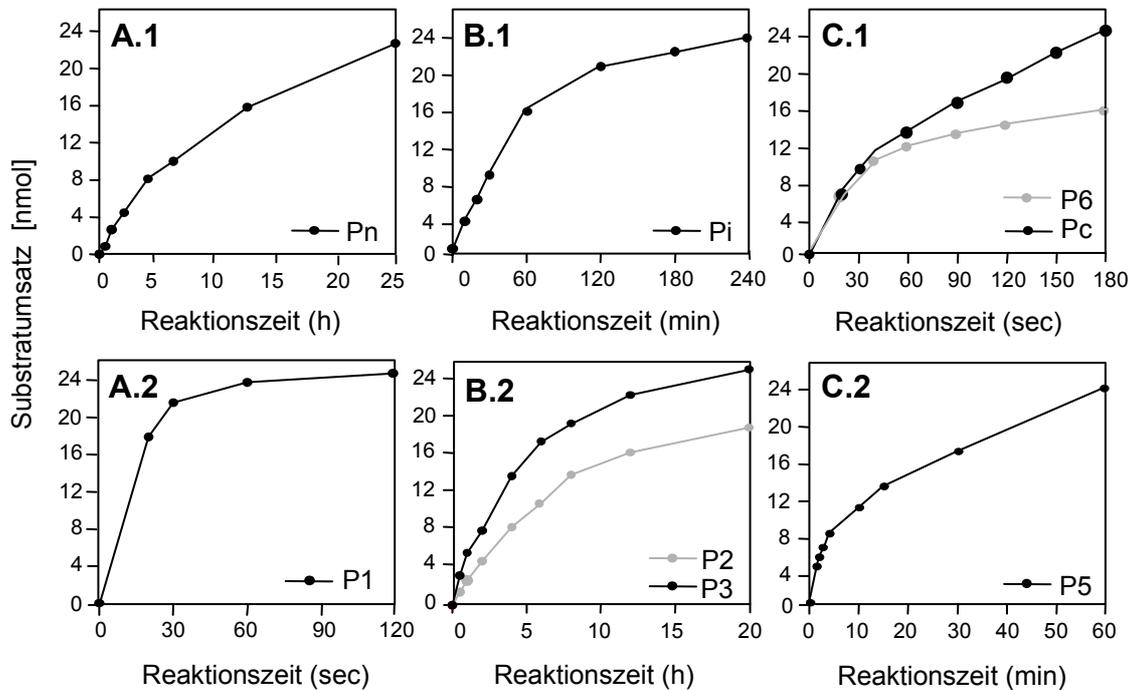


Abbildung C.7: Zeitlicher Verlauf der Spaltung der Peptidsubstrate mit rekombinanter HIV-1 PR. Die Peptide wurden in einem Gesamtvolumen von 200 μ l, wie in B.2.3.2 beschrieben, mit rekombinanter HIV-1 PR inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 15 μ l aus den Reaktionsansätzen entnommen und über RP-HPLC analysiert. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

C.2.2 Spaltung von rekombinanten GST-p6*-Fusionsproteinen

Die Modifikationen der internen PR-Spaltstelle von p6* hatten bei *in vitro*-Spaltung von entsprechenden Decapeptiden zur Hydrolyse einer alternativen Spaltstelle geführt. Um die Nutzung dieser Spaltstelle auch im komplexeren Kontext eines GST-p6* Fusionsproteins zu untersuchen, wurden rekombinante GST-p6*-Fusionsproteine, deren Produktion und Aufreinigung im Kapitel C.4.1 genauer beschrieben wird, mit HIV-1 PR inkubiert. Dabei wurde die Spaltkinetik des GST-p6* Wildtyp-Proteins mit derjenigen der beiden internen Varianten GST-p6*M2 (analog zu P2) und GST-p6*M3 (analog zu P3) verglichen. Die Reaktionsprodukte wurden, wie in Abbildung C.8 dargestellt, nach den angegebenen Reaktionszeiten über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung nachgewiesen. In allen Reaktionsansätzen mit PR verschwand das GST-p6*-Protein über die Zeit, während das ebenfalls im Reaktionsansatz enthaltene GST-Protein nicht von der PR gespalten wurde. Dies zeigt, dass das Verschwinden des Fusionsproteins ausschließlich auf Spaltung des p6*-

Anteils zurückgeführt werden kann. Außerdem konnte die Spaltung durch Zusatz von 10 μ M Ro 31-8959 komplett verhindert werden, was beweist, dass die Spaltereignisse spezifisch für die HIV-1 PR sind und nicht durch proteolytische Aktivitäten in den Proteinpräparationen verursacht wurden. Der abgespaltene Anteil des p6*-Peptids wurde jeweils durch Western Blot-Analysen mit einem polyklonalen, p6*-spezifischen Antiserum identifiziert (Daten nicht gezeigt). In guter Übereinstimmung mit den vorangegangenen Spaltexperimenten mit Decapeptiden wurde auch in diesem System das Wildtyp-Protein (A in C.8) schneller prozessiert als die Varianten mit Modifikation der internen PR-Spaltstelle (B und C in C.8). So konnte bereits nach einer zweistündigen Inkubation mit PR kein GST-p6*wt Protein mehr detektiert werden, während Reste von GST-p6*M3 noch nach 12 h (C in C.8) und Reste von GST-p6*M2 noch nach 24 h in den Ansätzen vorhanden waren.

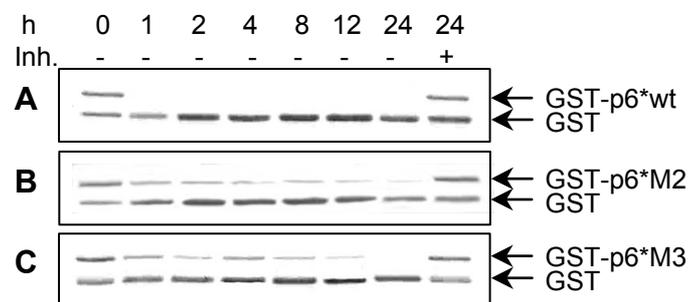


Abbildung C.8: Zeitlicher Verlauf der Spaltung der GST-p6*-Fusionsproteine mit rekombinanter HIV-1 PR. Die GST-p6* Varianten wurden, wie in B.2.1 beschrieben, produziert und aufgereinigt. Die Spaltung der Proteine mit HIV-1 PR wurde, wie in B.2.3.1 beschrieben, durchgeführt. Die Reaktionen wurden in An- (+) oder Abwesenheit (-) von Saquinavir zu den angegebenen Zeitpunkten (Stunden) gestoppt, die Reaktionsprodukte gefällt und über ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Anfärbung der Gele mit Coomassie detektiert.

Da sich das C-terminale p6*-Spaltprodukt aufgrund seines leicht sauren Charakters mit Coomassie schlecht anfärben ließ, wurden die Spaltansätze nach einer Reaktionszeit von 48 h über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Schließlich konnten die C-terminalen Spaltprodukte durch Anfärbung mit *Sypro-Ruby Red* detektiert werden (nicht gezeigt). Die anschließende Sequenzierung der Spaltprodukte ergab, dass im GST-p6* Fusionsprotein die Spaltung zwischen F₈ und L₉ erfolgt war, während die Mutanten GST-p6*M2 und M3 zwischen L₆ und A₇ gespalten wurden. Somit führten die Mutationen der internen PR-Spaltstelle auch im p6*-Volllängeprotein zur Nutzung einer alternativen Spaltstelle.

C.3 Einfluss von Modifikationen der *cis*-aktiven Elemente auf die „frameshift“-Effizienz

C.3.1 Herstellung der „frameshift“-Reporterkonstrukte

Da das HI-virale „frameshift“-Signal von Austausch in der N-terminalen und internen PR-Spaltstelle von p6* in den proviralen p6*-Mutanten csM1, csM2 und csM3 überlagert wird, wurde ein Reportersystem etabliert, um die Funktionalität des –1 Leserastersprungs in diesen Varianten zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde ein bereits beschriebenes System herangezogen (Reil & Hauser, 1990) und entsprechend modifiziert. Dabei wurde das Luciferasegen des Leuchtkäfers als Reporter verwendet und aminoterminal um die gesamte „frameshift“-Sequenz des Provirus HX10 inklusive der Heptanukleotidsequenz und des „stem-loop“-Bereichs erweitert. Somit war die Expression funktioneller Luciferase vom Plasmid pGL-fswt abhängig von einem –1 Leserastersprung (Abbildung B.2). Um die Aktivität der Luciferase in Zelllysaten quantifizieren zu können, wurden zusätzlich zwei Kontrollkonstrukte generiert. Im Reporterkonstrukt pGL-fsΔ wurde die für den Leserastersprung essentielle Heptanukleotidsequenz durch Deletion zerstört, was zu einer kontinuierlichen Expression der Luciferase führt. Dahingegen wurde im Konstrukt pGL-fs0 durch Insertion vier zusätzlicher Basen nach der Heptanukleotidsequenz der ursprüngliche Leserahmen des Luciferasegens wieder hergestellt. Somit führt ein –1 Leserastersprung aufgrund eines Stoppkodons im –1 Leserahmen zur Synthese eines verkürzten, nicht-funktionellen Enzyms (Abbildung B.2). Schließlich wurden die Mutationen der Proviruskonstrukte HX/p6*csM1, csM2 und csM3 auf das Reporterkonstrukt pGL-fswt übertragen. Die jeweiligen „frameshift“-Bereiche der Plasmide pGL-fswt, -fsΔ, -fs0 und der Varianten pGL-fs1,-fs2 und -fs3 sind in Abbildung C.9 dargestellt.

```

pGL-fswt ...TTTTTAAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAA...
pGL-fsΔ  ...T G G TAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAA...
           +4 GATC
pGL-fs0  ...TTTTTAAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAA...
pGL-fs1  ...TTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAA...
pGL-fs2  ...TTTTTAAGGGAAGATCTGGCCGTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAA...
pGL-fs3  ...TTTTTAAGGGAAGATCTGGCCGTCCTACAAGGGACGGCCAGGGAA...
  
```

Abbildung C.9: „frameshift“-Bereich der Luciferase-Reporterkonstrukte. Der „frameshift“-Bereich des Provirus HX10 wurde, wie in B.1.3.2 beschrieben, N-terminal an das Luciferasegen des Vektors pGL2 fusioniert. Der resultierende Vektor pGL-fswt wurde dann entsprechend modifiziert, um die Kontrollkonstrukte pGL-fsΔ und pGL-fs0 sowie die von den proviralen Konstrukten HX/p6*csM1, csM2 und csM3 abgeleiteten Varianten pGL-fs1,-fs2, und -fs3 zu erhalten. Die Heptanukleotidsequenz ist rot markiert und der „stem-loop“ Bereich unterstrichen. Individuelle Modifikationen der „frameshift“-Region bei den einzelnen Reporterkonstrukten sind blau hervorgehoben.

Schließlich wurde noch ein weiteres Kontrollkonstrukt generiert, nachdem in der Literatur die Frage aufgeworfen worden war, inwiefern Bereiche 3' der beschriebenen „frameshift“-Signale durch Rückfaltung und Ausbildung einer „pseudoknot“-Struktur die Haarnadelstruktur stabilisieren und somit einen Beitrag zur „frameshift“-Effizienz leisten (Dinman *et al.*, 2002). Falls sich Mutationen im „stem-loop“-Bereich auf diese Faltung auswirken sollten, so konnte dies mit den nach Reil & Hauser hergestellten Konstrukten nicht untersucht werden, da der in Abbildung C.10 grün markierte Abschnitt zwischen dem „stem-loop“-Bereich und der Luciferasesequenz im Vergleich zur proviralen Sequenz (schwarz) verändert worden war. Demnach wären potentiell modulierende Sequenzbereiche zerstört worden. Um dies zu überprüfen, wurde das Konstrukt pGL-fsHX generiert, in dem dieser Sequenzbereich mittels Fusions-PCR durch die originale HX10-Sequenz ersetzt wurde.

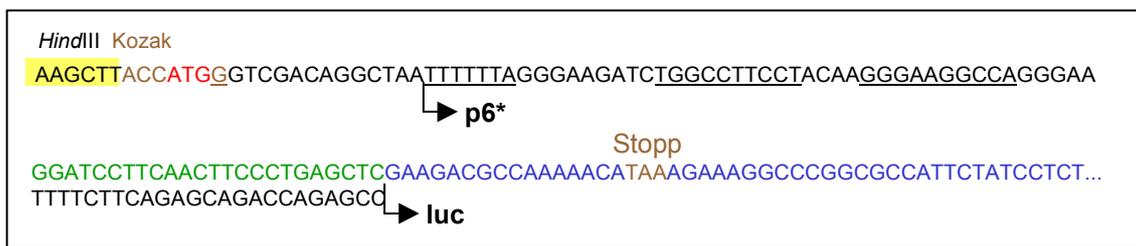


Abbildung C.10: Sequenzausschnitt aus dem Reporterkonstrukt pGL-fswt. Die Luciferasesequenz mit dem internen Stoppkodon im 0-Leserahmen ist blau hervorgehoben. Modifikationen, die in Anlehnung an Reil & Hauser (1990) übernommen wurden, sind grün markiert. Alle Sequenzabschnitte, die der Wildtyp-Sequenz des Provirus HX10 entsprechen, sind schwarz dargestellt. Der grün markierte Bereich wurde durch Fusions-PCR durch die darunter liegende HX10-Sequenz ersetzt. Die 5'-Restriktionsschnittstelle ist gelb unterlegt und die optimierte Kozak-Sequenz braun hervorgehoben. Nähere Erläuterungen siehe Text.

C.3.2 „Frameshift“-Luciferasereporter Assay

Um die Luciferase-Expression in Abhängigkeit von den modifizierten „frameshift“-Signalen zu untersuchen, wurden H1299 Zellen mit den oben beschriebenen eukaryontischen Reporterkonstrukten transfiziert. 48 h *post transfectionem* wurde die Luciferaseaktivität in den Zelllysaten quantifiziert. Um die relative „frameshift“-Rate zu erhalten, wurde die Luciferase-Expression der Konstrukte pGL-fs0, -fs1, -fs2, -fs3 sowie -fswt und -fsHX in Relation zur Expression des Konstruktes pGL-fsΔ gesetzt. Dabei wurden für das Konstrukt pGL-fsΔ 100% Luciferase-Expression angenommen. Wie in Abbildung C.11 gezeigt, lag die Wildtyp-„frameshift“-Rate des Konstruktes pGL-fswt in diesem System bei durchschnittlich 6%. Unter Berücksichtigung der Schwankungen in einzelnen Transfektionsexperimenten in Abhängigkeit von der Qualität der Plasmid-DNA konnten für die Konstrukte pLG-fs1, -fs2 und -fs3 Expressionsraten zwischen 4% (pGL-fs1) und 8% (pGL-fs2) errechnet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Transfektion der murinen Zellen Balb/c 3T3 mit den Reporterkonstrukten erzielt (Daten nicht gezeigt), wobei in diesem System die „frameshift“-Rate der Konstrukte pGL-fswt, -fs1, und -fs2 bei durchschnittlich 5% lag, während die Luciferase-Expression des Konstruktes pGL-fs3 bis zu 10% erreichte. Entgegen der Annahme, daß Sequenzen 3' des „stem-loop“-Bereichs die Effizienz des Leserastersprungs positiv

beeinflussen, konnten wir keine signifikante Abweichung der „frameshift“-Rate für das Kontrollkonstrukt pGL-fsHX feststellen. So lag dessen Luciferase-Expression in diesem Testsystem bei durchschnittlich 5%.

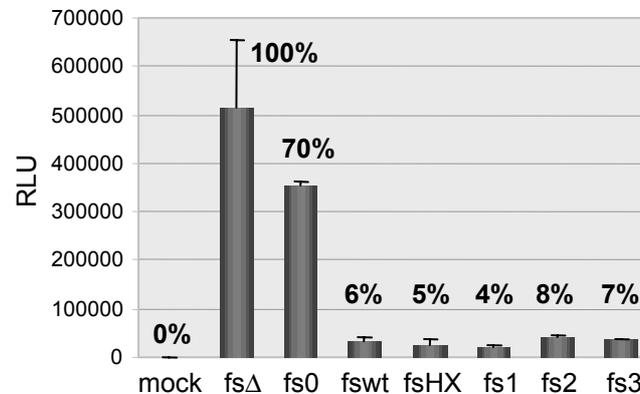


Abbildung C.11: Luciferase-Expression nach transientscher Transfektion von H1299 Zellen mit den „frameshift“-Reporterkonstrukten. H1299 Zellen wurden, wie in B.3.2 beschrieben, in Duplikaten mit pcDNA3 (mock) bzw. mit den Luciferase-Reporterplasmiden pGL-fsΔ, pGL-fs0, pGL-fsHX, pGL-fswt und pGL-fs1bis -fs3 transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die intrazelluläre Luciferaseaktivität, wie in B.4.2 beschrieben, bestimmt. Die Luciferaseaktivität ist in „relative light units“ (=RLU) angegeben. Die Absolutwerte aller anderen Konstrukte wurden sodann in Relation zum Maximalwert des Konstruktes pGL-fsΔ gesetzt, um die jeweilige „frameshift“-Rate zu bestimmen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus Transfektionen mit drei verschiedenen Plasmid-Präparationen.

Somit konnte mit Hilfe des *in-vitro* Reportersystems gezeigt werden, dass die Funktionalität des „frameshift“-Signals bei den Provirusmutanten csM1, csM2 und csM3 im Vergleich zum Wildtyp-Virus trotz geringer Abweichungen in verschiedenen Zellsystemen im Wesentlichen erhalten blieb. Geringfügige Unterschiede der „frameshift“-Effizienz konnten allerdings aufgrund der limitierten Sensitivität des verwendeten Systems nicht herausgearbeitet werden.

C.4 Einfluss der modifizierten C-terminalen p6*-Reste auf die Aktivität maturaer HIV-1 Protease

C.4.1 Herstellung und Reinigung rekombinanter p6*-Proteine

Um möglichst saubere Proteine in ausreichender Menge für Spaltanalysen oder PR-Aktivitätstests zu erhalten, wurden die p6*-Varianten als rekombinante Volllängeproteine unter nativen Bedingungen hergestellt. Zur Produktion der p6*-Proteine im bakteriellen System diente das prokaryontische Expressionsplasmid pGEX-KG/p6*, in dem das „transframe“-Protein an GST fusioniert vorliegt. Nach Einführen der jeweiligen Mutationen in die p6*wt-Sequenz standen somit die Plasmide pGEX-p6*M2 (vgl. csM2), -p6*M3 (vgl. csM3), -p6*M5 (vgl. csM5) und -p6*M6 (vgl. csM6) für die Produktion der GST-Fusionsproteine in Bakterien zur Verfügung. Nach Induktion wurden die Bakterien in NETN-Puffer (Kaelin *et al.*, 1991) resuspendiert und

in einer French Press aufgeschlossen. Alle GST-Fusionsproteine befanden sich nahezu quantitativ im löslichen Anteil des Bakterienlysats (Abbildung C.12, Spur 3) und wurden anschließend durch Bindung an Glutathion Sepharose von den übrigen bakteriellen Proteinen abgetrennt.

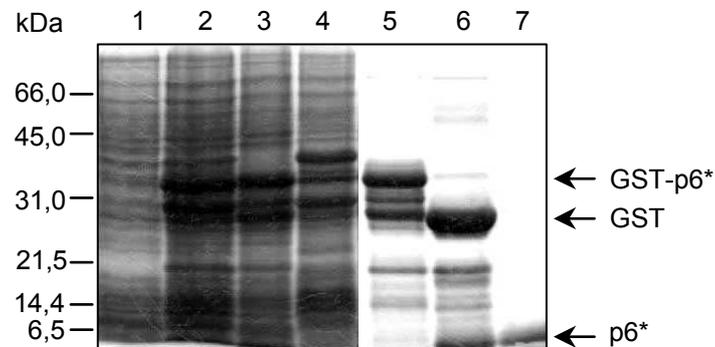


Abbildung C.12: Verlauf der Affinitätsreinigung rekombinantem p6*-Protein und Thrombinspaltung. Coomassiefärbung eines 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgels (Laemmli, 1970). Spur 1: Bakterien vor Induktion, Spur 2: Bakterien nach Induktion, Spur 3: löslicher Anteil des Bakterienlysats, Spur 4: unlöslicher Anteil des Bakterienlysats, Spur 5: Glutathion Sepharose mit gebundenem Protein, Spur 6: Spaltansatz nach Thrombinzugabe, Spur 7: Überstand nach Sedimentation der Affinitätsmatrix. Die Positionen der Markerproteine sind angegeben. GST-p6^{*}-, GST- und p6^{*}-Banden sind durch Pfeile markiert.

P6^{*}-Proteine für Spaltanalysen (siehe C.2.2) wurden lediglich durch Zugabe von reduziertem Glutathion und anschließender Zentrifugation von der Sepharose abgetrennt, was zu einer Ausbeute von ca. 10 mg GST-Fusionsprotein führte. Für den PR-Aktivitätstest wurden die Proteine weiter aufgereinigt. Hierfür wurden die p6^{*}-Varianten durch Spaltung mit Thrombin vom GST-Fusionsanteil entfernt, der an der Sepharose gebunden blieb (Abbildung C.12, Spur 6). Nach Sedimentation der Matrix verblieben die Polypeptide im Überstand (Abbildung C.12, Spur 7), die im Vergleich zum HI-viralen p6^{*} aminoterminal um zwei Aminosäuren verlängert waren (siehe auch B.1.3.3 und Abbildung B.4). Schließlich wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt (Abbildung C.13), um das Thrombin abzutrennen und somit eine Degradation der p6^{*}-Proteine durch Hydrolyse kryptischer Thrombinspaltstellen zu verhindern. p6^{*}-haltige Fraktionen wurden jeweils vereinigt und durch Ultrafiltration eingeeengt (Endkonzentration = 2 mM). Auf diese Weise wurden Proteinausbeuten von ca. 0,6 mg / l Bakterienkultur gewonnen.

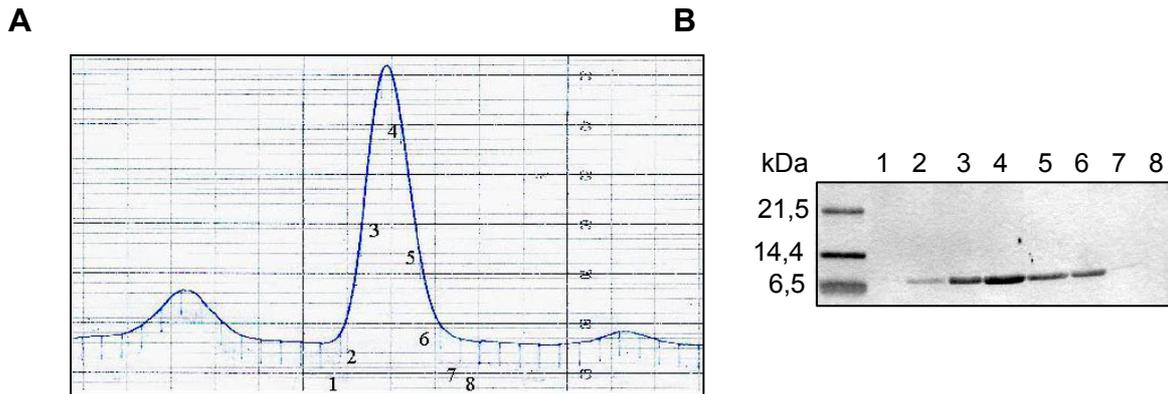


Abbildung C.13: Gelfiltrationschromatographie von rekombinantem p6*. Das Gelfiltrationsprofil ist exemplarisch für die Variante p6*M6 gezeigt (A). Die Gelfiltrationschromatographie wurde, wie in B.2.1 beschrieben, durchgeführt. Fraktionen des „peak“-Bereichs (hier Fraktionen 1-8) wurden gesammelt und nach Auftrennung über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel durch Coomassie-Färbung (B) analysiert. p6*-haltige Fraktionen wurden vereinigt und eingengt. Die Positionen der Markerproteine sind angegeben.

Die so gereinigten p6*-Proteine konnten nach Auftrennung über SDS-PAGE im Western Blot mit einem p6*-spezifischen polyklonalen Kaninchenantiserum (Abbildung C.14) nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Reinheit der Proteine im Silbergel überprüft (nicht gezeigt).

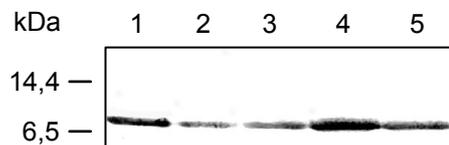


Abbildung C.14: Western Blot-Analyse der gereinigten p6*-Proteine. Nachweis der Proteine p6*wt (Spur 1), p6*M2 (Spur 2), p6*M3 (Spur 3), p6*M5 (Spur 4) und p6*M6 (Spur 5) nach Auftrennung über ein 16,5%iges SDS-

Polyacrylamidgel (Schägger & von Jagow, 1987) im Western Blot mit einem p6*-spezifischen polyklonalen Kaninchenantiserum. Die Positionen der Markerproteine sind links angegeben.

Um die Konzentration der Proteine zu bestimmen, wurden Absorptionsspektren der verschiedenen Varianten im Wellenlängenbereich zwischen 220 und 330 nm aufgezeichnet (Abbildung C.15). Die spektralen Eigenschaften von p6* werden durch den Anteil der chromophoren Aminosäurereste bestimmt. p6* enthält ein Tryptophan, dessen molarer Anteil an der Gesamttextinktion dominiert und ein Absorptionsmaximum bei 280 nm bewirkt. Aufgrund des hohen Anteils an Phenylalaninen werden im Spektrum zusätzliche Banden bei 250-260 nm sichtbar. Die Spektren der modifizierten p6*-Varianten (Abbildung C.15, B-E) unterscheiden sich kaum von dem des Wildtyp-Proteins (Abbildung C.15, A), da sich die Aminosäureaustausche auf nicht-chromophore Reste beschränken. Eine Ausnahme stellt die Variante M5 dar, die nur vier statt sechs Phenylalanine enthält (Abbildung C.15, D). Die flache Basislinie bei $\lambda > 310$ nm zeigt, dass alle Proben frei von lichtstreuenden Verunreinigungen waren. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte nach Lambert-Beer mit Hilfe des Absorptionsmaximums bei $\lambda = 280$ nm und den entsprechenden Extinktionskoeffizienten (ϵ_{280}) nach Gill & von Hippel (1989).

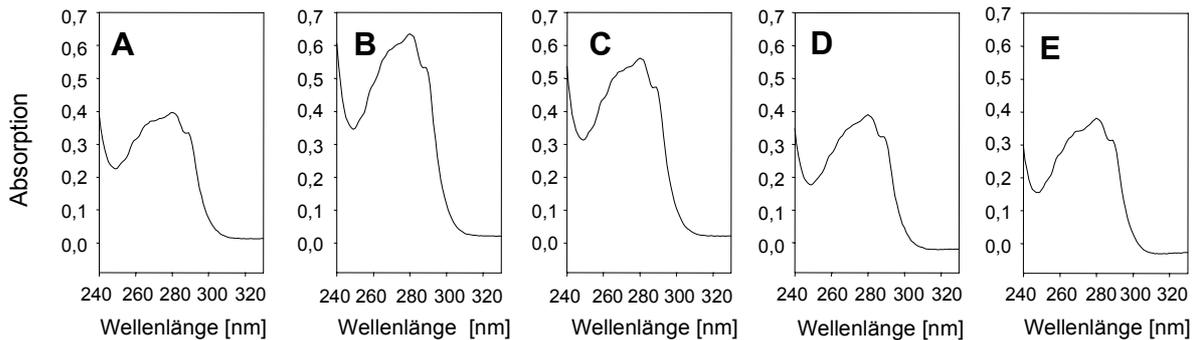


Abbildung C.15: Absorptionsspektren der p6*-Proteine. Dargestellt sind die Spektren der gereinigten Proteine p6*wt (A), p6*M2 (B), p6*M3 (C), p6*M5 (D) und p6*M6 (E) in 20 mM Natriumphosphat.

C.4.2 Kontinuierlicher spektrophotometrischer Protease-Aktivitätstest

Um den Einfluss von C-terminalen p6*-Modifikationen auf die Aktivität der HI-viralen PR zu untersuchen, wurde ein PR-Aktivitätstest durchgeführt. Da die C-terminale Freisetzung von p6* in diesem Fall Voraussetzung für eine Inhibition der PR ist, wurden nur p6*-Varianten in diesen Test eingesetzt, deren C-terminale Aminosäurekombination im Peptidspaltexperiment eine Prozessierung durch die PR erlaubt hatte (siehe C.2.1). Die Aktivität rekombinanter HIV-1 PR wurde zunächst in einem Vorversuch aus dem Verhältnis Substratumsatz/Absorptionsänderung bestimmt. Dabei bewirkt die Spaltung eines chromogenen Substrats durch die PR eine messbare Absorptionsabnahme bei 295 nm.

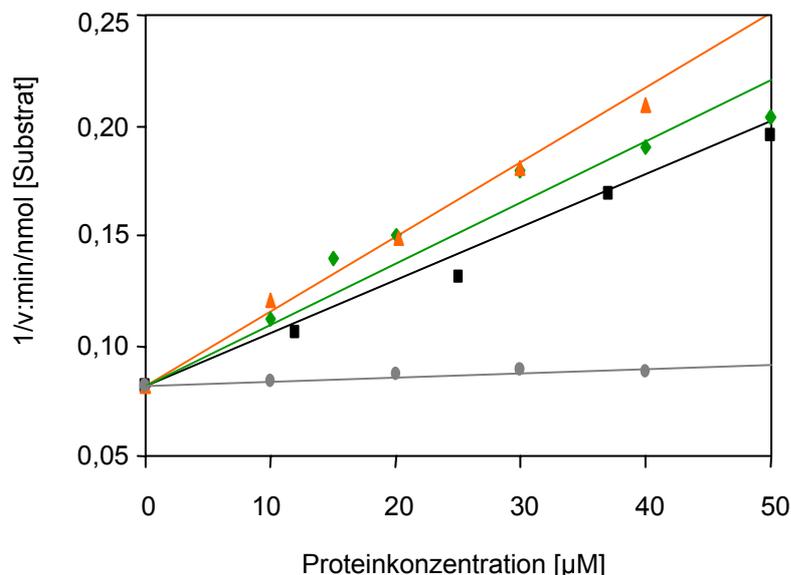


Abbildung C.16: Dixon Diagramm der Inhibition maturaer HIV-1 PR durch die carboxyterminal modifizierten p6*-Proteine. Der PR-Aktivitätstest wurde, wie in B.2.4 beschrieben, mit 25 µM Substrat in Anwesenheit steigender Konzentrationen der Proteine p6*wt (schwarze Linie), p6*M5 (grüne Linie), p6*M6 (orange Linie) sowie p6Gag (graue Linie) durchgeführt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Messungen mit verschiedenen Proteinpräparationen.

Wie bereits in früheren Studien gezeigt (Paulus *et al.*, 1999) konnte die PR durch das p6*wt-Protein konzentrationsabhängig inhibiert werden (Abbildung C.16, schwarze Linie), während das ähnlich große und gleichermaßen aufgereinigte p6Gag Protein keinen signifikanten Einfluss auf die PR-Aktivität zeigte (Abbildung C.16, graue Linie). Beim Vergleich der Initialgeschwindigkeiten in Anwesenheit von p6*wt und den beiden p6*-Varianten führten die C-terminalen Aminosäureaustausche in den Proteinen p6*M5 (Abbildung C.16, grüne Linie) und p6*M6 (Abbildung C.16, orange Linie) sogar zu einer verstärkten Inhibition der PR. So wurden für p6*wt ein IC₅₀-Wert von 34 µM – und für die Proteine p6*M5 und p6*M6 IC₅₀-Werte von 29 µM bzw. 24 µM bestimmt. Rekombinante p6*-Proteine mit Modifikationen der internen PR-Spaltstelle, die zur Kontrolle in den Aktivitätstest eingesetzt worden waren, verhielten sich wie das Wildtyp-Protein (Daten nicht gezeigt).

C.5 Einfluss der modifizierten Proteasespaltstellen von p6* auf die virale Replikation

C.5.1 Herstellung der rekombinanten Proviren

Um die Bedeutung der PR-Spaltstellen von p6* für die virale Replikation zu untersuchen, wurden – wie in C.1.2 hergeleitet, spezifische Punktmutationen in die für die PR-Spaltstellen von p6* kodierenden Bereiche des infektiösen Provirusklons HX10 eingeführt. So wurden für nachfolgende Untersuchungen in Zellkultur jeweils eine Variante mit Mutation der N-terminalen Spaltstelle (HX/p6*csM1), zwei Varianten mit Mutation der internen Spaltstelle (HX/p6*csM2 und csM3) und vier Varianten mit Mutation der C-terminalen Spaltstelle (HX/p6*csM4 und csM7) generiert. In Abbildung C.17 sind die jeweils eingeführten Punktmutationen mit Auswirkungen auf Proteinebene dargestellt.

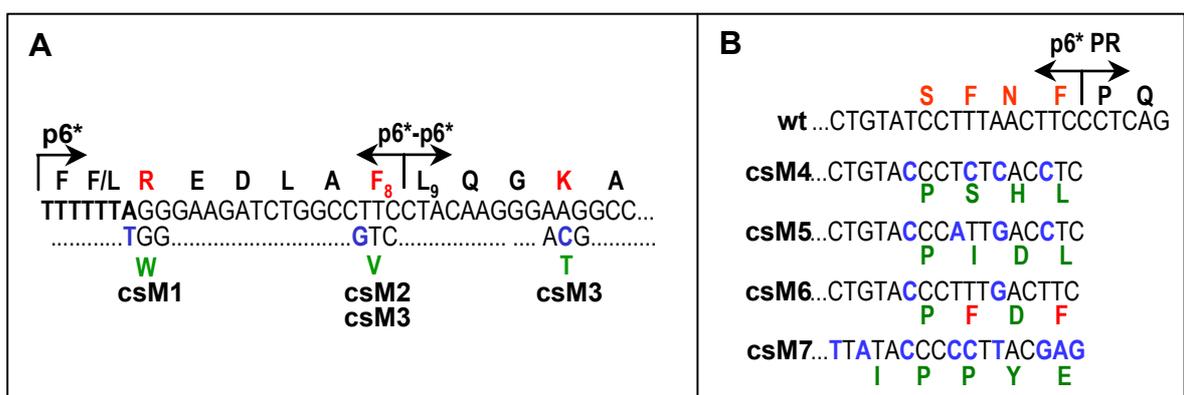


Abbildung C.17: Schematische Darstellung der proviralen p6*-Varianten HX/p6*csM1-csM7. Die spezifischen Mutationen der N-terminalen bzw. internen (A) und der C-terminalen (B) PR-Spaltstellen mit den zugrunde liegenden Punktmutationen in der p6* Nukleinsäuresequenz sind angegeben. Nukleinsäureaustausche sind blau dargestellt. Von Mutationen betroffene Reste der Wildtyp-Sequenz sind rot und veränderte Reste grün markiert.

C.5.2 Einfluss der Mutationen auf die Expression und intrazelluläre Prozessierung viraler Proteine

Um die Expression viraler HIV-1 Proteine und deren intrazelluläre Prozessierung zu untersuchen, wurden die rekombinanten Proviren HX/p6*csM1-csM7 und der Wildtyp-Klon HX10 parallel in nicht-permissive H1299 Zellen transfiziert. Abbildung C.18 zeigt eine Western Blot-Analyse der Zelllysate mit dem Capsid-spezifischen monoklonalen Antikörper 16/4/2. Alle Zelllysate, die aus Transfektionen mit den Proviruskonstrukten HX/p6*csM1-csM7 (Abbildung C.18, Spuren 3 bis 9) gewonnen wurden, wiesen vergleichbare Mengen an immunoreaktivem Material auf und lieferten ähnliche Bandenmuster wie Zellen aus Transfektionen mit HX10 (Abbildung C.18, Spur 2). Dies zeigt, dass die Mutationen in der p6*-kodierenden Region keinen Einfluss auf die Expression oder Stabilität des viralen Gag-Proteins haben. So konnte in allen Zelllysaten der 55-kDa Gag-Vorläufer sowie das 41-kDa MA-CA-p2 Intermediat detektiert werden. Überdies fand sich in allen Extrakten das mature 24-kDa CA-Protein, wobei jedoch in Zelllysaten aus Transfektionen mit HX/p6*csM4 und csM7 (Abbildung C.18, Spuren 6 und 9) ein vergleichsweise größerer Anteil an unprozessiertem CA-p2-Vorläufer vorhanden war. Zudem wurden in denselben Lysaten größere Mengen eines 40 bis 50-kDa großen Intermediats (Abbildung C.18, mit Fragezeichen markiert) detektiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Mutationen der Konstrukte HX/p6*csM4 und csM7 (Abbildung C.18, Spuren 6 und 9) zu Gag-spezifischen Prozessierungsdefekten führen, was auf eine verminderte Aktivität der HI-viralen PR schließen lässt. Dahingegen ließen alle übrigen Mutationen keine Auswirkungen auf die zell-assoziierte PR-Aktivität erkennen. Vergleichbare Ergebnisse lieferten Transfektionen von nicht-permissiven 293T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine zusätzliche Bande bei ca. 50-kDa, die auch in pcDNA3.1-transfizierten Kontrollzelllysaten auftrat (Abbildung C.18, Spur 1), resultiert aus einer Kreuzreaktion des verwendeten Antikörpers mit einem unbekanntem zellulären Protein. Dahingegen handelt es sich bei der Bande von ca. 40-kDa vermutlich um eine Gag-Isoform, die durch Translationsinitiation an einem internen Startkodon im Bereich des CA-Proteins entsteht und deren Synthese durch eine Gag-interne IRES angetrieben wird (Buck *et al.*, 2001).

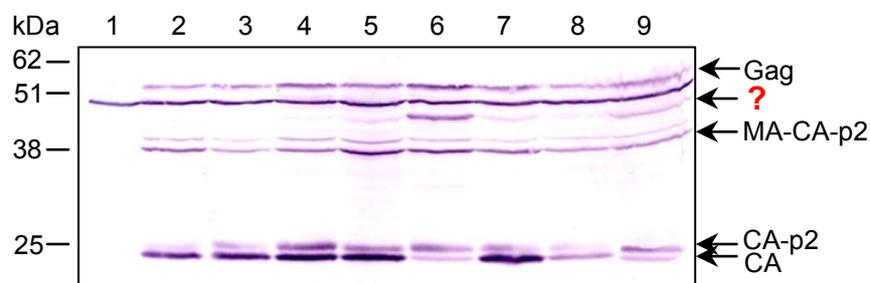


Abbildung C.18: Western Blot-Analyse der HI-viralen Gag-Expression in H1299-Zellen nach transients Transfektion mit HX10 und HX/p6*csM1-csM7. H1299 Zellen wurden, wie in B.3.2 beschrieben, mit pcDNA3.1 (Spur 1), HX10 (Spur 2) bzw. HX/p6*csM1-csM7 (Spuren 3 bis 9) transfiziert und 48 h *post transfectionem* geerntet. Je 150 µg Gesamtprotein der Zelllysate wurden über ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Laemmli, 1970), und

die CA-Spezies wurden im Western Blot mit dem monoklonalen Antikörper 16/4/2 nachgewiesen und über AP-Färbung detektiert. Die Positionen der Markerproteine sind links angegeben. Relevante CA-Banden sind durch Pfeile markiert.

C.5.3 Einfluss der Mutationen auf die Zusammensetzung und Maturation freigesetzter Viren

Um Auswirkungen der p6*-Mutationen auf die Zusammensetzung und Reifung der freigesetzten Viruspartikel zu untersuchen, wurden Viren aus Kulturüberständen transient transfizierter H1299 Zellen durch ein 20%iges Saccharosekissen aufkonzentriert und gereinigt. Die aufgeschlossenen Partikel wurden sodann im Western Blot mit verschiedenen Gag- und Gag-Pol spezifischen Antikörpern analysiert.

C.5.3.1 Reifung der viralen Gag-Proteine

Abbildung C.19 zeigt Western Blot-Analysen der Partikelpräparationen mit dem Capsidprotein-spezifischen monoklonalen Antikörper 13/5 (A) und mit dem Matrixprotein-spezifischen monoklonalen Antikörper 3-H-7 (B). Während in Wildtyp-Partikeln sowie in den p6*-Mutanten HX/p6*csM1, csM2, csM3, csM5 und csM6 das Capsidprotein weitgehend in seiner maturen Form vorlag (Abbildung C.19 A, Spuren 2 und Spuren 3, 4, 5, 7 und 8), lieferten die HX/p6*csM4- und csM7-Viren lediglich den ungespaltenen Gag-Vorläufer und zwei Prozessierungsintermediate, von denen eines den MA-CA-p2-Vorläufer mit einem Molekulargewicht von ca. 41-kDa repräsentiert (Abbildung C.19 A, Spuren 6 und 9). Vollständig prozessiertes Capsidprotein konnte in diesen Viren nicht detektiert werden. Erwartungsgemäß war in diesen Viruspartikeln auch kein matures Matrixprotein vorhanden (Abbildung C.19 B, Spuren 6 und 9). Die verminderte Anzahl nachgewiesener Gag-spezifischer Banden im Vergleich zu Abbildung C.18 ist vermutlich auf die Verwendung eines anderen Antiserums zurückzuführen.

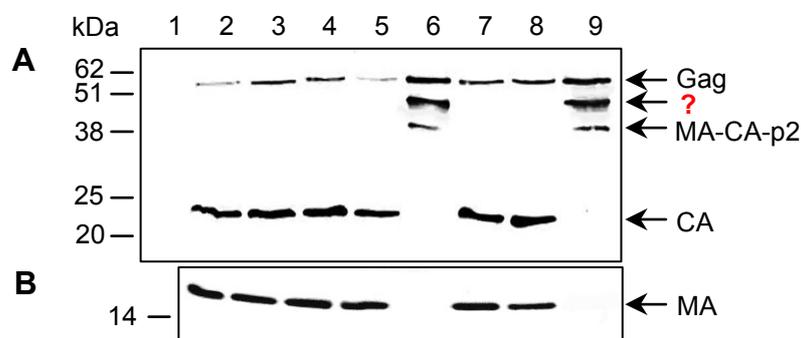


Abbildung C.19: Western Blot-Analyse der Gag-Proteine aus Kulturüberständen von H1299 Zellen nach transienter Transfektion mit HX10 und HX/p6*csM1-csM7. H1299 Zellen wurden, wie in B.3.2 beschrieben, mit pcDNA3.1 (Spur 1), HX10 (Spur 2) bzw. HX/p6*csM1-csM7 (Spuren 3 bis 9) transfiziert. Virushaltige Kulturüberstände wurden 60 h nach Transfektion geerntet und die Viren durch ein 20%iges Saccharosekissen aufkonzentriert. Nach Auftrennung der viralen Proteine über ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli,

1970) erfolgte der Nachweis von viralen CA- und MA-Spezies im Western Blot mit den monoklonalen Antikörpern 13/5 (A) und 3-H-7 (B) durch Detektion über Chemilumineszenz. Die Positionen der Markerproteine sind links angegeben. Relevante CA- und MA-Banden sind durch Pfeile markiert.

Des Weiteren wurde das Nukleocapsidprotein p7 aus Partikelpräparationen nachgewiesen, um etwaige Auswirkungen der Mutationen auf dessen Prozessierung zu erfassen. Abbildung C.20 A zeigt eine Western Blot-Analyse mit dem polyklonalen Kaninchenantiserum α -GST-p7. Wie erwartet, konnte auch hier bei den Varianten csM2, csM3, csM5 und csM6 (Abbildung C.20 A, Spuren 3, 4, 6 und 7) kein Unterschied im Prozessierungsgrad von p7 im Vergleich zu Wildtyp-Partikeln (Abbildung C.20 A, Spur 1) festgestellt werden. Dabei waren neben dem murenen p7-Protein auch noch Reste des unprozessierten NCp15-Vorläuferproteins (p7-p1-p6) vorhanden. Dahingegen konnte in csM4- als auch in csM7-Partikeln (Abbildung C.20 A, Spuren 5 und 8) keines dieser p7-spezifischen Produkte detektiert werden. Bei genauer Betrachtung verschiedener p7 Western Blot-Analysen fiel auf, dass in csM1-Viren neben dem Nukleocapsid-Protein mehrere zusätzliche p7-spezifische Banden vorhanden waren (Abbildung C.20 A und B, jeweils Spur 2), die in keiner der übrigen Partikelpräparationen detektiert werden konnten. Bei der prominenten Bande oberhalb von p7 handelt es sich vermutlich um den Vorläufer p7-p1. Die zusätzlichen Banden über dem NCp15-Vorläufer konnten nicht identifiziert werden, könnten aber p7-Intermediate aus der Gag-Pol Prozessierung darstellen. Im Gegensatz dazu waren bei einer weiteren Analyse der csM1-Partikel mit einem Antiserum gegen p6 keine Abweichungen im p6-Prozessierungsmuster erkennbar (Abbildung C.20 C). Sowohl in Wildtyp-Partikeln (Abbildung C.20 C, Spur 1) als auch in csM1-Viren (Abbildung C.20 C, Spur 2) waren neben dem weitgehend prozessierten p6-Protein noch geringe Mengen an NCp15-Vorläufer vorhanden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die N-terminale Mutation der Variante HX/p6*csM1 zu einem spezifischen p7-Prozessierungsdefekt führt. Dahingegen äußern sich die Mutationen der Varianten HX/p6*csM4 und csM7 in umfassenden Prozessierungsdefekten auf der gesamten Gag-Ebene.

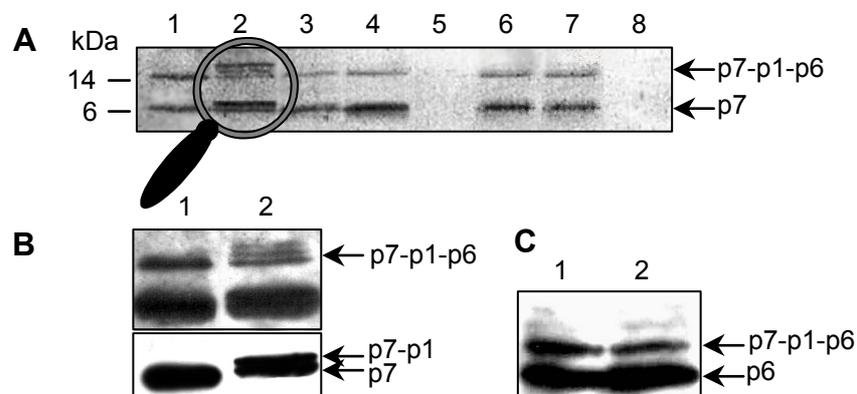


Abbildung C.20 : Western Blot-Analyse der Proteine p7 und p6 aus Kulturüberständen von H1299 Zellen nach transients Transfektion mit HX10 und HX/p6*csM1-csM7. H1299 Zellen wurden, wie in B.3.2 beschrieben, mit HX10 (Spur 1) bzw. HX/p6*csM1-csM7 (Spuren 2 bis 8) transfiziert. Virushaltige Kulturüberstände wurden 60 h nach Transfektion geerntet und die Viren durch ein 20%iges Saccharosekissen aufkonzentriert. Nach Auftrennung der

viralen Proteine über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) erfolgte der Nachweis von viralen p7- und p6-Spezies im Western Blot mit den polyklonalen Kaninchenantisera α -GST-p7 (A und B) und α -GST-p6 (C) durch Detektion über Chemilumineszenz. Relevante p7- und p6-Banden sind durch Pfeile markiert. Abbildung C.20 B wurde in zwei verschiedenen Belichtungsstärken abgebildet, um die einzelnen Banden herauszuarbeiten. Überdies wurde in Teilabbildung B eine andere Partikelpräparation verwendet als in A.

C.5.3.2 Reifung der viralen Pol-Proteine

Um den Einbau und die Prozessierung der Pol-Proteine in den Virusvarianten zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen der Partikelpräparationen mit Antikörpern durchgeführt, die spezifisch gegen die Pol-Domänen Integrase (Abbildung. C.21 A), Reverse Transkriptase (Abbildung. C.21 B) und Protease (Abbildung. C.21 C) gerichtet waren. Wie sich aus häufig wiederholten Transfektionsexperimenten ergab, wurden sämtliche Pol-Proteine gleichermaßen in Wildtyp-Partikel als auch in die p6*cs-Varianten verpackt. Somit ist der in Abbildung C.21 dargestellte RT-Western Blot (C.21 B) nicht repräsentativ und die stärkere Bandenintensität in den Spuren 2 und 4 ist vermutlich auf die Präparation der Virionen zurückzuführen. Allerdings gab es Auffälligkeiten beim Prozessierungsmuster der Pol-Proteine. So waren in csM4 als auch in csM7-Viren neben den murenen Enzymen IN (C.21 A, Spuren 6 und 9) und RT (C.21 B, Spuren 6 und 9) auch die Pol-Vorläufer RT-IN (p98) vorhanden, die mit beiden Antikörpern gleichermaßen detektiert wurden. Dahingegen war bei Wildtyp-Viren (C.21 A und B, Spur 2) und bei allen übrigen Mutanten HX/p6*csM1 - csM3, HX/p6*csM5 und csM6 (C.21 A und B, Spuren 3 - 5, 7 und 8) jeweils nur die mature Form des Enzyms nachweisbar.

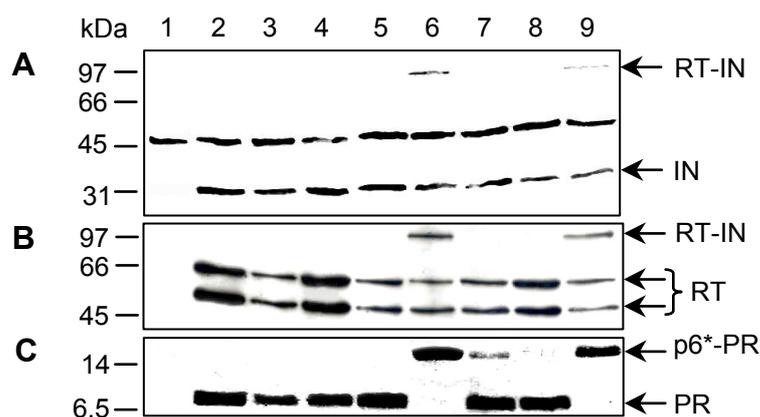


Abbildung C. 21 : Western Blot-Analyse der Pol-Proteine aus Kulturüberständen von H1299 Zellen nach transienter Transfektion mit HX10 und HX/p6*csM1-csM7. H1299 Zellen wurden, wie in B.3.2 beschrieben, mit pcDNA3 (Spur 1), HX10 (Spur 2) bzw. HX/p6*csM1-csM7 (Spuren 3 bis 8) transfiziert. Virushaltige Kulturüberstände wurden 72 h nach Transfektion geerntet und die Viren durch ein 20%iges Saccharosekissen aufkonzentriert. Virale Proteine wurden über ein 12%iges (A), 10%iges (B) oder 15%iges (C) SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) aufgetrennt und im Western Blot mit dem Integrase-spezifischen Antiserum ARP 419 (A), dem Reverse Transkriptase-spezifischen Antiserum 4F8 (B) bzw. dem Protease-spezifischen Antiserum ARP 413 (C) durch Detektion über

Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Positionen der Markerproteine sind links angegeben. Relevante IN-, RT- und PR-Banden sind durch Pfeile markiert.

Eine weitere Besonderheit der beiden C-terminalen p6*-Varianten HX/p6*csM4 und csM7 lieferte eine Western Blot-Analyse der Partikel mit einem polyklonalen PR-Antiserum. Wie in Abbildung C.21 C gezeigt, konnte in den besagten Viren im Vergleich zu Wildtyp-Partikeln und allen übrigen Varianten keine mature 11-kDa Proteaseform detektiert werden. Stattdessen wurde ein ca. 18-kDa Protein nachgewiesen, das vermutlich einen p6*-PR-Vorläufer darstellt. Dieses Intermediat war auch in den Viren csM5 und csM6 in geringen Spuren vorhanden. Daraus ist abzuleiten, dass die beiden C-terminalen p6*-Mutationen in csM4 und csM7 die Prozessierung zwischen p6* und PR vollständig verhindern, während sie in den Mutanten csM5 und csM6 lediglich langsamer abläuft. Alle anderen Mutationen zeigten keinen Einfluss auf die Prozessierung der Virus-assoziierten PR.

C.5.4 Einfluss der Mutationen auf die Infektiosität der Viren

C.5.4.1 Replikation der p6*-Mutanten in humanen T-Lymphozyten

Um den Einfluss der p6*cs-Mutationen auf die Replikationsfähigkeit der jeweiligen Viren in CD4-positiven T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden die Provirusklone in Parallelansätzen in die permissiven Zelllinien MT-4 und CEM-4 transfiziert. Die Virusproduktion der Zellen wurde sodann über einen Zeitraum von 20 bis 30 Tagen durch Quantifizierung des Capsidantigens aus den Kulturüberständen aufgezeichnet. Generell replizierten die Viren in MT-4 Zellen stets zu höheren Titern als in CEM-4 Zellen. Wie in Abbildung C.22 gezeigt, replizierten die meisten der p6*cs-Mutanten in beiden Zelllinien zu ähnlich hohen Titern wie das Wildtyp-Virus (Abbildung C.22 A und B, jeweils roter Kreis) und erreichten ein Maximum zwischen Tag 10 und 12 nach Transfektion, wonach die Virusproduktion mit dem Absterben der Kulturen wieder sank. Bei diesen p6*cs-Mutanten führte also die jeweilige Mutation zu keinerlei Einschränkung der viralen Replikationsfähigkeit. Im Gegensatz dazu war die Replikation der csM1-Variante in beiden Zellsystemen stets um zwei bis vier Tage zum Wildtyp verzögert (Abbildung C. 22 A und B, oranger Kreis) und erreichte durchschnittlich etwas geringere Titer als der Wildtyp und die p6*cs-Varianten csM2 (hellgrünes Dreieck), csM3 (dunkelgrünes Dreieck), csM5 (blaues Rechteck) und csM6 (violette Karo). Bei den beiden C-terminalen Varianten csM4 und csM7 konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum von 30 Tagen weder in MT-4 noch in CEM-4 Zellen eine produktive Replikation nachgewiesen werden (Abbildung C.22 A und B, jeweils türkises Rechteck und rotes Karo). Somit scheinen die Austausch der Varianten csM4 und csM7 am C-Terminus von p6* letal für die resultierenden Viren zu sein.

Im Fall der Mutante csM1 wurde zudem in einem Langzeitkultur-Experiment überprüft, ob der verzögerten Replikation dieser Viren eine Reversion der N-terminalen Punktmutation zugrunde lag. Hierfür wurden das Wildtyp-Provirus HX10 und mehrere DNA-Präparationen der Provirusmutante HX/p6*csM1 parallel in permissive CEM-4-Lymphozyten transfiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach

Transfektion wurde dann der *gag*-Bereich aus der viralen, ins zelluläre Genom integrierten DNA durch Sequenzierung auf Mutationen bzw. Reversionen hin überprüft. Auf diese Weise wurden 20 verschiedene *gag*-Sequenzen aus unabhängigen Transfektionen untersucht. In keiner dieser Sequenzen war eine Reversion der N-terminalen Punktmutation von p6* oder eine auffällige Sekundärmutation nachweisbar, was darauf hindeutet, dass die Mutation selbst eine Verzögerung der Replikationskinetik dieser Viren bewirkte.

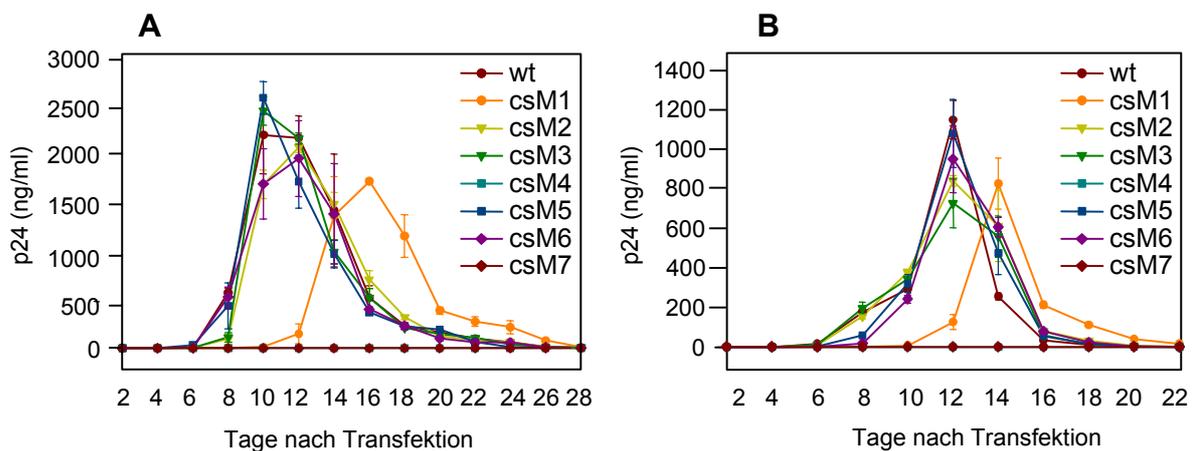


Abbildung C.22: Replikationskinetik der p6*cs-Mutanten in humanen CD4-positiven Lymphozyten. MT-4 (A) und CEM-4 Zellen (B) wurden, wie unter B.3.2 beschrieben, in Duplikaten mit dem Wildtyp-Provirus HX10 und mit den p6*cs-Mutanten HX/p6*csM1-csM7 transfiziert. Die Kulturen wurden alle 48 h mit einem Volumen Medium verdünnt. Gleichzeitig wurden Proben der Kulturüberstände entnommen und die Menge an Capsidantigen bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist für jeden Zeitpunkt angegeben.

C.5.4.2 Infektiosität der p6*-Mutanten im Magi-Assay

Dem sogenannten Magi-Assay („multinuclear activation of a galactosidase indicator“) liegt ein monozyklischer Replikationstest zugrunde, mit dessen Hilfe die Infektiosität von Viren überprüft werden kann. Dabei wird nach Infektion CD4-positiver HeLa Zellen ein endogenes β -Galactosidase-Gen induziert, das unter der Kontrolle eines LTR-Promotors steht. Infizierte Zellen werden sodann durch Anfärbung der Nuklei sichtbar. Um also die Infektiosität der p6*cs-Mutanten in diesem System mit der von Wildtyp-Viren zu vergleichen, wurden die Kulturüberstände von H1299 Zellen, die 48 h vorher mit den Konstrukten HX10 und HX/p6*csM1-csM7 transient transfiziert worden waren, in seriellen Verdünnungen auf Magi Zellen gegeben und die infektiösen Titer nach weiteren 48 h im Magi-Assay bestimmt. Um die infektiösen Einheiten quantifizieren zu können, wurde zunächst der Gesamtcapsidprotein-Gehalt der Kulturüberstände im p24-ELISA gemessen. Zusätzlich wurden die Viruspartikel aus den Überständen durch ein 20%iges Saccharosekissen aufkonzentriert, um nicht-partikuläres Capsidantigen von partikulärem abzutrennen. Die gereinigten Partikel wurden sodann mit rekombinanter HIV-1 PR nachprozessiert, um auch unprozessiertes p24 in Gag-Vorläufern zu erfassen, das vom p24-Antikörper des verwendeten ELISA-Formats schlechter erkannt wird als die mature Form. Abbildung C.23 zeigt die Menge an Gesamtcapsidantigen in Kulturüberständen transfizierter

H1299 Zellen (weiße Säule) sowie die Menge an Partikel-assoziiertem Capsidantigen vor (graue Säule) und nach (schwarze Säule) Behandlung mit rekombinanter HIV-1 Protease. Bei mehreren unabhängig durchgeführten Experimenten fiel zunächst auf, dass die Capsidantigen-Menge in Kulturüberständen abhängig von der Qualität der proviralen DNA und der Transfektionseffizienz bei allen Konstrukten schwankte. Somit handelt es sich bei Abbildung C.23 nicht um eine repräsentative Darstellung. Im Durchschnitt lieferten jedoch Transfektionen mit HX10 und den Mutanten HX/p6*csM2, csM5 und csM6 stets ähnliche Titer an Gesamtcapsidantigen im Medium (C.23, jeweils weiße Säule). Vergleichsweise führten Transfektionen mit HX/p6*csM1 und csM3 zu einer leicht reduzierten - und mit den Konstrukten HX/p6*csM4 und csM7 zu einer stark reduzierten p24-Produktion. Die Nachbehandlung von partikulärem Gag mit rekombinanter PR führte sowohl bei Wildtyp-Viren als auch bei den Mutanten csM2, csM3, csM5 und csM6 zu keinem bemerkenswerten Anstieg der Capsidantigen-Mengen (Abbildung C. 21, jeweils im Vergleich graue und schwarze Säule). Somit war in diesen Viren nach Freisetzung ins Medium bereits überwiegend matures p24 vorhanden. Dahingegen führte eine Nachprozessierung bei den Virusmutanten csM1, csM4 und csM7 zu einem deutlichen Anstieg des Capsidantigengehalts im ELISA. In diesen Partikeln wird offensichtlich der vollständige Umsatz des p24 Proteins aus dem Gag-Vorläufer verhindert. Im Fall von csM4 scheint allerdings in dem der Abbildung zugrunde liegenden Experiment die Nachprozessierung mit PR nicht funktioniert zu haben (schwarze Säule).

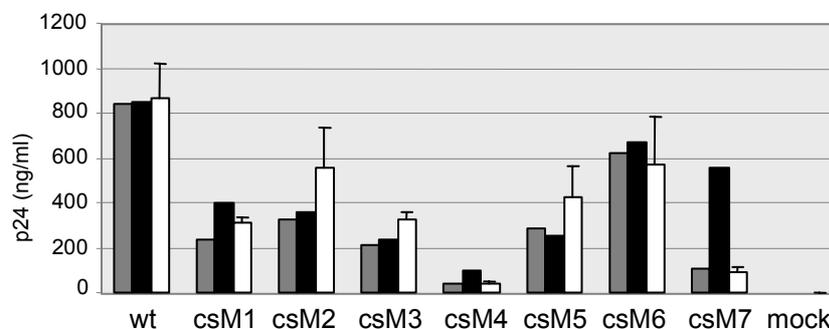


Abbildung C.23: Analyse des Gesamtcapsidantigens in Kulturüberständen von H1299 Zellen nach transients Transfektion mit HX10 und den p6*cs-Provirusmutanten. H1299 Zellen wurden, wie in B.3.2 beschrieben, mit HX10 bzw. HX/p6*csM1-csM7 transfiziert. Virushaltige Kulturüberstände wurden 48 h *post transfectionem* geerntet und die jeweils enthaltene Menge an Capsidantigen, wie in B.4.1 beschrieben, im p24-ELISA quantifiziert (weiße Säule). Zur Abtrennung nicht-partikulären Capsidantigens wurden die Viren durch ein 20%iges Saccharosekissen aufkonzentriert. Sodann wurde die Hälfte der Partikelpräparation, wie in B.2.3.3 beschrieben, mit rekombinanter PR nachprozessiert (schwarze Säule) und zusammen mit unbehandelten Partikeln (graue Säule) in den p24-ELISA eingesetzt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Transfektionen, die mit zwei unterschiedlichen DNA-Präparationen durchgeführt wurden. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist für das Gesamtcapsidantigen im Überstand angegeben.

Bei Titration der infektiösen Kulturüberstände auf Magi Zellen lieferten Überstände aus Transfektionen von H1299 Zellen mit HX10 und den p6*-Mutanten csM2, csM5 und csM6 in etwa gleiche Mengen blauer Zellen pro 100 ng Capsidantigen

(Abbildung C.24). Im Gegensatz dazu war der infektiöse Titer bei der Mutante csM1 im Vergleich zum Wildtyp um die Hälfte reduziert, während bei der Mutante csM3 die doppelte Menge infizierter Zellen pro 100 ng Capsidantigen gezählt wurde. Dies zeigt, dass ins Kulturmedium abgegebene csM1-Viren deutlich weniger infektiös sind als Wildtyp-Viren, was bereits aus der Replikationskinetik in Lymphozyten hervorging (Abbildung C.22). Dagegen scheint im Falle der csM3-Variante eine höhere Infektiosität vorzuliegen. Zwar wurden weniger csM3-Viren als Wildtyp-Viren ins Kulturmedium abgegeben (Abbildung C.23), diese führten aber im Magi-Assay zu deutlich höheren Infektionsraten (Abbildung C.24). In der Replikationskinetik verhielt sich diese Mutante allerdings ähnlich wie der Wildtyp (Abbildung C.22 A und B, jeweils grünes Dreieck). In Übereinstimmung mit den Replikationsdaten in T-Lymphozyten war die Infektiosität der p6*-Mutanten csM4 und csM7 im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert.

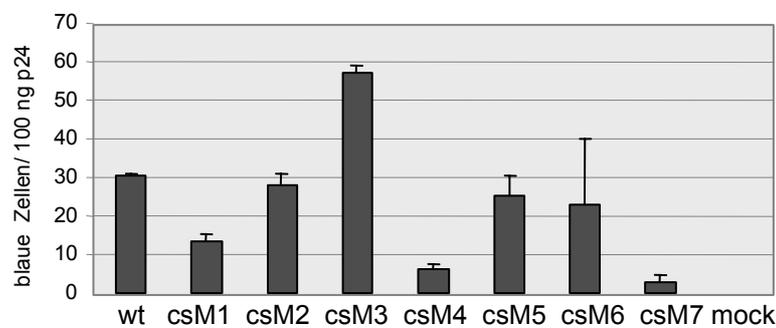


Abbildung C.24: Infektiosität der Virusmutanten auf Magi Zellen im Vergleich zum Wildtyp. H1299 Zellen wurden, wie in B.3.2 beschrieben, mit HX10 und den p6*-Provirusmutanten transfiziert. Virushaltige Kulturüberstände wurden 48 h *post transfectionem* geerntet und wie in B.3.3 beschrieben, in seriellen Verdünnungen in Duplikaten auf Magi Zellen gegeben. 48 h *post infectionem* wurden die Indikatorzellen fixiert und die angefärbten Zellkerne unter dem Mikroskop ausgezählt. Nach Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors wurde die Anzahl blauer Zellen der Parallelansätze gemittelt und auf die vorher im ELISA quantifizierte Menge an Capsidantigen in den Kulturüberständen (Abbildung C.23) bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die mit zwei unterschiedlichen DNA-Präparationen durchgeführt wurden. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist angegeben.

C.5.5 Zusammenfassung:

Im Laufe der viralen Replikation wird das „transframe“ Protein p6* aus dem Gag-Pol-Vorläufer durch die HIV-1 PR herausgespalten. Während die C-terminale Prozessierung von p6* für eine vollständige Aktivierung der PR und die Entstehung infektiöser Viren absolut essentiell ist, wird die Bedeutung der N-terminalen und internen Spaltung von p6* weiterhin konträr diskutiert. Um die biologische Funktion der PR-vermittelten Prozessierung von p6* bei der Virusreifung zu untersuchen, wurden rekombinante Proviren mit Mutationen in den drei PR-Spaltstellen von p6* hergestellt. Dabei sollten gezielte Aminosäureaustausche in den PR-Erkennungssequenzen die natürliche Kinetik der Spaltungen verändern, ohne jedoch funktionelle Bereiche des überlappenden *gag*-Leserahmens zu zerstören.

Um veränderte Spaltkinetiken *in vitro* zu charakterisieren, wurden die modifizierten Spaltstellen in Form synthetischer Decapeptide zunächst durch rekombinante PR gespalten. Dabei zeigte sich, dass die Mutationen zwar die ursprünglichen N-terminalen und internen Spaltstellen zerstört hatten, aber stattdessen alternative Erkennungssequenzen von der PR genutzt wurden. Im Falle der N-terminalen Spaltstelle führte dies zu einer drastischen Erhöhung der Hydrolyserate im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz. Im Gegensatz dazu wurde die Hydrolyserate der internen Spaltstelle durch die Modifikationen stark reduziert, was auch in einem Spaltexperiment mit Volllänge-p6* Varianten bestätigt wurde. Modifikationen der C-terminalen Spaltstelle lieferten hingegen unterschiedliche Resultate. So wurden nur zwei der vier Peptide von der PR hydrolysiert, wobei die Prozessierung im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz verlangsamt ablief.

Daraufhin wurde ein spektrophotometrischer PR-Aktivitätstest etabliert, um den Einfluss dieser C-terminalen p6*-Modifikationen auf die Aktivität maturer HIV-1 PR zu untersuchen. In diesem Test bewirkten die Austausch der C-terminalen „halfsite“ in den Varianten p6*csM5 und p6*csM6 sogar eine stärkere konzentrationsabhängige Inhibition der PR als das Wildtyp-Protein.

Da sich Mutationen der N-terminalen und internen PR-Spaltstellen mit den *cis*-aktiven Elementen für den Leserastersprung überlagerten, wurde die Funktionalität des Leserastersprungs in einem „frameshift“-Luciferasereporterassay überprüft. Dabei zeigte sich, dass keine der eingeführten Mutationen zu einer signifikanten Veränderung des Leserastersprungs führte.

Schließlich wurden Replikationsstudien mit den rekombinanten Proviren in verschiedenen Zellkultursystemen durchgeführt, um den Einfluss der Mutationen auf die Expression und Stabilität viraler Proteine als auch auf die Maturation und Infektiosität von freigesetzten Viruspartikeln zu analysieren. Dabei konnten wir keine Auswirkung von Modifikationen der internen PR-Spaltstelle von p6* auf die Infektiosität der resultierenden Viruspartikel feststellen. Allerdings bleibt unklar, ob diese Mutation im viralen Kontext tatsächlich zu einer Veränderung der Spaltkinetik als auch der Lokalisation der Spaltstelle führte.

Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, lieferten Mutationen in der C-terminalen „halfsite“ von p6*, die eine N-terminale Freisetzung der PR verhinderten, ausschließlich nicht-infektiöse Viren. Dahingegen zeigten Mutanten mit C-terminalen p6*-Modifikationen, die eine Prozessierung durch die PR erlaubten, unveränderte Prozessierungsmuster viraler Proteine und verhielten sich in Infektionsstudien wie der Wildtyp. Somit scheint die Beschaffenheit der vier C-terminalen Aminosäurereste nach Freisetzung durch die PR keine wesentliche Rolle mehr für eine weitere Regulation zu spielen. Lediglich die Mutante mit der N-terminalen Modifikation zeigte trotz unveränderter „frameshift“-Raten eine verlangsamte Replikation in permissiven Lymphozyten und wies ein ungewöhnliches p7-Prozessierungsmuster auf. Dies lässt vermuten, dass die eingeführte Mutation zu einer Verlangsamung der Prozessierung zwischen p7 und p1 führt, was in einer verminderten Infektiosität dieser Viren resultiert. Inwieweit die drastische Veränderung der Spaltkinetik am N-Terminus von p6* zu diesem Phänotyp beiträgt, bleibt zu klären.

C.6 Herstellung von synthetischen HI-viralen Genen zur Untersuchung des Einflusses von p6* auf die Protease-Aktivität in Zellkultur

C.6.1 Gesamtkonzept

In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Experimente haben erstmals eindeutig gezeigt, dass das „transframe“-Protein p6* in der Lage ist, *in vitro* die Aktivität der viralen PR zu inhibieren. Trotz umfassender Charakterisierungsmöglichkeiten von p6*-Modifikationen bleibt im komplexen viralen Kontext die Frage nach der direkten Interaktion zwischen p6* und der PR unbeantwortet. Daher scheint die Etablierung eines reduktionistischen Zellkultursystems sinnvoll, in dem der Einfluss von p6* auf die PR-Aktivität unabhängig von potentiell modulierenden viralen Komponenten betrachtet werden kann. Zu diesem Zweck sollten zunächst verschiedene Plasmidkonstrukte hergestellt werden, die auf der Basis synthetischer Gene eine effiziente Expression der zu untersuchenden PR- und p6*-Proteine in Säugerzellen erlauben. Anschließend sollten Nachweisverfahren etabliert werden, die eine quantitative Bestimmung der PR-Aktivität und Zytotoxizität in Zellkultur zulassen. Mit Hilfe dieser Testsysteme soll dann in transienten Kotransfektionsexperimenten der modulierende Einfluss von p6* auf die PR untersucht werden. Desweiteren sollten Expressionskonstrukte generiert werden, mit deren Hilfe der Einfluss von p6* auf die PR auch in virusinfizierten Zellen studiert werden kann. Zum effizienten „targeting“ von p6* an die virale PR sollten Konstrukte, die für verschiedene Vpr-Fusionsproteine kodieren, hergestellt werden, da Vpr während der Replikation an p6Gag bindet und auf diese Weise verschiedene Liganden in die Viruspartikel und somit in die räumliche Nähe der PR dirigieren kann (Selig *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1995).

C.6.2 Herstellung von synthetischen Genen zur Rev-unabhängigen Expression von p6*- und Protease-Proteinen in Säugerzellen

C.6.2.1 Ausgangsüberlegungen

Da die HI-virale PR und p6* im *pol*-Leserahmen kodiert werden (Abbildung A.3), ist deren Expression im viralen Replikationszyklus an die Anwesenheit des posttranskriptionellen Aktivators Rev geknüpft (Feinberg *et al.*, 1986; Sodroski *et al.*, 1986). In Abwesenheit von Rev führen sogenannte „*cis* reacting sequences“ (CRS) in den einfach- und ungespleißten RNAs zur Destabilisierung und Degradation dieser Transkripte im Zellkern. Dieser negative Effekt der CRS-Sequenzen kann durch die Wirkung des Rev-Proteins überwunden werden, indem es an das „rev responsive element“ (RRE) innerhalb einfach und ungespleißter RNAs bindet und so deren Export aus dem Zellkern ermöglicht (Hadzopoulou *et al.*, 1989). Statt des Einbringens eines RRE-Systems besteht auch die Möglichkeit, durch das Modifizieren der Gene die Wirkung von CRS-Sequenzen auf DNA-Ebene auszuschalten und so eine Rev-unabhängige Expression zu erreichen (Schneider *et al.*, 1997). Zusätzlich erhöht allein die Anpassung viraler Gensequenzen an die Kodonverwendung in Säugerzellen in der

Regel die Fremdproteinausbeuten. Inhibierende CRS-Sequenzen wurden bisher sowohl im *gag*-Leserahmen (Schwartz *et al.*, 1992) als auch in *pol* (Cochrane *et al.*, 1991; Maldarelli *et al.*, 1991; Olsen *et al.*, 1992; Luukkonen *et al.*, 1995) und *env* (Rosen *et al.*, 1988; Keller *et al.*, 1993; Nasioulas *et al.*, 1994) lokalisiert. Auch in der PR-kodierenden Region wurden CRS-Sequenzen identifiziert, die in beiden Orientierungen des Leserahmens aktiv sind (Huffman *et al.*, 1997). Über die Anwesenheit von CRS-Sequenzen in der p6*-kodierenden Region ist bisher nichts bekannt. Allerdings blieben alle bisher durchgeführten Versuche die p6*-Wildtyp-Sequenz in Abwesenheit von Rev/RRE in Säugerzellen zu exprimieren, erfolglos (C. Paulus, persönliche Mitteilung). Basierend auf diesen Überlegungen wurden zunächst synthetische Gene hergestellt, die eine gute, Rev-unabhängige Expression verschiedener p6*- und PR-Proteine in Säugerzellen ermöglichen sollten.

C.6.2.2 Herstellung der synthetischen HI-viralen Gene

Ausgehend von den p6*, PR- und Vpr-kodierenden Sequenzen des HIV-1 Isolats BH10 wurden mit Hilfe des GCG-Programms unterschiedliche Varianten der Proteine auf DNA-Ebene entworfen. Da die HIV-1 PR und p6* normalerweise als Fusionsvorläufer exprimiert werden und deren Gensequenzen somit keine natürlichen Start- und Stoppkodons enthalten, wurde den Konstrukten das Startkodon ATG vor die kodierende Sequenz gesetzt, um eine von anderen Genprodukten unabhängige Expression zu ermöglichen. Ebenso wurden für einen effizienten Translationsstopp die Stoppkodons TAA und TAG als Doppelstopp-Signale an die kodierenden Sequenzen angefügt. Ferner wurde die Sequenzumgebung des Initiationskodons unter Beachtung der *Kozak*-Sequenz optimiert. Schließlich wurden die gesamten Sequenzen an die Kodonverwendung von Säugerzellen adaptiert. Dabei führte die Modifizierung der Wildtyp-Sequenzen zu einer Erhöhung des GC-Gehalts. So wurde dieser im Falle der PR von 38,7% auf 65%, bei p6* von 51,5% auf 66,7% und bei Vpr von 44,3% auf 65% erhöht.

Für umfassende Studien in Zellkultur wurden auf diese Weise drei unterschiedliche Varianten der PR entworfen: Eine Wildtyp HIV-1 PR (synPR, A in C.25), eine funktionsdefekte PR (synPR⁻, B in C.25), bei der Asp₂₅ im aktiven Zentrum durch Asn ersetzt wurde und ein kovalentes PR-Dimer (synPR-PR, C in C.25), bei dem zwei PR-Monomere über einen flexiblen Linker in N→C - N→C-Orientierung fusioniert sind.

Ebenso wurden zwei verschiedene p6*-Proteine auf DNA-Ebene entworfen. Im ersten Fall wird p6* in Analogie zu synPR direkt unter Kontrolle einer CMV-Promotor/Enhancer-Einheit exprimiert (synp6*, D in C.25). Im zweiten Fall sollte das synthetische p6*-Gen an EGFP fusioniert werden (EGFP-synp6*, E in C.25). Zum einen vermag der EGFP-Fusionspartner das kleine p6*-Protein vor Degradation zu schützen und zum anderen erlaubt der Fusionsanteil einen distinkten Nachweis von gekoppelten Proteinen durch Immunfluoreszenz oder Western Blot-Analyse mit GFP-spezifischen Antikörpern. Um dem p6*-Anteil des EGFP-Fusionskonstruktes freie Faltung und uneingeschränkte Wechselwirkung mit einem potentiellen Reaktionspartner zu ermöglichen, wurde am 5'-Ende der p6*-Sequenz eine Linkersequenz angebracht.

Um p6* nach Kotransfektion mit proviraler DNA effizient in reife Viruspartikel einzuschleusen, sollte ein Vpr-p6* Expressionskonstrukt hergestellt werden. Da Vpr einen Zellzyklus-Arrest in der G₂-Phase induziert (Zhou *et al.*, 1998) und auf diesem Weg Apoptose einleitet (Stewart *et al.*, 1997), wurde für Zellkulturstudien eine C-terminal verkürzte Vpr-Variante (78 statt 96 Aminosäuren) als Vorlage für die Herstellung eines synthetischen Gens verwendet, da gezeigt werden konnte, dass durch Austausch eines Arginins im C-Terminus des Proteins dessen Fähigkeit zum Zellzyklus-Arrest verlorenght, ohne die Verpackung in Viruspartikel zu beeinträchtigen (Di Marzio *et al.*, 1995). Dabei wurde zunächst ein kodonadaptiertes synVpr-Gen (F in C.24) für die Rev-unabhängige Expression in Zellkultur generiert. Zusätzlich wurde eine Variante des synVpr-Gens ohne Stoppkodon entworfen (synVpr(pre), nicht gezeigt), an die das synp6*-Gen (synVpr-synp6*, G in C.25) sowie als Kontrollen die Gene für die funktionsdefiziente PR (synVpr-synPR⁻, H in C.24) und für EGFP (synVpr-EGFP, I in C.25) fusioniert wurden. Um eine uneingeschränkte Faltung der Proteine zu gewährleisten, wurde das synVpr-Gen am 3'-Ende mit einem flexiblen Linker ausgestattet.

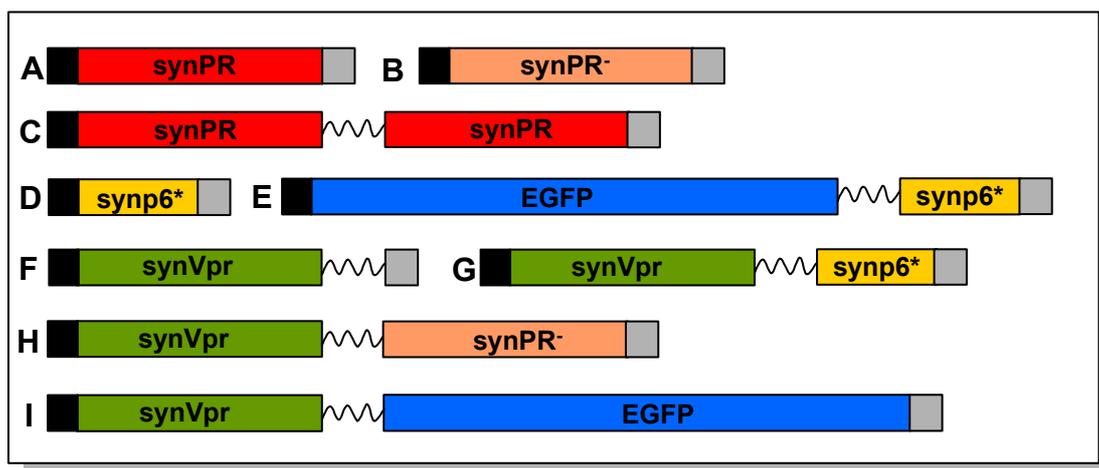


Abbildung C.25: Synthetische Gene für die Rev-unabhängige Expression in Säugerzellen. Die Konstruktion aller synthetischen Gene erfolgte, wie in B.1.3.4 beschrieben, durch sukzessive Verlängerung von geeigneten Oligonukleotiden in aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen. Startkodons sind dunkelgrau und Stoppkodons hellgrau gekennzeichnet. Die Linkersequenz ist durch eine Verbindungslinie dargestellt. Mit Ausnahme des EGFP-synp6* Gens (E), das unter Kontrolle des SV40-Promotors exprimiert wird, stehen alle Gene unter Kontrolle einer CMV-Promotor/Enhancer-Einheit.

C.6.3 Etablierung eines Protease-Aktivitätstests in Zellkultur

C.6.3.1 Expression der Protease-Varianten in Zellkultur

Als Voraussetzung für die Etablierung eines PR-Aktivitätstests in Zellkultur wurde zunächst die Rev-unabhängige Expression der synthetischen PR-Gene durch transiente Transfektion von H1299 Zellen mit den entsprechenden Konstrukten überprüft. Dazu wurden die Zellen mit ansteigenden Mengen der Konstrukte pcDNA3/synPR, pcDNA3/synPR⁻ und pcDNA3/synPR-PR transfiziert und nach 48 h mit einem PR-

spezifischen Antiserum im Western Blot analysiert. Dabei konnte in Zellen, welche mit dem Expressionskonstrukt für die funktionelle PR transfiziert worden waren, auch bei hohen Plasmidkonzentrationen keine PR-Expression nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu war in Zellen, die mit synPR⁻ transfiziert worden waren (Abbildung C.26, A), ab einer Plasmidmenge von 2 µg ein Protein von ca. 11-kDa nachweisbar, was dem errechneten Molekulargewicht der HIV-1 PR entspricht. Eine nachweisbare Expression der funktionellen PR als auch des PR-Dimers konnte schließlich nur in Anwesenheit des PR-Inhibitors Saquinavir (Ro 31-8959) erzielt werden (Abbildung C.26, B). Dies legt nahe, dass die pcDNA3/synPR und synPR-PR Konstrukte funktionell sind und ein fehlender Nachweis dieser aktiven PR-Varianten in Abwesenheit eines Inhibitors vermutlich auf deren zellschädigende Wirkung zurückzuführen ist. Da die Dimerbande jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war als die der funktionellen PR (Abbildung C.26 B, Spuren 2 und 3), scheint die eingesetzte Saquinavir-Konzentration von 1 µM nicht ausreichend gewesen zu sein, um die verstärkte zytotoxische Wirkung des kovalenten PR-Dimers vollständig zu inhibieren.

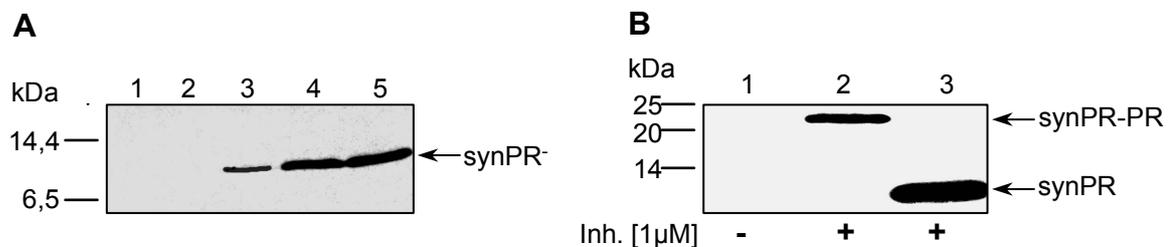


Abbildung C.26: Expression von funktioneller PR, funktionsdefizienter PR und PR-Dimer in Säugerzellen. H1299 Zellen wurden, wie unter B.3.2 beschrieben, mit den Konstrukten pcDNA3/synPR⁻ (Spuren 1 bis 5 in A), pcDNA3/synPR (Spur 3 in B) und pcDNA3/synPR-PR (Spuren 1 und 2 in B) transfiziert und 48 h nach Transfektion geerntet. Je 100 µg der Zelllysate wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) aufgetrennt und im Western Blot mit dem PR-spezifischen Antiserum ARP 413 durch Detektion über Chemilumineszenz nachgewiesen. A: konzentrationsabhängige Expression der funktionsdefizienten PR (Spur 1: 0,5 µg, Spur 2: 1 µg, Spur 3: 2 µg, Spur 4: 4 µg, Spur 5: 8 µg pcDNA3/synPR⁻). B: Inhibitorabhängige Expression von funktioneller PR und PR-Dimer (Spur 1: 10 µg pcDNA3/synPR-PR, Spur 2: wie Spur 1 + 1 µM Ro 31-8959, Spur 3: 10 µg pcDNA3/synPR + 1 µM Ro 31-8959). Die Positionen der Markerproteine sind links angegeben. Relevante PR-Banden sind durch Pfeile markiert.

C.6.3.2 Quantifizierung der Protease-vermittelten Zytotoxizität durch Koftransfektion eines Reporterplasmids

Nachdem die Expression der verschiedenen PR-Varianten nachgewiesen worden war, sollte ein möglichst quantitatives Nachweisverfahren etabliert werden, mit dessen Hilfe der modulierende Einfluss von p6* auf die HIV-1 PR in Zellkultur untersucht werden kann. Da die Aktivität der PR offensichtlich einen stark zellschädigenden Effekt auf transfizierte Zellen hat, sollte sich dies auch in der verminderten Expression eines koftransfizierten Reporterplasmids äußern. Um dies zu überprüfen, wurden H1299 Zellen mit dem Luciferase-Reporterplasmid pGL2-*Control* und verschiedenen PR-Expressionskonstrukten in An- und Abwesenheit von Saquinavir transfiziert und die Luciferaseaktivität 48 h später aus den Zelllysaten quantifiziert. Erwartungsgemäß war

die Luciferaseaktivität in mit pcDNA3/synPR transfizierten Zellen bei Abwesenheit von Inhibitor etwa um den Faktor 10 niedriger (Säule 2 in C.27) als in Transfektanten, die nur das Reporterkonstrukt erhalten hatten (Säule 1 in C.27). Dahingegen war die Luciferaseaktivität in vergleichbaren Zellen, die in Gegenwart von Saquinavir kultiviert worden waren, deutlich höher (Säule 3 in C.27) und erreichte in etwa den Wert von Zellen, die mit dem Konstrukt für funktionsdefiziente PR (Säule 4 in C.27) kotransfiziert worden waren. Insgesamt war die Luciferaseaktivität in allen PR-exprimierenden Zellen niedriger als in Zellen, die nur das Reporterkonstrukt erhalten hatten. Dies ist vermutlich auf eine verminderte Expression des Luciferasegens bei Kotransfektion mehrerer Expressionsplasmide zurückzuführen. Mit dem beschriebenen Verfahren kann also die zytotoxische Wirkung der PR in eukaryontischen Zellen quantitativ erfasst werden und es scheint somit geeignet, um den potentiell regulierenden Einfluss von p6* zu untersuchen.

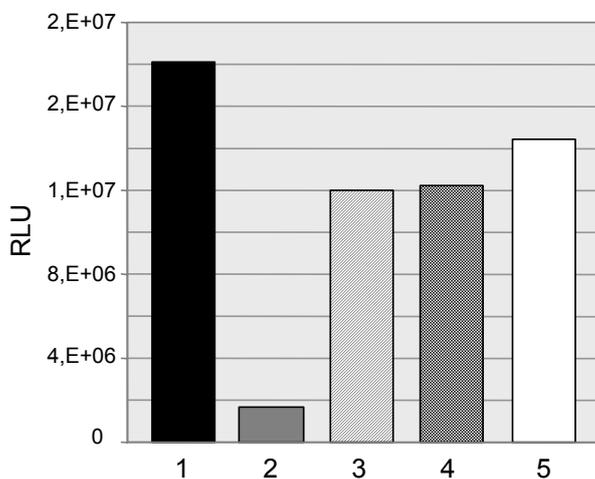


Abbildung C.27: Luciferaseaktivität in PR-exprimierenden Zellen. H1299 Zellen wurden, wie unter B.3.2 beschrieben, mit je 3 µg pGL2-Control und je 5 µg der Konstrukte pcDNA3 (Säule 1), pcDNA3/synPR (Säule 2), pcDNA3/synPR + 1 µM Saquinavir (Säule 3), pcDNA3/synPR⁻ (Säule 4) und pcDNA3/synPR⁻ + 1 µM Saquinavir (Säule 5) kotransfiziert. Die Luciferase-aktivität wurde 48 h nach Transfektion aus den Zelllysaten quantifiziert. Messwerte sind in RLU („relative light units“) angegeben. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente, die mit unterschiedlichen Plasmid-Präparationen durchgeführt wurden.

C.6.3.3 Nachweis der Protease-Aktivität durch Spaltung eines natürlichen Substrats

Eine andere Möglichkeit, die Aktivität der HIV-1 PR in Zellkultur nachzuweisen, besteht in der Kotransfektion eines Rev-unabhängigen Gag-Expressionsplasmids und dem Nachweis von Gag-Spaltprodukten im Western Blot. Hierzu wurden H1299 Zellen mit pcDNA3/syngag (Graf *et al.*, 2000) und verschiedenen PR-Expressionskonstrukten in An- und Abwesenheit von Saquinavir transfiziert. Die Zelllysate wurden anschließend im Western Blot mit einem Gemisch aus PR- und CA-spezifischen Antiseren analysiert. In Anwesenheit funktioneller PR ohne Zusatz von Saquinavir wurde das 24-kDa CA-Protein detektiert, was auf eine fast vollständige Prozessierung des 55-kDa Gag-Vorläufers durch die PR schließen lässt (Abbildung C.28, Spur 2). Der Nachweis funktioneller PR war wiederum nur in Anwesenheit von Saquinavir möglich, wobei die Prozessierung von Gag aufgrund der inhibierten PR-Aktivität in diesen Zellen unvollständig war (Abbildung C.28, Spur 3). Bei der 41-kDa Bande handelt es sich vermutlich um das Prozessierungsintermediat MA-CA-p2. In Zellen, die die funktionsdefiziente PR-Form exprimierten, waren erwartungsgemäß

keinerlei Gag-Spaltprodukte nachweisbar (Abbildung C.28, Spur 4). Somit scheint dieses System geeignet, um den Einfluss von p6* auf die PR-vermittelte Spaltung eines natürlichen Substrats *in vivo* zu untersuchen.

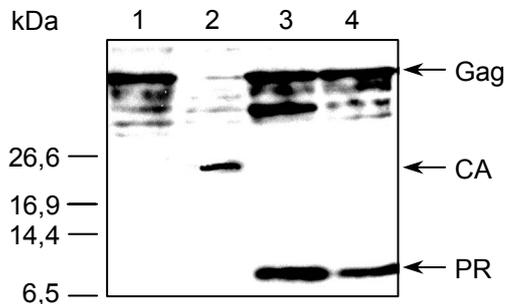


Abbildung C.28: PR-Aktivitätsnachweis durch Spaltung des Gag-Vorläufers. H1299 Zellen wurden, wie in B.3.2 beschrieben, mit je 5 µg des Gag-Expressionsplasmids pcDNA3/synGag sowie mit je 5 µg der Konstrukte pcDNA3 (Spur 1), pcDNA3/synPR (Spur 2), pcDNA3/synPR + 1µM Saquinavir (Spur 3) und pcDNA3/synPR⁻ (Spur 4) kotransfiziert. 48 h *post transfectionem* wurden je 100 µg der Zelllysate über ein 16%iges SDS-Polyacrylamidgel (Schägger & von

Jagow, 1987) aufgetrennt und im Western Blot mit dem PR-spezifischen Antiserum ARP 413 sowie mit dem CA-spezifischen Antikörper 13/5 analysiert. PR- und CA spezifische Banden wurden durch Detektion über Chemilumineszenz nachgewiesen und sind durch Pfeile markiert. Die Positionen der Markerproteine sind links angegeben.

C.6.4 Rev-unabhängige Expression der Vpr-Fusionsproteine in Säugerzellen

Um den Einfluss von p6* bzw. transdominant negativen Fusionsproteinen auf die PR-Aktivität zu studieren, wurden die p6*- und Vpr-Fusionsproteine zunächst in Säugerzellen überexprimiert und mit verschiedenen Antiseren, die gegen die jeweiligen Fusionsdomänen gerichtet waren, im Western Blot nachgewiesen. Abbildung C. 29 A zeigt eine Western Blot-Analyse der Zelllysate 48 h nach Transfektion mit den Vpr- und p6*-Fusionsproteinen, wobei erstmals eine Rev-unabhängige Expression für Vpr (Spur 2 in C.29 A), sowie für die Vpr-Fusionsproteine Vpr-p6* (Spur 3 in C.29 A), Vpr-PR⁻ (Spur 4 in C.29 A) und Vpr-EGFP (Spur 5 in C.29 A) mit einem Vpr-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnte.

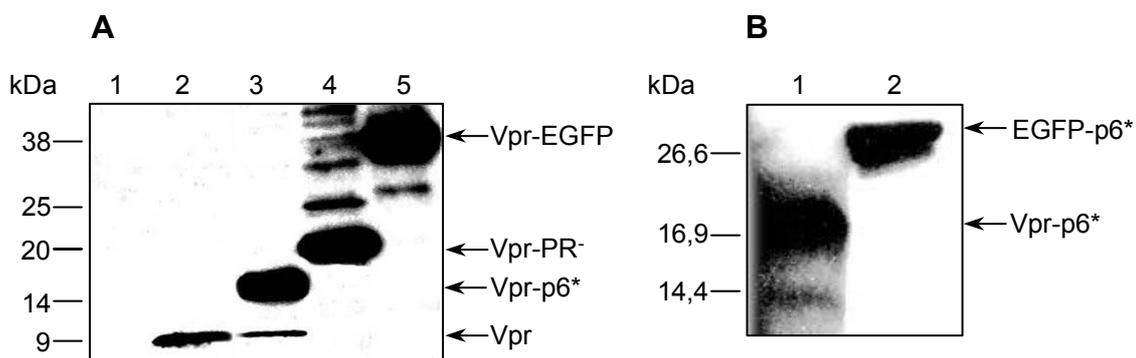


Abbildung C.29: Expression der Vpr- und p6*-Fusionsproteine in Säugerzellen. H1299 Zellen wurden, wie unter B.3.2 beschrieben, mit den Konstrukten pcDNA3 (Spur 1 in A), pcDNA3/synVpr (Spur 2 in A), pcDNA3/synVpr-synp6* (Spur 3 in A und Spur 1 in B), pcDNA3/synVpr-synPR⁻ (Spur 4 in A) und pcDNA3/synVpr-EGFP (Spur 5 in A) sowie mit pEGFP-synp6* (Spur 2 in B) transfiziert und 48 h nach Transfektion geerntet. Je 100 µg der Zelllysate wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) aufgetrennt und im Western Blot mit einem Vpr- (A), einem p6*- (Spur 1 in B) oder einem GFP-spezifischen Antiserum (Spur 2 in B) durch Detektion über Chemilumineszenz nachgewiesen. Die

Positionen der Markerproteine sind links angegeben. Relevante Vpr- und p6*-Banden sind durch Pfeile markiert.

Des Weiteren konnte die Expression von Vpr-PR⁻ auch mit einem PR-spezifischen Antikörper (nicht gezeigt) und die Expression von Vpr-p6* mit einem polyklonalen p6*-spezifischen Antikörper (Spur 1 in C.29 B) verifiziert werden. Die Expression des Fusionsproteins EGFP-p6* wurde mit einem GFP-spezifischen Antikörper nachgewiesen (Spur 2 in C.29 B). Überraschender Weise war es nicht möglich, das p6*-Protein nach Transfektion von H1299 Zellen mit dem Konstrukt pcDNA3/synp6* in Zelllysaten zu detektieren (nicht gezeigt). Möglicherweise ist dies auf Degradation des kleinen, unabhängig exprimierten p6*-Proteins durch zelluläre Proteasen zurückzuführen. Dahingegen scheint in den Proteinen Vpr-p6* und EGFP-p6* der jeweilige Fusionspartner das labile p6* weitgehend zu stabilisieren. Allerdings waren nach Überexpression der Fusionsproteine Vpr-p6* und EGFP-p6* stets auch geringe Mengen Vpr (Spur 3 in C.29 A) bzw. EGFP (Spur 2 in C.29 B) in den Zelllysaten vorhanden, was auch hier auf einen partiellen Abbau des p6*-Anteils hindeutet.

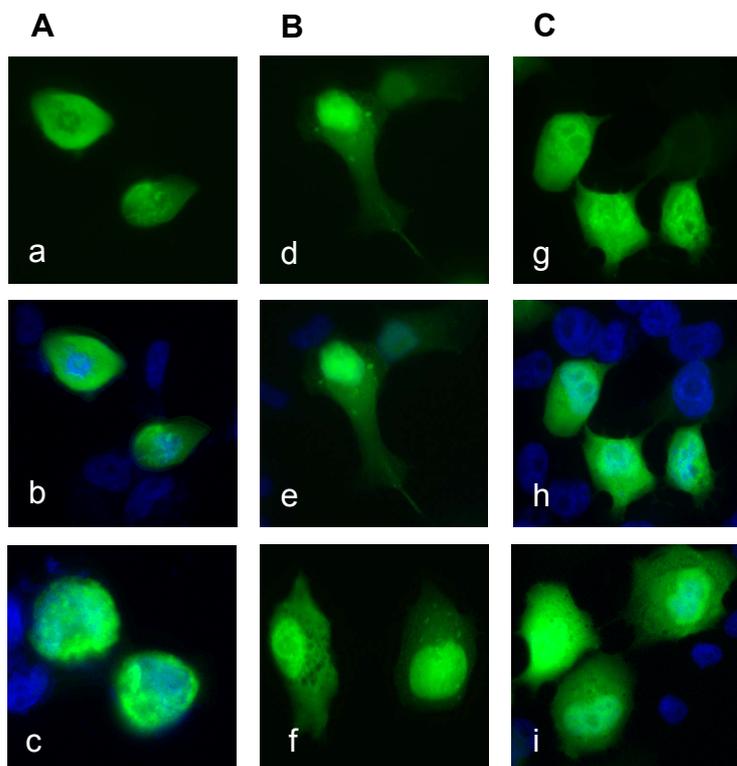


Abbildung C.30: Fluoreszenzanalyse der Expression von EGFP-Fusionsproteinen in H1299 Zellen. Die Zellen wurden, wie in B.3.2 beschrieben, mit 5 µg der Konstrukte pEGFP-C1 (A), pcDNA3/synVpr-EGFP (B) und pEGFP-synp6* (C) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen, wie unter B.4.4 beschrieben, für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert. In den Teilabbildungen b, e und h wurde zur Verdeutlichung die GFP-Fluoreszenz aus den Abbildungen a, d und g mit der unspezifischen Dapi-Färbung der Zellkerne überlagert. Die Teilabbildungen c, f und i zeigen jeweils andere Ausschnitte.

Schließlich ermöglichte der autofluoreszierende EGFP-Anteil einen Nachweis der Fusionsproteine EGFP-p6* und Vpr-EGFP über Fluoreszenzmikroskopie der transfizierten Zellen. Abbildung C.30 zeigt fluoreszierende H1299 Zellen 48 h nach Transfektion mit den Konstrukten pEGFP-C1 (C.30 A), pcDNA3/synVpr-EGFP (C.30 B) und pEGFP-synp6* (C.30 C). Während EGFP aufgrund passiver Diffusion in den Zellkern eine gleichmäßige zelluläre Verteilung aufwies (a-c in C.29 A), schien sich EGFP-p6* verstärkt um den Zellkern anzureichern (g-i in C.30 C). Dahingegen befand sich Vpr-EGFP überwiegend im Zellkern (d-f in C.30 B). Dies stimmt mit früheren Beobachtungen überein, dass Vpr in Abwesenheit anderer viraler Proteine

hauptsächlich im Nukleus akkumuliert (Lu *et al.*, 1993; Di Marzio *et al.*, 1995; Fouchier *et al.*, 1998). Mit Hilfe der Immunfluoreszenz kann also nicht nur die Expression der EGFP-Fusionsproteine, sondern auch deren intrazelluläre Lokalisierung nachgewiesen werden.

In einem weiteren Ansatz wurden die Vpr-Fusionsproteine konzentrationsabhängig exprimiert, um im Hinblick auf spätere Kotransfektionsexperimente inhibitorische Effekte der transdominant negativen Proteine regulieren zu können. Zudem sollten etwaige zytotoxische Auswirkungen dieser Proteine auf die transfizierten Säugerzellen ausgeschlossen werden. Hierfür wurden H1299 Zellen mit steigenden Mengen der entsprechenden Konstrukte in 6-Napfschalen transfiziert. Achtundvierzig h nach Transfektion wurden die Zellysate im Western Blot mit einem Vpr-spezifischen Antikörper analysiert.

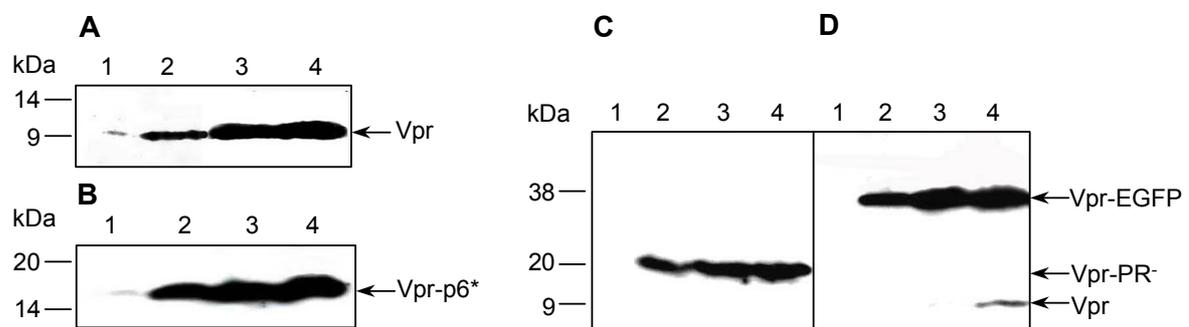


Abbildung C.31: Konzentrationsabhängige Expression von Vpr und Vpr-Fusionsproteinen in Säugerzellen. H1299 Zellen wurden, wie unter B.3.2 beschrieben, mit steigenden Mengen der Konstrukte pcDNA3/synVpr (A), pcDNA3/synVpr-synp6* (B), pcDNA3/synVpr-synPR⁻ (C) und pcDNA3/synVpr-EGFP (D) transfiziert und nach 48 h geerntet. (Spur 1: 1 µg, Spur 2: 2 µg, Spur 3: 4 µg, Spur 4: 8 µg Plasmid). Je 100 µg der Zellysate wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Laemmli, 1970) und im Western Blot mit einem Vpr-spezifischen Antiserum durch Detektion über Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Positionen der Markerproteine sind links angegeben. Relevante Banden sind durch Pfeile markiert.

Wie in Abbildung C.31 gezeigt, konnte für Vpr (A in C.31), Vpr-p6* (B in C.31), Vpr-PR⁻ (C in C.31) sowie für Vpr-EGFP (D in C.31) eine von der transfizierten Plasmidmenge abhängige Expression nachgewiesen werden. Dabei waren die Vpr-Varianten erst ab einer Plasmidmenge von > 1 µg deutlich im Western Blot detektierbar (vgl. jeweils Spuren 1 und 2 in C.31 A-D). Allerdings konnte bei Plasmidmengen > 8 µg im 6-Napfschalenformat keine signifikante Steigerung der Proteinexpression mehr erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Ferner zeigten Zellen, die mit jeweils 15 µg pcDNA3/synVpr-EGFP oder pEGFP-C1 transfiziert worden waren, deutliche zytopathische Effekte (Daten nicht gezeigt). Da sich Zellen, die die entsprechende Menge pcDNA3/synVpr erhalten hatten, diesbezüglich unauffällig verhielten, kann die zytotoxische Wirkung des Fusionskonstrukts auf den EGFP-Anteil zurückgeführt werden. Tatsächlich wurde kürzlich beschrieben, dass die Überexpression von EGFP in Säugerzellen Apoptose induziert (Liu *et al.*, 1999). Somit war eine Titration der Vpr-Fusionsproteine sinnvoll, damit diese zwar in ausreichenden, aber auch für die Zellen verträglichen Mengen gebildet wurden. Für Transfektionen im Petrischalenformat erwiesen sich Plasmidmengen zwischen 20 und

30 µg als optimal für eine effiziente, nicht-toxische Expression der entsprechenden Genprodukte.

C.6.5 Kotransfektionsanalysen

Nachdem verschiedene Nachweisverfahren für die Expression und Funktionalität der PR-, p6*- und Vpr-Proteine in Zellkultur etabliert waren, sollte das inhibitorische Potential der transdominant negativen synthetischen Gene in Bezug auf die Expression und Reifung viraler Proteine in Kotransfektionsexperimenten untersucht werden.

C.6.5.1 Verpackung von Vpr-Fusionsproteinen in Viruspartikel

Um zunächst das „targeting“ von überexprimierten Vpr-Varianten in Viruspartikel zu überprüfen, wurden H1299 Zellen parallel mit den jeweiligen Vpr-Expressionskonstrukten und dem Provirus HX10 kotransfiziert. Sechzig h nach Transfektion wurden die Viren aus den Kulturüberständen durch ein 20%iges Saccharosekissen aufkonzentriert und gereinigt. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Partikel im Western Blot mit einem Vpr-spezifischen Antikörper analysiert. Abbildung C.32 zeigt, dass sowohl Vpr (Abbildung C.32, Spur 3) als auch die transdominant negativen Varianten Vpr-p6* (Abbildung C.32, Spur 5) und Vpr-PR⁻ (Abbildung C.32, Spuren 4) effizient in neu synthetisierte HI-Viruspartikel verpackt wurden. Im Vergleich dazu konnten die geringen Mengen an viruseigenem Vpr in Wildtyp-Partikeln im Western Blot nicht detektiert werden (Abbildung C.32, Spur 2). Diese Ergebnisse bestätigen auch die Befunde anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass *in trans* exprimierte Vpr-Spezies in weitaus effizienterem Maße in HI-virale Partikel verpackt werden als *in cis* exprimiertes Vpr (Singh *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2001).

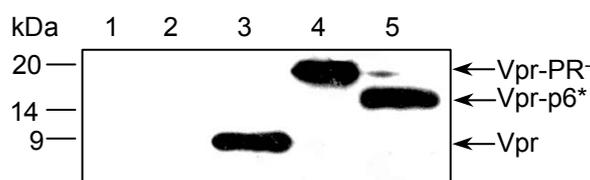


Abbildung C.32: Nachweis der Verpackung von Vpr, Vpr-p6* und Vpr-PR⁻ in Viruspartikel. H1299 Zellen wurden im Petrischalenformat, wie in B.3.2 beschrieben, mit pcDNA3 (Spur 1) bzw. je 10 µg HX10 und 25 µg der Konstrukte pcDNA3.1 (Spur 2),

pcDNA3/synVpr (Spur 3), pcDNA3/synVpr-synp6* (Spur 5) und pcDNA3/synVpr-synPR⁻ (Spur 4) kotransfiziert. Sechzig h *post transfectionem* wurden Viruspartikel aus filtrierten Kulturüberständen durch ein 20%iges Saccharosekissen aufkonzentriert. Nach Auftrennung der viralen Proteine über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) erfolgte der Nachweis der Vpr-Spezies im Western Blot mit einem Vpr-spezifischen Antikörper durch Detektion über Chemilumineszenz. Die Positionen der Markerproteine sind links angegeben. Relevante Vpr-Banden sind durch Pfeile markiert.

C.6.5.2 Einfluss der synthetischen Gene auf die Expression und Reifung viraler Proteine

Um inhibitorische Effekte der transdominant negativen Gene auf die Expression und Reifung viraler Proteine zu charakterisieren, wurden H1299 Zellen mit dem infektiösen Provirusklon HX10 in Ab- oder Anwesenheit von Saquinavir (+) und den synthetischen Genen kotransfiziert. 60 h nach Transfektion wurde das Capsidprotein in den zellfreien Kulturüberständen quantifiziert und die gewonnenen Viruspartikel im Western Blot mit einem CA-spezifischen Antikörper analysiert. Wie aus Abbildung C.33 hervorgeht, hatte die Kotransfektion des Kontrollkonstruktes synVpr keinerlei Einfluss auf die Freisetzung oder Reifung von Viruspartikeln (vgl. 1 und 3 in C.33 A und B). Im Gegensatz dazu wurden aus Zellen, die mit synVpr-synp6* (4 in C.33 A), synVpr-synPR⁻ (5 in C.33 A), synPR⁻ (6 in C.33 A) oder EGFP-synp6* (7 in C.33 A) kotransfiziert worden waren, deutlich weniger Virionen freigesetzt, und Kulturüberstände lieferten ähnliche p24-Titer wie nach Inkubation mit Saquinavir (2 in C.33 A). Allerdings enthielten alle Viruspartikel bereits matures Capsidprotein, woraus abgeleitet werden kann, dass sich die beobachteten inhibitorischen Effekte bereits intrazellulär ereignen und die transdominant negativen Genprodukte vermutlich durch Bindung an virale Komponenten zu einer verminderten Virusfreisetzung führen. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass die nachweislich in Partikel verpackten Fusionsproteine Vpr-PR⁻ (5 in C.33) und Vpr-p6* (4 in C.33) keine bessere inhibitorische Wirkung erzielen konnten als die intrazellulär lokalisierten Varianten PR⁻ (6 in C.33) und EGFP-p6* (7 in C.33). Da die Kotransfektion des Kontrollkonstruktes synVpr keinen Einfluss auf die Virusproduktion hatte, ist davon auszugehen, dass das inhibitorische Potential der Vpr-Varianten auf den jeweiligen Fusionspartner zurückzuführen ist. Generell zeigten Konstrukte, die eine transdominant negative PR exprimieren, eine bessere inhibitorische Wirkung als p6*-Varianten.

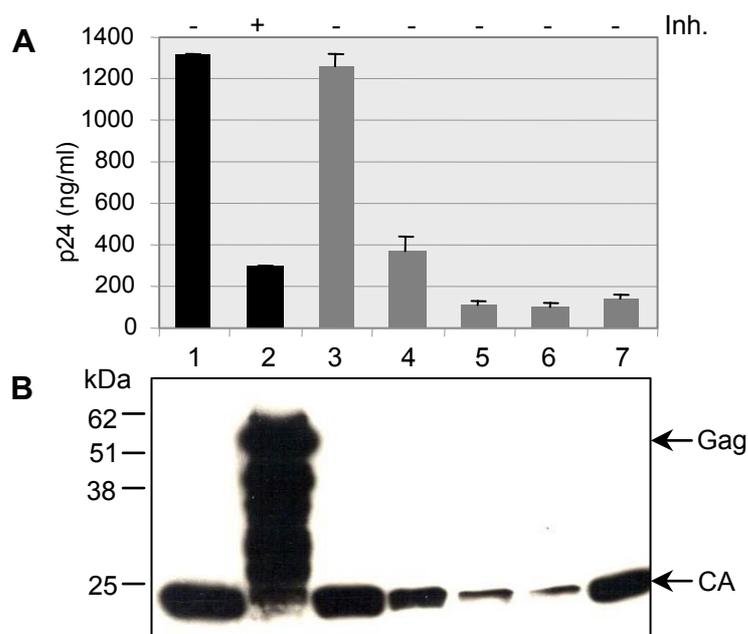


Abbildung C.33: Einfluss der transdominant negativen synthetischen Gene auf die Freisetzung und Reifung von Partikeln nach Kotransfektion mit HX10. H1299 Zellen wurden im Petrischalenformat, wie in B.3.2 beschrieben, mit 10 µg HX10 und 25 µg pcDNA3 (1) bzw. pcDNA3/synVpr (3), pcDNA3/synVpr-synp6* (4), pcDNA3/synVpr-synPR⁻ (5), pcDNA3/synPR⁻ (6) oder pEGFP-synp6* (7) in Anwesenheit (2, +) oder Abwesenheit von Saquinavir kotransfiziert. 60 h nach Transfektion wurde, wie in B.4.1 beschrieben, das Capsidprotein in zellfreien

Kulturüberständen quantifiziert (A). Viruspartikel aus den filtrierten Kulturüberständen wurden durch ein 20%iges Saccharosekissen aufkonzentriert. Nach Auftrennung der viralen Proteine über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) erfolgte der Nachweis der CA-Spezies im Western Blot mit einem CA-spezifischen Antikörper durch Detektion über Chemilumineszenz (B). Die in Teilabbildung A dargestellten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente, die mit unterschiedlichen Plasmid-Präparationen durchgeführt wurden. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist jeweils angegeben. Die Positionen der Markerproteine sind links dargestellt. Relevante CA-Banden sind durch Pfeile markiert.

C.6.6 Zusammenfassung

Wie im Laufe dieses Kapitels gezeigt, wurde mit Hilfe der synthetischen, HI-viralen Gene die Grundlage für verschiedene Testsysteme zur intrazellulären Immunisierung geschaffen. So konnten mit Ausnahme des synthetischen Gens für p6* alle zu diesem Zweck hergestellten Konstrukte Rev-unabhängig, in effizientem Maße in Säugerzellen exprimiert werden. Überdies wurde ein PR-Aktivitätstest etabliert, mit dessen Hilfe nicht nur der Einfluss von p6* auf die HIV-1 PR sondern auch Effekte anderer PR-Inhibitoren in einem reduktionistischen Zellkultursystem untersucht werden können. Weiter stellt die Expression von Vpr-Fusionskonstrukten eine gute Möglichkeit dar, inhibitorische Proteine in großen Mengen in Viruspartikel einzuschleusen. Zudem können alle synthetischen Gene konzentrationsabhängig exprimiert werden, was für eine Feinabstimmung der inhibitorischen Wirkung in Zellkultur von Bedeutung ist. So konnten wir in bisher durchgeführten Kotransfektionsanalysen einen negativ modulierenden Effekt der synthetischen Genprodukte auf die Freisetzung von Viruspartikeln nachweisen. Ziel weiterer Studien sollte es demnach sein, die Wirkung der transdominant negativen Gene in Zellkultur zu optimieren und deren Inhibitionsmechanismus aufzuklären. Insgesamt bieten die synthetisch hergestellten, transdominant negativen HI-viralen Gene die Möglichkeit zur Betrachtung definierter viraler Zusammenhänge und stellen ein ideales Testsystem für die Entwicklung antiviraler, gentherapeutisch wirksamer Substanzen dar.

D Diskussion

D.1 Entwicklung eines Gesamtkonzepts zur funktionellen Untersuchung der Proteasespaltstellen von p6* *in vitro* und im Kontext der viralen Replikation

D.1.1 Ansätze zur Aufklärung von Spaltereignissen in Gag-Pol

Das kleine, 68 Aminosäuren umfassende „transframe“-Protein p6* liegt im Gag-Pol-Vorläufer direkt aminoterminal vor der Protease und Untersuchungen der letzten Jahre deuten darauf hin, dass es ähnlich einem Propeptid zellulärer Asp-PR bei der Regulation der PR-Aktivität eine Rolle spielt. In der Vergangenheit ergaben verschiedene Autoprocessingstudien mit PR-Vorläufern, dass das „transframe“-Protein selbst ein Substrat der PR ist. Allerdings führten diese Untersuchungen zu konträren Aussagen über die Anzahl und Reihenfolge von PR-vermittelten Spaltereignissen in und um p6*. Während gezeigt wurde, dass die Hydrolyse der carboxyterminalen Spaltstelle von p6* für die Aktivierung der PR und die Entstehung infektiöser Viren essentiell ist (Tessmer & Kräusslich, 1998 und C.5.4), konnte bisher noch kein eindeutiger Nachweis für die Notwendigkeit einer aminoterminalen Spaltung von p6* erbracht werden. So wurden Oligopeptide, welche die beiden Varianten der aminoterminalen Spaltstelle von p6* repräsentieren (Tabelle C.1), in einem von uns etablierten Peptidspaltexperiment etwa 400fach langsamer von maturaer PR hydrolysiert als das Peptid mit der carboxyterminalen Spaltstelle (Abbildung C.1 und C.2.1). Dahingegen ergaben die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, dass diese Spaltstelle vermutlich überhaupt nicht prozessiert wird (Almog *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2001; Pettit *et al.*, 2003).

Unsere eigenen Spaltversuche mit rekombinantem p6*-Protein lieferten auch nach längerer Inkubation mit maturaer HIV-1 PR nur zwei Spaltprodukte, weshalb wir davon ausgehen, dass das „transframe“-Protein nur eine interne PR-Spaltstelle zwischen F₈ und L₉ besitzt (Dissertation C. Paulus, 1999). Die Hydrolyse dieser Spaltstelle wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bei der Autoprocessing von PR-Vorläufern beobachtet (Phylip *et al.*, 1992; Zybarth *et al.*, 1994; Almog *et al.*, 1996; Louis *et al.*, 1999a; Louis *et al.*, 1999b; Chen *et al.*, 2001; Pettit *et al.*, 2003). Allerdings wurden im Gegensatz zu unseren Ergebnissen in einigen dieser Studien auch zusätzliche Spaltstellen in p6* beschrieben (Zybarth *et al.*, 1994; Almog *et al.*, 1996; Louis *et al.*, 1999b). Für die meisten dieser Spaltanalysen wurden verkürzte oder mutierte Gag-Pol-Vorläufer verwendet, die aus bakteriellen Systemen oder durch *in vitro* Translation gewonnen wurden. Daher ist die Interpretation dieser *in vitro* Daten stets an die biochemischen Bedingungen der Versuchsdurchführung gebunden, die nicht unbedingt den physiologischen Abläufen bei der Virusmaturation entsprechen. Da die Aktivität und Substratspezifität der viralen PR von vielen äußeren Faktoren beeinflusst wird (A.2), können sich unterschiedliche Versuchsbedingungen drastisch auf die Spalteffizienz und Reihenfolge von Spaltereignissen auswirken. So berichteten Louis

und Mitarbeiter (1999b), dass ein in *E. coli* produzierter p6*-PR-Vorläufer bei pH 4.0 zunächst an der internen PR-Spaltstelle von p6* autoprozessiert wird, während bei pH-Werten >6.5 die Spaltung am C-Terminus von p6* zuerst erfolgt.

Um der Aufklärung der tatsächlichen Spaltereignisse im Gag-Pol-Vorläufer und insbesondere in und um p6* näher zu kommen, scheint daher die Durchführung ergänzender Untersuchungen im viralen Kontext sinnvoll. So konnten bestimmte Prozessierungsschritte bei der Reifung des Gag-Pol-Vorläufers in infizierten Zellen mit Hilfe eines PR-Inhibitors untersucht werden, der die Detektion intrazellulärer Intermediate der Prozessierungskaskade erlaubt (A.4.2). Da die Vorläufer-assoziierte PR offensichtlich über eine andere Substratspezifität verfügt als das mature Enzym, kann jedoch auch ein effizienter PR-Inhibitor frühe Prozessierungsereignisse nicht vollständig verhindern (Lindhofer *et al.*, 1995; Speck *et al.*, 2000).

Eine andere Möglichkeit, den Ablauf und die funktionelle Bedeutung bestimmter Hydrolyseschritte zu untersuchen, besteht in der unabhängigen Mutagenese einzelner Spaltstellen. Derartige Mutationsanalysen führten zur Aufklärung der Prozessierungsreihenfolge im Gag-Vorläufer (Wiegers *et al.*, 1998). Weitaus schwieriger gestalten sich allerdings entsprechende Mutationsanalysen des *pol*-Bereiches, da dieser vom *gag*-Leserahmen überlagert wird (Abbildung C.1). Dies schließt von vornherein die Möglichkeit von Deletionen oder Insertionen völlig aus. Vor allem die Mutagenese von p6* erweist sich in diesem Zusammenhang als besonders problematisch, weil dieser Abschnitt sowohl auf RNA- als auch auf Gag-Proteinebene funktionell bedeutsame Bereiche enthält. Vermutlich liegen aus diesem Grund bisher keine Daten zur Mutationsanalyse von p6* im viralen Kontext vor. Dennoch haben wir ein Konzept entwickelt, um die Bedeutung einer korrekten Prozessierung von p6* im viralen Replikationszyklus näher zu charakterisieren. Dabei haben wir unsere Untersuchungen auf die drei von uns identifizierten PR-Spaltstellen in und um p6* beschränkt.

D.1.2 Mutagenese der Protease-Spaltstellen von p6* im viralen Kontext

Wie ein Vergleich verschiedener Virusisolate ergab, besitzt p6* zwei hochkonservierte Bereiche am Amino- und am Carboxyterminus. Diese als CR1 und CR2 bezeichneten Abschnitte sind durch einen relativ flexiblen Bereich voneinander getrennt und enthalten die drei putativen PR-Spaltstellen (Abbildung A.10). Bei der Mutagenese dieser Sequenzen war darauf zu achten, dass auch das Gag-Polyprotein im Bereich p1-p6 zwei konservierte Abschnitte aufweist, die vollständig mit der CR1- und CR2-Region von p6* überlappen. So befindet sich die PR-Spaltstelle zwischen p7 und p1 genau in dem Bereich, der im Gag-Pol-Vorläufer der aminoterminalen PR-Spaltstelle von p6* entspricht (Henderson *et al.*, 1992). Ferner wurde berichtet, dass Sequenzen im CR2-Abschnitt des p6Gag-Proteins bei der Verpackung des Hüllproteins Env eine Rolle spielen (Ott *et al.*, 1999). Dieser Bereich überlappt wiederum mit der carboxyterminalen PR-Spaltstelle von p6*. Da der *pol*-Leserahmen um -1 zum *gag*-Leserahmen versetzt ist, besteht dennoch die Möglichkeit, unter Verwendung des degenerierten Codes durch Punktmutation einen Aminosäureaustausch in p6* vorzunehmen, ohne die Primärsequenz der überlappenden Gag-Domänen zu

verändern. Daher sind Austausche auf Basen beschränkt, die eine „wobble“-Position im Codon der entsprechenden Aminosäure einnehmen. Eine weitere Hürde bei der Mutagenese der N-terminalen und internen PR-Spaltstellen stellen die *cis*-aktiven Elemente der viralen RNA dar, die genau in den Bereichen zu liegen kommen, die für die Sequenzen der PR-Spaltstellen kodieren. Dabei überlappt die Heptanukleotidsequenz, die für die Funktionalität des Leserastersprungs essentiell notwendig ist (Abbildung A.3 und Jacks *et al.*, 1988, Wilson *et al.*, 1988; Bidou *et al.*, 1997), mit der aminoterminalen Spaltstelle von p6*, während die interne PR-Spaltstelle von der Haarnadelschleife überlagert wird, die den Leserastersprung fördert (Parkin *et al.*, 1992; Kollmus *et al.*, 1996).

Die Intention der p6*-Mutagenese war an die jeweilige Fragestellung geknüpft. Während wir im Fall der N-terminalen und internen PR-Spaltstelle bemüht waren, diese zu zerstören, um deren Bedeutung für die virale Replikation aufzuklären, war für die C-terminale PR-Spaltstelle bereits gezeigt worden, dass deren Blockierung zum Verlust der Infektiosität der resultierenden Viren führt (Tessmer & Kräusslich, 1998). In diesem Fall galt es zu untersuchen, welche Rolle das C-terminale Tetrapeptid von p6* nach Abtrennung von der PR für deren Regulation spielt. Außerdem sollten entsprechende Mutationen, die zu einer verlangsamten oder beschleunigten Hydrolyse dieser Spaltstelle führen, aufzeigen, wie wichtig die Kinetik dieser Spaltung für die sequentielle Maturation der Viren ist. Für die Auswahl der Mutationen am C-Terminus von p6* wurde daher ein Algorithmus zu Hilfe genommen (Chou *et al.*, 1996), der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der eine beliebige, acht Aminosäuren lange Sequenz von der HIV-1 PR gespalten wird. Demnach wählten wir verschiedene Sequenzkombinationen aus, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von der PR hydrolysiert werden. Dahingegen machten wir uns bei der Mutagenese der N-terminalen und internen Spaltstelle die Tatsache zunutze, dass einige Aminosäuren nie an bestimmten „subsites“ der PR vorkommen (Tözser *et al.*, 1992; Mildner *et al.*, 1994). So sollte der Einbau einer aromatischen Aminosäure an der P3'-Position der N-terminalen Spaltstelle oder eine β -verzweigte Aminosäure an der P1-Position der internen Spaltstelle die Erkennungssequenz für die PR zerstören. Da die Mutation der internen Spaltstelle die Anzahl der Basenpaarungen in der Haarnadelschleife reduzierte, wurde in einer zweiten Variante eine zusätzliche Mutation auf der gegenüberliegenden Seite des „stem-loop“ eingeführt, um die Basenpaarung wieder herzustellen und dadurch den „stem-loop“ zu stabilisieren.

D.2 *In vitro*-Charakterisierung der modifizierten Proteasespaltstellen von p6*

D.2.1 *Die Mutationen in p6* führen zu veränderten Hydrolyseraten bei der Spaltung von Peptidsubstraten*

Nach Auswahl geeigneter p6*-Mutationen im viralen Kontext wurden verschiedene *in vitro* Testsysteme entwickelt, um eine selektive Bewertung der einzelnen Modifikationen zu ermöglichen. Dabei wurde zunächst die Spaltbarkeit der

veränderten Sequenzen mit Hilfe von synthetischen Oligopeptiden überprüft und mit den Hydrolyseraten der Wildtyp-Sequenzen verglichen. Um auch langsamere Spaltereignisse zu registrieren, wurden die Peptidsubstrate für mindestens 48 h mit maturer HIV-1 PR inkubiert. Wie bereits in früheren Experimenten gezeigt (C. Paulus, Dissertation 1999), werden die drei natürlichen Spaltstellen in p6* von maturer HIV-1 PR unterschiedlich effizient prozessiert, wobei die N-terminale Spaltstelle die geringste Hydrolyserate aufweist (C.2.1). Dennoch konnten wir nach etwa 24 h einen vollständigen Umsatz des entsprechenden Decamers beobachten. Im Gegensatz dazu konnten Chen und Mitarbeiter (2001) in einem ähnlichen Spaltexperiment keine Prozessierung der N-terminalen Spaltstelle feststellen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Inkubationszeit nicht ausreichte, um die entsprechenden Reaktionsprodukte quantitativ nachweisen zu können. Ein Vergleich der Hydrolyseraten von natürlichen und modifizierten Sequenzen ergab in allen Fällen eine Änderung der Spaltkinetik. So konnten tatsächlich die N-terminale und interne Spaltstelle durch einzelne Aminosäureaustausche blockiert werden. Gleichzeitig wurden jedoch durch diese Mutationen alternative Erkennungssequenzen für die PR geschaffen. So wurden die Peptide P1 bzw P2 und P3 jeweils um zwei Aminosäuren zur natürlichen Spaltstelle versetzt hydrolysiert (C.2.1). Da die Spaltstelle in den Decapeptiden einmal aminoterminal und einmal carboxyterminal verschoben wurde, entstand dabei jeweils ein Produkt mit nur drei Aminosäuren. Dies würde Berichte bestätigen, dass prinzipiell 5-6 Reste für die Proteolyse eines Substrats ausreichen. (Toth *et al.*, 1990; Tözser *et al.*, 1992; Hazebrouck *et al.*, 2001). Da diese alternativen Spaltstellen bisher nicht beschrieben sind, scheinen sie aufgrund der jeweiligen Punktmutation neu entstanden zu sein. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass an dieser Position bereits Erkennungssequenzen für die PR existieren, die aber wegen bevorzugter Prozessierung der benachbarten, effizienteren Spaltstelle nicht genutzt werden („priority competition“).

Wenngleich die Austausch in der N-terminalen und internen Spaltstelle von p6* zumindest im Peptidspaltexperiment nicht den gewünschten Effekt erzielen konnten, nämlich eine Spaltung an dieser Stelle vollkommen zu blockieren – so unterscheiden sich doch die Hydrolyseraten der neu entstandenen Spaltstellen beträchtlich von denen der ursprünglichen. Während die N-terminale Mutation eine drastische Steigerung der Spalteffizienz bewirkte, führte die Mutagenese der internen Spaltstelle zu einer deutlichen Abnahme der Hydrolyserate. Die Entstehung einer alternativen internen Spaltstelle konnte auch in den entsprechenden GST-p6*-Fusionsproteinen nachgewiesen werden (C.2.2). Dies zeigt, dass diese neue Spaltsequenz nicht nur im Decapeptid sondern auch im Kontext eines komplexeren Volllängeproteins von der PR erkannt wird. In guter Übereinstimmung mit den Peptidanalysen wurde auch hier die modifizierte Sequenz im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz wesentlich langsamer hydrolysiert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass entsprechende Auswirkungen dieser Mutationen auch im viralen Kontext wahrscheinlich sind.

Eine veränderte Spaltkinetik zeigten auch Peptide mit Mutationen der C-terminalen Spaltstelle. Allerdings konnte der verwendete Algorithmus nicht in allen Fällen die Spaltung der Substrate richtig prognostizieren. So wurden nur zwei der vier Aminosäurekombinationen von maturer HIV-1 PR gespalten, obwohl für alle dieser Sequenzen Spaltbarkeit vorhergesagt worden war. Diese beiden Decapeptide (P5

und P6) wurden im Zeitraum von 48 h zwar vollständig aber auch wesentlich langsamer hydrolysiert als die Wildtyp-Sequenz (C.2.1). So wurde zwar P6 zunächst mit einer dem Wildtyp-Peptid vergleichbaren Anfangsrate umgesetzt, jedoch ging die Hydrolyserate nach ca. 30% Umsatz stark zurück, was auf eine Produktinhibition der PR schließen lässt (Abbildung C.7). Wenn eine schnelle Prozessierung der C-terminalen Spaltstelle für die Aktivierung der PR essentiell ist, sollten sich derartige Mutationen im viralen Kontext auf die Regulation des Enzyms auswirken.

D.2.2 Verlässlichkeit von Algorithmen für die Vorhersage von Spaltereignissen

Obwohl die HIV-1 PR über ein sehr breites Substratspektrum verfügt und keine einheitliche Konsensussequenz für die Spaltung von Proteinen benötigt, müssen dennoch bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein, damit die PR ein Substrat als solches erkennt. So hat die Suche nach potenten PR-Inhibitoren in den letzten Jahren zur Entwicklung verschiedener Algorithmen geführt, die Vorhersagen über die Spaltbarkeit von Peptidsubstraten durch die HIV-1 PR zulassen (Poorman *et al.*, 1991; Chou *et al.*, 1993; Chou & Zhang, 1993; Zhang & Chou, 1994; Chou, 1993; Chou *et al.*, 1996). Dabei wurden aufgrund der statistischen Analyse von spaltbaren und nicht-spaltbaren Sequenzen mathematische Funktionen abgeleitet, die die Wahrscheinlichkeit errechnen, mit der eine Aminosäure an einer bestimmten Position im Substrat vorkommt. Während die ersten dieser Algorithmen annahmen, dass diese Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen einer bestimmten Aminosäure an allen 8 „subsites“ der PR gleich groß ist (Poorman *et al.*, 1991; Chou *et al.*, 1993), berücksichtigen neuere Modelle auf der Basis von Strukturkenntnissen auch die gegenseitige Beeinflussung benachbarter Substratrete, den sogenannten „coupling“-Effekt (Chou *et al.*, 1996). Nachdem das Substratrückgrat in einer gestreckten Konformation im aktiven Zentrum gebunden ist, können dabei Interaktionen zwischen zwei alternativen „subsites“ entlang der Sequenz sogar stärker ausgeprägt sein als zwischen direkt benachbarten Resten (Abbildung A.7). Trotz Berücksichtigung von gekoppelten Effekten werden Spaltereignisse von den gegenwärtigen Algorithmen manchmal überschätzt. So wurden zwei von uns ausgewählte Sequenzen nicht von maturer PR hydrolysiert, obwohl in beiden Fällen ein positiver Δ -Wert errechnet worden war. Offensichtlich ist auch der absolute Δ -Wert kein Anhaltspunkt für die Effizienz einer Spaltung, da die Sequenz mit dem höchsten errechneten Wert von 1,97 (Wildtyp-Sequenz: 1,38) *in vitro* nicht prozessiert wurde. Des Weiteren muss bei der Verwendung von Algorithmen berücksichtigt werden, dass die tatsächliche Spaltung eines Substrats nicht nur von dessen Primärsequenz, sondern ganz wesentlich von der Zugänglichkeit der Spaltstelle innerhalb eines komplex gefalteten Proteins abhängt (Hazebrouck *et al.*, 2001). Dennoch stellen Algorithmen eine nützliche Hilfe bei der Analyse von Spaltereignissen dar, wenn sie durch entsprechende experimentelle Ansätze ergänzt werden.

D.3 Einfluss von Modifikationen der *cis*-aktiven Elemente auf die „frameshift“ Effizienz

D.3.1 Bedeutung der *cis*-aktiven Elemente für die virale Replikation

Der ribosomale Leserastersprung bei HIV-1 und vielen anderen Retroviren (Jacks *et al.*, 1988; Jacks *et al.*, 1988; Farabaugh, 1993; Gesteland & Atkins, 1996) ist von einer heptameren Konsensus- oder „slippery“-Sequenz (X XXY YYZ, Tabelle D.1) und einer 3' gelegenen RNA-Sekundärstruktur abhängig. Dabei gewährleistet die niedrige „frameshift“-Frequenz, dass Gag- und Gag-Pol-Vorläufer im richtigen Verhältnis synthetisiert werden, was essentiell für die Entstehung infektiöser Nachkommenviren ist (Park & Morrow, 1991; Hunter, 1994; Hung *et al.*, 1998; Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001). Dabei reicht die Heptanukleotidsequenz alleine bereits aus, um einen Leserastersprung zu induzieren (Wilson *et al.*, 1988; Honda *et al.*, 1995). Allerdings ist dessen Effizienz *in vivo* von vielerlei Faktoren abhängig, einschließlich der thermodynamischen Stabilität der RNA-Sekundärstruktur (Bidou *et al.*, 1997), der Sequenzumgebung der *cis*-aktiven Elemente, den Interaktionen zwischen Ribosomen und tRNAs und zwischen tRNA und mRNA-Matrize, sowie von Wechselwirkungen zwischen dem Translationsapparat und zahlreichen, zellkodierten *trans*-aktiven Faktoren (zur Übersicht: Brierley, 1995; Dinman, 1995, Lee *et al.*, 1995; Farabaugh, 1997; Kim *et al.*, 2001). Während die Heptanukleotidsequenz U UUU UUA bei HIV-1 hochkonserviert ist (Tabelle D.1), treten im Bereich der „stem-loop“-Struktur auch natürliche Polymorphismen auf, die teilweise zu einer starken Reduktion der thermodynamischen Stabilität dieser Haarnadelstruktur führen. Dennoch wirken sich diese Polymorphismen nicht zwingend auf die virale Replikation oder die Infektiosität der resultierenden Viren aus (Telenti *et al.*, 2002). Somit scheint diese Sekundärstruktur bei HIV-1 weniger Einfluss zu haben als bei anderen Retroviren, wo die Destabilisierung dieser „loop“-Struktur unter Umständen zu einer mehr als 10fach reduzierten „frameshift“-Rate führt (Jacks *et al.*, 1988; Brierley *et al.*, 1989; Dinman *et al.*, 1991; Chamorro *et al.*, 1992).

Da die Mutationen der internen PR-Spaltstelle von p6* lediglich zu singulären Basenaustauschen im „stem-loop“ führten und auch nicht die stabilisierenden G-C-„stretches“ betrafen (Kim *et al.*, 2001), war kein drastischer Effekt auf die Frequenz des Leserastersprungs zu erwarten. Dahingegen bewirkte die N-terminale Mutation von p6* eine Änderung der Heptanukleotidsequenz von U UUU UUA zu U UUU UUU. Diese Sequenzfolge wurde in inhibitorresistenten HIV-1 Varianten zusätzlich zum eigentlichen „frameshift“-Signal beobachtet und schien dort die reduzierte PR-Aktivität durch Erhöhung der „frameshift“-Rate zu kompensieren. Allerdings befindet sich diese Sequenz in den Virus-Mutanten im Bereich der Spaltstelle zwischen p1 und p6, also auf RNA-Ebene fünf Basen 3' der Haarnadelstruktur bzw. 39 Basen von der eigentlichen „slippery sequence“ entfernt und wirkt dort additiv zur ersten Heptanukleotidsequenz. Experimente konnten zeigen, dass diese neue Sequenz ein im 5'-Bereich fehlendes „frameshift“-Signal funktionell ersetzen kann (Doyon *et al.*, 1998). Deshalb nahmen wir an, dass diese

Sequenzfolge auch vergleichbare „frameshift“-Raten liefert, wenn sie die Position der eigentlichen „slippery sequence“ einnimmt.

Tabelle D.1: Ribosomale „frameshift“-Signale in Retroviren

„slippery sequence“	Position	Retrovirus
AAAAAAC	<i>gag-pro</i>	BLV, HTLV-1 und 2, MMTV, STLV-1
UUUAAAC	<i>pro-pol</i> <i>gag-pol</i>	BLV, HTLV-1 und 2, STLV-1 EIAV
GGGAAAC	<i>gag-pro</i>	MPMV, SRV-1 und 2
AAAUUUU	<i>pro-pol</i>	MPMV, SRV-1 und 2
AAAUUUA	<i>gag-pol</i>	RSV
GGAUUUA	<i>pro:pol</i>	MMTV
UUUUUUA	<i>gag-pol</i>	HIV-1 und 2, SIV

D.3.2 Der Leserastersprung ist in allen p6*-Mutanten funktionell

Um die Funktionalität des Leserastersprungs in den p6*-Varianten gesondert zu überprüfen, modifizierten wir ein bereits beschriebenes Luciferase-Reportersystem, das eine Quantifizierung der „frameshift“-Rate in Säugerzellen erlaubt. So schien uns die Verwendung der „firefly“-Luciferase als Reporter geeignet, da bereits gezeigt wurde, dass eine N-terminale Erweiterung um bis zu 28 Aminosäurereste deren enzymatische Aktivität nicht beeinflusst (Reil & Hauser, 1990). Der Vergleich verschiedener beschriebener „frameshift“-Reportersysteme ergab, dass die „frameshift“-Frequenz, die bei *in vitro* Translationsexperimenten oder in bakteriellen Systemen ermittelt wurde, deutlich von der Frequenz in intakten Zellen abweichen kann (Reil *et al.*, 1993). In unserem Fall waren allerdings nicht absolute, sondern relative Vergleichswerte der „frameshift“-Raten von Wildtyp- und modifizierten Sequenzen von Interesse. So konnten Transfektionen von humanen H1299 oder murinen 3T3 Zellen mit den entsprechenden „frameshift“-Reporterkonstrukten zeigen, dass der Leserastersprung trotz Modifikationen der Heptanukleotidsequenz oder der Haarnadelstruktur funktionell ist und sich nicht wesentlich von der Frequenz des Reporters mit der Wildtyp-Sequenz unterscheidet (C.3.2). Insgesamt war die Luciferasexpression in den murinen Zellen um ein Vielfaches schlechter als in H1299 Zellen. Die „frameshift“-Rate lag aber auch hier bei durchschnittlich 5-6% und korreliert somit hervorragend mit den für HIV-1 ermittelten *in vivo*-„frameshift“-Raten. Unterschiede in der „frameshift“-Frequenz wurden allerdings bei den Konstrukten mit Mutationen im „stem-loop“ Bereich in Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp beobachtet. Während das Konstrukt mit der Einfachmutation im „stem-loop“ in H1299 Zellen die höchste „frameshift“-Rate zeigte (bis zu 8%), lag die Frequenz des Konstruktes mit der Doppelmutation in murinen Zellen sogar bei 10%. Dies stimmt mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein, dass offensichtlich in Zellkultur eine höhere Abhängigkeit des Leserastersprungs von der „stem-loop“-Struktur besteht als bei *in vitro* Systemen (Parkin *et al.*, 1992; Brunelle *et al.*, 1999). Überdies könnten auch spezifische zelluläre Faktoren an derartigen Effekten beteiligt sein. Für das Konstrukt mit der alternativen Heptanukleotidsequenz wurden „frameshift“-Raten von durchschnittlich 4-5% in Zellkultur ermittelt. Somit konnte erstmals gezeigt werden,

dass die HI-virale Heptanukleotidsequenz UUUU UUA durch die Sequenzfolge UUUU UUU aus inhibitorresistenten Viren funktionell ersetzt werden kann.

Die Validität dieser Ergebnisse wurde jedoch im Folgenden von aktuellen Entwicklungen in Frage gestellt. Während die Mehrheit bisheriger Modelle vorschlägt, dass es sich bei der RNA-Sekundärstruktur von HIV-1 um eine einfache Haarnadelschleife handelt (Jacks *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1988; Parkin *et al.*, 1992; Kollmus *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 1998), favorisieren neuere Untersuchungen, die auf bioinformatischen, strukturellen und genetischen Daten basieren, das Vorhandensein einer komplexen „triplex“-RNA-Struktur, zu deren Ausbildung auch Sequenzen 3' der Haarnadelschleife durch Rückfaltung beitragen (Abbildung D.1 A und Dinman *et al.*, 2002). Da die HX10-Sequenz in den von uns verwendeten „frameshift“-Reportern nur bis zur Haarnadelschleife reicht, konnte der Einfluss weiter 3' gelegener Sequenzelemente auf die Effizienz des Leserastersprungs nicht mit den vorhandenen Konstrukten überprüft werden (D.1 B). Aus diesem Grund wurde noch ein weiteres Konstrukt in die Versuchsreihe aufgenommen. Dabei wurde der Bereich 3' der Haarnadelstruktur durch die entsprechende HX10-Sequenz ersetzt, um die Ausbildung einer „pseudoknot“-Struktur zu ermöglichen. Wie sich in Transfektionsexperimenten herausstellte, lieferte jedoch dieses Konstrukt in beiden Zellkulturen gleiche „frameshift“-Raten wie die unveränderte Variante. Somit konnten wir keinen Einfluss der 3' gelegenen Sequenzbereiche auf die Effizienz des Leserastersprungs feststellen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass zumindest in diesem System eine komplexe „pseudoknot“-Struktur von geringerer Bedeutung für die „frameshift“-Effizienz ist. Insgesamt bleibt anzumerken, dass diese isolierte Betrachtung der „frameshift“-Funktion nicht unbedingt auf die Situation im komplexen Provirus übertragen werden kann und dass dieses System durch Schwankungen von Qualität und Transfektionseffizienz der verwendeten Plasmid-DNA in Einzelexperimenten nur begrenzt sensitiv für geringfügige Veränderungen des Leserastersprungs ist.

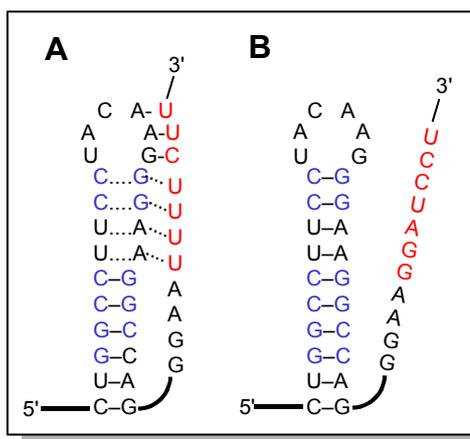


Abbildung D.1: Ausbildung einer „pseudoknot“-Struktur im „stem-loop“ Bereich von HIV-1. Intramolekulare „triplex“-Struktur, wie sie von Dinman *et al.* (2002) postuliert wird (A). Nach diesem Modell faltet eine pyrimidinreiche Sequenzfolge 3' des „stem-loop“ zurück und paart mit Abschnitten der Haarnadelschleife. Dahingegen erlauben die „frameshift“-Reporterkonstrukte aufgrund von Sequenzveränderungen im 3'-Bereich (rot markiert) nur die Ausbildung einer einfachen Haarnadelstruktur (B). Die hochkonservierten, stabilisierenden G-C Bereiche sind blau markiert.

D.4 Einfluss der modifizierten C-Termini von p6* auf die Aktivität maturer HIV-1 Protease

D.4.1 Die C-terminalen M5- und M6-Modifikationen von p6* wirken sich nicht signifikant auf die Inhibition der Protease-Aktivität aus

In der Vergangenheit konnten wir erstmals zeigen, dass hochreines, rekombinantes p6*-Protein die Aktivität maturer HIV-1 PR konzentrationsabhängig inhibiert (Paulus *et al.*, 1999). Weiterführende kinetische Analysen wiesen dabei auf einen kompetitiven Inhibitionsmechanismus hin. Ferner ergaben Untersuchungen mit p6*-Mutanten, dass die vier carboxyterminalen Reste S₆₅-F₆₆-N₆₇-F₆₈ für die Hemmung der PR durch p6* zwar nötig, aber alleine nicht ausreichend sind. Darüberhinaus müssen diese vier Aminosäuren frei zugänglich am äußersten C-Terminus von p6* vorliegen, um inhibitorisch zu wirken.

Um zu überprüfen, wie sich die Mutationen der vier C-terminalen Reste von p6* *in vitro* auf die Aktivität der HIV-1 PR auswirken, wurden rekombinante p6*-Proteine mit den veränderten C-Termini in Bakterien produziert, aufgereinigt und anschließend in einen kontinuierlichen, spektrophotometrischen PR-Aktivitätstest eingesetzt (C.2.1). Dabei zeigten alle p6*-Proteine eine konzentrationsabhängige Inhibition der PR-Aktivität. Der Vergleich der Initialgeschwindigkeiten ergab, dass die PR von den C-terminal modifizierten Varianten p6*M5 und p6*M6 sogar etwas stärker gehemmt wird als durch das p6*wt-Protein. Somit wurden für p6*M5 und p6*M6 niedrigere IC₅₀-Werte von 29 µM und 24 µM ermittelt als für das Wildtyp-Protein (34 µM). Beide Modifikationen von p6* hatten bereits im Peptidspaltexperiment zu einer verzögerten Freisetzung des C-terminalen Tetrapeptids geführt. Allerdings korreliert diese Spaltkinetik nicht mit dem Inhibitionspotential des freigesetzten Halbsubstrats. So wurde im Peptidspaltexperiment die Sequenz PIDL (M5) zwar am langsamsten hydrolysiert; die stärkste Inhibition der PR erfolgte jedoch durch die Sequenz PFDF (M6), die sich nur durch zwei Reste von der Wildtyp-Sequenz SFNF unterscheidet. Tatsächlich würde eine größere Affinität des Halbsubstrates PFDF zum aktiven Zentrum der PR nicht nur die verstärkte Hemmung des Enzyms im Aktivitätstest sondern auch die im Peptidspaltexperiment angedeutete Produktinhibition erklären. Da die p6*-Proteine mit Modifikation der internen Spaltstelle in diesem PR-Aktivitätstest den gleichen IC₅₀-Wert lieferten wie das Wildtyp-Protein, können die beobachteten Effekte ausschließlich auf die veränderten C-terminalen Reste und weniger auf experimentelle Ungenauigkeiten zurückgeführt werden.

D.4.2 Vergleich der Inhibitionsanalysen mit früheren Ergebnissen

Unsere Experimente ergaben für die p6*-vermittelte PR-Hemmung einen IC₅₀-Wert von 34 µM. Im Gegensatz dazu hatten vorangegangene Studien einen wesentlich niedrigeren IC₅₀-Wert von 13 µM für diese Inhibition ermittelt (Paulus *et al.*, 1999). Diese Abweichung ist vermutlich auf unterschiedliche Parameter bei der Versuchsdurchführung zurückzuführen. So arbeiteten wir mit einer anderen PR-

Charge, für die in Vorversuchen eine sehr hohe spezifische Aktivität ermittelt wurde. Aus Gründen der Pipettiergenauigkeit setzten wir daher 40 nM aktive PR-Dimere statt der in früheren Versuchen verwendeten 20 nM in den Test ein. Überdies verwendeten wir einen Reaktionspuffer mit höherer Ionenstärke, was vermutlich die PR-Aktivität durch Stabilisierung der Dimere zusätzlich erhöht (Szeltner & Polgar, 1996). Folglich können die Ergebnisse dieser beiden Studien nicht direkt miteinander verglichen werden. Diese Divergenz bei der Ermittlung von IC_{50} -Werten in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen stellt auch häufig ein Problem bei der vergleichenden Analyse von PR-Inhibitoren in Zellkultur dar (Vacca *et al.*, 1994; Kempf *et al.*, 1995; Patick *et al.*, 1996; Lazdins *et al.*, 1997).

Wie bereits in früheren Studien mit verschiedenen rekombinanten p6*-Varianten gezeigt, besteht die Möglichkeit, die inhibitorische Potenz des „transframe“-Proteins *in vitro* noch signifikant zu erhöhen. So war beispielsweise der IC_{50} -Wert, der nach Austausch des C-terminalen Tetrapeptids SFNF gegen die Sequenzfolge SYEL im PR-Aktivitätstest ermittelt wurde, um den Faktor 5 niedriger als der des Wildtyp-Proteins (Paulus *et al.*, 1999). Für diese Aminosäurekombination hatte molekulares Modellieren eine verstärkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum der PR ergeben. Allerdings konnte diese Sequenzfolge nicht im viralen Kontext untersucht werden, da die entsprechenden Mutationen am C-Terminus von p6* mit Veränderungen im p6Gag-Protein einhergehen. Um also den Einfluss der C-terminalen Aminosäurereste von p6* auf die Regulation der PR-Aktivität im Virus zu untersuchen, müssen gleichzeitig drei Voraussetzungen erfüllt sein: So dürfen die ausgewählten Sequenzkombinationen (i) eine Hydrolyse der C-terminalen PR-Spaltstelle nicht verhindern, (ii) den überlappenden Gag-Leserahmen nicht verändern und sollen (iii) mit veränderter Affinität ins aktive Zentrum der PR binden als das Wildtyp-Halbsubstrat. So ist eine isolierte Betrachtung dieser Einzelaspekte zwar sinnvoll, aber deren gegenseitige Abhängigkeit im komplexen viralen Zusammenhang kann im Rahmen von *in vitro* Testsystemen nicht erfasst werden.

D.5 Einfluss der modifizierten Proteasespaltstellen von p6* auf die virale Replikation

Während die Funktionen der meisten HI-viralen Proteine bei der Virusreplikation klar definiert sind, wird weiterhin über die Rolle des „transframe“-Proteins p6* während der viralen Morphogenese spekuliert. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass sich Mutationsanalysen des kleinen Proteins im viralen Kontext aus genannten Gründen als schwierig erweisen. So haben wir unsere derzeitigen Erkenntnisse über die Struktur und Funktion von p6* hauptsächlich aus *in vitro* Untersuchungen mit rekombinantem p6*-Protein oder Prozessierungsstudien mit verkürzten und mutierten Gag-Pol-Vorläufern. Alle daraus bezogenen Daten weisen aber übereinstimmend auf eine Beteiligung von p6* bei der Regulation der PR-Aktivierung hin (Partin *et al.*, 1991; Schramm *et al.*, 1993; Zybarth *et al.*, 1994; Zybarth & Carter, 1995; Almog *et al.*, 1996; Tessmer & Kräusslich, 1998; Louis *et al.*, 1998; 1999; Pettit *et al.*, 2003). Um die Bedeutung von p6* für die virale Replikation näher zu untersuchen, wurden von uns erstmals p6*-Mutationsanalysen mit rekombinanten Proviren durchgeführt

(Manuskript in Vorbereitung). Dabei wurde zunächst die gesamte p6*-kodierende Region des Provirusklons HX10 durchmutiert, ohne den Gag-Leserahmen zu verändern. Die vergleichende Analyse dieser Virusmutanten in verschiedenen Zellkultursystemen hatte gezeigt, dass Mutationen in den stark konservierten, N- und C-terminalen Bereichen von p6* drastische Auswirkungen auf die Infektiosität der entstehenden Viruspartikel haben. Dahingegen scheint die zentrale Region von p6* nicht essentiell für die Virusreplikation zu sein. Dieser Befund steht im Widerspruch zu früheren Berichten, die eine Beteiligung von kryptischen, internen PR-Spaltstellen an der PR-Regulation vorschlugen (Zybarth *et al.*, 1994). Des Weiteren konnten wir keine Funktion für die hochkonservierten Aminosäurereste zwischen p6* und dem Pepsinogen-Propeptid nachweisen (Partin *et al.*, 1991), die auf eine Ähnlichkeit des p6*-vermittelten Regulationsmechanismus mit der zellulären Zymogenaktivierung hinweisen. Da die PR-Spaltstellen von p6* innerhalb der hochkonservierten Bereiche liegen, deren Modifikation starke Auswirkungen auf die Virusvermehrung hatte, sollten nun weiterführende Mutationsanalysen auf die Spaltstellen selbst reduziert werden.

Wie in C.1.2 hergeleitet, wurden insgesamt sieben Provirusklone für Zellkulturstudien hergestellt. Um mutationsbedingte Phänotypen in möglichst allen Stadien der viralen Replikation zu erfassen, wurden je nach Fragestellung unterschiedliche Zellkultursysteme verwendet. So wurde die späte Phase der Virusreplikation, die von der Expression viraler Proteine über die Maturation bis zur Freisetzung der Viren reicht, in nicht-permissiven Zelllinien untersucht. Dahingegen erlauben permissive, CD4-positive Zellen die Analyse der frühen Replikationsstadien und lassen Aussagen über die Infektiosität der mutierten Viren zu.

D.5.1 Die internen csM2- und csM3-Mutationen haben keine erkennbare Auswirkung auf die Autoprozessierung der Protease

Bei Analyse der rekombinanten Proviren in Zellkultur zeigten die Varianten csM2 und csM3 mit Modifikation der internen PR-Spaltstelle von p6* keinen auffälligen Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Viren. Offensichtlich haben diese Mutationen weder Einfluss auf die Expression und Stabilität viraler Gag-Proteine noch auf die korrekte Prozessierung der Polyproteinvorläufer. Darüberhinaus replizieren diese Viren in humanen Lymphozyten zu vergleichbar hohen Titern wie Wildtyp-Viren. Auch die Western Blot-Analyse freigesetzter Virionen zeigte keine Unterschiede im Proteinprofil. Die einzige Auffälligkeit der csM3-Variante ergab sich aus Infektionsstudien. Daraus ging hervor, dass zwar weniger csM3-Viren aus transfizierten Zellen freigesetzt wurden, diese aber Magi-Zellen besonders gut infizieren konnten. Dass dieses Phänomen auf eine Veränderung der Spaltkinetik an der internen PR-Spaltstelle von p6* zurückgeht, ist dabei eher unwahrscheinlich, da die Variante csM2 über die gleiche Mutation verfügt und keinen auffälligen Phänotyp zeigt. So unterscheidet sich csM3 lediglich durch eine Punktmutation, die auf Proteinebene an Position P4' der original-Spaltstelle liegt. Allerdings hätte diese Mutation keinen Einfluss auf eine weiter aminoterminal entstandene Spaltstelle, wie sie *in vitro* nachgewiesen wurde. Wahrscheinlicher sind dahingegen Auswirkungen

dieser Mutation auf RNA-Ebene, da ein Reporterkonstrukt mit der entsprechenden Veränderung im „stem-loop“ in murinen Zellen eine doppelt so hohe „frameshift“-Rate induzierte wie Reporter mit der Wildtyp-Haarnadelstruktur. Sollte sich diese zusätzliche Punktmutation durch Ausbildung einer weiteren G-C-Paarung tatsächlich stabilisierend auf die Haarnadelstruktur auswirken und dadurch auch im viralen Kontext zu leicht erhöhten „frameshift“-Raten führen, so würde sich das intrazelluläre Verhältnis von Gag zu Gag-Pol verschieben. In diesem Zusammenhang konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Überexpression von Gag-Pol zu einer frühzeitigen intrazellulären Prozessierung der Proteinvorläufer führt (Park & Morrow, 1991; Karacostas *et al.*, 1993), wonach weniger Gag-Vorläufer für die Assemblierung an der Zytoplasmamembran zur Verfügung stehen. Dabei bewirkt bereits eine leichte Verschiebung des Verhältnisses zugunsten von Gag-Pol eine verringerte Freisetzung von Viruspartikeln (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001). Wenn folglich auch mehr Gag-Pol-Moleküle in knospende Partikel verpackt werden, würde die PR-Aktivität im freigesetzten Virion zunehmen und die Reifung dieser Viren beschleunigen. Demnach wären bereits 48 h nach Transfektion (Erntezeitpunkt für Infektionsstudien) mehr infektiöse Einheiten im Überstand vorhanden. Da wir unsere Western Blot Analysen jedoch erst 60 bis 72 h *post transfectionem* mit überwiegend murenen Viren durchgeführt haben, werden daraus Maturationsunterschiede der nativen Virusvarianten nicht ersichtlich. Überdies könnte auch eine verstärkte RT-Aktivität in diesen Viren die Infektionseffizienz bei neuen Zielzellen fördern. Da csM3-Viren in Lymphozyten aber wie Wildtyp-Viren replizieren (C.5.4.1), könnten sich dort die beiden Effekte gegenseitig aufheben oder aber erst gar nicht in Erscheinung treten, wenn in diesen Zellen die „stem-loop“-Stabilität von geringerer Bedeutung für die „frameshift“-Effizienz ist. Um dies zu überprüfen, sollte der „frameshift“-Assay in Lymphozyten durchgeführt werden.

Western Blot-Analysen von reifen csM2- und csM3-Viren konnten zeigen, dass die Mutation der internen Spaltstelle in Zellkultur keinen Einfluss auf die Autoprozessierung der PR hat. So war in beiden Virusspezies die mature Form der PR nachweisbar. Leider war es uns nicht möglich, festzustellen, ob in Analogie zu den Peptidspaltexperimenten auch im viralen Kontext die ursprüngliche Spaltstelle zerstört und stattdessen eine alternative Spaltstelle genutzt wurde. Diese könnte durchaus die Funktion der ursprünglichen Spaltstelle ersetzen, wenn ihre optimale Zugänglichkeit innerhalb des Gag-Pol-Vorläufers die reduzierte Hydrolyserate kompensiert (Hazebrouck *et al.*, 2001). Keine Auswirkung auf die virale Infektiosität zeigte diese Mutation an der P1-Position (F->V) der internen PR-Spaltstelle von p6* auch nach jüngeren Berichten von Hill und Mitarbeitern (2002), wo sie im Rahmen von „stem-loop“-Untersuchungen zustande kam.

D.5.2 Die C-terminalen csM5- und csM6-Mutationen haben keinen Einfluss auf die Infektiosität rekombinanter Viren in Zellkultur

Alle in dieser Studie durchgeführten Zellkulturanalysen konnten keine signifikanten Unterschiede der C-terminal modifizierten Proviren csM5 und csM6 im Vergleich zu Wildtyp-Viren aufzeigen. Offensichtlich beeinträchtigten die Veränderungen am C-

Terminus von p6* weder die Autoprozessierung des Gag-Pol-Vorläufers noch die Entstehung reifer, infektiöser Viren. So zeigten diese Viren in Lymphozyten eine dem Wildtyp vergleichbare Replikationskinetik über den beobachteten Zeitraum und auch die Proteinprofile der Gag- und Gag-Pol Komponenten lassen keinerlei Prozessierungsdefekt erkennen. Einzig die aminoterminal Freisetzung der PR erfolgte bei den Varianten csM5 und csM6 im Vergleich zu den übrigen Viren etwas verzögert. Dies korreliert hervorragend mit unseren *in vitro* Ergebnissen, die zeigen konnten, dass auch die entsprechenden Decapeptide *in trans* von maturaer HIV-1 PR langsamer prozessiert werden als die Wildtyp-Sequenz. Dabei wurde für das Substrat PIDL-PQIT die geringste Hydrolyserate ermittelt. Entsprechend wurde diese Sequenz auch im viralen Kontext am langsamsten prozessiert, da noch Restmengen des ungespaltenen, ca. 17-kDa großen p6*-PR-Vorläufers in den Virionen nachweisbar waren (C.5.3.1). Da die PR dennoch alle weiteren Prozessierungsschritte unbeeinträchtigt vornehmen konnte, hatten die C-terminalen Modifikationen von p6* offensichtlich eine größere Wirkung auf die Spaltung selbst als auf nachfolgende regulatorische Ereignisse. Dies ist nicht weiter überraschend, da wir bereits im PR-Aktivitätstest keine signifikanten Effekte der modifizierten C-Termini auf die p6*-vermittelte PR-Inhibition beobachten konnten. Für die Beleuchtung dieses Aspekts waren unsere Mutanten somit ungeeignet.

D.5.3 Die C-terminalen csM4 und csM7-Mutationen blockieren die Freisetzung der Protease und führen zur Produktion nicht-infektiöser Viruspartikel

Während bei den csM5- und csM6-Viren die aminoterminal Freisetzung der PR verzögert ablief, wurde eine Spaltung zwischen p6* und PR bei den Varianten csM4 und csM7 vollständig verhindert. So konnten in den freigesetzten Viruspartikeln selbst 72 h nach Transfektion nur N-terminal verlängerte PR-Spezies nachgewiesen werden (Abbildung C.21). Dieser Befund bestätigt somit unsere Ergebnisse aus dem Peptidspaltexperiment, wo die Sequenzen PSHL-PQIT und PPYE-PQIT trotz positiver Vorhersagen nicht von maturaer PR gespalten wurden. Diese unvollständige Autoprozessierung der PR scheint im viralen Kontext enorme Auswirkungen auf die Reifung der Gag-Proteine zu haben. Demnach waren in freigesetzten Virionen weder die maturaen Spezies von Matrix-, Capsid-, oder Nukleocapsidprotein noch der beim ersten Prozessierungsschritt entstehende p15-Vorläufer (p7-p1-p6) nachweisbar. (C.5.3.1). Stattdessen konnten wir in Viruspartikeln ein ca. 50-kDa Intermediat mit dem CA-spezifischen Antikörper detektieren, das vermutlich kein natürliches Zwischenprodukt der Gag-Prozessierungskaskade darstellt und auch in Gegenwart verschiedener PR-Inhibitoren gebildet wird (Speck *et al.*, 2000). Ein vergleichbares Intermediat konnten Tessmer & Kräusslich nach Blockierung der N-terminalen PR-Spaltstelle im Provirusklon pNL4-3 in den resultierenden Viren beobachten (1998) und schlugen vor, dass es sich dabei um einen MA-CA-p2-NC-Vorläufer handelt. Offensichtlich ist die N-terminal verlängerte PR nicht in der Lage, die Spaltstelle zwischen p2 und p7 im Gag-Vorläufer zu prozessieren. Da diese Spaltung aber normalerweise zuerst erfolgt und bestimmend für die sequentielle Prozessierung des Gag-Vorläufers ist (Pettit *et al.*, 1994; Wiegers *et al.*, 1998), scheint sich dieser Prozessierungsdefekt auf nachfolgende Spaltereignisse auszuwirken, wobei

unnatürliche Intermediate gebildet werden. Dies würde auch erklären, warum wir mit unserem p7-spezifischen Antiserum keinen p15-Vorläufer detektieren konnten. Ebenso scheint die Spaltung zwischen MA und CA von der Anwesenheit einer murenen PR abhängig zu sein, da wir in csM4- und csM7-Partikeln keines dieser Proteine nachweisen konnten. Einen weitaus schwächeren Effekt hatte die Blockierung der C-terminalen PR-Spaltstelle von p6* auf die Reifung der Pol-Domänen. So konnten in den entsprechenden Viren neben geringen Mengen unvollständig gespaltener RT-IN-Vorläufer bereits die reifen RT- und IN-Spezies detektiert werden (C.5.3.2). Diese Beobachtungen decken sich ebenfalls mit den Berichten von Tessmer & Kräusslich, dass ein viraler p6*-PR-Vorläufer durchaus imstande ist, die Spaltungen in Pol korrekt, wengleich weniger effizient durchzuführen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die im Inneren der knospenden Partikel angeordneten Pol-Domänen besser zugänglich für den verlängerten PR-Vorläufer sind als die weiter außen liegenden, dicht gepackten Gag-Domänen (Abbildung D.2). Schließlich waren die csM4- und csM7-Viruspartikel nicht in der Lage, in einem Beobachtungszeitraum von 20-30 Tagen in CD4-positiven Lymphozyten zu replizieren. Wahrscheinlich verhindern diese umfassenden Gag-Prozessierungsdefekte die Kondensation des „Cores“. Ferner könnte die fehlende Infektiosität auf ein fehlerhaftes „uncoating“ des Capsids nach Eintritt in die Wirtszelle zurückzuführen sein, wie es bei PR-defizienten Viren der Fall ist (Kaplan *et al.*, 1993).

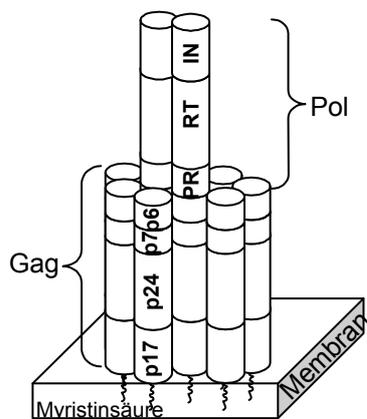


Abbildung D.2: Schematische Darstellung der Verpackung von Gag- und Gag-Pol-Vorläufern in knospende Viruspartikel. (Modifiziert nach Nermut *et al.*, 1994.) Durch die dichte Packung in nativen Viren sind die Spaltstellen innerhalb der Gag-Polyproteine für die Vorläufer-assoziierte PR schlecht zugänglich.

D.5.4 Die csM1-Mutante weist einen Prozessierungsdefekt des Nukleocapsid-Proteins auf und repliziert verzögert in humanen Lymphozyten

Im Gegensatz zu den C-terminalen Modifikationen hatte die Mutation der N-terminalen Spaltstelle von p6* keinerlei Einfluss auf die Freisetzung der PR (C.5.3.1). Diese war somit in der Lage, die Spaltung zwischen MA und CA sowie zwischen allen Pol-Domänen korrekt durchzuführen. Überdies konnten in diesen Viren vergleichbare Mengen Pol-spezifischer Produkte wie in Wildtyp-Partikeln nachgewiesen werden. Daraus geht hervor, dass der Leserastersprung im viralen Kontext trotz Veränderung der Heptanukleotidsequenz funktionell ist. Dies korreliert auch mit den Ergebnissen des „frameshift“-Reporterassay, wo wir keine signifikante Abweichung der „frameshift“-Rate mit dem entsprechenden Reporterkonstrukt feststellen konnten.

Dennoch zeigten diese Viren in humanen Lymphozyten eine verlangsamte Replikationskinetik, die im Vergleich zu Wildtyp-Viren stets um zwei bis vier Tage verzögert ablief (C.5.4.1). Dieses Verhalten war in zwei verschiedenen Zelllinien mehrmals reproduzierbar. Dabei konnten wir aufgrund von Sequenzanalysen ausschließen, dass es sich um replikationsdefekte Viren handelt, die durch eine Reversion wieder infektiös werden. Des Weiteren war die Infektiosität der csM1-Viren im Magi-Assay stark reduziert. Schließlich ergab eine weitere Western Blot-Analyse mit einem p7-spezifischen Antiserum, dass diese Viren offensichtlich einen das p7-Protein betreffenden Prozessierungsdefekt aufweisen. Während in Wildtyp-Viren neben dem murenen p7-Protein noch Reste des p15-Vorläufers (p7-p1-p6) vorhanden waren, konnten in csM1-Viren zusätzliche p7-Spezies detektiert werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die eingeführte Mutation, wie anfangs erwähnt, einen Aminosäureaustausch in p1 zur Folge hat (C.1.2.1), der sich an der P2'-Position der p7-p1 Spaltstelle befindet und vermutlich die Hydrolyserate dieser Spaltung beeinflusst. Demnach dürfte es sich bei der prominenten, ca. 8-kDa Bande oberhalb des murenen NC-Proteins um einen p7-p1-Vorläufer handeln. Leider verfügten wir über keinen p1-spezifischen Antikörper, um dies zu überprüfen. Dahingegen konnten wir mit einem p6-spezifischen Antikörper zeigen, dass die Spaltung zwischen p1 und p6 von dieser Mutation unbeeinflusst bleibt. Anscheinend reicht eine verzögerte Freisetzung von p7 aus, um die Infektiosität der resultierenden Viren stark zu beeinträchtigen. Dies belegen auch neuere Untersuchungen von Fehér und Mitarbeitern (2002), die zeigen konnten, dass eine verlangsamte Spaltung zwischen p7 und p1 zur Entstehung von Viren mit verminderter Infektiosität führt. Dahingegen scheinen Mutationen, die diese Spaltung beschleunigen, keine Auswirkung auf die resultierenden Viren zu haben. Offensichtlich stellt dieses späte Spaltereignis einen geschwindigkeitslimitierenden Schritt bei der Virusmorphogenese dar, der dem Virus die Möglichkeit für Sequenzvariationen offenlässt. Unterstützung für diese Hypothese liefern verschiedene Studien, die zeigen konnten, dass diese Spaltstelle besonders häufig von Sekundärmutationen in PR-inhibitorresistenten HIV-1 Varianten betroffen ist (Doyon *et al.*, 1996; Mammano *et al.*, 1998; Bally *et al.*, 2000; Côté *et al.*, 2001; Dauber *et al.*, 2002; Fehér *et al.*, 2002). Auf diese Weise können Inhibitor-assoziierte, primäre Mutationen in der PR, die die Aktivität des Enzyms herabsetzen, durch eine bis zu 60fach effizientere Hydrolyse der modifizierten Spaltstelle kompensiert werden (Pettit *et al.*, 2002). Allerdings ist stets nur das C-terminale p7-Halbsubstrat von Sekundärmutationen betroffen, da das N-terminale Tetrapeptid von p1 aufgrund der *cis*-aktiven Signale hochkonserviert ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Spaltung des p15-Vorläufers von der Anwesenheit der eigenen mRNA abhängig ist (Sheng & Erickson-Viitanen, 1994; Sheng *et al.*, 1997). Somit kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Mutation im p1-Protein mit der Bindung der RNA an den p15-Vorläufer interferiert und dadurch die Spaltung zwischen p7 und p1 verzögert wird. Dabei kann sich die Mutation auf zwei verschiedenen Ebenen auf diese Bindung auswirken. Zum einen könnte die Punktmutation auf RNA-Ebene deren komplexe Sekundärstruktur und somit ihr Bindemotiv verändern. Zum anderen könnte sich die Mutation auf Proteinebene auf die Konformation des p15-Vorläufers auswirken. Beide Möglichkeiten sind jedoch in Anbetracht einer einzigen Mutation eher

unwahrscheinlich! Während für das NC-Protein viele verschiedene Funktionen bei der viralen Replikation beschrieben sind, ist die Rolle des Spacer Peptids p1 noch nicht eindeutig geklärt. Dennoch konnten neuere Untersuchungen zeigen, dass vermutlich zwei konservierte Prolin-Reste in p1 essentiell für die Infektiosität und Reifung der Proteinvorläufer sind und bei der Stabilisierung der genomischen RNA-Dimere eine Rolle spielen (Hill *et al.*, 2002). Diese Reste sind allerdings in unserer csM1-Mutante unverändert.

Während also die Entstehung des ca. 8-kDa Intermediats in csM1-Viren plausibel ist, gibt es keine einleuchtende Erklärung für die zusätzlichen p7-spezifischen Intermediate mit Molekulargewichten zwischen 16- und 20-kDa in diesen Partikeln. Sollte die csM1-Mutation tatsächlich die von uns beabsichtigte Zerstörung der N-terminalen Spaltstelle von p6* bewirkt haben und dadurch andere Spaltereignisse beeinflussen, so könnte es sich bei diesen Produkten um Intermediate aus dem Gag-Pol-Vorläufer handeln. Allerdings ist die N-terminale Verlängerung des NC-Proteins durch die CA-Region aufgrund des Molekulargewichts auszuschließen. Auch eine C-terminale Erweiterung durch PR-Domänen ist unwahrscheinlich, da wir diese Intermediate nicht mit einem PR-spezifischen Antikörper nachweisen konnten. Eine weitere Möglichkeit wäre die Entstehung zusätzlicher „nonsense“-Proteine, wenn durch partielle Verschiebung des Leserasters um -2 aufgrund der neu eingeführten Heptanukleotidsequenz p7 C-terminal verlängert wird. Dies bleibt allerdings anzuzweifeln, da der -2 Leseraster durch viele in kurzen Abständen aufeinanderfolgende Stoppkodons nur Polyproteine <15-kDa liefern würde.

Schließlich stellt sich uns die Frage, inwieweit eine Änderung der Spaltkinetik am Aminoterminus von p6* zur Ausbildung des csM1-Phänotyps beiträgt. So konnten wir zwar nachweisen, dass diese Mutation keinen Einfluss auf die vollständige Aktivierung der PR hat, jedoch blieben etwaige Auswirkungen auf die Hydrolyseraten und Spaltreihenfolge in p6* verborgen. Chen und Mitarbeiter (2001) hatten in Zellkulturstudien mit Gag-Pol-Polyproteinen beobachtet, dass die Blockierung der internen und C-terminalen Spaltstelle von p6* einen stabilen NC-p6*-PR-Vorläufer liefert und daraus gefolgert, dass die Spaltstelle am Aminoterminus von p6* nicht funktionell ist. Wenn also tatsächlich nur die interne Spaltstelle von p6* genutzt wird, würde eine C-terminal um 8 Aminosäuren verlängerte NC-Variante aus dem Gag-Pol-Vorläufer freigesetzt. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Pettit und Mitarbeiter (2003) mit einem *in vitro* translatierten Gag-Pol-Volllängeprotein. Dennoch scheint diese Spaltstelle *in vivo* von Bedeutung zu sein, da sie ebenso häufig von Sekundärmutationen in PR-inhibitorresistenten Virusvarianten betroffen ist wie die Spaltstelle NC-p1 (Côté *et al.*, 2001). Um diese Frage zu beantworten, müsste die C-terminal verlängerte NC-Spezies in reifen Wildtyp-Viren nachgewiesen werden. Dies dürfte allerdings nicht trivial sein, da sich dieses Produkt nur um 8 Aminosäuren vom maturen NC-Protein unterscheidet und es somit einer hohen Auflösung bei der Auftrennung dieser NC-Spezies über SDS-PAGE bedarf. Außerdem beträgt der Anteil der aus dem Gag-Pol-Vorläufer stammenden NC-Variante nur etwa 5% des gesamten NC-Proteins, weshalb deren Detektion eine besonders hohe Sensitivität des verwendeten Antiserums voraussetzt. Aus diesen Gründen war es wohl bisher nicht möglich, diese verlängerte NC-Spezies in Viren nachzuweisen. Dahingegen wurden bereits sehr früh Peptide aus HI-Virionen isoliert, deren Sequenz dem

aminoterminalen Oktapeptid von p6* entspricht (Henderson *et al.*, 1992; Gorelick & Henderson, 1994), was ebenfalls für eine Prozessierung dieser Spaltstelle spricht.

D.6. Reihenfolge der Spaltereignisse in und um p6*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir versucht, durch gezielte Mutationen die Reihenfolge und Bedeutung der Spaltungen in und um p6* im viralen Kontext aufzuklären. Trotz der selektiven Analyse von Teilaspekten in reduktionistischen *in vitro* Testsystemen konnten wir mutationsbedingte Phänotypen nicht in jedem Fall eindeutig interpretieren. Vor allem eine Mutagenese der aminoterminalen PR-Spaltstelle von p6* war nicht möglich, ohne gleichzeitig *cis*-aktive RNA-Elemente oder die Spaltkinetik am C-Terminus des NC-Proteins aus dem Gag-Vorläufer zu beeinflussen. Während wir im Fall der C-terminalen Modifikationen von p6* eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus Peptidspaltexperimenten und Zellkulturanalysen feststellten, blieben uns direkte Effekte von Veränderungen der internen Spaltstelle bei der Virusreifung verborgen - obwohl sich die entsprechende Mutation durchaus signifikant auf die Spaltung eines Peptidsubstrats auswirkte. Allerdings wurde die Spaltung *in vitro* von maturer PR durchgeführt, während sie *in vivo* von der Vorläufer-assoziierten PR vermittelt wird. Da der PR-Vorläufer jedoch eine andere Substratspezifität besitzt als das mature Enzym, bleibt ungeklärt, ob die interne Spaltstelle von p6* im komplexen viralen Kontext durch diese Mutation überhaupt zerstört wurde. Außerdem wäre durchaus denkbar, dass bei deren Zerstörung eine alternative Spaltstelle in p6* vergleichbar effizient genutzt wird und die Prozessierungskaskade somit unbeeinträchtigt ablaufen kann.

Wenngleich unsere Mutationsanalysen keinen Rückschluss auf die Spaltkinetik am Aminoterminus von p6* zulassen, können wir dennoch Aussagen über die Prozessierungsreihenfolge von interner und C-terminaler PR-Spaltstelle treffen. Da die csM5- und csM6-Mutationen trotz einer verzögerten N-terminalen Freisetzung der PR keine weiteren Auswirkungen auf die Reifung der viralen Vorläuferproteine zeigten, wurde vermutlich die Reihenfolge der Spaltereignisse nicht verändert. Da in diesen Virionen neben der maturen 11-kDa PR auch geringe Mengen eines ca. 17-kDa PR-Vorläufers nachgewiesen werden konnten, scheint die C-terminale Spaltstelle von p6* *in vivo* tatsächlich erst nach der internen hydrolysiert zu werden, obwohl für die C-terminale Spaltstelle im Peptidspaltexperiment eine wesentlich höhere Hydrolyserate ermittelt wurde. Ein vergleichbarer Ablauf der Spaltereignisse ergab sich auch aus Prozessierungsstudien mit p6*-PR-Vorläufern. Allerdings war die Reihenfolge der Spaltungen in dem verwendeten *in vitro* System pH-abhängig (Louis *et al.*, 1999). Auch die Spaltanalysen mit einem *in vitro* translatierten Gag-Pol-Volllängeprotein führten zu dem Ergebnis, dass die interne Spaltstelle von p6* als eine der ersten hydrolysiert wird (Pettit *et al.*, 2003). Dennoch waren auch hier keine physiologischen Bedingungen gegeben. Zwar wurde ein 17-kDa PR-Intermediat bereits in infizierten Zellen und in Viruspartikeln nachgewiesen. In diesen Fällen konnte jedoch die N-terminal verlängerte PR-Spezies nur detektiert werden, nachdem die Spaltung der C-terminalen PR-Spaltstelle von p6* durch PR-Inhibitoren (Lindhofer *et al.*, 1995) oder durch Mutation der Spaltstelle (Tessmer & Kräusslich, 1998) vollständig verhindert

worden war. Bei Interpretation dieser Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass die Blockierung einzelner Spaltungen durchaus die Hydrolyseraten an anderen Spaltstellen und somit auch die natürliche Prozessierungsreihenfolge beeinflussen kann (Pettit *et al.*, 1994; Pettit *et al.*, 2003)

Dahingegen führten unsere Mutationen nicht zu einer Blockierung, sondern lediglich zu einer Verzögerung der Spaltung am C-Terminus von p6*. Dies ermöglicht uns, das letzte Intermediat, das bei der schrittweisen Autoaktivierung der PR entsteht, in Viren sichtbar zu machen, ohne den regulären Ablauf der Virsureifung zu stören. Da in den Viruspartikeln, die Restmengen dieser p6*-PR-Vorläufer enthielten, gleichzeitig nur reife RT und IN-Spezies nachweisbar waren, scheint die C-terminale Freisetzung der PR der N-terminalen voranzugehen. Zwar konnten auch Almog und Mitarbeiter (1996) in Viruspartikeln aus chronisch infizierten U937 Zellen diesen PR-Vorläufer nachweisen. Allerdings gingen sie davon aus, dass es sich dabei um die vorherrschende, katalytisch aktive PR-Spezies in reifen Viren handelt. Dahingegen konnten wir in maturen Wildtyp-Viren, die aus Transfektionen oder Infektionen gewonnen wurden, ausschließlich die reife 11-kDa Form der PR nachweisen. Auch wenn mehrfach gezeigt werden konnte, dass eine N-terminal verlängerte PR-Variante bereits eine ähnliche katalytische Aktivität besitzt wie das reife Enzym (Phylip *et al.*, 1992; Co *et al.*, 1994; Louis *et al.*, 1994; Zybarth *et al.*, 1994; Almog *et al.*, 1996) und durchaus in der Lage ist, die Spaltungen in Pol korrekt durchzuführen, findet eine Reifung der Gag-Proteine jedoch nur in Anwesenheit der maturen PR statt (Tessmer & Kräusslich, 1998 und diese Arbeit).

D.7 Herstellung von synthetischen HI-viralen Genen zur Untersuchung des Einflusses von p6* auf die Protease-Aktivität in Zellkultur

Obwohl die HIV-1 PR zu einem der bestuntersuchten Enzyme gehört und zu einem wichtigen Ziel bei der antiviralen Therapie geworden ist, sind die molekularen Mechanismen, die zur Kontrolle der PR-Aktivität im Replikationszyklus beitragen, noch nicht im Detail verstanden. Befunde verschiedener Arbeitsgruppen lenkten dabei die Aufmerksamkeit in den letzten Jahren unter anderem auf das kleine 68 Aminosäuren umfassende „transframe“-Protein p6*. Allerdings gibt es bislang sehr unterschiedliche Hypothesen über eine p6*-vermittelte Regulation der PR-Aktivierung. Während die ersten durchgeführten Untersuchungen aufgrund der Lage von p6* Parallelen zum Pepsinogen-Propeptid aufzeigten (Partin *et al.*, 1991), deuteten andere Studien darauf hin, dass es sich bei dem hydrophilen, flexiblen „transframe“-Protein um einen Dimerisierungsinhibitor der PR handeln könnte (Schramm *et al.*, 1993; Zybarth & Carter, 1995). Wiederum andere Untersuchungen legten nahe, dass die Nutzung kryptischer PR-Spaltstellen in p6* durch kompetitive Blockade des aktiven Zentrums zu einer verlangsamten autokatalytischen Aktivierung der PR führt (Zybarth *et al.*, 1994). Des Weiteren wurde auch für das N-terminale Octapeptid (FLREDLAF) von p6* eine pH-abhängige, kompetitive Inhibition der HIV-1 PR beschrieben (Louis *et al.*, 1998). Schließlich deuten auch unsere eigenen Untersuchungen mit rekombinantem p6*-Protein auf einen kompetitiven Inhibitionsmechanismus hin

(Paulus *et al.*, 1999). Nach einem von uns postulierten Modell hält dabei das p6*-Protein nach der N-terminalen Autoproteolyse der PR deren aktives Zentrum durch seinen freien C-Terminus so lange besetzt, bis es im knospenden Viruspartikel von anderen Substraten verdrängt wird.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten die *in vitro* Ergebnisse auf ein einfaches Zellsystem übertragen werden, bei dem der Einfluss von p6* auf die Aktivität der viralen PR unter Ausschluss anderer potentiell modulierender Proteine wie p2 (Pettit *et al.*, 1994; Misumi *et al.*, 1997) und Vif (Kotler *et al.*, 1997; Potash *et al.*, 1998; Baraz *et al.*, 1998; Friedler *et al.*, 1999; Bardy *et al.*, 2001; Baraz *et al.*, 2002; Blumenzweig *et al.*, 2002) analysiert werden kann. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich erörtert, sind die Möglichkeiten, die p6*-kodierende Region im viralen Kontext zu modifizieren, aufgrund des überlappenden gag-Leserahmens stark limitiert. Überdies hat eine Veränderung des C-terminalen Bereichs von p6* auch immer eine Modifikation der Spaltstelle zwischen p6* und der PR zur Folge. Dahingegen kann in einem reduktionistischen Zellsystem durch die konkrete „trans“-Situation von isoliert exprimiertem p6*-Protein und PR die Bedeutung des freien C-Terminus von p6* unabhängig untersucht werden. Schließlich bietet ein vereinfachtes Zellsystem auch die Möglichkeit, den molekularen Mechanismus der p6*-vermittelten PR-Regulation *in vivo* aufzuklären. Das grundlegende Verständnis dieser Interaktion wird schließlich zur (negativ)-Modulation der PR-Aktivierung im Sinne einer intrazellulären Immunisierung beitragen

D.7.1 Effiziente Expression HI-viraler Proteine auf der Basis synthetischer Gene

Die HI-viralen Gene können generell in zwei Klassen unterteilt werden. So werden die einen von vollständig gespleißten RNAs exprimiert, während die anderen Introns enthalten. Die vollständig gespleißten RNAs werden über den herkömmlichen Weg zellulärer RNAs ins Zytoplasma transportiert und sind Rev-unabhängig. Dahingegen werden intronhaltige RNAs normalerweise im Zellkern zurückgehalten und können nur in Anwesenheit von Rev exportiert werden (Hadzopoulou *et al.*, 1989). Zudem scheinen suboptimale Spleißvorgänge beim zeitlich stringent regulierten Rev-abhängigen RNA-Transport eine Rolle zu spielen (Chang *et al.*, 1989; Mikaelian *et al.*, 1996). Da sowohl die im *pol*-Leserahmen kodierten p6*- und PR-Proteine als auch das akzessorische Protein Vpr von ungespleißten bzw. einfach gespleißten mRNAs abgelesen werden, war deren isolierte Expression in Zellkultur in der Vergangenheit nur bei Kotransfektion eines Rev/RRE-Systems möglich. Allerdings stellte sich heraus, dass die *cis*-aktiven, inhibitorischen Elemente durch entsprechende Modifikation der Gensequenz eliminiert werden können, wodurch eine Rev-unabhängige Expression des Gens möglich wird. So erlaubt das Prinzip des degenerierten Codes Änderungen auf DNA-Basis, ohne die Aminosäuresequenz und damit die Struktur und Funktion des entsprechenden Genprodukts anzutasten. Auf diese Weise konnten Graf und Mitarbeiter (2000) ein synthetisches gag-Gen erzeugen, das auch in Abwesenheit von Rev exprimiert wird. Überdies zeigte diese synthetische gag-Variante eine wesentlich effizientere Expression als das natürliche Gen bei Kontransfektion mit Rev. Bei der Modifikation des gag-Gens wurden vornehmlich A und T an der „wobble“-Position der

Codons durch G und C ersetzt. Da sich der hohe AU-Gehalt lentiviraler RNA-Transkripte bekanntlich negativ auf deren Stabilität auswirkt (Chen *et al.*, 1995), scheint die Erhöhung des GC-Gehalts durch Anpassung der Gensequenz an die Triplethhäufigkeit in Säugerzellen die Translationseffizienz enorm zu steigern.

Aufgrund dieser Beobachtungen führten wir die entsprechenden Modifikation auch bei den Gensequenzen durch, die für die viralen Proteine Vpr, PR und p6* kodieren. Dabei wurde der GC-Gehalt dieser Gene um durchschnittlich 25-35% erhöht. Tatsächlich konnten wir auf diese Weise eine effiziente, Rev-unabhängige Expression der entsprechenden Genprodukte in Säugerzellen nachweisen, was darauf hindeutet, dass die CRS-Sequenzen in den für PR, Vpr und p6* kodierenden Regionen durch Modifizierung der Nukleotidsequenzen zerstört wurden.

D.7.2 Entwicklung von Testsystemen zum Nachweis von Aktivität und Zytotoxizität der HIV-1 Protease

Seit langem ist bekannt, dass die Prozessierung der HIV-1 Gag- und Gag-Pol-Vorläufer durch die virale PR essentiell notwendig für die Entstehung infektiöser Viruspartikel ist (Kohl *et al.*, 1988; Kaplan *et al.*, 1993; Arrigo *et al.*, 1995). Obwohl der vollständige Verlust der proteolytischen Aktivität durch Mutation des aktiven Zentrums oder durch den Einsatz von PR-Inhibitoren die Virusreifung verhindert (Kohl *et al.*, 1988; Seelmeier *et al.*, 1988; Loeb *et al.*, 1989), ist im Gegenzug eine übermäßige PR-Aktivität ebenso schädlich für die virale Replikation. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der HIV-1 PR zu einer verfrühten Prozessierung der 55-kDa Gag-Vorläufer führt und die Freisetzung von Viruspartikeln verhindert (Wagner *et al.*, 1992; Luukkonen *et al.*, 1995). Außerdem bewirkt eine übermäßige PR-Aktivität im Zytoplasma der Zellen stets starke zytotoxische Effekte durch die unkontrollierte Spaltung zellulärer Proteine (Shoeman *et al.*, 1990; Oswald & von der Helm, 1991; Rivière *et al.*, 1991; Shoeman *et al.*, 1991; Tomasselli *et al.*, 1991).

In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte in transienten Transfektionsexperimenten die funktionsdefiziente HIV-1 PR (PR⁻) problemlos exprimiert werden (C.6.3.1), während der Nachweis der katalytisch aktiven PR-Varianten (PR und PR-PR) nur in Anwesenheit des „active-site“-Inhibitors Saquinavir möglich war. Vermutlich führte die unkontrollierte Aktivität der funktionellen PR zu einer Schädigung und selektiven Eliminierung der exprimierenden Zellen. Außerdem fiel auf, dass die für die Expression der Wildtyp-PR ermittelte optimale Inhibitorkonzentration von 1 µM nicht ausreichte, um das kovalente PR-Dimer in vergleichbaren Mengen zu exprimieren. So wurde auch von anderen Arbeitsgruppen eine erhöhte Aktivität und damit einhergehende Zytotoxizität von PR-Dimeren oder Multimeren beobachtet (Kräusslich, 1991; Arrigo & Huffman, 1995). Dies scheint darauf zu beruhen, dass der für die Aktivierung der HIV-1 PR notwendige Dimerisierungsschritt in diesem Fall wegfällt. Schließlich wurde die starke zytotoxische Wirkung der funktionellen PR dazu verwendet, ein quantitatives Testsystem zu etablieren, mit dem der Einfluss von potentiellen PR-Inhibitoren wie p6* auf die Aktivität der HIV-1 PR in Zellkultur untersucht werden kann. Hierfür wurden die synPR-Konstrukte mit einem Luciferse-Expressionsplasmid kotransfiziert und die zytotoxische Wirkung der PR-Aktivität in

einem Luciferase-Reportertest quantifiziert (C.6.3.2). Zudem konnten wir durch Kotransfektion eines Gag-Plasmids nachweisen, dass die PR, der eine synthetische Gensequenz zugrunde liegt, in Zellkultur funktionell ist. Dabei wurde das Gag-Polyprotein spezifisch von der PR prozessiert, was durch Detektion des CA-Proteins im Western Blot bestätigt wurde (C.6.3.3). Somit kann auch die Spaltung eines natürlichen PR-Substrats zur Quantifizierung inhibitorischer Einflüsse herangezogen werden.

D.7.3 Die Kopplung an Fusionspartner ermöglicht die Expression von p6* in Säugerzellen

Während die Vpr- und PR-Genprodukte problemlos mit den entsprechenden Antisera in Zelllysaten nachgewiesen wurden, konnte das p6*-Protein nur in Verbindung mit einem Fusionspartner erfolgreich exprimiert werden (C.6.4). Vermutlich ist das kleine „transframe“-Protein im isolierten Zustand sehr instabil und wird aufgrund seiner unvollständigen Faltung rasch von zellulären PR degradiert. Im viralen Kontext hingegen scheint p6* als integraler Bestandteil des Gag-Pol-Vorläuferproteins vor dem frühzeitigen Abbau durch zelluläre PR geschützt zu sein. Ähnliche Probleme bereitete auch anfänglich die Expression von rekombinantem p6* im bakteriellen System (persönliche Mitteilung von C. Paulus). Da gezeigt werden konnte, dass kleine Polypeptide durch Kopplung an ein gut strukturiertes Fremdprotein stabilisiert werden können (Lee *et al.*, 1984), wurde das p6*-Protein an die Reinigungshilfe GST fusioniert. Um p6* für Zellkulturversuche entsprechend zu stabilisieren, stellten wir daher zwei verschiedene Fusionskonstrukte her. So ermöglicht einerseits die Kopplung von p6* an GFP einen Nachweis des Genprodukts sowohl im Western Blot als auch durch Autofluoreszenz. Andererseits wählten wir Vpr als Fusionspartner, um p6* in knospende Viruspartikel zu dirigieren. Dabei wurde in beiden Fällen p6* N-terminal über einen Linker an den Fusionspartner gekoppelt, damit der für die Regulation der PR bedeutende C-Terminus von p6* frei vorlag.

Aufgrund des stabilisierenden Vpr-Fusionspartners konnten wir nun auch erstmals die Expression des p6*-Proteins in Zellkultur nachweisen. Ebenso erfolgreich verlief die Produktion des Fusionsproteins EGFP-p6* in Säugerzellen. Dennoch war ein partieller Abbau des p6*-Anteils in beiden Fusionsproteinen zu beobachten. Da bisher keine Zellkultur-Studien mit isoliert exprimiertem p6* durchgeführt wurden, bleibt noch zu klären, welche Prozesse am raschen Abbau des hydrophilen „transframe“-Proteins in Säugerzellen beteiligt sind. Auffällig war außerdem die intrazelluläre Lokalisation des EGFP-p6*-Proteins. Während die Fluoreszenzmikroskopie transfizierter Zellen für EGFP eine gleichmäßige intrazelluläre Verteilung ergab, schien sich EGFP-p6* vermehrt um den Zellkern herum anzureichern (Abbildung C.30), was darauf hindeutet, dass p6* mit Zellkern-assoziierten Strukturen interagiert. Obwohl eine Interaktion von p6* mit Membranen aufgrund seiner hydrophilen Natur eher unwahrscheinlich ist, wurden p6*-PR-Intermediate aus den Membran-Fractionen infizierter Zellen isoliert (Lindhofer *et al.*, 1995). Im Gegenzug befand sich aber das rekombinante GST-p6*-Protein, das für *in vitro* Studien aufgereinigt worden war

(C.4.1), überwiegend im löslichen Anteil des Bakterienlysats. Allerdings kann dies auch auf den hochlöslichen GST-Fusionspartner zurückzuführen sein.

D.7.4 Verpackung von negativ modulierenden Vpr-Fusionsproteinen in Viruspartikel

Das 96 Aminosäuren umfassende Virion-assoziierte Protein R (Vpr) wurde bisher bei fast allen Lentiviren identifiziert, was darauf hindeutet, dass es *in vivo* eine wichtige Rolle im viralen Replikationszyklus spielt. In der Tat sind mittlerweile viele verschiedene biologische Aktivitäten von Vpr beschrieben, darunter Ionenkanalbildung (Piller *et al.*, 1996), Transaktivierung verschiedener heterologer Promotoren (Cohen *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1995; Felzien *et al.*, 1998; Stark *et al.*, 1998), Koaktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors (Kino *et al.*, 1999), Regulation der Zell-Differenzierung (Levy *et al.*, 1993) und Induktion von Apoptose (Stewart *et al.*, 1997; Ayyavoo *et al.*, 1997). Überdies ist es am Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern beteiligt (Heinzinger *et al.*, 1994; zur Übersicht: Emerman, 1996; Bukrinsky & Adzhubei, 1999) und wurde vor kurzem aufgrund seiner NLS und NES als nucleozytoplasmatisches „shuttle“-Protein identifiziert (Sherman *et al.*, 2001). Außerdem ist bekannt, dass es in infizierten proliferierenden T-Zellen einen Zellzyklus-Arrest in der G₂-Phase induziert (zur Übersicht: Levy *et al.*, 1993, Jowett *et al.*, 1995; Rogel *et al.*, 1995; Bukrinsky & Adzhubei, 1999), was vermutlich die LTR-abhängige Transkription der viralen Gene begünstigt (Goh *et al.*, 1998). Mutationsexperimente haben allerdings gezeigt, dass eine verkürzte Form des Vpr-Proteins (78 AS), dem ein spezieller Arg-Rest im C-terminalen Bereich fehlt, die Fähigkeit zur Induktion des G₂-Arrests verliert, ohne aber dabei die Verpackung von Vpr in Viruspartikel zu beeinträchtigen (Di Marzio *et al.*, 1995). Um eine effiziente Expression von Vpr-Proteinen in Zellkultur zu gewährleisten, empfahl es sich deshalb bei der Herstellung der synVpr-Gene, diese C-terminal verkürzte Vpr-Sequenz als Vorlage zu verwenden.

Um den Einfluss von überexprimierten Vpr-p6*-Fusionsproteinen auf die HIV-1 Replikation zu untersuchen, wurden insgesamt vier eukaryontische Expressionskonstrukte hergestellt, die für Vpr bzw. für Vpr-Fusionen mit EGFP, PR^{*} und p6* kodieren. Diesem Ansatz lag zugrunde, dass Vpr über Interaktion mit dem Linker Protein p6 in neuentstehende Viruspartikel eingebaut wird (Checroune *et al.*, 1995; Selig *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2001). Mit Vpr fusionierte Genabschnitte des *pol*-Leserahmens, die üblicherweise aufgrund des seltenen Leserastersprungs nur im Verhältnis 20:1 entstehen, werden auf diese Weise im gleichen Zellkompartiment wie Gag- und Gag-Pol-Vorläufer lokalisiert und können so mit diesen quantitativ interagieren (Paxton *et al.*, 1993). Überdies scheint das kleine Vpr-Protein die Faltung und biologische Funktion heterologer Fusionspartner nicht zu beeinträchtigen (Wu *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997). So führte die Expression einer transdominant-negativen PR^{*}-Mutante, die an das Vpr-Homolog Vpx gekoppelt wurde, zum effizienten Einbau in HIV-2 Viruspartikel und durch Heterodimerbildung mit der viralen PR-Domäne zu einer unvollständigen Gag- und Gag-Pol-Prozessierung sowie zu einer verminderten Infektiosität der freigesetzten Viruspartikel (Wu *et al.*,

1996). Allerdings war die Expression dieser Konstrukte von der Anwesenheit eines Rev/RRE-Systems abhängig. Dahingegen konnten wir auf der Basis synthetischer Gensequenzen diese Rev-Abhängigkeit überwinden und alle Vpr-Varianten konzentrationsabhängig in Säugerzellen überexprimieren (C.6.4). Dabei konnten wir auch über den autofluoreszierenden EGFP-Anteil durch Fluoreszenzmikroskopie Vpr-EGFP-exprimierender Zellen frühere Berichte bestätigen, aus denen hervorgeht, dass Vpr bei Abwesenheit anderer viraler Proteine vornehmlich im Zellkern lokalisiert ist (Lu *et al.*, 1993; Di Marzio *et al.*, 1995; Fouchier *et al.*, 1998).

Um das „targeting“ der Vpr-Proteine in neuentstehende Viruspartikel zu überprüfen, wurden H1299 Zellen mit den synthetischen Vpr-Konstrukten und dem Provirusklon HX10 kotransfiziert. Die anschließenden Western Blot-Analysen mit einem Vpr-spezifischen Antiserum konnten bestätigen, dass die Proteine Vpr, Vpr-p6* und Vpr-PR⁻ gleichermaßen effizient in Viruspartikel verpackt werden (C.6.5.1). Nachdem anfänglich vermutet wurde, dass viruseigene Vpr-Moleküle in gleichen Mengen wie Gag-Vorläufer (Cohen *et al.*, 1990) oder RT-Moleküle (Kobinger *et al.*, 1998) in HI-Virionen eingebaut werden, ergaben jüngere Studien, dass das Verhältnis von Vpr zu Gag in Viruspartikeln ungefähr 1 : 7 beträgt (Müller *et al.*, 2000). Das bedeutet, dass nur etwa 200 Vpr-Moleküle pro HI-Virion vorhanden sind. Diese geringe Konzentration reichte nicht aus, um mit unserem Vpr-spezifischen Antiserum im Western Blot ein Signal zu erzeugen. Des Weiteren wurde berichtet, dass es für die Effizienz der Verpackung von Vpr in Viruspartikel keine Rolle spielt, ob Vpr in den Zellen in *cis* oder durch einen heterologen Promotor exprimiert wird (Poon *et al.*, 1998; Hrimech *et al.*, 1999). Diese Befunde wurden aber kürzlich wiederlegt, indem gezeigt werden konnte, dass die transiente Expression eines Vpr-Plasmids bei Kotransfektion proviraler DNA die Menge der verpackten Vpr-Moleküle drastisch erhöht und dass dieser Einbau direkt proportional zur Konzentration der verwendeten Vpr-Plasmidmenge ist (Singh *et al.*, 2001). Diese Daten korrelieren gut mit unseren Ergebnissen und bestätigen, dass die Verpackung von in *trans* exprimierten Vpr-Fusionsproteinen in Viruspartikel regulierbar und effizient ist.

D.7.5 Die Koexpression der synthetischen Gene führt zur verminderten Freisetzung von Viruspartikeln aus transfizierten Zellen

Um den Einfluss der synthetischen Gene auf die Expression und Reifung viraler Proteine zu untersuchen, wurden Säugerzellen mit proviraler DNA und den PR⁻, p6*- und Vpr-Varianten transfiziert und die resultierenden Viruspartikel sodann quantitativ im p24-ELISA und qualitativ im Western Blot analysiert. Dabei konnten wir zeigen, dass die Koexpression der synthetischen PR⁻ und p6*-Gene generell zu einer stark reduzierten Freisetzung neuer Viruspartikel führte (C.6.5.2), während Vpr alleine keinen Einfluss auf die Partikelfreisetzung hatte. Dennoch interferierte das Einbringen von Vpr-PR⁻ bzw. Vpr-p6* nicht, wie erwartet, mit der virus-assoziierten Prozessierung der Gag-Vorläufer, da alle rekombinanten Viren bereits matures CA-Protein aufwiesen. Dies war überraschend, da bereits Wu und Mitarbeiter (1996) für HIV-2 zeigen konnten, dass Viren, die in *trans* mit Vpx-PR⁻-Fusionsproteinen komplementiert wurden, erhöhte Mengen an unprozessierten Gag- und Gag-Pol-

Vorläufern enthielten und dass diese Effekte vergleichbar mit denen eines potenten „active site“-PR-Inhibitors waren. Allerdings unterscheidet sich die in dieser Studie verwendete transdominant negative PR-Variante in zwei wesentlichen Punkten von unserem Fusionskonstrukt. So wurde zum einen für das spezifische „targeting“ der PR-Mutante in HIV-2-Partikel nicht Vpr, sondern das Vpx-Protein als Fusionspartner verwendet. Zwar verfügt auch HIV-2 über ein Vpr-Protein, dieses ist aber dort auf den Kerntransport des PIC spezialisiert und wird nicht, wie Vpx in Viren miteingebaut. So sind im Vpr-Protein von HIV-1 alle Funktionen der HIV-2 Proteine Vpx und Vpr vereinigt. Dabei können sich zusätzliche Eigenschaften von Vpr im Vergleich zu Vpx bei der Verwendung als Fusionspartner durchaus nachteilig auswirken. So wurde beispielsweise für Vpr gezeigt, dass es Oligomere ausbilden kann (Zhao *et al.*, 1994; Schüler *et al.*, 1999; Henklein *et al.*, 2000; Sawaya *et al.*, 2000; Jenkins *et al.*, 2001). Sollte dadurch bedingt die Homodimerisierung von Vpr-PR⁻-Fusionsproteinen gegenüber der erwünschten Heterodimerbildung mit viralen PR-Vorläufern bevorzugt werden, würde die Aktivität der viralen PR und somit die Prozessierung der Gag-Vorläufer nicht wesentlich beeinträchtigt. Wenn Vpx nicht über entsprechende Oligomerisierungsdomänen verfügt, so würde in diesem Fall aber die Heterodimerbildung des Fusionsproteins mit viraler PR begünstigt und es könnten überwiegend nicht-funktionelle PR-Dimere gebildet werden. Ein weiterer Unterschied betrifft die Wahl des Promotors für die Expression der PR-Fusionsproteine. Während in unserem Fall die Expression der synthetischen Gene von der viralen Gen-Expression entkoppelt wurde, war die Expression der Vpx-PR-Variante vom Rev/RRE-System des kotransfizierten Provirus abhängig. So könnte eine synchronisierte Expression stärkere Wechselwirkungen der viralen und transdominant negativen PR-Proteine erlauben, während vermutlich eine raschere Expression der synthetischen Genprodukte Interaktionen mit den verzögert gebildeten viralen Komponenten erschwert.

Schließlich konnten wir auch in Gegenwart der Proteine EGFP-p6* und Vpr-p6* eine verminderte Virusfreisetzung beobachten, wenngleich dieser Effekt weniger stark ausgeprägt war als in Anwesenheit der PR⁻-Varianten. Dabei darf nicht ausgeschlossen werden, dass im Fall von EGFP-p6* eine verminderte Entstehung von Viruspartikeln auch auf zytotoxische Effekte des EGFP-Anteils zurückzuführen ist (Liu *et al.*, 1999).

D.7.6 Ausblick: Optimierung der p6*-Fusionsproteine für eine effiziente negativ-Modulation der HIV-1 Protease

Auf der Basis synthetischer Genen konnten wir ein Zellkultursystem entwickeln, das die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von p6* auf die HIV-1 PR erlaubt. Da die Expression eines aus dem viralen Kontext isolierten p6*-Proteins nicht möglich war und sich p6* selbst nach Einbindung in Fusionsproteine als nur mäßig stabil erwies, sollten weitere Ansätze darauf abzielen, das p6*-Protein in Zellkultur zusätzlich zu stabilisieren. So könnte beispielsweise eine Reduktion des p6*-Proteins auf eine für die inhibitorische Wirkung notwendige Mindestlänge etwaige Angriffsstellen für zelluläre PR eliminieren.

Generell konnten zwar Vpr-p6*-Fusionsproteine effizient in neusezernierte Viruspartikel verpackt werden, ohne aber eine weitere Reifung der Virionen wesentlich zu beeinflussen. Dies könnte auch daran liegen, dass in den freigesetzten Viren durch die hohe Konzentration viraler Proteine eine intensive Wechselwirkung von viraler PR und *in trans* komplementierten p6*-Fusionsproteinen erschwert wird. Da wir nur Volllänge-Vpr-p6*-Fusionsproteine in Virionen detektieren konnten, scheint die interne Spaltstelle von p6* nicht *in trans* von der viralen PR hydrolysiert zu werden. Dies würde entweder dafür sprechen, dass diese Spaltstelle im viralen Kontext nur intramolekular von der Vorläufer-assoziierten PR gespalten wird oder aber nahelegen, dass die PR zu diesem Zeitpunkt der Maturation entweder andere Substrate bevorzugt oder andere Spaltstellen besser zugänglich sind. Dabei wäre es durchaus denkbar, dass die Freisetzung von p6* aus dem Fusionsprotein förderlich für eine intensivere Wechselwirkung mit der viralen PR innerhalb der Viruspartikel ist.

Um außerdem die Wirkung von p6* gegenüber der PR zu steigern, sollen weitere Mutationsanalysen die inhibitorische Potenz verschiedener C-terminaler Tetrapeptide ermitteln. In diesem Zusammenhang würde sich beispielsweise die Sequenzfolge SYEL anbieten, für die bereits im PR-Aktivitätstest ein besonders niedriger IC₅₀-Wert ermittelt wurde (Paulus *et al.*, 1999). Hierbei können viele unterschiedliche Aminosäurekombinationen ausgetestet werden, da der C-Terminus von p6* bereits frei vorliegt und keine Spaltbarkeit der entsprechenden Sequenz vorausgesetzt werden muss. Diese verschiedenen p6*-Varianten könnten demnach in Zellkultur die Prozessierung eines natürlichen Substrats durch die PR unterschiedlich effizient inhibieren.

Bei einem klaren Hinweis auf eine Beeinflussung der PR-Aktivität sollen CD4-positive Zelllinien angelegt werden, die p6*- und PR⁻-Varianten mit dem besten inhibitorischen Potential stabil exprimieren. Diese Zellen sollen dann mit unterschiedlichen HIV-Isolaten infiziert werden, woraufhin der Einfluss der überexprimierten, transdominant negativen Proteine auf die Reifung und Infektiosität freigesetzter Viruspartikel untersucht wird. Sollten diese Versuche erfolgreich verlaufen, werden die entsprechenden p6*- und PR⁻-Gene unter die Kontrolle eines HIV-1 LTR-Promotors gestellt, um die Transgen-Expression an eine HIV-Infektion zu koppeln. Damit es erst im Fall einer HIV-Infektion zur Expression der inhibitorischen Transgene kommt, sollten diese außerdem durch Einführen von CRS-Sequenzen und Anfügen eines RRE-Elements wieder in eine Rev-Abhängigkeit überführt werden. Im günstigen Fall kann diese Strategie Berücksichtigung bei weiteren gentherapeutischen Anwendungen finden.

E Literaturverzeichnis

- Almog, N., Roller, R., Arad, G., Passi-Even, L., Wainberg, M. A. & Kotler, M. (1996): A p6^{Pol}-protease fusion protein is present in mature particles of human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* **70**, 7228-7232.
- Arrigo, S. J. & Huffman, K. (1995): Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by inducible expression of HIV-1 PR multimers, *J. Virol.* **69**, 5988-5994.
- Arrigo, S. J., Haines, J. K. & Huffman, K. M. (1995): Intrinsic activity of human immunodeficiency virus type 1 protease heterologous fusion proteins in mammalian cells, *DNA Cell Biol.* **14**, 15-23.
- Arthos, J., Deen, K. C., Chaikin, M. A., Fornwald, J. A., Sathe, G., Sattentau, Q. J., Clapham, P.R., Weiss, R. A., McDougal, J. S. & Pietropaolo, C., et al. (1989): Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV, *Cell* **57**, 469-481.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G. & Struhl, K. (1987): *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Ayyavoo, V., Mahalingam, S., Rafaeli, Y., Kudchodkar, S., Chang, D., Nagashunmugam, T., Williams, W. V. & Weiner, D. B. (1997): HIV-1 viral protein R (Vpr) regulates viral replication and cellular proliferation in T cells and monocytoïd cells in vitro, *J. Leukoc. Biol.* **62**, 93-99.
- Babe, L. M., Pichuanes, S. & Craik, C. (1991): Inhibition of HIV protease by heterodimer formation, *Biochemistry* **30**, 106-111.
- Baca, M. & Kent, S. B. (1993): Catalytic contribution of flap-substrate hydrogen bonds in "HIV-1 protease" explored by chemical synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**, 11638-11642.
- Bally, F., Martinez, R., Peters, S., Sudre, P. & Telenti, A. (2000): Polymorphism of HIV type 1 gag p7/p1 and p1/p6 cleavage sites: clinical significance and implications for resistance to protease inhibitors, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**, 1209-1213.
- Barat, C., Schatz, O., Le Grice, S. & Darlix, J. L. (1993): Analysis of the interactions of HIV1 replication primer tRNA(Lys,3) with nucleocapsid protein and reverse transcriptase, *J. Mol. Biol.* **231**, 185-190.
- Baraz, L., Friedler, A., Blumenzweig, I., Nussinov, O., Chen, N., Steinitz, M., Gilon, C. & Kotler, M. (1998): Human immunodeficiency virus type 1 Vif-derived peptides inhibit the viral protease and arrest virus production, *FEBS Lett.* **441**(3):419-26.
- Baraz, L., Hutoran, M., Blumenzweig, I., Katzenellenbogen, M., Friedler, A., Gilon, C., Steinitz, M. & Kotler, M. (2002): Human immunodeficiency virus type 1 Vif binds the viral protease by interaction with its N-terminal region, *J. Gen. Virol.* **83**, 2225-2230.
- Bardy, M., Gay, B., Pebernard, S., Chazal, N., Courcoul, M., Vigne, R., Decroly, E. & Boulanger, P. (2001): Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vif with Gag and Gag-Pol precursors: co-encapsidation and interference with viral protease-mediated Gag processing, *J. Gen. Virol.* **82**, 2719-2733.
- Barret, A. J., Rawlings, N. D. & Woessner, J. F. (1998): *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, Inc., London.
- Battula, N. & Loeb, L. A. (1976): On the fidelity of DNA replication. Lack of exodeoxyribonuclease activity and error-correcting function in avian myeloblastosis virus DNA polymerase, *J. Biol. Chem.* **251**, 982-986.
- Beissinger, M., Paulus, C., Bayer, P., Wolf, H., Rösch, P. & Wagner, R. (1996): Sequence-specific resonance assignments of the ¹H-NMR spectra and structural characterization in solution of the HIV-1 transframe protein p6*, *Eur. J. Biochem.* **237**, 383-392.
- Bennett, R. P., Nelle, T. D. & Wills, J. W. (1993): Functional chimeras of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag protein, *J. Virol.* **67**, 6487-6498.
- Bennett, R. P., Rhee, S., Craven, R. C., Hunter, E. & Wills, J. W. (1991): Amino acids encoded downstream of gag are not required by Rous sarcoma virus protease during gag-mediated assembly, *J. Virol.* **65**, 272-280.
- Bidou, L., Stahl, G., Grima, B., Liu, H., Cassan, M. & Rousset, J. P. (1997): In vivo HIV-1 frameshifting efficiency is directly related to the stability of the stem-loop stimulatory signal, *RNA* **3**, 1153-1158.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

- Blanco, R., Carrasco, L. & Ventoso, I. (2002): Cell killing by HIV-1 protease, *J. Biol. Chem.* **278**, 1086-1093.
- Blumenzweig, I., Baraz, L., Friedler, A., Danielson, U. H., Gilon, C., Steinitz, M. & Kotler, M. (2002): HIV-1 Vif-derived peptide inhibits drug-resistant HIV proteases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 832-840.
- Blundell, T. L., Sibanda, B. L., Sternberg, M. J. & Thornton, J. M. (1987): Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules, *Nature* **326**, 347-352.
- Blundell, T. & Pearl, L. (1989): Retroviral proteinases. A second front against AIDS, *Nature* **337**, 596-597.
- Borman, A. M., Paulous, S. & Clavel, F. (1996): Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to protease inhibitors: selection of resistance mutations in the presence and absence of the drug, *J. Gen. Virol.* **77**, 419-426.
- Boross, P., Bagossi, P., Copeland, T. D., Oroszlan, S., Louis, J. M. & Tozser, J. (1999): Effect of substrate residues on the P2' preference of retroviral proteinases, *Eur. J. Biochem.* **264**, 921-929.
- Bouyac-Bertoia, M., Dvorin, J. D., Fouchier, R. A., Jenkins, Y., Meyer, B. E., Wu, L., Emerman, M. & Malim, M. H. (2001): HIV-1 infection requires a functional integrase NLS, *Mol. Cell* **7**, 1025-1035.
- Bowzard, J. B., Bennett, R. P., Krishna, N. K., Ernst, S. M., Rein, A. & Wills, J. W. (1998): Importance of basic residues in the nucleocapsid sequence for retrovirus Gag assembly and complementation rescue, *J. Virol.* **72**, 9034-9044.
- Braaten, D., Franke, E. K. & Luban, J. (1996a): Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription, *J. Virol.* **70**, 3551-3560.
- Braaten, D., Franke, E. K. & Luban, J. (1996b): Cyclophilin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus SIV(CPZ)GAB but not group O HIV-1 or other primate immunodeficiency viruses, *J. Virol.* **70**, 4220-4227.
- Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J. L. & Sonenberg, N. (2003): The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle, *J. Virol.* **77**, 3939-3949.
- Brierley, I. (1995): Ribosomal frameshifting viral RNAs, *J. Gen. Virol.* **76**, 1885-1892.
- Brierley, I., Digard, P. & Inglis, S. C. (1989): Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot, *Cell* **57**, 537-547.
- Brunelle, M. N., Payant, C., Lemay, G. & Brakier-Gingras, L. (1999): Expression of the human immunodeficiency virus frameshift signal in a bacterial cell-free system: influence of an interaction between the ribosome and a stem-loop structure downstream from the slippery site, *Nucleic Acids Res.* **27**, 4783-4791.
- Bryant, M. & Ratner, L. (1990): Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 523-527.
- Buck, C., Shen, X., Egan, M. A., Pierson, T. C., Walker, C. M. & Siliciano, R. F. (2001): The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosomal entry site, *J. Virol.* **75**, 181-191.
- Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A. & Stevenson, M. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton (1998).
- Bukrinsky, M. & Adzhubei, A. (1999): Viral protein R of HIV-1, *Rev. Med. Virol.* **9**, 39-49.
- Campbell, S. M., Crowe, S. M. & Mak, J. (2001): Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions, *J. Clin. Virol.* **22**, 217-227.
- Candotti, D., Chappey, C., Rosenheim, M., M'Pele, P., Huraux, H. M. & Agut, H. (1994): High variability of the gag/pol transframe region among HIV-1 isolates, *R. C. Acad. Sci. III.* **317**, 183-189.
- Cartier, C., Sivard, P., Tranchat, C., Decimo, D., Desgranges, C. & Boyer, V. (1999): Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection, *J. Biol. Chem.* **274**, 19434-19440.

- Cassan, M., Delaunay, N., Vaquero, C. & Rousset, J. (1994): Translational frameshifting at the gag-pol junction of human immunodeficiency virus type 1 is not increased in infected T-lymphoid cells, *J. Virol.* **68**, 1501-1508.
- Chamorro, M., Parkin, N. & Varmus, H. E. (1992): An RNA pseudoknot and an optimal heptameric shift site are required for highly efficient ribosomal frameshifting on a retroviral messenger RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**, 713-717.
- Chang, D. D. & Sharp, P. A. (1989): Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites, *Cell* **59**, 789-795.
- Chapham, P. R. & Weiss, R. A. (1997): Spoilt choice of co-receptors, *Nature* **388**, 230-231.
- Checroune, F., Yao, X. J., Gottlinger, H. G., Bergeron, D. & Cohen, E. A. (1995): Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1: role of conserved regions within the P6 domain of Pr55gag, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **10**, 1-7.
- Chen, C. Y. & Shyu, A. B. (1995): AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation, *Trends Biochem. Sci.* **20**, 465-470.
- Chen, H. & Engelman, A. (1998): The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 15270-4
- Chen, N., Morag, A., Almog, N., Blumenzweig, I., Dreazin, O. & Kotler, M. (2001): Extended nucleocapsid protein is cleaved from the Gag-Pol precursor of human immunodeficiency virus type 1, *J. Gen. Virol.* **82**, 581-590.
- Cheng, Y. S. F., Yin, F. H., Foundling, S., Blomstrom, D. & Kettner, C. A. (1990): Stability and activity of human immunodeficiency virus protease - comparison of the natural dimer with a homologous, single-chain tethered dimer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 9660-9664.
- Cherry, E., Ling, C., rong, L., Quan, Y., Inouye, P., Li, X., Morin, N., Kotler, M. & Wainberg, M. A. (1998): Characterization of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) particles that express protease-reverse transcriptase fusion proteins, *J. Mol. Biol.* **284**, 43-56.
- Chou, J. J. (1993): A formulation for correlating properties of peptides and its application to predicting human immunodeficiency virus protease-cleavable sites in proteins, *Biopolymers* **33**, 1405-1414.
- Chou, K. C. (1993): A vectorized sequence-coupling model for predicting HIV protease cleavage sites in proteins, *J. Biol. Chem.* **268**, 16938-16948.
- Chou, K. C. (1996): Prediction of human immunodeficiency virus protease cleavage sites in proteins, *Anal. Biochem.* **233**, 1-14.
- Chou, K. C., Tomasselli, A. G., Reardon, I. M. & Henrikson, R. L. (1996): Predicting human immunodeficiency virus protease cleavage sites in proteins by a discriminant function method, *Proteins* **24**, 51-72.
- Chou, K. C. & Zhang, C. T. (1993): Studies on the specificity of HIV protease: an application of Markov chain theory, *J. Protein Chem.* **12**, 709-724.
- Chou, K. C., Zhang, C. T. & Kezdy, F. J. (1993): A vector projection approach to predicting HIV protease cleavage sites in proteins, *Proteins* **16**, 195-204.
- Co, E., Koelsch, G., Lin, Y., Ido, E., Hartsuck, J. A. & Tang, J. (1994): Proteolytic processing mechanisms of a miniprecursor of the aspartic protease of human immunodeficiency virus type 1, *Biochemistry* **33**, 1248-1254.
- Cochrane, A. W., Jones K. S., Beidas, S., Dillon P. J., Skalka, A. M. & Rosen, C. A. (1991): Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression, *J. Virol.* **65**, 5305-5313.
- Cohen, E. A., Dehni, G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1990): Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein, *J. Virol.* **64**, 3097-3099.
- Collins, J. R., Burt, S. K. & Erickson, J. W. (1995): Flap opening in HIV-1 protease simulated by activated molecular dynamics, *Nat. Struct. Biol.* **2**, 334-338.
- Condra, J. H., Schleif, W. A., Blahy, O. M., Gabryelski, L. J., Graham, D. J., Quintero, J. C., Rhodes, A., Robbins, H. L., Roth, E. & Shivaprakash, M. (1995): In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors, *Nature* **374**, 569-571.
- Cosson, P. (1996): Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1, *EMBO J.* **15**, 5783-5788.

- Côté, H. C., Brumme, Z. L. & Harrigan, P. R. (2001): Human immunodeficiency virus type 1 protease cleavage site mutations associated with protease inhibitor cross-resistance selected by indinavir, ritonavir, and/or saquinavir, *J. Virol.* **75**, 589-594.
- Cullen, B. (1998): Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways, *Virology* **249**, 203-210.
- Dagleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., Weiss, R. A. (1984): The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus, *Nature* **312**, 763-767.
- Darke, P. L., Jordan, S. P., Hall, D. L., Zugay, J. A., Shafer, J. A. & Kuo, L. C. (1994): Dissociation and association of the HIV-1 protease dimer subunits: equilibria and rates, *Biochemistry* **33**, 98-105.
- Darke, P. L., Leu, C. T., Davis, L. J., Heimbach, J. C., Diehl, R. E., Hill, W. S., Dixon, R. A. & Sigal, I. S. (1989): Human immunodeficiency virus protease. Bacterial expression and characterization of the purified aspartic protease, *J. Biol. Chem.* **264**, 2307-2312.
- Darke, P. L., Nutt, R. F., Brady, S. F., Garsky, V. M., Ciccarone, T. M., Leu, C. T., Lumma, P. K., Freidinger, R. M., Veber, D. F. & Sigal, I. S. (1988): HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 297-303.
- Dauber, D. S., Ziermann, R., Parkin, N., Maly, D. J., Mahrus, S., Harris, J. L., Ellman, J. A., Petropoulos, C. & Craik, C. S. (2002): Altered substrate specificity of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease, *J. Virol.* **76**, 1359-1368.
- Davies, D. R. (1990): The structure and function of the aspartic proteinases, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **19**, 189-215.
- Davis, D. A., Dorsey, K., Wingfield, P. T., Stahl, S. J., Kaufman, J., Fales, H. M., Levine, R. L. (1996): Regulation of HIV-1 protease activity through cysteine modification, *Biochemistry* **35**, 2482-2488.
- Davis, D. A., Yusa, K., Gillim, L. A., Newcomb, F. M., Mitsuya, H. & Yarchoan, R. (1999): Conserved cysteines of the human immunodeficiency virus type 1 protease are involved in regulation of polyprotein processing and viral maturation of immature virions, *J. Virol.* **73**, 1156-1164.
- Dayhoff, M. O., von Eck, R. & Park, C. M. (1972): A model for evolutionary change in proteins, in *Atlas of protein sequence and structure vol. 5* (Dayhoff, M. O. ed.), 89-99, Natl. Biomed. Res. Found., Washington D.C.
- De Camp, D. L., Babe, L. M., Salto, R., Lucich, J. L., Koo, M. S., Kahl, S. B. & Craik, C. S. (1992): Specific inhibition of HIV-1 protease by boronated porphyrins, *Med. Chem.* **35**, 3426-3428.
- Decroly, E., Benjannet, S., Savaria, D. & Seidah, N. G. (1997): Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *FEBS Lett.* **405**, 68-72.
- De Pasquale, M. P., Murphy, R., Gulick, R., Smeaton, L., Sommadossi, J.-P., Degruittola, V., Calindo, A., Kuritzkes, D., Sutton, L., Savara, A. & D'Aquila, R. (1998): Mutations selected in HIV plasma RNA during 141W94 therapy, *5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Abstract **406a**, IL.
- De Voss, J. J., Sui, Z., DeCamp, D. L., Salto, R., Babe, L. M., Craik, C. S. & Ortiz de Montellano, P. R. (1994): Haloperidol-based irreversible inhibitors of the HIV-1 and HIV-2 proteases, *J. Med. Chem.* **37**, 665-673.
- Dewar, R. L., Vasudevachari, M. B., Natarajan, V. & Salzman, N. P. (1989): Biosynthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: effects of monensin on glycosylation and transport, *J. Virol.* **63**, 2452-2456.
- Di Marzio, P., Choe, S., Ebright, M., Knoblauch, R. & Landau, N. R. (1995): Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr, *J. Virol.* **69**, 7909-7916.
- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A. D., Singh, M., Skinner, M. A. & Valerio, R. (1989): Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**, 6925-6929.
- Dinman, J. D., Icho, T. & Wickner, R. B. (1991): A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 174-178.
- Dinman, J. D., Richter, S., Plant, E. P., Taylor, R. C., Hammell, A. B. & Rana, T. M. (2002): The frameshift signal of HIV-1 involves a potential intramolecular triplex RNA structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 5331-5336.

- Dinman, J. D. & Wickner, R. B. (1995): 5 S rRNA is involved in fidelity of translational reading frame, *Genetics* **141**, 95-105.
- Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G. & Doms, R. W. (1996): A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors, *Cell* **85**, 1149-1158.
- Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W. A. & Göttlinger, H. G. (1994): Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, *J. Virol.* **68**, 1689-1696.
- Dougherty, J. P. & Temin, H. M. (1988): Determination of the rate of base-pair substitution and insertion mutations in retrovirus replication, *J. Virol.* **62**, 2817-2822.
- Doyon, L., Croteau, G., Thibeault, D., Poulin, F., Pilote, L. & Lamarre, D. (1996): Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors, *J. Virol.* **70**, 3763-3769.
- Doyon, L., Payant, C., Brakier-Gingras, L. & Lamarre, D. (1998): Novel Gag-Pol frameshift site in human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors, *J. Virol.* **72**, 6146-6150.
- Dreyer, G. B., Boehm, J. C., Chenera, B., Desjarlais, R. L., Hassell, A. M., Meek, T. D., Tomaszek, T. A. Jr. & Lewis, M. (1993): A symmetric inhibitor binds HIV-1 protease asymmetrically, *Biochemistry* **32**, 937-947.
- Dunn, B. M., Gustchina, A., Wlodawer, A. & Kay, J. (1994): Subsite preferences of retroviral proteinases, *Methods Enzymol.* **241**, 254-278.
- el-Farrash, M. A., Kuroda, M. J., Kitazaki, T., Masuda, T., Kato, K., Hatanaka, M. & Harada, S. (1994): Generation and characterization of a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mutant resistant to an HIV-1 protease inhibitor, *J. Virol.* **68**, 233-239.
- Emerman, M. (1996): HIV-1, Vpr and the cell cycle, *Curr. Biol.* **6**, 1096-1103.
- Emerman, M. & Malim, M. H. (1998): HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology, *Science* **280**, 1880-1884.
- Erickson, J., Rao, J. K. M., Abad-Zapatero, C. & Wlodawer, A. (1989): *Structural comparisons of retroviral and eukaryotic aspartic proteinases. In Viral Proteinases as Targets for Chemotherapy* (Kräusslich, H.-G., Oroszlan, S. & Wimmer, E., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 191-210.
- Erickson, J. W. & Burt, S. K. (1996): Structural mechanisms of HIV drug resistance, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 545-571.
- Erickson-Viitanen, S., Manfredi, J., Viitanen, P., Tribe, D. E., Tritch, R., Hutchison, C. A. 3rd, Loeb, D. D. & Swanstrom, R. (1989): Cleavage of HIV-1 gag polyprotein synthesized in vitro: sequential cleavage by the viral protease, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**, 577-591.
- Fäcke, M., Janetzko, A., Shoeman, R. L. & Kräusslich, H.-G. (1993): A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum, *J. Virol.* **67**, 4972-4980.
- Farabaugh, P. J. (1993): Alternative readings of the genetic code, *Cell* **74**, 591-596.
- Farabaugh, P. J. (1997): *Programmed Alternative Reading of the Genetic Code* (Landes Austin TX).
- Fehér, A., Weber, I. T., Bagossi, P., Boross, P., Mahalingam, B., Louis, J. M., Copeland, T. D., Torshin, I. Y., Harrison, R. W. & Tozser, J. (2002): Effect of sequence polymorphism and drug resistance on two HIV-1 Gag processing sites, *Eur. J. Biochem.* **269**, 4114-4120.
- Feinberg, M. B., Jarrett, R. F., Aldovini, A., Gallo, R. C. & Wong-Staal, F. (1986): HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA, *Cell* **46**, 807-817.
- Felzien, L. K., Woffendin, C., Hottiger, M. O., Subbramanian, R. A., Cohen, E. A. & Nabel, G. J. (1998): HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 5281-5286.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. (1996): HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, *Science* **272**, 872-877.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* **246**, 64-71.
- Fitzgerald, P. M. & Springer, J. P. (1991): Structure and function of retroviral proteases, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **20**, 299-320.

- Foley *et al.* (1965), *Cancer* **18**, 522-529
- Fouchier, R. A., Meyer, B. E., Simon, J. H., Fischer, U., Albright, A. V., Gonzalez-Scarano, F. & Malim, M. H. (1998): Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex, *J. Virol.* **72**, 6004-6013.
- Fouchier, R. A. & Malim, M. H. (1999): Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes, *Adv. Virus Res.* **52**, 275-299.
- Franke, E. K., Yuan, H. E. & Luban, J. (1994): Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions, *Nature* **372**, 359-362.
- Freed, E. O., Englund, G. & Martin, M. A. (1995): Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection, *J. Virol.* **69**, 3949-3954.
- Freed, E. O. & Martin, M. A. (1995b): Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix, *J. Virol.* **69**, 1984-1989.
- Freed, E. O., Orenstein, J. M., Buckler-White, A. J. & Martin, M. A. (1994): Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production, *J. Virol.* **68**, 5311-5320.
- Freund, J., Kellner, R., Konvalinka, J., Wolber, V., Kräusslich, H. G. & Kalbitzer, H. R. (1994): A possible regulation of negative factor (Nef) activity of human immunodeficiency virus type 1 by the viral protease, *Eur. J. Biochem.* **223**, 589-593.
- Friedler, A., Blumenzweig, I., Baraz, L., Steinitz, M., Kotler, M. & Gilon, C. (1999): Peptides derived from HIV-1 Vif: a non-substrate based novel type of HIV-1 protease inhibitors, *J. Mol. Biol.* **287**, 93-101.
- Fu, W. & Rein, A. (1993): Maturation of dimeric viral RNA of Moloney murine leukemia virus, *J. Virol.* **67**, 5443-5449.
- Fujiwara, T. & Mizuuchi, K. (1988): Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate, *Cell* **54**, 497-504.
- Gaedigk-Nitschko, K., Schon, A., Wachinger, G., Erfle, V. & Kohleisen, B. (1995). Cleavage of recombinant and cell derived human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Nef protein by HIV-1 protease, *FEBS. Lett.* **357**, 275-278.
- Gallina, A., Mantoan, G., Rindi, G. & Milanesi, G. (1994): Influence of MA internal sequences, but not of the myristylated N-terminus sequence, on the budding site of HIV-1 Gag protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 1031-1038.
- Gamble, T. R., Yoo, S., Vajdos, F. F., von Schwedler, U. K., Worthylake, D. K., Wang, H., McCutcheon, J. P., Sundquist, W. I. & Hill, C. P. (1997): Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein, *Science* **278**, 849-853.
- Garnier, L., Parent, L. J., Rovinski, B., Cao, S. X. & Wills, J. W. (1999): Identification of retroviral late domains as determinants of particle size, *J. Virol.* **73**, 2309-2320.
- Garrett, E. D., Tiley, L. S. & Cullen, B. R. (1991): Rev activates expression of the human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr gene products, *J. Virol.* **65**, 1653-1657.
- Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., Rich, R. L., Myszka, D. G. & Sundquist, W. I. (2001): Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding, *Cell* **107**, 55-65.
- Gatlin, J., Arrigo, S. J. & Schmidt, M. G. (1998): Regulation of intracellular human immunodeficiency virus type-1 protease activity, *Virology* **244**, 87-96.
- Gelderblom, H. R. (1991): Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function, *AIDS991* **5**, 617-637.
- Gesteland, R. F. & Atkins, J. F. (1996): Recoding: dynamic reprogramming of translation, *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 741-768.
- Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D. & De Wilde, M. (1989): Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells, *Cell* **59**, 103-112.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gitti, R. K., Lee, B. M., Walker, J., Summers, M. F., Yoo, S. & Sundquist, W. I. (1996): Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein, *Science* **273**, 231-235.

- Goh, W. C., Rogel, M. E., Kinsey, C. M., Michael, S. F., Fultz, P. N., Nowak, M. A., Hahn, B. H. & Emerman, M. (1998): HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo, *Nat. Med.* **4**, 65-71.
- Goldblum, A. (1990): Titel, *FEBS Lett.* **261**, 241-244.
- Goobar-Larsson, L., Larsson, P. T., Debouck, C. & Towler, E. M. (1996): HIV-1 RT enhances the activity of a tethered dimer of HIV-1 proteinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 203-207.
- Gorelick, R. J., Nigida, S. M. Jr., Bess, J. W. Jr., Arthur, L. O., Henderson, L. E. & Rein, A. (1990): Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA, *J. Virol.* **64**, 3207-3211.
- Göttlinger, H. G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1989): Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**, 5781-5785.
- Gorelick, R. J. & Henderson, L. E. (1994) in Human Retroviruses and AIDS (Myers, G., Korber, B., Wain-Hobson, S. Jeang, K. T., Henderson, L. & Pavlakis, G., Eds.) Part III: Analyses, pp 2-5, The Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM (<http://hiv-web.lanl.gov>).
- Graf, M., Bojak, A., Deml, L., Bieler, K., Wolf, H. & Wagner, R. (2000): Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression, *J. Virol.* **74**, 10822-10826.
- Graham, F. L. & van der Eb, A. J. (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA, *Virology* **52**, 456-467.
- Grant, S. K., Deckman, I. C., Culp, J. S., Minnich, M. D., Brooks, I. S., Hensley, P., Debouck, C. & Meek, T. D. (1992): Use of protein unfolding studies to determine the conformational and dimeric stabilities of HIV-1 and SIV proteases, *Biochemistry* **31**, 9491-9501.
- Grant, S. K., Deckman, I. C., Tomaszek, T. A. Jr., Minnich, M., Culp, J., Franklin, S., Dreyer, G. B., Debouck, C. & Meek, T. D. (1991): Purification and biochemical characterization of recombinant simian immunodeficiency virus protease and comparison to human immunodeficiency virus type 1 protease, *Biochemistry* **30**, 8424-8434.
- Griffiths, J. T., Phylip, L. H., Konvalinka, J., Strop, P., Gustchina, A., Wlodawer, A., Davenport, R. J., Briggs, R., Dunn, B. M. & Kay, J. (1992): Different requirements for productive interaction between the active site of HIV-1 proteinase and substrates containing -hydrophobic*hydrophobic- or -aromatic*Pro- cleavage sites, *Biochemistry* **31**, 5193-5200.
- Gross, I., Hohenberg, H., Wilk, T., Wieggers, K., Grattinger, M., Muller, B., Fuller, S., Kräusslich, H. G. (2000): A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis, *EMBO J.* **19**, 103-113.
- Guan, K. L. & Dixon, J. E. (1991): Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase, *Anal. Biochem.* **192**, 262-267.
- Gustchina, A. & Weber, I. T. (1990): Comparison of inhibitor binding in HIV-1 protease and in non-viral aspartic proteases: the role of the flap, *FEBS Lett.* **269**, 269-272.
- Hadzopoulou-Cladaras, M., Felber, B. K., Cladaras, C., Athanassopoulos, A., Tse, A. & Pavlakis, G. N. (1989): The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region, *J. Virol.* **63**, 1265-1274.
- Hallenberger, S., Moulard, M., Sordel, M., Klenk, H. D. & Garten, W. (1997): The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells, *J. Virol.* **71**, 1036-1045.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids, *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Harada, S., Koyanagi, Y. & Yamamoto, N. (1985): Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay, *Science* **229**, 563-566.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988): *Antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Hayakawa, T., Misumi, Y., Kobayashi, M., Yamamoto, Y. & Fujisawa, Y. (1992): Requirement of N- and C-terminal regions for enzymatic activity of human T-cell leukemia virus type I protease, *Eur. J. Biochem.* **206**, 919-925.
- Hazebrouck, S., Machtelinckx-Delmas, V., Kupiec, J. J. & Sonigo, P. (2001): Local and spatial factors determining HIV-1 protease substrate recognition, *Biochem. J.* **358**, 505-510.

- Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M. & Emerman, M. (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.
- Henderson, B. R. & Percipalle, P. (1997): Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta, *J. Mol. Biol.* **274**, 693-707.
- Henderson, L. E., Bowers, M. A., Sowder, R. C., Serabyn, S. A., Johnson, D. G., Bess, J. W., Arthur, L. O., Bryant, D. K. & Fenselau, C. (1992): Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences, *J. Virol.* **66**, 1856-1865.
- Henderson, L. E., Copeland, T. D., Sowder, R. C., Scultz, A. M. & Oroszlan, S. (1988): In human retroviruses, cancer and AIDS: approaches to prevention and therapy, *New York Liss*, 135-147.
- Henklein, P., Bruns, K., Sherman, M. P., Tessmer, U., Licha, K., Kopp, J., de Noronha, C. M., Greene, W. C., Wray, V. & Schubert, U. (2000): Functional and structural characterization of synthetic HIV-1 Vpr that transduces cells, localizes to the nucleus, and induces G2 cell cycle arrest, *J. Biol. Chem.* **275**, 32016-32026.
- Hermida-Matsumoto, L. & Resh, M. D. (1999): Human immunodeficiency virus type 1 protease triggers a myristoyl switch that modulates membrane binding of Pr55gag and p17MA, *J. Virol.* **73**, 1902-1908.
- Herrmann, C. H. & Rice, A. P. (1995): Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor, *J. Virol.* **69**, 1612-1620.
- Hill, M. K., Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S. M. & Mak, J. (2002): Proline residues within spacer peptide p1 are important for human immunodeficiency virus type 1 infectivity, protein processing, and genomic RNA dimer stability, *J. Virol.* **76**, 11245-11253.
- Hirsch, M. S., Conway, B., D'Aquila, R. T., Johnson, V. A., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Demeter, L. M., Hammer, S. M., Jacobsen, D. M., Kuritzkes, D. R., Loveday, C., Mellors, J. W., Vella, S. & Richman, D. D (1998): Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management, International AIDS Society - USA Panel, *JAMA* **279**, 1984-1991.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M. & Markowitz, M. (1995): Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection, *Nature* **373**, 123-126.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989): Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene* **77**, 51-59.
- Honda, A., Nakamura, T. & Nishimura, S. (1995): RNA signals for translation frameshift: influence of stem size and slippery sequence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 575-582.
- Hrimech, M., Yao, X.-J., Bachand, F., Rougeau, N. & Chen, E. A. (1999): Human immunodeficiency virus type 1 Vpr functions as an immediate early protein during HIV-1 infection, *J. Virol.* **73**, 4101-4109.
- Huffman, K. & Salvatore J., A. (1997): Identification of cis-acting repressor activity within human immunodeficiency virus type 1 protease sequences, *Virol.* **234**, 253-260.
- Hung, M., Patel, P., Davis, S. & Green, S. R. (1998): Importance of ribosomal frameshifting for human immunodeficiency virus type 1 particle assembly and replication, *J. Virol.* **72**, 4819-4824.
- Hunter, E. (1994): Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses, *Semin. Virol.* **5**, 71-83.
- Hyland, L. J., Dayton, B. D., Moore, M. L., Shu, A. Y. L., Heys, J. R. & Meek, T. D. (1990): A radiometric assay for HIV-1 protease, *Anal. Biochem.* **188**, 408-415.
- Hyland, L. J., Tomaszek, T. A., Roberts, G. D., Carr, S. A., Magaard, V. W., Bryan, H. L., Fakhoury, S. A., Moore, M. L., Minnich, M. D., Culp, J. S., Desjarlais, R. L. & Meek, T. D. (1991): Human immunodeficiency virus-1 protease. 1. Initial velocity studies and kinetic characterization of reaction intermediates by O-18 isotope exchange, *Biochemistry* **30**, 8454-8463.
- Hyland, L. J., Tomaszek, T. A. & Meek, T. D. (1991): Human immunodeficiency virus-1 protease. 2. Use of pH rate studies and solvent kinetic isotope effects to elucidate details of chemical mechanism, *Biochemistry* **30**, 8454-8463.
- Ido, E., Han, H., Kezdy, F. J. & Tang, J. (1991): Kinetic studies of human immunodeficiency virus type 1 protease and its active-site hydrogen bond mutant A28S, *J. Biol. Chem.* **266**, 24359-24366.

- Inagami, T. (1981): Biochemical regulation of blood pressure (Soffer, R. L., ed), John Wiley & Sons, Inc., New York, 39-73.
- Isel, C & Karn, J. (1999): Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation, *J. Mol. Biol.* **290**, 929-941.
- Ishima, R., Freedberg, D. I., Wang, Y. X., Louis, J. M. & Torchia, D. A. (1999): Flap opening and dimer-interface flexibility in the free and inhibitor-bound HIV protease, and their implications for function, *Structure* **7**, 1047-1055.
- Ishima, R., Ghirlando, R., Tözser, J., Gronenborn, A. M., Torchia, D. A. & Louis, J. M. (2001): Folded monomer of HIV-1 protease, *J. Biol. Chem.* **276**, 49110-49116.
- Ishima, R., Louis, J. M. & Torchia, D. A. (2001): Characterisation of two hydrophobic methyl clusters in HIV-1 protease by NMR spin relaxation in solution, *J. Mol. Biol.* **305**, 515-521.
- Jacks, T., Madhani, H. D., Masiarz, F. R. & Varmus, H. E. (1988): Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region, *Cell* **55**, 447-458.
- Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J. & Varmus, H. E. (1988): Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression, *Nature* **331**, 280-283.
- Jacobsen, H., Yasargil, K., Winslow, D. L., Craig, J. C., Krohn, A., Duncan, I. B. & Mous, J. (1995): Characterization of human immunodeficiency virus type 1 mutants with decreased sensitivity to proteinase inhibitor Ro31-8959, *Virology* **206**, 527-534.
- Jameson, B. A., Rao, P. E., Kong, L. I., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Hood, L. E., Kent, S. B. (1988): Location and chemical synthesis of a binding site for HIV-1 on the CD4 protein, *Science* **240**, 1335-1339.
- Peterson, A., Seed, B. (1988): Genetic analysis of monoclonal antibody and HIV binding sites on the human lymphocyte antigen CD4, *Cell* **54**, 65-72.
- Jenkins, Y., McEntee, M., Weis, K. & Greene W. C. (1998): Characterisation of HIV-1 Vpr nuclear import: analysis of signals and pathways, *J. Cell Biol.* **143**, 875-885.
- Jenkins, Y., Pornillos, O., Rich, R. L., Myszka, D. G., Sundquist, W. I. & Malim, M. H. (2001): Biochemical analyses of the interactions between human immunodeficiency virus type 1 Vpr and p6(Gag), *J. Virol.* **75**, 10537-10542.
- Jenkins, Y., Sanchez, P. V., Meyer, B. E. & Malim, M. H. (2001): Nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Vpr is not required for virion packaging, *J. Virol.* **75**, 8348-8352.
- Jordan, S. P., Zugay, J., Darke, P. L. & Kuo, L. C. (1992): Activity and dimerization of human immunodeficiency virus protease as a function of solvent composition and enzyme concentration, *J. Biol. Chem.* **267**, 20028-20032.
- Jowett, J. B., Hockley, D. J., Nermut, M. V. & Jones, I. M. (1992): Distinct signals in human immunodeficiency virus type 1 Pr55 necessary for RNA binding and particle formation, *J. Gen. Virol.* **73**, 3079-3086.
- Jowett, J. B., Planelles, V., Poon, B., Shah, N. P., Chen, M. L. & Chen, I. S. (1995): The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle, *J. Virol.* **69**, 6304-6313.
- Junker, U., Escaich, S., Plavec, I., Baker, J., Mc Phee, F., Rose, J. R., Craik, C. S. & Bohnlein, E. (1996): Intracellular expression of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) protease variants inhibits replication of wild-type and protease inhibitor-resistant HIV-1 strains in human T-cell lines, *J. Virol.* **70**, 7765-7772.
- Kaelin, W. G. Jr., Pallas, D. C., De Caprio, J. A., Kaye, F. J. & Livingston, D. M. (1991): Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product, *Cell* **64**, 521-532.
- Kang, H. (1998): Direct structural evidence for formation of a stem-loop structure involved in ribosomal frameshifting in human immunodeficiency virus type 1, *Biochem. Biophys. Acta.* **1397**, 73-78.
- Kaplan, A. H., Manchester, M. & Swanstrom R. (1994): The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency, *J. Virol.* **68**, 6782-6786.
- Kaplan, A. H. & Swanstrom, R. (1991): Human immunodeficiency virus type 1 Gag proteins are processed in two cellular compartments, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 4528-4532.
- Kaplan, A. H., Zack, J. A., Knigge, M., Paul, D. A., Kempf, D. J., Norbeck, D. W. & Swanstrom, R. (1993): Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles, *J. Virol.* **67**, 4050-4055.

- Karacostas, V., Wolffe, E. J., Nagashima, K., Gonda, M. A. & Moss, B. (1993): Overexpression of the HIV-1 gag-pol polyprotein results in intracellular activation of HIV-1 protease and inhibition of assembly and budding of virus-like particles, *Virology* **193**, 661-671.
- Karn, J. (1999): Tackling Tat, *J. Mol. Biol.* **293**, 235-254.
- Katoh, I., Yasunaga, T., Ikawa, Y. & Yoshinaka, Y. (1987): Inhibition of retroviral protease activity by an aspartyl proteinase inhibitor, *Nature* **329**, 654-656.
- Katz, R. A. & Skalka, A. M. (1994): The retroviral enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 133-173.
- Keller, R., Montagnier, L. & Cordonnier, A. (1993): Characterization of a nuclear retention sequence within the 3' region of the HIV-2 envelope gene, *Virology* **192**, 33-37.
- Kempf, D. J., Marsh, K. C., Denissen, J. F., McDonald, E., Vasavanonda, S., Flentge, C. A., Green, B. E., Fino, L., Park, C. H., Kong, X. P., Wideburg, N. E., Saldivar, A., Ruiz, L., Kati, W. M., Sham, H. L., Robins, T., Stewart, K. D., Hsu, A., Plattner, J. J., Leonard, J. M. & Nordeck, D. W. (1995): ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 2484-2488.
- Khan, M. A., Aberham, C., Kao, S., Akari, H., Gorelick, R., Bour, S. & Strebel, K. (2001): Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA, *J. Virol.* **75**, 7252-7265.
- Khan, M. A., Akari, H., Kao, S., Aberham, C., Davis, D., Buckler-White, A. & Strebel, K. (2002): Intravirion processing of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein by the viral protease may be correlated with Vif function, *J. Virol.* **76**, 9112-9125.
- Kim, E. E. & Baker, C. T., Dwyer, M. D., Murcko, M. A., Rao, B. G., Tung, R. D. & Navia, M. A. (1995): Crystal structure of HIV-1 protease in complex with VX-478, a potent and orally bioavailable inhibitor of the enzyme, *J. Amer. Chem. Soc.* **117**, 1181-1182.
- Kim, Y. G., Maas, S. & Rich, A. (2001): Comparative mutational analysis of cis-acting RNA signals for translational frameshifting in HIV-1 and HTLV-2, *Nucleic Acids Res.* **29**, 1125-1131.
- Kimpton, J. & Emerman, M. (1992): Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene, *J. Virol.* **66**, 2232-2239.
- Kino, T., Gragerov, A., Kopp, J. B., Stauber, R. H., Pavlakis, G. N. & Chrousos, G. P. (1999): The HIV-1 virion-associated protein vpr is a coactivator of the human glucocorticoid receptor, *J. Exp. Med.* **189**, 51-62.
- Kobinger, G. P., Borsetti, A., Nie, Z., Mercier, J., Daniel, N., Gottlinger, H. G. & Cohen, A. (1998): Virion-targeted viral inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by using Vpr fusion proteins, *J. Virol.* **72**, 5441-5448.
- Kohl, N. E., Emini, E. A., Schleif, W. A., Davis, L. J., Heimbach, J. C., Dixon, R. A., Scolnick, E. M. & Sigal, I. S. (1988): Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**, 4686-4690.
- Kollmus, H., Hentze, M. W. & Hauser, H. (1996): Regulated ribosomal frameshifting by an RNA-protein interaction, *RNA* **2**, 316-323.
- Kollmus, H., Honigman, A., Panet, A. & Hauser, H. (1994): The sequences of and distance between two cis-acting signals determine the efficiency of ribosomal frameshifting in human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell leukemia virus type II in vivo, *J. Virol.* **68**, 6087-6091.
- Kondo, E. & Göttlinger, H. G. (1996): A conserved LXXLF-sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr, *J. Virol.* **70**, 159-164.
- Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E. A. & Göttlinger, H. G. (1995): The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles, *J. Virol.* **69**, 2759-2764.
- Konvalinka, J., Heuser, A.-M., Hruskova-Heidingsfeldova, O., Vogt, V. M., Sedlacek, J., Strop, P. & Krüsslich, H.-G. (1994): Proteolytic processing of particle-associated retroviral polyproteins by homologous and heterologous viral proteinases, *Eur. J. Biochem.* **228**, 191-198.
- Kotler, M., Arad, G. & Hughes, S. H. (1992): Human immunodeficiency virus type 1 gag-protease fusion proteins are enzymatically active, *J. Virol.* **66**, 6781-6783.
- Kotler, M., Katz, R. A. & Skalka, A. M. (1988): Activity of avian retroviral protease expressed in *Escherichia coli*, *J. Virol.* **62**, 2696-2700.

- Kotler, M., Simm, M., Zhao, Y. S., Sova, P., Chao, W., Ohnona, S. F., Roller, R., Krachmarov, C., Potash, M. J., Volsky, D. J. (1997): Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protein Vif inhibits the activity of HIV-1 protease in bacteria and in vitro, *J. Virol.* **71**, 5774-5781.
- Kräusslich, H.-G. (1991): Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 3213-3217.
- Kräusslich, H.-G. (1992): Specific inhibitor of human immunodeficiency virus proteinase prevents the cytotoxic effects of a single-chain proteinase dimer and restores particle formation, *J. Virol.* **66**, 567-572.
- Kräusslich, H.-G., Fäcke, M., Heuser, A. M., Konvalinka, J. & Zentgraf, H. (1995): The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity, *J. Virol.* **69**, 3407-3419.
- Kräusslich, H.-G. & Wimmer, E. (1988): Viral proteinases, *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 701-754.
- Kramer, R. A., Schaber, M. D., Skalka, A. M., Ganguly, K., Wong-Staal, F., Reddy, E. P. (1986): HTLV-III gag protein is processed in yeast cells by the virus pol-protease, *Science* **231**, 1580-1584.
- Kulpa, D., Topping, R., Telesnitsky, A. (1997): Determination of the site of first strand transfer during Moloney murine leukemia virus reverse transcription and identification of strand transfer-associated reverse transcriptase errors, *EMBO J.* **16**, 856-865.
- Kumar, M. & Hosur, M. V. (2003): Adaptability and flexibility of HIV-1 protease, *Eur. J. Biochem.* **270**, 1231-1239.
- Kuroda, M. J., el Farrash, M. A., Choudhury S. & Harada, S. (1995): Impaired infectivity of HIV-1 after a single point mutation in the pol gene to escape the effect of a protease inhibitor in vitro, *Virol.* **210**, 212-216.
- Kuzmic, P., Garcia-Echeverria, C. & Rich, D. H. (1993): Stabilization of HIV proteinase dimer by bound substrate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 301-305.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
- Lambert, D. M., Petteway, S. R. Jr., McDanal, C. E., Hart, T. K., Leary, J. J., Dreyer, G. B., Meek, T. D., Bugelski, P. J., Bolognesi, D. P., Metcalf, B. W. et al. (1992): Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors irreversibly block infectivity of purified virions from chronically infected cells, *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 982-988.
- Lapatto, R., Blundell, T., Hemmings, A., Overington, J., Wilderspin, A., Wood, S., Merson, J. R., Whittle, P. J., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Hawrylik, S. J., Lee, S. E., Scheld, K. G. & Hobart, P. M. (1989): X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes, *Nature* **342**, 299-302.
- Lazdins, J. K., Mestan, J., Goutte, G., Walker, M. R., Bold, G., Capraro, H. G. & Klimkait, T. (1997): In vitro effect of alpha1-acid glycoprotein on the anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity of the protease inhibitor CGP 61755: a comparative study with other relevant HIV protease inhibitors, *J. Infect. Dis.* **175**, 1063-1070.
- Lee, H., Darden, T. A. & Pedersen, L. G. (1996): *Ab initio* quantum mechanical model for the catalytic mechanism of HIV-1 protease, *J. Am. Chem.* **118**, 3946-3950.
- Lee, N., Cozzikorto, J., Wainwright, N & Testa, D. (1984): Cloning with tandem gene systems for high level gene expression, *Nucl. Acids Res.* **12**, 6797-6812.
- Lee, S. I., Umen, J. G. & Varmus, H. E. (1995): A genetic screen identifies cellular factors involved in retroviral -1 frameshifting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**, 6587-6591.
- Lee, Y. M., Liu, B., & Yu, X. F. (1999): Formation of virus assembly intermediate complexes in the cytoplasm by wild-type and assembly-defective mutant human immunodeficiency virus type 1 and their association with membranes, *J. Virol* **73**, 5654-5662.
- Lee, Y. M., Tian, C. J. & Yu, X. F. (1998): A bipartite membrane-binding signal in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is required for the proteolytic processing of Gag precursors in a cell type-dependent manner, *J. Virol.* **11**, 9061-9068.
- Lee, Y. M. & Yu, X. F. (1998): Identification and characterization of virus assembly intermediate complexes in HIV-1-infected CD4+ T cells, *Virology* **243**, 78-93.
- Le Grice, S. F., Mills, J. & Mous, J. (1988): Active site mutagenesis of the AIDS virus protease and its alleviation by trans complementation, *EMBO J.* **7**, 2547-2553.

- Le Rouzic, E., Mousnier, A., Rustum, C., Stutz, F., Hallberg, E., Dargemont, C. & Benichou, S. (2002): Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1, *J. Biol. Chem.* **277**, 45091-45098.
- Levy, D. N., Fernandes, L. S., Williams, W. V. & Weiner, D. B. (1993): Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus 1 vpr, *Cell* **72**, 541-550.
- Liang, C., Rong, L., Cherry, E., Kleiman, L., Laughrea, M. & Wainberg, M. A. (1999): Deletion mutagenesis within the dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 results in delayed processing of the p2 peptide from precursor proteins, *J. Virol.* **73**, 6147-6151.
- Lightfoote, M. M., Coligan, J. E., Folks, T. M., Fauci, A. S., Martin, M. A. & Venkatesan, S. (1986): Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus, *J. Virol.* **60**, 771-775.
- Lillehoj, E. P., Salazar, F. H., Mervis, R. J., Raum, M. G., Chan, H. W., Ahmad, N. & Venkatesan, S. (1988): Purification and structural characterization of the putative gag-pol protease of human immunodeficiency virus, *J. Virol.* **62**, 3053-3058.
- Lindhofer, H., von der Helm, K. & Nitschko, H. (1995): In vivo processing of Pr160^{gag-pol} from human immunodeficiency virus type 1 (HIV) in acutely infected, cultured human T-lymphocytes, *Virology* **214**, 624-627.
- Liu, H. S., Jan, M. S., Chou, C. K., Chen, P. H. & Ke, N. J. (1999): Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 712-717.
- Liu, H., Wu, X., Xiao, H., Conway, J. A. & Kappes, J. C. (1997): Incorporation of functional human immunodeficiency virus type 1 integrase into virions independent of the Gag-Pol precursor protein, *J. Virol.* **71**, 7704-7710.
- Loeb, D. D., Hutchison, C. A. III, Edgell, M. H., Farmerie, W. G. & Swanstrom, R. (1989a): Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 protease suggests functional homology with aspartic proteinases, *J. Virol.* **63**, 111-121.
- Loeb, D. D., Swanstrom, R., Everitt, L., Manchester, M., Stamper, S. E. & Hutchison, C. A. III (1989b): Complete mutagenesis of the HIV-1 protease, *Nature* **340**, 397-400.
- Louis, J. M., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1999a): Autoprocessing of HIV-1 protease is tightly coupled to protein folding, *Nat. Struct. Biol.* **6**, 868-875.
- Louis, J. M., Dyda, F., Nashed, N. T., Kimmel, A. R. & Davies, D. R. (1998): Hydrophilic peptides derived from the transframe region of Gag-Pol inhibit the HIV-1 protease, *Biochemistry* **37**, 2105-2110.
- Louis, J. M., Nashed, N. T., Parris, K. D., Kimmel, A. R. & Jerina, D. M. (1994): Kinetics and mechanism of autoprocessing of human immunodeficiency virus type 1 protease from an analog of the Gag-Pol polyprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 7970-7974.
- Louis, J. M., Wondrak, E. M., Kimmel, A. R., Wingfield, P. T. & Nashed, N. T. (1999b): Proteolytic processing of HIV-1 protease precursor, kinetics and mechanism, *J. Biol. Chem.* **274**, 23437-23442.
- Lu, Y. L., Spearman, P. & Ratner, L. (1993): Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions, *J. Virol.* **67**, 6542-6550.
- Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V. & Goff, S. P. (1993): Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B, *Cell* **73**, 1067-1078.
- Luo, Y., Yu, H. & Peterlin, B. M. (1994): Cellular protein modulates effects of human immunodeficiency virus type 1 Rev, *J. Virol.* **68**, 3850-3856.
- Luukkonen, B. G., Fenyo, E. M. & Schwartz, S. (1995): Overexpression of human immunodeficiency virus type 1 protease increases intracellular cleavage of gag and reduces virus infectivity, *Virol.* **206**, 854-865.
- Maldarelli, F., Malcolm, A. M. & Strebel, K. (1991). Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: Novel level of gene regulation, *J. Virol.* **65**, 5732-5743.
- Mammano, F., Petit, C. & Clavel, F. (1998): Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients, *J. Virol.* **72**, 7632-7637.
- Markowitz, M., Mo, H., Kempf, D. J., Norbeck, D. W., Bhat, T. N., Erickson, J. W. & Ho, D. D. (1995): Selection and analysis of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to ABT-538, a novel protease inhibitor, *J. Virol.* **69**, 701-706.

- Mc Phee, F., Good, A. C., Kuntz, I. D. & Craik C. S. (1996): Engineering human immunodeficiency virus 1 protease heterodimers as macromolecular inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 11477-11481.
- Meek, T. D., Dayton, B. D., Metcalf, B. W., Dreyer, G. B., Strickler, J. E., Gorniak, J. G., Rosenberg, M., Moore, M. L., Magaard, V. W. & Debouck, C. (1989): Human immunodeficiency virus 1 protease expressed in *Escherichia coli* behaves as a dimeric aspartic protease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**, 1841-1845.
- Mergener, K., Fäcke, M., Welker, R., Brinkmann, V., Gelderblom, H. R., Kräusslich, H.-G. (1992): Analysis of HIV particle formation using transient expression of subviral constructs in mammalian cells, *Virology* **186**, 25-39.
- Mikaelian, I., Krieg, M., Gait, M. J. & Karn, J. (1996): Interactions of INS (CRS) elements and the splicing machinery regulate the production of Rev-responsive mRNAs, *J. Mol. Biol.* **257**, 246-264.
- Mildner, A. M., Rothrock, D. J., Leone, J. W., Bannow, C. A., Lull, J. M., Reardon, I. M., Sarcich, J. L., Howe, W. J., Tomich, C. S. & Smith, C. W. (1994): The HIV-1 protease as enzyme and substrate: mutagenesis of autolysis sites and generation of a stable mutant with retained kinetic properties, *Biochemistry* **33**, 9405-9413.
- Miller, M., Jaskolski, M., Rao, J. K., Leis, J. & Wlodawer, A. (1989a): Crystal structure of a retroviral protease proves relationship to aspartic protease family, *Nature* **337**, 576-579.
- Miller, M., Schneider, J., Sathyanarayana, B. K., Toth, M. V., Marshall, G. R., Clawson, L., Selk, L., Kent, S. B. & Wlodawer, A. (1989b): Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution, *Science* **246**, 1149-1152.
- Misumi, S., Kudo, A., Azuma, R., Tomonaga, M., Furuishi, K. & Shoji, S. (1997): The p2gag peptide, AEAMSQVTNTATIM, processed from HIV-1 Pr55gag was found to be a suicide inhibitor of HIV-1 protease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 275-280.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S. M., Nau, M. M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H. K., Linnoila, R. I., Mulshine, J. L., Minna, J. D. & Gazdar, A. F. (1992): p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features, *Oncogene* **7**, 171-180.
- Moore, J. P. (1997): Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy, *Science* **276**, 51-52.
- Moore, M. L., Bryan, W. M., Fakhoury, S. A., Magaard, V. W., Huffman, W. F., Dayton, B. D., Meek, T. D., Hyland, L., Dreyer, G. B. & Metcalf, B. W. (1989): Peptide substrates and inhibitors of the HIV-1 protease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 420-425.
- Moore, M. L. & Dreyer, G. B. (1993): Substrate-based inhibitors of HIV-1 protease, *Prospect. Drug. Discovery Des.* **1**, 85-101.
- Mous, J., Heimer, E. P. & Le Grice, S. F. (1988): Processing protease and reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type I polyprotein in *Escherichia coli*, *J. Virol.* **62**, 1433-1436.
- Müller, B., Tessmer, U., Schubert, U. & Kräusslich, H.-G. (2000): Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than Gag and is phosphorylated in infected cells, *J. Virol.* **74**, 9727-9731.
- Nasioulas, G., Zolotukhin, A. S., Tabernero, C., Solomin, L., Cunningham, C. P., Pavlakis, G. N., Felber, B. K. (1994): Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA, *J. Virol.* **68**, 2986-2993.
- Navia, M. A., Fitzgerald, P. M., McKeever, B. M., Leu, C. T., Heimbach, J. C., Herber, W. K., Sigal, I. S., Darke, P. L. & Springer, J. P. (1989): Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1, *Nature* **337**, 615-620.
- Nermut, M. V., Hockley, D. J., Jowett, J. B., Jones, I. M., Garreau, M. & Thomas, D. (1994): Fullerene-like organization of HIV gag-protein shell in virus-like particles produced by recombinant baculovirus, *Virology* **198**, 288-296.
- Nicholson, L. K., Yamazaki, T., Torchia, D. A., Grzesiek, S., Bax, A., Stahl, S. J., Kaufman, J. D., Wingfield, P. T., Lam, P. Y., Jadhav, P. K., Hodge, C. N., Domaille, P. J. & Chang, C.-H. (1995): Flexibility and function in HIV-1 protease, *Nat. Struct. Biol.* **2**, 274-280.
- Niedrig, M., Hinkula, J., Weigelt, W., L'age-Stehr, J., Pauli, G., Rosen, J., Wahren, B. (1989): Epitope mapping of monoclonal antibodies against human immunodeficiency virus type 1 structural proteins by using peptides, *J. Virol.* **63**, 3525-3528.

- Nilsson, J., Askjaer, P. & Kjems, J. (2001): A role for the basic patch and the C terminus of RanGTP in regulating the dynamic interactions with importin beta, CRM1 and RanBP1, *J. Mol. Biol.* **305**, 231-243.
- Ohagen, A. & Gabuzda, D. (2000): Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core, *J. Virol.* **74**, 11055-11066.
- Ohno, M., Fornerod, M. & Mattaj, I. W. (1998): Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers, *Cell* **92**, 327-336.
- Okimoto, N., Hata, M., Hoshino, T. & Tsuda, M. (2000): Protein hydrolysis mechanism of HIV-1 protease: Investigation by ab initio MO calculations, *RIKEN Review* **29**, 100-102.
- Okimoto, N., Tsukui, T., Hata, M., Hoshino, T. & Tsuda, M. (1999): Hydrolysis mechanism of the phenylalanine-proline peptide bond specific to HIV-1 protease: investigation by the *ab initio* molecular orbital method, *J. Am. Chem.* **121**, 7349-7354.
- Olsen, H. S., Cochrane, A. W. & Rosen, C. (1992): Interaction of cellular factors with intragenic cis-acting repressive sequences within the HIV genome, *Virology* **191**, 709-715.
- Oroszlan, S. & Luftig, R. B. (1990): Retroviral proteinases, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **157**, 153-185.
- Ott, D. E., Chertova, E. N., Busch, L. K., Coren, L. V., Gagliardi, T. D. & Johnson, D. G. (1999): Mutational analysis of the hydrophobic tail of the human immunodeficiency virus type 1 p6(Gag) protein produces a mutant that fails to package its envelope protein, *J. Virol.* **73**, 19-28.
- Ott, D. E., Coren, L. V., Kane, B. P., Busch, L. K., Johnson, D. G., Sowder, R. C. 2nd, Chertova, E. N., Arthur, L. O. & Henderson, L. E. (1996): Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions, *J. Virol.* **70**, 7734-7743.
- Park, J. & Morrow, C. D. (1991): Overexpression of the gag-pol precursor from human immunodeficiency virus type 1 proviral genomes results in efficient proteolytic processing in the absence of virion production, *J. Virol.* **65**, 5111-5117.
- Parkin, N. T., Chamorro, M. & Varmus, H. E. (1992): Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo, *J. Virol.* **66**, 5147-5151.
- Partin, K., Zybarth, G., Ehrlich, L., DeCrombrugghe, M., Wimmer, E. & Carter, C. (1991): Deletion of sequences upstream of the proteinase improves the proteolytic processing of human immunodeficiency virus type 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 4776-4780.
- Patick, A. K., Mo, H., Markowitz, M., Appelt, K., Wu, B., Musick, L., Kalish, V., Kaldor, S., Reich, S., Ho, D. & Weber, S. (1996): Antiviral and resistance studies of AG1343, an orally bioavailable inhibitor of human immunodeficiency virus protease, *Antimicro. Agents Chemother.* **40**, 292-297.
- Paulus, C. (1995): Expression und Charakterisierung des HIV-Proteins p6*, *Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg*.
- Paulus, C. (1999): Untersuchungen zur Struktur und Funktion der HIV-1 Gag-Pol Domäne p6*, *Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg*.
- Paulus, C., Hellebrand, S., Tessmer, U., Wolf, H., Kräusslich, H.-G. & Wagner, R. (1999): Competitive inhibition of immunodeficiency virus type-1 protease by the Gag-Pol transframe protein*, *J. Biol. Chem.* **274**, 21539-21543.
- Pearl, L. & Blundell, T. (1984): The active site of aspartic proteinases, *FEBS Lett.* **174**, 96-101.
- Pearl, L. H. & Taylor, W. R. (1987): A structural model for the retroviral proteases, *Nature* **329**, 351-354.
- Peng, C., Ho, B. K., Chang, T. W. & Chang, N. T. (1989). Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *J. Virol.* **63**, 2550-2556.
- Perales, C., Carrasco, L. & Ventoso, I. (2003): Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation, *FEBS Lett.* **533**, 89-94.
- Perez, L. G., O'Donnell, M. A. & Stephens, E. B. (1992): The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor-binding glycoprotein, *J. Virol.* **66**, 4134-4143.
- Pettit, S. C., Gulnik, S., Everitt, L. & Kaplan, A. H. (2003): The dimer interface of protease and extra-protease domains influence the activation of protease and the specificity of Gag-Pol cleavage, *J. Virol.* **77**, 366-374.

- Pettit, S. C., Henderson, G. J., Schiffer, C. A. & Swanstrom, R. (2002): Replacement of the P1 amino acid of human immunodeficiency virus type 1 Gag processing sites can inhibit or enhance the rate of cleavage by the viral protease, *J. Virol.* **76**, 10226-10233.
- Pettit, S. C., Michael, S. F. & Swanstrom, R. (1993): The specificity of the HIV-1 protease, *Prospect-Drug. Discovery Des.* **1**, 69-83.
- Pettit, S. C., Moody, M. D., Wehbie, R. S., Kaplan, A., Nantermet, P. V., Klein, C. A. & Swanstrom, R. (1994): The p2 domain of human immunodeficiency virus type I Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions, *J. Virol.* **68**, 8017-8027.
- Pettit, S. C., Sheng, N., Tritch, R., Erickson-Viitanen, S. & Swanstrom, R. (1998): The regulation of sequential processing of HIV-1 Gag by the viral protease, *Adv. Exp. Med. Biol.* **436**, 15-25.
- Pettit, S. C., Simsic, J., Loeb, D. D., Everitt, L., Hutchison, C. A. 3rd. & Swanstrom, R. (1991): Analysis of retroviral protease cleavage sites reveals two types of cleavage sites and the structural requirements of the P1 amino acid, *J. Biol. Chem.* **266**, 14539-14547.
- Phylip, L. H., Griffiths, J. T., Mills, J. S., Graves, M. C., Dunn, B. M. & Kay, J. (1995): Activities of precursor and tethered dimer forms of HIV proteinase, *Adv. Exp. Med. Biol.* **362**, 467-472.
- Phylip, L. H., Mills, J. S., Parten, B. F., Dunn, B. M. & Kay, J. (1992): Intrinsic activity of precursor forms of HIV-1 proteinase, *FEBS Lett.* **314**, 449-454.
- Piller, S. C., Ewart, G. D., Premkumar, A., Cox, G. B. & Gage, P. W. (1996): Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 111-115.
- Pollard, V. W. & Malim, M. H. (1998): The HIV-1 Rev protein, *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 491-532.
- Poon, B., Grovit-Ferbas, K., Stewart, S. A. & Chen, I. S. (1998): Cell cycle arrest by Vpr in HIV-1 virions and insensitivity to antiretroviral agents, *Science* **281**, 266-269.
- Poorman, R. A., Tomasselli, A. G., Heinrikson, R. L., Kezdy, F. J. (1991): A cumulative specificity model for proteases from human immunodeficiency virus types 1 and 2, inferred from statistical analysis of an extended substrate data base, *J. Biol. Chem.* **266**, 14554-14561.
- Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G. & Bukrinsky, M. (1998): Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex, *J. Biol. Chem.* **273**, 13347-13352.
- Porter, D. J. T., Hanlon, M. H., Carter, L. H. III, Danger, D. P. & Furfine, E. S. (2001): Effectors of protease peptidolytic activity, *Biochemistry* **40**, 11131-11139.
- Potash, M. J., Bentsman, G., Muir, T., Krachmarov, C., Sova, P. & Volsky, D. J. (1998): Peptide inhibitors of HIV-1 protease and viral infection of peripheral blood lymphocytes based on HIV-1 Vif, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 13865-13868.
- Powell, D. M., Amaral, M. C., Wu, J. Y., Maniatis, T. & Greene, W. C. (1997): HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **94**, 973-978.
- Quillent, C., Borman, A. M., Paulous, S., Dauguet, C. & Clavel, F. (1996): Extensive regions of pol are required for efficient human immunodeficiency virus polyprotein processing and particle maturation, *Virology* **219**, 29-36.
- Rao, J. K., Erickson, J. W. & Wlodawer, A. (1991): Structural and evolutionary relationships between retroviral and eucaryotic aspartic proteinases, *Biochemistry* **30**, 4663-4671.
- Ratner, L., Fisher, A., Jagodzinski, L. L., Mitsuya, H., Liou, R. S., Gallo, R. C. & Wong-Staal, F. (1987): Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **3**, 57-69.
- Reil, H., Bukovsky, A. A., Gelderblom, H. R. & Göttinger, H. G. (1998): Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein, *EMBO J.* **17**, 2699-2708.
- Reil, H. & Hauser, H. (1990): Test system for determination of HIV-1 frameshifting efficiency in animal cells, *Biochim. Biophys. Acta.* **1050**, 288-292.
- Reil, H., Kollmus, H., Weidle, U. H. & Hauser, H. (1993): A heptanucleotide sequence mediates ribosomal frameshifting in mammalian cells, *J. Virol.* **67**, 5579-5584.
- Rey, O., Canon, J. & Krogstad, P. (1996): HIV-1 Gag protein associates with F-actin present in microfilaments, *Virology* **220**, 530-534.
- Rice, A. P. & Mathews, M. B. (1988): Transcriptional but not translational regulation of HIV-1 by the tat gene product, *Nature* **332**, 551-553.

- Richards, A. D., Phylip, L. H., Farmerie, W. G., Scarborough, P. E., Alvarez, A., Dunn, B. M., Hirel, Ph.-H., Konvalinka, J., Strop, P., Pavlickova, L., Kostka, V. & Kay, J. (1990): Sensitive, soluble chromogenic substrates for HIV-1 proteinase, *J. Biol. Chem.* **265**, 7733-7736.
- Richards, A. D., Roberts, R., Dunn, B. M., Graves, M. C. & Kay, J. (1989): Effective blocking of HIV-1 proteinase activity by characteristic inhibitors of aspartic proteinases, *FEBS Lett.* **247**, 113-117.
- Richman, D. D. (1995): Human immunodeficiency virus. Protease uninhibited [news; comment], *Nature* **374**, 494.
- Richter-Cook, N. J., Howard, K. J., Cirino, N. M., Wohrl, B. M. & Le Grice, S. F. (1992): Interaction of tRNA(Lys-3) with multiple forms of human immunodeficiency virus reverse transcriptase, *J. Biol. Chem.* **267**, 15952-15957.
- Rick, S. W., Erickson, J. W. & Burt, S. K. (1998): Reaction path and free energy calculations of the transition between alternate conformations of the HIV-1 protease, *Proteins* **32**, 7-16.
- Ridky, T. & Leis, J. (1995): Development of drug resistance to HIV-1 protease inhibitors, *J. Biol. Chem.* **270**, 29621-29623.
- Ringe, D. (1994): X-ray structures of retroviral proteases and their inhibitor-bound complexes, *Methods Enzymol.* **241**, 157-177.
- Riviere, Y., Blank, V., Kourilsky, P. & Israel, A. (1991): Processing of the precursor of NF-kappa B by the HIV-1 protease during acute infection, *Nature* **350**, 625-626.
- Rodriguez, E. J., Angeles, T. S. & Meek, T. D. (1993): Use of N-15 kinetic isotope effects to elucidate details of the chemical mechanism of human immunodeficiency virus-1 protease, *Biochemistry* **32**, 12380-12385.
- Rogel, M. E., Wu, L. I. & Emerman, M. (1995): The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection, *J. Virol.* **69**, 882-888.
- Rosé, J. R., Babé, L. M. & Craik, C. S. (1995): Defining the level of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease activity required for HIV-1 particle maturation and infectivity, *J. Virol.* **69**, 2751-2758.
- Rosé, J. R., Salto, R. & Craik, C. S. (1993): Regulation of autoproteolysis of the HIV-1 and HIV-2 proteases with engineered amino acid substitutions, *J. Biol. Chem.* **268**, 11939-11945.
- Rosen, C. A., Terwilliger, E., Dayton, A., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1988): Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**, 2071-2075.
- Rozzelle, J. E., Dauber, D. S., Todd, S., Kelley, R. & Craik, C. S. (2000): Macromolecular inhibitors of HIV-1 protease. Characterization of designed heterodimers, *J. Biol. Chem.* **275**, 7080-7086.
- Salto, R., Babe, L.M., Li, J., Rose, J. R., Yu, Z., Burlingame, A., De Voss, J. J., Sui, Z., Ortiz de Montellano, P. & Craik, C. S. (1994): In vitro characterization of nonpeptide irreversible inhibitors of HIV proteases, *J. Biol. Chem.* **269**, 10691-10698.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**, 5463-5467.
- Sattentau, Q. J. & Moore, J. P. (1991): Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding, *J. Exp. Med.* **174**, 407-415.
- Sawaya, B. E., Khalili, K., Gordon, J., Srinivasan, A., Richardson, M., Rappaport, J. & Amini, S. (2000): Transdominant activity of human immunodeficiency virus type 1 Vpr with a mutation at residue R73, *J. Virol.* **74**, 4877-4881.
- Scarlata, S., Ehrlich, L. S. & Carter, C. A. (1998): Membrane-induced alterations in HIV-1 Gag and matrix protein-protein interactions, *J. Mol. Biol.* **277**, 161-169.
- Schaeffer, E., Geleziunas, R. & Greene, W. C. (2001): Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions, *J. Virol.* **75**, 2993-3000.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

- Schechter, I. & Berger, A. (1967): On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162.
- Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, K. B. & Pavlakis, G. N. (1997): Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of gag and gag/protease and particle formation, *J. Virol.* **71**, 4892-4903.
- Schock, H. B., Garsky, V. M. & Kuo, L. C. (1996): Mutational anatomy of an HIV-1 protease variant conferring cross-resistance to protease inhibitors in clinical trials. Compensatory modulations of binding and activity, *J. Biol. Chem.* **271**, 31957-31963.
- Schramm, H. J., Billich, A., Jaeger, E., Rucknagel, K.-P., Arnold, G. & Schramm, W. (1993): The inhibition of HIV-1 protease by interface peptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 595-600.
- Schüler, W., Wecker, K., de Rocquigny, H., Baudat, Y., Sire, J. & Roques, B. P. (1999): NMR structure of the (52-96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: molecular insights into its biological functions, *J. Mol. Biol.* **285**, 2105-2117.
- Schwartz, S., Felber, B. K. & Pavlakis, G. N. (1992): Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein, *J. Virol.* **66**, 150-159.
- Seelmeier, S., Schmidt, H., Turk, V. & von der Helm, K. (1988): Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**, 6612-6616.
- Selig, L., Pages, J. C., Tanchou, V., Preveral, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L. S., Erdtmann, L., Darlix, J. L., Benarous, R. & Benichou, S. (1999): Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses, *J. Virol.* **73**, 592-600.
- Sham, H. L., Kempf, D. J., Molla, A., Marsh, K. C., Kumar, G. N., Chen, C. M., Kati, W., Stewart, K., Lal, R., Hsu, A., Betebenner, D., Korneyeva, M., Vasavanonda, S., McDonald, E., Saldivar, A., Wideburg, N., Chen, X., Niu, P., Park, C., Jayanti, V., Grabowski, B., Granneman, G. R., Sun, E., Japour, A. J. & Norbeck, D. W. (1998): ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease, *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 3218-3224.
- Shehu-Xhilaga, M., Crowe, S. M. & Mak, J. (2001): Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity, *J. Virol.* **75**, 1834-1841.
- Shehu-Xhilaga, M., Kräusslich, H.-G., Pettit, S., Swanstrom, R., Lee, J. Y., Marshall, J. A., Crowe, S. M. & Mak, J. (2001): Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation, *J. Virol.* **75**, 9156-9164.
- Shehu-Xhilaga, M., Lee, J. Y., Campbell, S., Marshall, J. A., Crowe, S. M. & Mak, J. (2002): Overexpression and incorporation of GagPol precursor does not impede packaging of HIV-1 tRNA^{Lys3} but promotes intracellular budding of virus-like particles, *J. Biomed. Sci.* **9**, 697-705.
- Sheng, N. & Erickson-Viitanen, S. (1994): Cleavage of p15 protein in vitro by human immunodeficiency virus type 1 protease is RNA dependent, *J. Virol.* **68**, 6207-6214.
- Sheng, N., Pettit, S. C., Tritch, R. J., Ozturk, D. H., Rayner, M. M., Swanstrom, R. & Erickson-Viitanen, S. (1997): Determinants of the human immunodeficiency virus type 1 p15NC-RNA interaction that affect enhanced cleavage by the viral protease, *J. Virol.* **71**, 5723-5732.
- Sherman, M. P., de Noronha, C. M., Heusch, M. I., Greene, S. & Greene, W. C. (2001): Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr, *J. Virol.* **75**, 1522-1532.
- Shoeman, R. L., Honer, B., Stoller, T. J., Kesselmeier, C., Miedel, M. C., Traub, P. & Graves, M. C. (1990): Human immunodeficiency virus type 1 protease cleaves the intermediate filament proteins vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 6336-6340.
- Silva, A. M., Cachau, R. E., Sham, H. L. & Erickson, J. W. (1996): Inhibition and catalytic mechanism of HIV-1 aspartic protease, *J. Mol. Biol.* **255**, 321-346.
- Singh, S. P., Lai, D., Cartas, M., Serio, D., Murali, R., Kalyanaraman, V. S. & Srinivasan, A. (2000): Epitope-tagging approach to determine the stoichiometry of the structural and nonstructural proteins in the virus particles: amount of Vpr in relation to Gag in HIV-1, *Virology* **268**, 364-371.
- Singh, S. P., Tungaturthi, P., Cartas, M., Tomkowicz, B., Rizvi, T. A., Khan, S. A., Kalyanaraman, V. S. & Srinivasan, A. (2001): Virion-associated HIV-1 Vpr: variable amount in virus particles derived from cells upon virus infection or proviral DNA transfection, *Virology* **283**, 78-83.

- Smith, R., Brereton, I. M., Chai, R. Y. & Kent, S. B. H. (1996): Ionization states of the catalytic residues in HIV-1 protease, *Nature Struct. Biol.* **3**, 946-950.
- Sodroski, J., Goh, W. C., Rosen, C., Dayton, A., Terwilliger, E. & Haseltine, W. (1986): A second post-transcriptional *trans*-activator gene required for HTLV-III replication, *Nature* **321**, 412-417.
- Sonigo, P., Barker, C., Hunter, E. & Wain-Hobson, S. (1986): Nucleotide sequence of Mason-Pfizer monkey virus: an immunosuppressive D-type retrovirus, *Cell* **45**, 375-385.
- Sova, P., Volsky, D. J., Wang, L. & Chao, W. (2001): Vif is largely absent from human immunodeficiency virus type 1 mature virions and associates mainly with viral particles containing unprocessed gag, *J. Virol.* **75**, 5504-5517.
- Speck, R. R., Flexner, C., Tian, C.-J. & Yu, X.-F. (2000): Comparison of human immunodeficiency virus type 1 Pr55^{Gag} and Pr160^{Gag-Pol} processing intermediates that accumulate in primary and transformed cells treated with peptidic and nonpeptidic protease inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1397-1403.
- Stark, L. A. & Hay, R. T. (1998): Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral protein R (Vpr) interacts with Lys-tRNA synthetase: implications for priming of HIV-1 reverse transcription, *J. Virol.* **72**, 3037-3044.
- Stebbins, J., Towler, E. M., Tennant, M. G., Deckman, I. C. & Debouck, C. (1997): The 80's loop (residues 78 to 85) is important for the differential activity of retroviral proteases, *J. Mol. Biol.* **267**, 467-475.
- Stein, B. S., Gowda, S. D., Lifson, J. D., Penhallow, R. C., Bensch, K. G. & Engleman, E. G. (1987): pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane, *Cell* **49**, 659-668.
- Stemmler, T., Alam, S., Wang, H., Davis, D. & Sundquist, W. (2000): A b-hairpin Switch in the Proteolytic Maturation of HIV-1 Gag, submitted.
- Stewart, S. A., Poon, B., Jowett, J. B. M. & Chen, I. S. Y. (1997): Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest, *J. Virol.* **71**, 5579-5592.
- Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G. (2000): A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 13063-13068.
- Strack, P. R., Frey, M. W., Rizzo, C. J., Cordova, B., George, H. J., Meade, R., Ho, S. P., Corman, J., Tritch, R. & Korant, B. D. (1996): Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of Bcl-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 9571-9576.
- Suguna, K., Bott, R. R., Padlan, E. A., Subramanian, E., Sheriff, S., Cohen, G. H. & Davis, D. R. (1987): Structure and refinement at 1.8 Å resolution of the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*, *J. Mol. Biol.* **196**, 877-900.
- Swanstrom, R. & Wills, J. W. (1997): Retroviral gene expression. II. Synthesis, processing, and assembly of viral proteins, in: Coffin, J. M., Hughes, S. H., Varmus, H. E., editors. *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbour, Chapter 7.
- Szeltner, Z. & Polgar, L. (1996): Conformational stability and catalytic activity of HIV-1 protease are both enhanced at high salt concentration, *J. Biol. Chem.* **271**, 5458-5463.
- Takeda, M., Khamdang, S., Narikawa, S., Kimura, H. & Kobayashi, Y. (2002): Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 918-924.
- Tang, J., James, M. N., Hsu, I. N., Jenkins, J. A. & Blundell, T. L. (1978): Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases, *Nature* **271**, 618-621.
- Tang, J. & Hartsuck, J. A. (1995): A kinetic model for comparing proteolytic processing activity and inhibitor resistance potential of mutant HIV-1 proteases, *FEBS Lett.* **367**, 112-116.
- Telenti, A., Martinez, R., Munoz, M., Bleiber, G., Greub, G., Sanglard, D. & Peters, S. (2002): Analysis of natural variants of the human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshift stem-loop structure, *J. Virol.* **76**, 7868-7873.
- Telesnitsky, A. & Goff, S. P. (1997): Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA, in *Retroviruses* (Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E. eds.), 121-160, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Tessmer, U. & Kräusslich, H.-G. (1998): Cleavage of human immunodeficiency virus type 1 proteinase from the N-terminally adjacent p6* protein is essential for efficient Gag polyprotein processing and viral infectivity, *J. Virol.* **72**, 3459-3463.

- Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E., Rosenwirth, B., Walsh, C. T., Sodroski, J. & Gottlinger, H. G. (1994): Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions, *Nature* **372**, 363-365.
- Todd, M. J., Semo, N. & Freire, E. (1998): The structural stability of the HIV-1 protease, *J. Mol. Biol.* **283**, 475-488.
- Tözser, J., Blaha, I., Copeland, T. D., Wondrak, E. M. & Oroszlan, S (1991): Comparison of the HIV-1 and HIV-1 proteinases using oligopeptide substrates representing cleavage sites in Gag and Gag-Pol polyproteins, *FEBS Lett.* **281**, 77-80.
- Tözser, J., Weber, I. T., Gustchina, A., Blaha, I., Copeland, T. D., Louis, J. M. & Oroszlan, S. (1992): Kinetic and modeling studies of S3-S3' subsites of HIV proteinases, *Biochemistry* **31**, 4793-4800.
- Toh, H., Ono, M., Saigo, K. & Miyata, T. (1985): Retroviral protease-like sequence in the yeast transposon Ty 1, *Nature* **315**, 691-692.
- Tomasselli, A. G. & Henrikson, R. L. (1994): Specificity of retroviral proteases: an analysis of viral and nonviral protein substrates, *Methods Enzymol.* **241**, 279-301.
- Tomasselli, A. G., Hui, J. O., Adams, L., Chosay, J., Lowery, D., Greenberg, B., Yem, A., Deibel, M. R., Zurcher-Neely, H. & Henrikson, R. L. (1991): Actin, troponin C, Alzheimer amyloid precursor protein and pro-interleukin 1 beta as substrates of the protease from human immunodeficiency virus, *J. Biol. Chem.* **266**, 14548-14553.
- Tomasselli, A. G., Sarcich, J. L., Barrett, L. J., Reardon, I. M., Howe, W. J., Evans, D. B., Sharma, S. K. & Henrikson, R. L. (1993): Human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase and ribonuclease H as substrates of the viral protease, *Protein Sci.* **2**, 2167-2176.
- Toth, M. V. & Marshall, G. R. (1990): A simple, continuous fluorometric assay for HIV protease, *Int. J. Pept. Protein Res.* **36**, 544-550.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **76**, 4350-4354.
- Tritch, R. J., Cheng, Y. E., Yin, F. H. & Erickson-Viitanen, S. (1991): Mutagenesis of protease cleavage sites in the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein, *J. Virol.* **65**, 922-930.
- Vacca, J. P., Dorsey, B. D., Schleif, W. A., Levin, R. B., McDaniel, S. L., Darke, P. L., Zugay, J., Quintero, J. C., Blahy, O. M., Roth, E., Sardana, V. V., Schlabach, A. J., Graham, P. I., Condra, J. H., Gotlib, L., Holloway, M. K., Lin, J., Chen, I.-W., Vastag, K., Ostovic, D., Anderson, P. S., Emini, E. A. & Huff, J. R. (1994): L-735,524: an orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**, 4096-4100.
- Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C. & Carrasco, L. (2001): HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 12966-12971.
- VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T. J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J. & Carter, C. A. (2001): Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag), *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 7724-7729.
- Villarejo, M. R. & Zabin, I. (1974): Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains, *J. Bacteriol.* **120**, 466-474.
- Vincent, M. J., Melsen, L. R. & Martin, A. S. (1999): Compans RW. Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins, *J. Virol.* **73**, 8138-8144.
- Vink, C. & Plasterk, R. H. (1993): The human immunodeficiency virus integrase protein. *Trends Genet.* **9**, 433-438.
- Vogt, V. M. (1996): Proteolytic processing and particle maturation, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**, 95-131.
- von der Helm, K., Gürtler, L., Eberle, J. & Deinhardt, F. (1989): Inhibition of HIV replication in cell culture by the specific aspartic protease inhibitor pepstatin A, *FEBS Lett.* **247**, 349-352.
- von Pöblotzki, A., Wagner, R., Niedrig, M., Wanner, G., Wolf, H. & Modrow, S. (1993): Identification of a region in the Pr55gag-polyprotein essential for HIV-1 particle formation, *Virology* **193**, 981-985.
- von Schwedler, U. K., Stemmler, T. L., Klishko, V. Y., Li, S., Albertine, K. H., Davis, D. R. & Sundquist, W. I. (1998): Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly, *EMBO J.* **17**, 1555-1568.

- Wagner, R., Fließbach, H., Wanner, G., Motz, M., Niedrig, M., Deby, G., von Brunn, A. & Wolf, H. (1992): Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine, *Arch. Virol.* **127**, 117-137.
- Wan, M., Takagi, M., Loh, B. N., Xu, X. Z. & Imanaka, T. (1996): Autoprocessing: an essential step for the activation of HIV-1 protease, *Biochem. J.* **316**, 569-573.
- Wang, L., Mukherjee, S., Jia, F., Narayan, O. & Zhao, L. J. (1995): Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat, *J. Biol. Chem.* **270**, 25564-25569.
- Wang, W. & Kollman, P. A. (2000): Free energy calculations on dimer stability of the HIV protease using molecular dynamics and a continuum solvent model, *J. Mol. Biol.* **303**, 567-582.
- Weber, I. T. (1990): Evaluation of homology modeling of HIV protease, *Proteins* **7**, 172-184.
- Weber, I. T., Miller, M., Jaskolski, M., Leis, J., Skalka, A. M. & Wlodawer, A. (1989): Molecular modeling of the HIV-1 protease and its substrate binding site, *Science* **243**, 928-931.
- Weeks, K. M., Ampe, C., Schultz, S. C., Steitz, T. A. & Crothers, D. M. (1990): Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA, *Science* **249**, 1281-1285.
- Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H. & Jones, K. A. (1998): A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA, *Cell* **92**, 451-462.
- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A. & Hahn, B. H. (1995): Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection, *Nature* **373**, 117-122.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1997): Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41, *Nature* **387**, 426-430.
- Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H. R., & Kräusslich, H.-G. (1996): Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase, *Virology* **219**, 228-236.
- Wieggers, K., Rutter, G., Kottler, H., Tessmer, U., Hohenberg, H. & Kräusslich, H.-G. (1998): Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites, *J. Virol.* **72**, 2846-2854.
- Wild, C., Dubay, J. W., Greenwell, T., Baird, T. Jr., Oas, T. G., McDanal, C., Hunter, E. & Matthews, T. (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.
- Wilk, T., Gowen, B. & Fuller, S. D. (1999): Actin associates with the nucleocapsid domain of the human immunodeficiency virus Gag polyprotein, *J. Virol.* **73**, 1931-1940.
- Wilson, W., Braddock, M., Adams, S. E., Rathjen, P. D., Kingsman, S. M. & Kingsman, A. J. (1988): HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems, *Cell* **55**, 1159-1169.
- Wlodawer, A. & Erickson, J. W. (1993): Structure-based inhibitors of HIV-1 protease, *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 543-585.
- Wlodawer, A., Miller, M., Jaskolski, M., Sathyanarayana, B. K., Baldwin, E., Weber, I. T., Selk, L. M., Clawson, L., Schneider, J. & Kent, S. B. (1989): Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease, *Science* **245**, 616-621.
- Wlodawer, A. & Vondrasek, J. (1998): Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 249-284.
- Wolf, H., Modrow, S., Soutschek, E., Motz, M., Grunow, R., Döbl, H. & von Baehr, R. (1990): Production, mapping and biological characterization of monoclonal antibodies against core protein (p24) of the human immunodeficiency virus, *AIFO* **1**, 16-18.
- Wondrak, E. M., Louis, J. M., de Rocquigny, H., Chermann, J. C. & Roques, B. P. (1993): The Gag precursor contains a specific HIV-1 protease cleavage site, between the NC (p7) and p1 proteins, *FEBS Lett.* **333**, 21-24.
- Wondrak, E. M., Nashed, N. T., Haber, M. T., Jerina, D. M. & Louis, J. M. (1996): A transient precursor of the HIV-1 protease. Isolation, characterization, and kinetics of maturation, *J. Biol. Chem.* **271**, 4477-4481.

- Wu, X., Liu, H., Kim, J., Seshaiiah, P., Natsoulis G., Boeke, J. D., Hahn, B. H. & Kappes J. C. (1995): Targeting foreign proteins to human immunodeficiency virus particles via fusion with Vpr and Vpx, *J. Virol.* **69**, 3389-3398.
- Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Conway, J. A., Hunter, E. & Kappes, J. C. (1997): Functional RT and IN incorporated into HIV-1 particles independently of the Gag/Pol precursor protein, *EMBO J.* **16**, 5113-5122.
- Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Conway, J. A. & Kappes, J. C. (1996). Inhibition of human and simian immunodeficiency virus protease function by targeting Vpx-protease-mutant fusion protein into viral particles, *J. Virol.* **70**, 3378-3384.
- Wu, X., Liu, H., Xiao, H. & Kappes, J. C. (1996). Proteolytic activity of human immunodeficiency virus Vpr- and Vpx-protease fusion proteins, *Virology* **219**, 307-313.
- Wyatt, R. & Sodroski, J. (1998): The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens, *Science* **280**, 1884-1888.
- Wyma, D. J., Kotov, A. & Aiken, C. (2000): Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles, *J. Virol.* **74**, 9381-9387.
- York, D. M., Darden, T. A., Pedersen, L. G. & Anderson, M. W. (1993): Molecular dynamics simulation of HIV-1 protease in a crystalline environment and in solution, *Biochemistry* **32**, 1443-1453.
- Yoshinaka, Y. & Luftig, R. B. (1977): Murine leukemia virus morphogenesis: cleavage of P70 in vitro can be accompanied by a shift from a concentrically coiled internal strand ("immature") to a collapsed ("mature") form of the virus core, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**, 3446-3450.
- Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T. H. & Essex, M. (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.
- Zennou, V., Petit, c., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L. & Charneau, P. (2000): HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap, *Cell* **101**, 173-185.
- Zhang, C. T. & Chou, K. C. (1994): An alternate-subsite-coupled model for predicting HIV protease cleavage sites in proteins, *Protein Eng.* **7**, 65-73.
- Zhang, W. H., Hockley, D. J., Nermut, M. V., Morikawa, Y. & Jones, I. M. (1996): Gag-Gag interactions in the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 p24 capsid antigen are essential for Gag particle assembly, *J. Gen. Virol.* **77**, 743-751.
- Zhang, Y., Imamichi, H., Imamichi, T., Lane, H., Falloon, J., Vasudevachari, M. & Salzman, N. (1997): Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites, *J. Virol.* **71**, 6662-6670.
- Zhang, Z. Y., Poorman, R. A., Maggiora, L. L., Henrikson, R. L. & Kezdy, F. J. (1991): Dissociative inhibition of dimeric enzymes. Kinetic characterization of the inhibition of HIV-1 protease by its COOH-terminal tetrapeptide, *J. Biol. Chem.* **266**, 15591-15594.
- Zhao, L. J., Wang, L., Mukherjee, S. & Narayan, O. (1994): Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function. Oligomerization mediated by the N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **269**, 32131-32137.
- Zhou, Y., Lu, Y. & Ratner, L. (1998): Arginine residues in the C-terminus of HIV-1 Vpr are important for nuclear localization and cell cycle arrest, *Virology* **242**, 414-424.
- Zhuang, J., Jetzt, A. E., Sun, G., Yu, H., Klarmann, G., Ron, Y., Preston, B. D. & Dougherty, J. P. (2002): Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots, *J. Virol.* **76**, 11273-11282.
- Zimmerman, C., Klein, K. C., Kiser, P. K., Singh, A. R., Firestein, B. L., Riba, S. C. & Lingappa, J. R. (2002): Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids, *Nature* **415**, 88-92.
- Zoete, V., Michielin, O. & Karplus, M. (2002): Relation between sequence and structure of HIV-1 protease inhibitor complexes: a model system for the analysis of protein flexibility, *J. Mol. Biol.* **315**, 21-52.
- Zybarth, G. & Carter, C. (1995): Domains upstream of the protease (PR) in human immunodeficiency virus type 1 Gag-Pol influence PR autoprocessing, *J. Virol.* **69**, 3878-3884.
- Zybarth, G., Kräusslich, H.-G., Partin, K. & Carter, C. (1994): Proteolytic activity of novel human immunodeficiency virus type 1 proteinase proteins from a precursor with a blocking mutation at the N terminus of the PR domain, *J. Virol.* **68**, 240-250.

Veröffentlichungen

Posterpräsentationen bei Fachtagungen:

Ch. Ludwig, U. Reischl, B. Haber, H. Melzl, M. Heep, H.-D. Schröder & N. Lehn: *Helicobacter* sp. nov. isolated from tigers with gastritis. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Berlin, 1998.

Ch. Ludwig, U. Reischl, B. Haber, H. Melzl, M. Heep, H.-D. Schröder & N. Lehn: *Helicobacter* sp. nov. isolated from tigers with gastritis. International Workshop Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter pylori*, Budapest, 1998.

C. Ludwig & R. Wagner: Defining a role for the HIV-1 transframe protein p6* in viral replication: importance of protease cleavage sites for viral maturation and infectivity Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, 2003.

C. Ludwig & R. Wagner: Defining a role for the HIV-1 transframe protein p6* in viral replication: importance of protease cleavage sites for viral maturation and infectivity. 9. Deutscher und 14. Österreichischer AIDS-Kongress, Hamburg, 2003.

Vorträge bei Fachtagungen:

C. Paulus, C. Ludwig, H. Wolf & R. Wagner: Untersuchungen zu Struktur und Funktion der HIV-1 Gag-Pol Domäne p6*, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien, 2000.

C. Paulus, C. Ludwig, H. Wolf & R. Wagner: Analysis of structure and function of the HIV-1 Gag-Pol domain p6*: Implication on protease regulation and virion morphogenesis, 6th European Conference on Experimental AIDS Research, Madrid, 2000.

C. Ludwig & R. Wagner: Role of the HIV- transframe protein p6* - regulation of protease activation and impact on viral regulation, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 2002.

C. Ludwig & R. Wagner: Role of the HIV- transframe protein p6* - regulation of protease activation and impact on viral regulation, 7th European Conference on Experimental AIDS Research, Genua, 2002.

Artikel in Fachzeitschriften:

H.-D. Schröder, C. Ludwig, W. Jakob, U. Reischl, M. Stolte & N. Lehn (1998): Chronic gastritis in tigers associated with *Helicobacter acinonyx*, *J. Comp. Path.* **119**, 67-73.

C. Ludwig, C. Paulus, & R. Wagner (2003): Analysis of HIV-1 mutants with substitutions in the HIV-1 Gag-Pol transframe domain p6*, Manuskript in Vorbereitung.

C. Ludwig & R. Wagner (2003): Characterization of protease cleavage sites within and around the HIV-1 Gag-Pol transframe domain p6*, Manuskript in Vorbereitung.

Auszeichnung-Posterpreis:

C. Ludwig & R. Wagner: Defining a role for the HIV-1 transframe protein p6* in viral replication: importance of protease cleavage sites for viral maturation and infectivity. 9. Deutscher und 14. Österreichischer AIDS-Kongress, Hamburg, 2003.

Lebenslauf

Name: Christine Andrea Ludwig

Geburtsdatum: 13.09.1972

Geburtsort: Burghausen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

private Anschrift: Rilkestraße 32
93049 Regensburg
Telefon: 0941/91938

dienstliche Anschrift: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Franz-Josef-Strauss-Allee 11
93053 Regensburg
Telefon: 0941-944 6479
Fax: 0941/944 6402
Email: christine.ludwig@klinik.uni-regensburg.de

Schulbildung: 09/79 – 07/83 Grundschule Mehring
09/83 – 07/92 Gymnasium der Englischen Fräulein, Altötting
07/92 Abitur

Auslandsaufenthalt: 10/92 – 03/93 Neuseeland; Sprachreise und Beschäftigung
als „au pair“

Studium: 11/93 – 03/99 Biologie-Studium an der Universität
Regensburg
10/95 Diplomvorprüfung
05/98 Diplomhauptprüfung
06/98 – 03/99 Diplomarbeit am Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Hygiene der Universität
Regensburg zum Thema: „Grundlegende
Versuche zur Regulation der HIV-1 Protease
durch ihr aminoterminales Propeptid p6* in
Zellkultur“
03/99 Diplom

Promotion: 04/99 – 06/03 Promotion am Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Hygiene der Universität
Regensburg unter Anleitung von Prof. Dr. Ralf
Wagner

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner für die Finanzierung dieser Arbeit sowie für die fachlich kompetente Betreuung meines Themas bedanken.

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

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

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Teilfinanzierung meines Projektes.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Rainer Deutzmann und Eduard Hochmuth (Lehrstuhl für Biochemie I, Universität Regensburg) für massenspektrometrische Analysen und Proteinsequenzierungen.

Dr. Karla Lehle und Dr. Anja Ellenrieder danke ich für die Einführung in die Benutzung des Smart-Systems und Christian Gerdes für die Hilfsbereitschaft bei der Bedienung der Gelfiltrationsanlage.

Überdies gilt mein Dank Holger Melzl für die zuverlässigen DNA-Sequenzierungen.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hermann Katinger sowie bei Herrn Prof. Dr. Prakash Chandra und Herrn Prof. Dr. Ulrich Schubert für die Bereitstellung von Antikörpern.

Bei Klaus Wanisch möchte ich mich herzlich für die tatkräftige Unterstützung im Rahmen seiner Diplomarbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Ingrid Winkel, deren stetes Engagement den Laboralltag enorm erleichterte.

Ferner bedanke ich mich bei all meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Wagner für Ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen sowie für die persönliche, angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ganz herzlich möchte ich mich außerdem bei Christina Paulus für ihre rege Diskussionsbereitschaft und hilfreiche Tipps sowie für konstruktive Kritik in fachlichen Angelegenheiten bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern und Freunden, die immer an mich geglaubt haben.

Schließlich möchte ich mich bei Andi bedanken, der mich in schweren Zeiten stets unterstützt hat.

F Anhang

F.1 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotidsequenzen sind in 5'→3'-Orientierung angegeben. Alle angegebenen Bindungspositionen der Oligonukleotide beziehen sich auf die unten aufgeführten Sequenzen.

Oligonukleotide für die Herstellung der Provirusmutanten (B.1.3.1):

(A) Oligonukleotide für die Herstellung von pHX/p6*csM1

1a

AGACAGGCTAATTTTTTGGGAAGATCTGGCCTTCC

1b

GGAAGGCCAGATCTTCCCAAAAAATTAGCCTGTCT

(B) Oligonukleotide für die Herstellung von pHX/p6*csM2:

2a

GCTAATTTTTAGGGAAGATCTGGCCGCTCTACAAG

2b

CTTGTAGGACGGCCAGATCTTCCCTAAAAAATTAGC

(C) Oligonukleotide für die Herstellung von pHX/p6*csM3:

3a

CAAGGGACGGCCAGGGAATTTCTCAGAGC

3b

GCTCTGAAGAAAATCCCTGGCCGTCCTTG

(D) Oligonukleotide für die Herstellung von pHX/p6*csM4, p6*csM5, p6*csM6:

0a

GGAAGTGTACCCTTAACTCCCTCAGATCACTCTTTGG

0b

CCAAAGAGTGATCTGAGGGAGGTAAAGGGTACAGTTCC

(E) zusätzliche Oligonukleotide für die Herstellung von pHX/p6*csM4:

4a

GGAAGTGTACCCTCTCACCTCCCTCAGATCACTCTTTGG

4b

CCAAAGAGTGATCTGAGGGAGGTGAGAGGGTACAGTTCC

(F) zusätzliche Oligonukleotide für die Herstellung von pHX/p6*csM5:

5a

GGAAGTGTACCCATTGACCTCCCTCAGATCACTCTTTGG

5b

CCAAAGAGTGATCTGAGGGAGGTCAATGGGTACAGTTCC

(G) zusätzliche Oligonukleotide für die Herstellung von pHX/p6*csM6:

6a

GGAAGTGTACCCTTTGACTTCCCTCAGATCACTCTTTGG

6b

CCAAAGAGTGATCTGAGGGAAGTCAAAGGGTACAGTTCC

Oligonukleotide für die Herstellung der „frameshift“-Reporterplasmide (B.1.3.2):

(A) Oligonukleotide für die Herstellung von pGL-fswt:

luc1:

GTCAGAAGCTTACCATGGGTCGACAGGCTAATTTTTAGGGAAG

luc2

GGGAAGTTGAAGGATCCTTCCCTGGCCTTCCCTGTAGG

luc3

CTTTTTGGCGTC TTCGAGCTCAGGGAAGTTGAAGGATCCTTCCC

luc4

CGCCGGGCCTTTCTTTATGTTTTGGCGTCTTCGAGCTCAGGG

luc5

GCTAGTCTAGAGGATAGAATGGCGCCGGGCCTTTCTTTATGTTTTGG

(B) Oligonukleotide für die Herstellung von pGL-fsΔ:

fsΔa

GGGTCGACAGGCTAATGGTAGGGAAGATCTGGCC

fsΔb

GGCCAGATCTTCCCTACCATTAGCCTGTCGACCC

(C) Oligonukleotide für die Herstellung von pGL-fs0:

fs-0a

GGCTAATTTTTAGGGAAGATCGATCTGGCCTTCTACAAGGG

fs-0b

CCCTGTAGGAAGGCCAGATC GATCTTCCCTAAAAAATTAGCC

(D) Oligonukleotide für die Herstellung von pGL-fs1:

fs-1a

AGACAGGCTAATTTTTGGGAAGATCTGGCCTTCC

fs-1b

GGAAGGCCAGATCTTCCCAAAAAAATTAGCCTGTCT

(E) Oligonukleotide für die Herstellung von pGL-fs2:

fs-2a

GCTAATTTTTAGGGAAGATCTGGCCGTCCTACAAG

fs-2b

CTTG TAGGACGGCCAGATCTTCCCTAAAAAATTAGC

(F) Oligonukleotide für die Herstellung von pGL-fs3:

fs-3a

CCTACAAGGGACGGCCAGGGAAGGATCC

fs-3b

GGATCCTTCCCTGGCCGTCCTTGTAGG

(G) Oligonukleotide für die Herstellung von pGL-fsHX:

fs-HXa

CCCGGGAGGTACCGAGCTTTACGCG

fs-HXb

GGCTCTGGTCTGCTCTGAAGAAAATCCCTGGCCTTCCCTTGTAGGAAGGCC

fs-HXc

TTTTCTCAGAGCAGACCAGAGCCGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCG

fs-HXd

GCCCATATCGTTTCATAGCTTCTGCC

Oligonukleotide für die Herstellung der GST-Expressionsplasmide (B.1.3.3):

(A) Oligonukleotide für die Herstellung von pGEX-p6*M2:

GEX-2a

GGATCCTTTTTAGGGAAGATCTGGCCGTCCTACAAG

GEX-2b

CTTG TAGGACGGCCAGATCTTCCCTAAAAAAGGATCC

(B) Oligonukleotide für die Herstellung von pGEX-p6*M3:

siehe Oligonukleotide für die Herstellung von pHX/p6*csM3 (**3a** und **3b**)

(C) Oligonukleotide für die Herstellung von pGEX-p6*M6:

GEX-6a

GGAAGTGTACCCCTTGACTTCTAAGAATTCTAGACTCC

GEX-6b

GGAGTCTAGAATTCTTAGAAGTCAAAGGGTACAGTTCC

(D) Zusätzliche Oligonukleotide für die Herstellung von pGEX-p6*M5:

GEX-5a

GGAAGTGTACCCATTGACCTCTAAGAATTCTAGACTCC

GEX-5b

GGAGTCTAGAATTCTTAG AGGTCAATGGGTACAGTTCC

Oligonukleotide für die Herstellung der synthetischen HIV-1 Gene (B.1.3.4):

(A) Oligonukleotide für die Herstellung des synp6*-Gens:

Nr. 1 (vorwärts, Position in synp6*-Sequenz: nt 70-129)

GCCAGCAGACCAGGGCCAACAGCCCCACCATCAGCAGCGAGCAGACCAGGGCCAACAGCC

Nr. 2 (rückwärts, Position in synp6*-Sequenz: nt 167-108)

GTTGTCCCTGCCCCACACCTGCAGCTCCCTCGGTGGGGCTGTTGGCCCTGGTCTGCTC

Nr. 3 (vorwärts, Position in synp6*-Sequenz: nt 30-89)

GACCTGGCCTTCTGCAGGGCAAGGCCAGGGAGTTCAGCAGCGAGCAGACCAGGGCCAAC

Nr. 4 (rückwärts, Position in synp6*-Sequenz: nt 206-147)

GGTGCCTGCTGTGCGGCGCGCCTCGCTGGGGCTGTTGTTGCCCTGCCCCACACCTG

Nr. 5 (vorwärts, Position in synp6*-Sequenz: nt 1-49)

GCTACGGATTGCCATGTTCTTCAGGGAGGACCTGGCCTTCTGCAGGG

Nr. 6 (rückwärts, Position in synp6*-Sequenz: nt 238-186)

CCGAGGAATTCCTATTAGAAGTTGAAGTCAACGGTGCCTGCTGTCGGCGCC

(B) zusätzliches Oligonukleotid für die Herstellung des EGFP-synp6*-Gens:

Nr. 7 (vorwärts, Position in synp6*-Sequenz: nt 1-58)

GCTACAGATCTGGCGGCGGCGGCTTCTCAGGGAGGACCTGGCCTTCTGCAGGG

(C) Oligonukleotide für die Herstellung des synPR-Gens:

Nr. 11 (vorwärts, Position in synPR-Sequenz: nt 117-176)

GAGGAGATGAGCCTGCCCGCAGGTGGAAGCCCAAGATGATCGGCGGCATCGGCGGCTTC

Nr. 12 (rückwärts, Position in synPR-Sequenz: nt 217-158)

CAGATCTCGATCAGGATCTGGTCTACTGCCTCACCTTGATGAAGCCGCCGATGCCGCCG

Nr. 13 (vorwärts, Position in synPR-Sequenz: nt 77-136)

GGAGGCCCTGCTGGACACCGGCGCCGACGACACCGTCTGGAGGAGATGAGCCTGCCCGG

Nr. 14 (rückwärts, Position in synPR-Sequenz: nt 258-198)

GTGTGGGGCCACCAGCACGGTCCGATGGCCTTGTGGCCGAGATCTCGATCAGGATCTG

Nr. 15 (vorwärts, Position in synPR-Sequenz: nt 36-96)

CAGAGCCCCTGGTGACCATCAAGATCGGCGGCCAGCTGAAGGAGGCCCTGCTGGACACCG

Nr. 16 (rückwärts, Position in synPR-Sequenz: nt 298-239)

CCGATCTGGGTCAGCAGGTTCTGCGGATGATGTTACGGGIGTGGGGCCACCAGCACG

Nr. 17 (vorwärts, Position in synPR-Sequenz: nt 1-56)

GACGTGGATTGCCATGCCCCAGATCACCTGTGGCAGAGGCCCTGGTGACCATC

Nr. 18 (rückwärts, Position in synPR-Sequenz: nt 331-278)

GTCACGAATTCCTATTAGAAGTTCAGGGTGCAGCCGATCTGGGTCAGCAGGTTTC

(D) zusätzliche Oligonukleotide für die Herstellung des synPR-Gens:

Nr. 19 (vorwärts, Position in synPR-Sequenz: nt 77-136)

GGAGGCCCTGCTGAACACCGGCGCCGACGACACCGTCTGGAGGAGATGAGCCTGCCCGG

Nr. 20 (rückwärts, Position in synPR-Sequenz: nt 36-96)

CAGAGGCCCTGGTGACCATCAAGATCGGCGGCCAGCTGAAGGAGGCCCTGCTGAACACCG

(E) zusätzliche Oligonukleotide für die Herstellung des synPR-PR-Gens:

Nr. 21 (vorwärts, Position in synPR-PR-Sequenz: nt 321-362)

GACGTGCTAGCGGAGGAGCCCCCAGATCACCTGTGGCAGAGGCC

Nr. 22 (rückwärts, Position in synPR-PR-Sequenz: nt 639-584)

GTCACGAATTCGCTAGCTCCGGCGAAGTTCAGGGTGCAGCCGATCTGGGTCAGCAG

(F) Oligonukleotide für die Herstellung des synVpr(pre)-Gens:

Nr. 25 (vorwärts, Position in synVpr(pre)-Sequenz: nt 90-152)

CTGAAGAACGAGGCCGTGAGGCACTTCCCCAGGATCTGGCTGCACGGCCTGGGCCAGCACATC

Nr. 26 (rückwärts, Position in synVpr(pre)-Sequenz: nt 197-134)

GATGATGGCCTCCACGCCGGCCAGGTGTCGCCGTAGGTCTCGTAGATGTGCTGGCCCAGGCCG

Nr. 27 (vorwärts, Position in synVpr(pre)-Sequenz: nt 47-109)

GAGGGAGCCCCACAACGAGTGGACCCTGGAGCTGCTGGAGGAGCTGAAGAACGAGGCCGTGAG

Nr. 28 (rückwärts, Position in synVpr(pre)-Sequenz: nt 240-178)

CCCAGTTCTGGAAGTGATGAACAGCAGCTGCTGCAGATCCTGATGATGGCCTCCACGCCGG

Nr. 29 (vorwärts, Position in synVpr(pre)-Sequenz: nt 1-65)

CTGACAGATCTGCCATGGAGCAGGCCGCCGAGGACCAGGGACCCCAGAGGGAGCCCCACAACGAG

Nr. 30 (rückwärts, Position in synVpr(pre)-Sequenz: nt 274-221)

CAGTCTCGAGGCCGCCGCCGCCGGTGCTACCCAGTTCTGGAAGTGGATG

(G) zusätzliches Oligonukleotid für die Herstellung des synVpr-Gens:

Nr. 31 (rückwärts, Position in synVpr(pre)-Sequenz: nt 280-221)

CAGTCTCGAGCTATTAGCCGCCGCCGCCGGTGCTACCCAGTTCTGGAAGTGGATG

(H) Oligonukleotide für die Fusion des synp6*-Gens an synVpr(pre):

Nr. 9 (vorwärts, Position in synp6*: nt 1-43)

GCTACCTCGAGTTCTTCAGGGAGGACCTGGCCTTCTGCAGGG

Nr. 10 (rückwärts, Position in synp6*: nt 238-186)

CTCGACTCGAGCTATTAGAAGTTGAAGCTACGGTGCCTGCTGTCGGCGCC

(I) Oligonukleotide für die Fusion des synPR' Gens an synVpr(pre):

Nr. 23 (vorwärts, Position in synPR: nt 1-50)

GACGTCTCGAGCCCCAGATCACCCCTGTGGCAGAGGCCCTGGTGACCATC

Nr. 24 (rückwärts, Position in synPR: nt 331-278)

GTCAGCTCGAGCTATTAGAAGTTCAGGGTGCAGCCGATCTGGGTCAGCAGGTTTC

(J) Oligonukleotide für die Fusion des EGFP-Gens an synVpr(pre):

Nr. 32 (vorwärts, Position in EGFP: nt 1-30)

GACGTCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCACC

Nr. 33 (rückwärts, Position in EGFP: nt 1-723)

GTCACCTCGAGCTATTACTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG

Oligonukleotide für die Sequenzierung von Fremdgenen:

(A) pPCR Script™ Amp:

-21M13 (vorwärts)

ACGACGTTGAAAACGACGGCCAG

(B) pcDNA3.1 (+):

T7 (vorwärts)

GAATTGTAATACGACTCACTATAG

Sp6 (rückwärts)

GATTTAGGTGACTATAGAATAC

(C) pEGFP-C1:

282 (vorwärts)

CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTC

(D) pGL2 und fs-Reporterkonstrukte

GL-f (vorwärts, Position in pGLfswt: nt 177-196)

CGGCCTCTGAGCTATTCCAG

GL-r (rückwärts, Position in pGLfswt: nt 1459-1481)

GGCGTATCTTTCATAGCC

(E) pGEX-KG-p6*

GEX-f (vorwärts, Position in GST: 42 nt vor p6*-Start)

CTATGCCACAAAGCTCTTAACG

(F) pHX10 und plin8/GagΔPst

S1 (vorwärts, Position in pHX10: nt 433-414)

GCACCAGGCCAGATGAGAGAACC

S2 (vorwärts, Position in pHX10: nt 1795-1815)

GCATTGGGACCAGCGGCTACAC

S3 (vorwärts, Position in pHX10: nt 2109-2127)

CTACAAGGGAAGGCCAGGG

S4 (rückwärts, Position in pHX10: nt 2270-2256)

GGATACAGTTCCTTGTCTATCGGC

S5 (rückwärts, Position in pHX10: nt 2657-2637)

CCATTGTTAACTTTTGGGCC

F.2 Sequenzen synthetischer HIV-1 Gene

Tabelle F.1: Matrix für die Herstellung der synthetischen Gene

Aminosäure	Triplett	Relative Häufigkeit	Aminosäure	Triplett	Relative Häufigkeit
G	GGG	1,0	Stopp	TGA	1,0
G	GGA	3,0	Stopp	TAG	0,0
G	GGT	1,0	Stopp	TAA	0,0
G	GGC	39,0	Y	TAT	1,0
E	GAG	42,0	Y	TAC	9,0
E	GAA	2,0	L	TTG	0,0
D	GAT	1,0	L	TTA	0,0
D	GAC	13,0	F	TTT	0,0
V	GTG	25,0	F	TTC	13,0
V	GTA	0,0	S	TCG	0,0
V	GTT	1,0	S	TCA	0,0
V	GTC	0,0	S	TCT	0,0
A	GCG	2,0	S	TCC	2,0
A	GCA	0,0	R	CGG	0,0
A	GCT	0,0	R	CGA	0,0
A	GCC	40,0	R	CGT	0,0
R	AGG	29,0	R	CGC	3,0
R	AGA	0,0	Q	CAG	35,0
S	AGT	0,0	Q	CAA	0,0
S	AGC	31,0	H	CAT	0,0
K	AAA	1,0	H	CAC	10,0
N	AAT	0,0	L	CTG	37,0
N	AAC	23,0	L	CTA	0,0
M/ Start	ATG	17,0	L	CTT	0,0
I	ATA	0,0	L	CTC	2,0
I	ATC	25,0	P	CCG	0,0
T	ACG	0,0	P	CCA	0,0
T	ACA	0,0	P	CCT	0,0
T	ACT	0,0	P	CCC	37,0
T	ACC	34,0	C	TGC	10,0
W	TGG		C	TGT	0,0

Die Sequenzen der synthetischen Gene sind entsprechend dem finalen PCR-Produkt angegeben. Start- und Stoppkodons sind fettgedruckt und Restriktionsschnittstellen unterstrichen. Linker sind grau schraffiert und die Kozak-Sequenz kursiv dargestellt. Punktmutationen sind eingerahmt und terminale Überhänge sind durch graue Kleinbuchstaben gekennzeichnet..

synPR

```

1  gacgtGGATT CGCCATGCC CAGATCACCC TGTGGCAGAG GCCCCTGGTG
51  ACCATCAAGA TCGGCGGCCA GCTGAAGGAG GCCCTGCTGG ACACCGGCGC
101 CGACGACACC GTGCTGGAGG AGATGAGCCT GCCCGGCAGG TGGAAGCCCA

```

151 AGATGATCGG CGGCATCGGC GGCTTCATCA AGGTGAGGCA GTACGACCAG
 201 ATCCTGATCG AGATCTGCGG CCACAAGGCC ATCGGCACCG TGCTGGTGGG
 251 CCCCACCCCG GTGAACATCA TCGGCAGGAA CCTGCTGACC CAGATCGGCT
 301 GCACCCTGAA CTTC**TAATAG** GAATTCgtga c

synPR

1 gacgtGGATT CGCC**ATG**CCCC CAGATCACCC TGTGGCAGAG GCCCCTGGTG
 51 ACCATCAAGA TCGGCGGCCA GCTGAAGGAG GCCCTGCTG**A** ACACCGGGCG
 101 CGACGACACC GTGCTGGAGG AGATGAGCCT GCCCGGCAGG TGGAAAGCCCA
 151 AGATGATCGG CGGCATCGGC GGCTTCATCA AGGTGAGGCA GTACGACCAG
 201 ATCCTGATCG AGATCTGCGG CCACAAGGCC ATCGGCACCG TGCTGGTGGG
 251 CCCCACCCCG GTGAACATCA TCGGCAGGAA CCTGCTGACC CAGATCGGCT
 301 GCACCCTGAA CTTC**TAATAG** GAATTCgtga c

synPR-PR

1 gacgtGGATT CGCC**ATG**CCCC CAGATCACCC TGTGGCAGAG GCCCCTGGTG
 51 ACCATCAAGA TCGGCGGCCA GCTGAAGGAG GCCCTGCTGG ACACCGGGCG
 101 CGACGACACC GTGCTGGAGG AGATGAGCCT GCCCGGCAGG TGGAAAGCCCA
 151 AGATGATCGG CGGCATCGGC GGCTTCATCA AGGTGAGGCA GTACGACCAG
 201 ATCCTGATCG AGATCTGCGG CCACAAGGCC ATCGGCACCG TGCTGGTGGG
 251 CCCCACCCCG GTGAACATCA TCGGCAGGAA CCTGCTGACC CAGATCGGCT
 301 GCACCCTGAA CTTC**CGCCGGA** GCTAGCGGAG GAGCCCCCCA GATCACCCCTG
 351 TGGCAGAGGC CCCTGGTGAC CATCAAGATC GGCGGCCAGC TGAAGGAGGC
 401 CCTGCTGGAC ACCGGCGCCG ACGACACCGT GCTGGAGGAG ATGAGCCTGC
 451 CCGGCAGGTG GAAGCCCAAG ATGATCGGCG GCATCGGCGG CTTTCATCAAG
 501 GTGAGGCAGT ACGACCAGAT CCTGATCGAG ATCTGCGGCC ACAAGGCCAT
 551 CGGCACCGTG CTGGTGGGCC CCACCCCGT GAACATCATC GGCAGGAACC
 601 TGCTGACCCA GATCGGCTGC ACCCTGAACT TCTAATAGGA ATTCgtgac

*synp6**

1 gctacGGATT CGCC**ATG**TTC TTCAGGGAGG ACCTGGCCTT CCTGCAGGGC
 51 AAGGCCAGGG AGTTCAGCAG CGAGCAGACC AGGGCCAACA GCCCCACCAT
 101 CAGCAGCGAG CAGACCAGGG CCAACAGCCC CACCAGGAGG GAGCTGCAGG
 151 TGTGGGGCAG GGACAACAAC AGCCCCAGCG AGGCCGGCGC CGACAGGCAG
 201 GGCACCGTGA GCTTCAACTT CTAATAGGAA TTCctegg

*(EGFP-) synp6**

1 gctacAGATC TGGCGGCGGC GGCGGCTTCT TCAGGGAGGA CCTGGCCTTC
 51 CTGCAGGGCA AGGCCAGGGA GTTCAGCAGC GAGCAGACCA GGGCCAACAG
 101 CCCCACCATC AGCAGCGAGC AGACCAGGGC CAACAGCCCC ACCAGGAGGG
 151 AGCTGCAGGT GTGGGGCAGG GACAACAACA GCCCCAGCGA GGCCGGCGCC
 201 GACAGGCAGG GCACCGTGAG CTTCAACTTC TAATAGGAAT TCctegg

synVpr

1 ctgacAGATC TGCC**ATG**GAG CAGGCGCCCG AGGACCAGGG ACCCCAGAGG
 51 GAGCCCCACA ACGAGTGGAC CCTGGAGCTG CTGGAGGAGC TGAAGAACGA
 101 GGCCGTGAGG CACTTCCCCA GGATCTGGCT GCACGGCCTG GGCCAGCACA
 151 TCTACGAGAC CTACGGCGAC ACCTGGGCCG GCGTGGAGGC CATCATCAGG
 201 ATCCTGCAGC AGCTGCTGTT CATCCACTTC CAGAACTGGG TGAGCACCCG
 251 CGGCGGCGGC GGCTAATAGC TCGAGgactg

synVpr(pre)

1 ctgacAGATC TGCC**ATG**GAG CAGGCGCCCG AGGACCAGGG ACCCCAGAGG
 51 GAGCCCCACA ACGAGTGGAC CCTGGAGCTG CTGGAGGAGC TGAAGAACGA
 101 GGCCGTGAGG CACTTCCCCA GGATCTGGCT GCACGGCCTG GGCCAGCACA
 151 TCTACGAGAC CTACGGCGAC ACCTGGGCCG GCGTGGAGGC CATCATCAGG
 201 ATCCTGCAGC AGCTGCTGTT CATCCACTTC CAGAACTGGG TGAGCACCCG
 251 CGGCGGCGGC GGCTCTGAGg actg

*synVpr-synp6**

1 ctgacAGATC TGCC**ATG**GAG CAGGCGCCCG AGGACCAGGG ACCCCAGAGG
 51 GAGCCCCACA ACGAGTGGAC CCTGGAGCTG CTGGAGGAGC TGAAGAACGA
 101 GGCCGTGAGG CACTTCCCCA GGATCTGGCT GCACGGCCTG GGCCAGCACA
 151 TCTACGAGAC CTACGGCGAC ACCTGGGCCG GCGTGGAGGC CATCATCAGG
 201 ATCCTGCAGC AGCTGCTGTT CATCCACTTC CAGAACTGGG TGAGCACCCG
 251 CGGCGGCGGC GGCTCTGAGT TCTTCAGGGA GGACCTGGCC TTCCTGCAGG
 301 GCAAGGCCAG GGAGTTCAGC AGCGAGCAGA CCAGGGCCAA CAGCCCCACC
 351 ATCAGCAGCG AGCAGACCAG GGCCAACAGC CCCACCAGGA GGGAGCTGCA
 401 GGTGTGGGGC AGGGACAACA ACAGCCCCAG CGAGGCCGGC GCCGACAGGC

451 AGGGCACCGT GAGCTTCAAC TTCTAATAGG AATTCctcgg

synVpr-synPR

1 ctgacAGATC TGCCATGGAG CAGGCGCCCG AGGACCAGGG ACCCCAGAGG
 51 GAGCCCCACA ACGAGTGGAC CCTGGAGCTG CTGGAGGAGC TGAAGAACGA
 101 GGCCGTGAGG CACTTCCCCA GGATCTGGCT GCACGGCCTG GGCCAGCACA
 151 TCTACGAGAC CTACGGCGAC ACCTGGGCCG GCGTGGAGGC CATCATCAGG
 201 ATCCTGCAGC AGCTGCTGTT CATCCACTTC CAGAACTGGG TGAGCACC~~GG~~
 251 ~~CGGCGCGGC~~ GGCTCGAGC CCCAGATCAC CCTGTGGCAG AGGCCCTGG
 301 TGACCATCAA GATCGGCGGC CAGCTGAAGG AGGCCCTGCT ~~G~~AACCCGGC
 351 GCCGACGACA CCGTGTCTGGA GGAGATGAGC CTGCCCGGCA GGTGGAAGCC
 401 CAAGATGATC GGCGGCATCG GCGGCTTCAT CAAGGTGAGG CAGTACGACC
 451 AGATCCTGAT CGAGATCTGC GGCCACAAGG CCATCGGCAC CGTGTCTGGT
 501 GGCCCCACCC CCGTGAACAT CATCGGCAGG AACCTGCTGA CCCAGATCGG
 551 CTGCACCCCTG AACTTCTAAT **AGCTCGAG**ct gac

synVpr-EGFP

1 ctgacAGATC TGCCATGGAG CAGGCGCCCG AGGACCAGGG ACCCCAGAGG
 51 GAGCCCCACA ACGAGTGGAC CCTGGAGCTG CTGGAGGAGC TGAAGAACGA
 101 GGCCGTGAGG CACTTCCCCA GGATCTGGCT GCACGGCCTG GGCCAGCACA
 151 TCTACGAGAC CTACGGCGAC ACCTGGGCCG GCGTGGAGGC CATCATCAGG
 201 ATCCTGCAGC AGCTGCTGTT CATCCACTTC CAGAACTGGG TGAGCACC~~GG~~
 251 ~~CGGCGCGGC~~ GGCTCGAGA **TGGT**GAGCAA GGGCGAGGAG CTGTTCAACC
 301 GGGTGGTGCC CATCCTGGTC GAGCTGGACG GCGACGTAAA CGGCCACAAG
 351 TTCAGCGTGT CCGGCGAGGG CGAGGGCGAT GCCACCTACG GCAAGCTGAC
 401 CCTGAAGTTC ATCTGCACCA CCGGCAAGCT GCCCGTGCCG TGGCCACCC
 451 TCGTGACCAC CCTGACCTAC GGCGTGCAGT GCTTCAGCCG CTACCCCGAC
 501 CACATGAAGC AGCACGACTT CTTCAAGTCC GCCATGCCCG AAGGCTACGT
 551 CCAGGAGCGC ACCATCTTCT TCAAGGACGA CGGCAACTAC AAGACCCGCG
 501 CCGAGGTGAA GTTTCGAGGGC GACACCCTGG TGAACCCGAT CGAGCTGAAG
 651 GGCATCGACT TCAAGGAGGA CGGCAACATC CTGGGGCACA AGCTGGAGTA
 701 CAACTACAAC AGCCACAACG TCTATATCAT GGCCGACAAG CAGAAGAACG
 751 GCATCAAGGT GAACTTCAAG ATCCGCCACA ACATCGAGGA CGGCAGCGTG
 801 CAGCTCGCCG ACCACTACCA GCAGAACCACC CCCATCGGCG ACGGCCCCGT
 851 GCTGCTGCCG GACAACCACT ACCTGAGCAC CCAGTCCGCC CTGAGCAAAG
 901 ACCCCAACGA GAAGCGCGAT CACATGGTCC TGCTGGAGTT CGTGACCCGC
 951 GCCGGGATCA CTCTCGGCAT GGACGAGCTG TACAAG**TAAT** **AGCTCGAG**gt
 1001 gac

F.3 Sequenzen eukaryontischer Expressionsplasmide

pHX10

1 TGGAAGGGCT AATTCACTCC CAACGAAGAC AAGATATCCT TGATCTGTGG
 51 ATCTACCACA CACAAGGCTA CTTCCCTGAT TAGCAGAACT ACACACCAGG
 101 GCCAGGGATC AGATATCCAC TGACCTTGG ATGGTGCTAC AAGCTAGTAC
 151 CAGTTGAGCC AGAGAAGTTA GAAGAAGCCA ACAAGGAGA GAACACCAGC
 201 TTGTTACACC CTGTGAGCCT GCATGGAATG GATGACCCGG AGAGAGAAGT
 251 GTTAGAGTGG AGGTTTGACA GCCGCCTAGC ATTTTCATCAC ATGGCCCGAG
 301 AGCTGCATCC GGAGTACTTC AAGAACTGCT GACATCGAGC TTGCTACAAG
 351 GGACTTTCCG CTGGGGACTT TCCAGGGAGG CGTGGCCCTGG GCGGGACTGG
 401 GGAGTGGCGA GCCCTCAGAT CCTGCATATA AGCAGCTGCT TTTTGCCGTG
 451 ACTGGGTCTC TCTGGTTAGA CCAGATCTGA GCCTGGGAGC TCTCTGGCTA
 501 ACTAGGGAAC CCACTGCTTA AGCCTCAATA AAGCTTGCCT TGAGTGCTTC
 551 AAGTAGTGTG TGCCCGTCTG TTGTGTGACT CTGGTAACTA GAGATCCCTC
 601 AGACCCTTTT AGTCAGTGTG GAAAATCTCT AGCAGTGGCG CCCGAACAGG
 651 GACCTGAAAG CGAAAGGGAA ACCAGAGGAG CTCTCTCGAC GCAGGACTCG
 701 GCTTGCTGAA GCGCGCACGG CAAGAGGCGA GGGGCGGCGA CTGGTGAGTA
 751 CGCCAAAAAT TTTGACTAGC GGAGGCTAGA AGGAGAGAGA TGGGTGCGAG
 801 AGCGTCAGTA TTAAGCGGGG GAGAATTAGA TCGATGGGAA AAAATTCGGT
 851 TAAGGCCAGG GGGAAAGAAA AAAATATAAT TAAAACATAT AGTATGGGCA
 901 AGCAGGGAGC TAGAACGATT CGCAGTTAAT CCTGGCCCTGT TAGAAACATC
 951 AGAAGGCTGT AGACAAATAC TGGGACAGCT ACAACCATCC CTTCAGACAG
 1001 GATCAGAAGA ACTTAGATCA TTATATAATA CAGTAGCAAC CCTCTATTGT
 1051 GTGCCATCAAA GGATAGAGAT AAAAGACACC AAGGAAGCTT TAGACAAGAT
 1101 AGAGGAAGAG CAAAACAAAA GTAAGAAAAA AGCACAGCAA GCAGCAGCTG
 1151 ACACAGGACA CAGCAGTCAG GTCAGCCAAA ATTACCCTAT AGTGCAGAAC
 1201 ATCCAGGGGC AAATGGTACA TCAGGCCATA TCACCTAGAA CTTTAAATGC
 1251 ATGGGTAAAA GTAGTAGAAG AGAAGGCTTT CAGCCAGAA GTAATACCA
 1301 TGTTTTTCAGC ATTATCAGAA GGAGCCACCC CACAAGATTT AAACACCATG
 1351 CTAAACACAG TGGGGGGACA TCAAGCAGCC ATGCAAAATGT TAAAAGAGAC
 1401 CATCAATGAG GAAGCTGCAG AATGGGATAG AGTACATCCA GTGCATGCAG
 1451 GGCCTATTGC ACCAGGCCAG ATGAGAGAAC CAAGGGGAAG TGACATAGCA

1501 GGAAC TACTA GTACCCTTCA GGAACAAATA GGATGGATGA CAAATAATCC
1551 ACCTATCCCA GTAGGAGAAA TTTATAAAAAG ATGGATAATC CTGGGATTAA
1601 ATAAAAATAGT AAGAAATGTAT AGCCCTACCA GCATTCTGGA CATAAGACAA
1651 GGACCAAAAG AACCTTTTAG AGACTATGTA GACCGGTTCT ATAAAACTCT
1701 AAGAGCCGAG CAAGCTTCAC AGGAGGTAATA AAATTGGATG ACAGAAAACCT
1751 TGTTGGTCCA AAATGCGAAC CCAGATTGTA AGACTATTTT AAAAGCATTG
1801 GGACCAGCGG CTACACTAGA AGAAATGATG ACAGCATGTC AGGGAGTAGG
1851 AGGACCCGGC CATAAGGCAA GAGTTTGGC TGAAGCAATG AGCCAAGTAA
1901 CAAATACAGC TACCATAATG ATGCAGAGAG GCAATTTTAG GAACCAAAGA
1951 AAGATGGTTA AGTGTTTCAA TTGTGGCAA GAAAGGCACA CAGCCAGAAA
2001 TTGCCAGGGC CTTAGGAAAA AGGGCTGTTG GAAATGTGGA AAGGAAGGAC
2051 ACCAAATGAA AGATTGTACT GAGAGACAGG CTAATTTTTT AGGGAAGATC
2101 TGGCCTTCCT ACAAGGGAAG GCCAGGGAAT TTTCTTCAGA GCAGACCAGA
2151 GCCAACAGCC CCACCATTTC TTCAGAGCAG ACCAGAGCCA ACAGCCCCAC
2201 CAGAAAGAGG CTTTCAGGTC GGGTAGAGA CAACAACCTC CCCTCAGAAG
2251 CAGGAGCCGA TAGACAAGGA ACTGTATCCT TTAACCTCCC TCAGATCACT
2301 CTTTGGCAAC GACCCTCGT CACAATAAAG ATAGGGGGGC AACTAAAAGGA
2351 AGCTCTATTA GATACAGGAG CAGATGATAC AGTATTAGAA GAAATGAGTT
2401 TGCCAGGAAG ATGGAACCA AAAATGATAG GGGGAATTGG AGGTTTTATC
2451 AAAGTAAGAC AGTATGATCA GATACTCATA GAAATCTGTG GACATAAAGC
2501 TATAGGTACA GTATTAGTAG GACCTACACC TGTCAACATA ATTTGGAAGAA
2551 ATCTGTTGAC TCAGATTGGT TGCACCTTAA ATTTTCCCAT TAGCCCTATT
2601 GAGACTGTAC CAGTAAAATT AAAGCCAGGA ATGGATGGCC CAAAAGTTAA
2651 ACAATGGCCA TTGACAGAAG AAAAAATAAA AGCATTAGTA GAAATTTGTA
2701 CAGAAATGGA AAAGGAAGGG AAAATTTCAA AAATTTGGCC TGAGAATCCA
2751 TACAATACTC CAGTATTTGC CATAAAGAAA AAAGACAGTA CTAATGGGAG
2801 AAAATTAGTA GATTTTCAGAG AACTTAATAA GAGAACCTAA GACTTCTGGG
2851 AAGTTCAATT AGGAATACCA CATCCCGCAG GGTAAAAAAA GAAAAATCA
2901 GTAACAGTAC TGGATGTGGG TGATGCATAT TTTTCAGTTC CCTTAGATGA
2951 AGACTTCAGG AAGTATACTG CATTTACCAT ACCTAGTATA AACAATGAGA
3001 CACCAGGGAT TAGATATCAG TACAATGTGC TTCCACAGGG ATGGAAGGGA
3051 TCACCAGCAA TATTTCCAAAG TAGCATGACA AAAATCTTAG AGCCTTTTAA
3101 AAAACAAAAT CCAGACATAG TTATCTATCA ATACATGGAT GATTTGTATG
3151 TAGGATCTGA CTTAGAAAATA GGGCAGCATA GAACAAAAAT AGAGGAGCTG
3201 AGACAACATC TGTTGAGGTG GGGACTTACC ACACCAGACA AAAACATCA
3251 GAAAGAACCT CCATTCCTTT GGATGGGTTA TGAACCTCAT CCTGATAAAT
3301 GGACAGTACA GCCTATAGTG CTGCCAGAAA AAGACAGCTG GACTGTCAAT
3351 GACATACAGA AGTTAGTGGG GAAATTGAAT TGGCAAGTC AGATTTACCC
3401 AGGGATTAATA GTAAGGCAAT TATGTAACT CCTTAGAGGA ACCAAGCAC
3451 TAACAGAAGT AATACCACCTA ACAGAAGAAG CAGAGCTAGA ACTGGCAGAA
3501 AACAGAGAGA TTCTAAAAGA ACCAGTACAT GGAGTGTATT ATGACCCATC
3551 AAAAGACTTA ATAGCAGAAA TACAGAAGCA GGGCAAGGC CAATGGACAT
3601 ATCAAATTTA TCAAGAGCCA TTTAAAAATC TGAAAAACAG AAAATATGCA
3651 AGAATGAGGG GTGCCACAC TAATGATGTA AAACAATTA CAGAGGCAGT
3701 GCAAAAAATA ACCACAGAAA GCATAGTAAT ATGGGGAAG ACTCCTAAT
3751 TTAAACTACC CATACAAAAG GAAACATGGG AAACATGGTG GACAGAGTAT
3801 TGGCAAGCCA CCTGGATTCC TGAGTGGGAG TTTGTTAATA CCCCTCCTTT
3851 AGTGAAATTA TGGTACCAGT TAGAGAAAAGA ACCCATAGTA GGAGCAGAAA
3901 CCTTCTATGT AGATGGGGCA GCTAACAGGG AGACTAAAT AGGAAAAGCA
3951 GGATATGTTA CTAACAAAGG AAGACAAAAG GTTGTCCCC TAACTAACAC
4001 AACAAATCAG AAAACTGAGT TACAAGCAAT TTATCTAGCT TTGCAGGATT
4051 CAGGATTAGA AGTAAACATA GTAACAGACT CACAATATGC ATTAGGAATC
4101 ATTCAGCAC AACAGATAA AAGTGAATCA GAGTTAGTCA ATCAAATAAT
4151 AGAGCAGTTA ATAAAAAGG AAAAGGTCTA TCTGGCATGG GTACCAGCAC
4201 ACAAGGAAT TGGAGGAAAT GAACAAGTAG ATAAATAGT CAGTGCTGGA
4251 ATCAGGAAAA TACTATTTTT AGATGGAATA GATAAGGCC AACATGAACA
4301 TGAGAAATAT CACAGTAAT GGAGAGCAAT GGCTAGTGAT TTTAACCTGC
4351 CACCTGTAGT AGCAAAAGAA ATAGTAGCCA GCTGTGATAA ATGTCAGCTA
4401 AAAGGAGAAG CCATGCATGG ACAAGTAGAC TGTAGTCCAG GAATATGGCA
4451 ACTAGATTGT ACACATTTAG AAGGAAAAGT TATCCTGGTA GCAGTTCTAG
4501 TAGCCAGTGG ATATATAGAA GCAGAAGTTA TTCCAGCAGA AACAGGGCAG
4551 GAAACAGCAT ATTTCTTTTT AAAATTAGCA GGAAGATGGC CAGTAAAAAC
4601 AATACATACA GACAAATGGCA GCAATTTTAC CAGTGCTACG GTTAAGGCCG
4651 CCTGTTGGTG GCGGGGAATC AAGCAGGAAT TTGGAATTCC CTACAATCCC
4701 CAAAGTCAAG GAGTAGTAGA ATCTATGAAT AAAGAATTA AGAAAATTAT
4751 AGGACAGGTA AGAGATCAGG CTGAACATCT TAAGACAGCA GTACAAATGG
4801 CAGTATTCAT CCACAATTTT AAAAGAAAAG GGGGATTTGG GGGGTACAGT
4851 GCAGGGGAAA AATAGTAGA CATAATAGCA ACAGACATAC AAATAAAGA
4901 ATTACAAAA CAAATTACAA AAATTCAAAA TTTTGGGTT TATTACAGGG
4951 ACAGCAGAAA TCCACTTTGG AAAGGACCAG CAAAGCTCCT CTGGAAAGGT
5001 GAAGGGGCAG TAGTAATACA AGATAATAGT GACATAAAG TAGTGCCAAG
5051 AAGAAAAGCA AAGATCATT GGGATTATGG AAAACAGATG GCAGGTGATG
5101 ATTTGTGGC AAGTAGACAG GATGAGGATT AGAACATGGA AAAGTTTAGT
5151 AAAACACCAT ATGTATGTTT CAGGGAAAGC TAGGGGATGG TTTTATAGAC
5201 ATCACTATGA AAGCCCTCAT CCAAGAATAA GTTCAGAAGT ACACATCCCA
5251 CTAGGGATG CTAGATTGGT AATAACAACA TATTTGGGTG TGCATACAGG
5301 AGAAAGAGAC TGGCATTGG GTCAGGGAGT CTCCATAGAA TGGAGGAAAA
5351 AGAGATATAG CACACAAGTA GACCTGAAC TAGCAGACCA ACTAATTCAT

5401 CTGTATTACT TTGACTGTTT TTCAGACTCT GCTATAAGAA AGGCCTTATT
5451 AGGCACATA GTTAGCCCTA GGTGTGAATA TCAAGCAGGA CATAACAAGG
5501 TAGGATCTCT ACAACTCTTG GCACTAGCAG CATTAAATAAC ACCAAAAAAG
5551 ATAAAGCCAC CTTTGCCTAG TGTTACGAAA CTGACAGAGG ATAGATGGAA
5601 CAAGCCCCAG AAGACCAAGG GCCACAGAGG GAGCCACACA ATGAATGGAC
5651 ACTAGAGCTT TTAGAGGAGC TTAAGAATGA AGCTGTTAGA CATTTTCCTA
5701 GGATTTGGCT CCATGGCTTA GGGCAACATA TCTATGAAAC TTATGGGGAT
5751 ACTTGGGCAG GAGTGAAGC CATAATAAGA ATTCTGCAAC AACTGCTGTT
5801 TATCCATTTT CAGAATTGGG TGTGACATA GCAGAATAGG CGTACTCGA
5851 CAGAGGAGAG CAAGAAATGG AGCCAGTAGA TCCTAGACTA GAGCCCTGGA
5901 AGCATCCAGG AAGTCAGCCT AAAACTGCTT GTACCAATG CTATTGTAAA
5951 AAGTGTGCTT TTCATTGCCA AGTTTGTTC ATAACAAAAG CCTTAGGCAT
6001 CTCCTATGGC AGGAAGAAGC GGAGACAGCG ACGAAGACCT CCTCAAGGCA
6051 GTCAGACTCA TCAAGTTTCT CTATCAAAGC AGTAAGTAGT ACATGTAATG
6101 CAACCTATAC AAATAGCAAT AGTAGCATTG GTAGTAGCAA TAATAATAGC
6151 AATAGTTGTG TGGTCCATAG TAATCATAGA ATATAGGAAA ATATTAAGAC
6201 AAAGAAAAAT AGACAGGTTA ATTGATAGAC TAATAGAAAG AGCAGAAGAC
6251 AGTGGCAATG AGAGTGAAGG AGAAATATCA GCACTTGTGG AGATGGGGGT
6301 GGAGATGGGG CACCATGCTC CTTGGGATGT TGATGATCTG TAGTGCTACA
6351 GAAAAATTGT GGGTCACAGT CTATTATGGG GTACCTGTGT GGAAGGAAGC
6401 AACCACCCTT CTATTTTGTG CATCAGATGC TAAAGCATAT GATACAGAGG
6451 TACATAATGT TTGGGCCACA CATGCCTGTG TACCCACAGA CCCCAACCCA
6501 CAAGAAGTAG TAATGGTAAA TGTGACAGAA AATTTTAAACA TGTGAAAAAA
6551 TGACATGGTA GAACAGATGC ATGAGGATAT AATCAGTTTA TGGGATCAAA
6601 GCCTAAAGCC ATGTGTAAAA TTAACCCAC TCTGTGTTAG TTTAAAGTGC
6651 ACTGATTTGA AGAATGATAC TAATACCAAT AGTAGTAGCG GGAGAATGAT
6701 AATGGAGAAA GGAGAGATAA AAACTGCTC TTTCAATATC AGCACAAGCA
6751 TAAGAGGTAA GGTGCAGAAA GAATATGCAT TTTTTTATAA ACTTGATATA
6801 ATACCAATAG ATAATGATAC TACCAGCTAT ACGTTGACAA GTTGTAAACAC
6851 CTCAGTCATT ACACAGGCCT GTCCAAAGGT ATCCTTTGAG CCAATTCCCA
6901 TACATTATTG TGCCCCGGCT GGTTTGCGA TTCTAAAAAG TAATAATAAG
6951 ACGTTCAATG GAACAGGACC ATGTACAAAT GTCAGCACAG TACAATGTAC
7001 ACATGGAATT AGGCCAGTAG TATCAACTCA ACTGCTGTTA AATGGCAGTC
7051 TGGCAGAAAG AGAGGTAGTA ATTAGATCTG CCAATTTTAC AGACAATGCT
7101 AAAACCATAA TAGTACAGCT GAACCAATCT GTAGAAATTA ATTGTACAAG
7151 ACCCAACAAC AATACAAGAA AAAGTATCCG TATCCAGAGA GGACCAGGGA
7201 GAGCATTGTG TACAATAGGA AAAATAGGAA ATATGAGACA AGCACATTGT
7251 AACATTAGTA GAGCAAAATG GAATAACACT TTAACAACAGA TAGATAGCAA
7301 ATTAAGAGAA CAATTGGGAA ATAATAAAC AATAATCTTT AAGCAGCTCT
7351 CAGGAGGGGA CCCAGAAATG GTAACGCACA GTTTTAAATG TGAGGGGGAA
7401 TTTTCTACT GTAATCAAC ACACTGTTT AATAGTACTT GGTTAATAG
7451 TACTTGGAGT ACTAAAGGGT CAAATAACAC TGAAGGAAGT GACACAATCA
7501 CCTCCCATG CAGAATAAAA CAAATATAA ACATGTGGCA GGAAGTAGGA
7551 AAAGCAATGT ATGCCCTCC CATCAGTGA CAAATTAGAT GTTCATCAAA
7601 TATTACAGGG CTGCTATTAA CAAGAGATGG TGGTAATAGC AACATGAGT
7651 CCGAGATCTT CAGACCTGGA GGAGGAGATA TGAGGGCAA TTTGGAGAAGT
7701 GAATTATATA AATATAAAGT AGTAAAAAT GAACCAATG GAGTAGCACC
7751 CACCAGGCA AAGAGAAAG TGGTGCAGAG AGAAAAAGA GCAGTGGGAA
7801 TAGGAGCTTT GTTCTTGGG TTCTTGGGAG CAGCAGGAAG CACTATGGGC
7851 GCAGCGTCAA TGACGCTGAC GGTACAGGCC AGACAATTAT TGCTGGTAT
7901 AGTGCAGCAG CAGAACAATT TGCTGAGGGC TATTGAGCGC CAACAGCATC
7951 TGTTCGCACT CACAGTCTGG GGCATCAAGC AGCTCCAGC AAGAATCCTG
8001 GCTGTGGAAA GATACCTAAA GGATCAACAG CTCCTGGGGA TTTGGGGTTG
8051 CTCTGGAAAA CTCATTGCA CCACTGCTGT GCCTTGGAAAT GCTAGTTGGA
8101 GTAATAAATC TCTGGAACAG ATTTGGAATA ACATGACCTG GATGGAGTGG
8151 GACAGAGAAA TTAACAATTA CACAAGCTTA ATCACTCCT TAATTGAAGA
8201 ATCGCAAAAC CAGCAAGAAA AGAATGAACA AGAATTATTG GAATTAGATA
8251 AATGGGCAAG TTTGTGGAAT TGGTTTAAACA TAACAAATG GCTGTGGTAT
8301 ATAAAAATTAT TCATAATGAT AGTAGGAGGC TTGGTAGGTT TAAGAATAGT
8351 TTTTGTGTA CTTTCTGTAG TGAATAGAGT TAGGCAGGGA TATTCACCAT
8401 TATCGTTTCA GACCCACCTC CCAATCCCGA GGGGACCCGA CAGGCCCGAA
8451 GGAATAGAAG AAGAAGGTGG AGAGAGAGAC AGAGACAGAT CCATTGATG
8501 AGTGAACGGA TCCTTAGCAC TTATCTGGGA CGATCTGCGG AGCCTGTGCC
8551 TCTTCAGCTA CCACCGCTTG AGAGACTTAC TCTTGTATTG AACGAGGATT
8601 GTGGAACCTC TGGGACGCAG GGGGTGGGAA GCCCTCAAAT ATTGGTGGAA
8651 TCTCCTACAG TATTGGAGTC AGGAGCTAAA GAATAGTGCT GTTAGCTTGC
8701 TCAATGCCAC AGCTATAGCA GTAGCTGAGG GGACAGATAG GGTATAGAA
8751 TGAGTACAAG GAGCTTATAG AGCTATTCCG CACATACCTA GAAGAATAAG
8801 ACAGGGCTTG GAAAGGATTT TGCTATAAGA TGGGTGGCAA GTGGTCAAAA
8851 AGTAGTGTGG TTGGATGGCC TGCTGTAAGG GAAAGAATGA GACGAGCTGA
8901 GCCAGCAGCA GATGGGGTGG GAGCAGCATC TCGAGACCTG GAAAAACATG
8951 GAGCAATCAC AAGTAGCAAT ACAGCAGCTA CCAATGCTCG TTGTGCCTGG
9001 CTAGAAGCAC AAGAGGAGGA GGAGGTGGGT TTTCCAGTCA CACCTCAGGT
9051 ACCTTTAAGA CCAATGACTT ACAAGGCAGC TGTAGATCTT AGCCACTTTT
9101 TAAAAGAAA GGGGGGACTG GAAGGGCTAA TTTACTCCA AAGAAGCAA
9151 GATATCCTTG ATCTGTGGAT CTACCACACA CAAGGCTACT TCCCTGATTA
9201 GCAGAACTAC ACACCAGGGC CAGGGGTCAG ATATCCACTG ACCTTTGGAT
9251 GGTGCTACAA GCTAGTACCA GTTGAGCCAG ATAAGATAGA AGAGGCCAAT

9301 AAAGGAGAGA ACACCAGCTT GTTACACCCT GTGAGCCTGC ATGGGATGGA
 9351 TGACCCGGAG AGAGAAGTGT TAGAGTGGAG GTTTGACAGC CGCCTAGCAT
 9401 TTCATCACGT GGCCCGAGAG CTGCATCCGG AGTACTTCAA GAACTGCTGA
 9451 CATCGAGCTT GCTACAAGGG ACTTTCCGCT GGGGACTTTC CAGGGAGGCG
 9501 TGGCCTGGGC GGGACTGGGG AGTGGCGAGC CCTCAGATCC TGCATATAAG
 9551 CAGCTGCTTT TTGCCTGTAC TGGGTCTCTC TGGTTAGACC AGATCTGAGC
 9601 CTGGGAGCTC TCTGGCTAAC TAGGGAACCC ACTGCTTAA CCAATAAAA
 9651 GCTTGCTTGT AGTGTCTCAA GTAGTGTGTG CCCGTCTGTT GTGTGACTCT
 9701 GGTAAC TAGA GATCCCTCAG ACCCTTTT TAG TCAGTGTGGA AAATCTCTAG
 9751 CA

pGL-fswt

1 CCCGGGAGGT ACCGAGCTCT TACGCGTGCT AGCTCGAGAT CTGCATCTCA
 51 ATTAGTCAGC AACCATAGTC CCGCCCTAA CTCCGCCAT CCCGCCCTA
 101 ACTCCGCCCA GTTCCGCCA TTCTCCGCC CATGGCTGAC TAATTTTTTT
 151 TATTTATGCA GAGCCGAGG CCGCTCGGC CTCTGAGCTA TTCCAGAAGT
 201 AGTGAGGAGG CTTTTTTGGA GGCCTAGGCT TTTGCAAAA GCTTACATG
 251 GGTGACAGG CTAATTTTT AGGAAGATC TGGCCTTCT ACAAGGGAAG
 301 GCCAGGGAAG GATCCTTCAA CTTCCCTGAG CTGGAAGACG CCAAAAACAT
 351 AAAGAAAGGC CCGGCGCCAT TCTATCTCT AGAGGATGGA ACCGCTGGAG
 401 AGCAACTGCA TAAGGCTATG AAGAGATACG CCCTGGTTC TGAACAATT
 451 GCTTTTACAG ATGCACATAT CGAGGTGAAC ATCACGTACG CGGAATACTT
 501 CGAAATGTCC GTTCGGTTGG CAGAAGCTAT GAAACGATAT GGGCTGAATA
 551 CAAATCACAG AATCGTCGTA TGCAGTGAAC ACTCTCTCA ATTCTTTATG
 601 CCGGTGTTGG CCGCGTTAT TATCGAGTT GCAGTTGCGC CCGCAAGCA
 651 CATTTATAAT GAACGTGAAT TGCTCAACAG TATGAACATT TCGCAGCCTA
 701 CCGTAGTGTT TGTTTCCAAA AAGGGTTGC AAAAAATTT GAACGTGCAA
 751 AAAAAATTAC CAATAATCCA GAAAAATTT ATCATGGATT CTAACCGGA
 801 TTACCAGGGA TTTTCTGCGA TGTACAGTT CGTACATCT CATCTACTC
 851 CCGGTTTTAA TGAATACGAT TTTGTACCAG AGTCTTTGA TCGTGACAAA
 901 ACAATGACAC TGATAATGAA TTCCTCTGGA TCTACTGGGT TACCTAAGGG
 951 TGTGGCCCTT CCGCATAGAA CTGCCTGCGT CAGATTCTCG CATGCCAGAG
 1001 ATCCTATTTT TGGCAATCAA ATCATTCCGG ATACTGCGAT TTTAAGTGT
 1051 GTTCCATTCC ATCACGGTTT TGGAAATGTT ACTACACTCG GATATTTGAT
 1101 ATGTGGATTT CGAGTCGTCT TAATGTATAG ATTTGAAGAA GAGCTGTTTT
 1151 TACGATCCCT TCAGGATTAC AAAATTCAAA GTGCGTTGCT AGTACCAAC
 1201 CTATTTTTCAT TCTTCGCCAA AAGCACTCTG ATTGACAAA ACGATTTATC
 1251 TAATTTACAC GAAATTGCTT CTGGGGGCGC ACCTCTTTTCG AAAGAAGTCG
 1301 GGGAAGCGGT TGCAAAACGC TTCCATCTTC CAGGGATACG ACAAGGATAT
 1351 GGGCTCACTG AGACTACATC AGCTATTTCTG ATTACACCCG AGGGGGATGA
 1401 TAAACCGGGC CCGGTGCGTA AAGTTGTTCC ATTTTTTGAA GCGAAGGTTG
 1451 TGGATCTGGA TACCGGAAA ACGCTGGGCG TTAATCAGAG AGGCGAATTA
 1501 TGTGTCAGAG GACCTATGAT TATGTCCGGT TATGTAAACA ATCCGGAAGC
 1551 GACCAACGCC TTGATTGACA AGGATGGATG GCTACATTCT GGAGACATAG
 1601 CTTACTGGGA CGAAGACGAA CACTTCTTCA TAGTTGACCG CTGAAAGTCT
 1651 TTAATTAAT ACAAAGGATA TCAGGTGGCC CCCGCTGAAT TGGAATCGAT
 1701 ATTTGTTACAA CACCCCAACA TCTTCGACGC GGGCGTGGCA GGTCTTCCCG
 1751 ACGATGACGC CGGTGAACCT CCCCGCCCG TTGTTGTTTT GGAGCACGGA
 1801 AAGACGATGA CCGAAAAAGA GATCGTGGAT TACGTGCGCA GTCAAGTAAAC
 1851 AACCGCGAAA AAGTTGCGCG GAGGAGTTGT GTTTGTGGAC GAAGTACCGA
 1901 AAGTCTTAC CGGAAAACCT GACGCAAGAA AAATCAGAGA GATCCTCATA
 1951 AAGGCCAAGA AGGGCGGAAA GTCCAAATTTG TAAAATGTAA CTGTATTGAG
 2001 CAGTACGAAA ATTTCTAGCT ATTTGTAATAC TGCAGATGAGT GCGAGGCGG
 2051 GCGGTAATTT TTTTAAGGCA GTTATTGGTG CCCTTAAACG CCTGGTGTCTA
 2101 CGCCTGAATA AGTGATAATA AGCGGATGAA TGGCAGAAAT TCGCCGATC
 2151 TTTGTGAAGG AACCTTACTT CTGTGGTGTG ACATAATTGG ACAAACCTACC
 2201 TACAGAGATT TAAAGCTCTA AGGTAAATAT AAAATTTTTA AGTGTATAAT
 2251 GTGTTAAACT ACTGATTCTA ATTTGTTGTG TATTTTAGAT TCCAACCTAT
 2301 GGAACGTGAT AATGGGAGCA GTGGTGGAA GCCTTTAATG AGGAAAACCT
 2351 GTTTTGTCTA GAAGAAATGC CATCTAGTGA TGATGAGGCT ACTGCTGACT
 2401 CTCAACATTC TACTCTCCA AAAAAGAAGA GAAAGGTAGA AGACCCCAAG
 2451 GACTTTCCTT CAGAATTGCT AAGTTTTTTG AGTCATGCTG TGTTTAGTAA
 2501 TAGAACTCTT GCTTGTCTTG CTATTTACAC CACAAAGGAA AAAGCTGCAC
 2551 TGCTATACAA GAAAATATG GAAAAATATT CTGTAACCTT TATAAGTAGG
 2601 CATAACAGTT ATAATCATAA CATACTGTTT TTTCTTACT CACACAGGCA
 2651 TAGAGTGTCT GCTATTAATA ACTATGCTCA AAAATTGTGT ACCTTTAGCT
 2701 TTTTAATTTG TAAAGGGGTT AATAAGGAAT ATTTGATGTA TAGTGCCTTG
 2751 ACTAGAGATC ATAATCAGCC ATACCACATT TGTAAGGTT TACTTGTCTT
 2801 TAAAAAACCT CCCACACCTC CCCCTGAACC TGAACATAA AATGAATGCA
 2851 ATTTGTTGTTG TTAACCTGTT TATTGCAGCT TATAATGGTT ACAAATAAAG
 2901 CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTCA CTGCATTCTA
 2951 GTTGTGGTTT GTCCAAACTC ATCAATGTAT CTATCATGT CTGGATCTGA
 3001 ACCATGGAGC GGAGAATGGG CGGAACCTGG CGGAGTTAGG GCGGGATGG
 3051 GCGGAGTTAG GGGCGGACT ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT
 3101 TGCATACTTC TGCTGCTGG GGAGCCTGG GACTTTCCAC ACCTGGTTGC
 3151 TGACTAATG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG

```

3201 GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCAG ATCCTCTAGG
3251 GATCCGTCGA CCGATGCCCT TGAGAGCCTT CAACCCAGTC AGCTCCCTCC
3301 GGTGGGCGCG GGGCATGACT ATCGTCGCCG CACTTATGAC TGCTCTCTTT
3351 ATCATGCAAC TCGTAGGACA GGTGCCGGCA GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC
3401 TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTCCGC TCGGCGCAGC GGTATCAGCT
3451 CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCGAG
3501 AAAGAACATG TGAGCAAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG
3551 CCGCGTTGCT GCGGTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCCTGA CGAGCATCAC
3601 AAAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG
3651 ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGTCCCTT CGTGGCTCTT CCTGTTCCGA
3701 CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG
3751 GCGCTTTTCT AATGCTCACG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT
3801 TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCCCCTTCCG CCGCAGCGCT
3851 GCGCCTTATC CGGTAACTAT CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC
3901 TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA
3951 TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA
4001 CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC
4051 GGA AAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG
4101 CCGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGT
4151 CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGGAA
4201 GAAAACCTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCAAG AGATTATCAA AAAGGATCCT
4251 CACCTAGATC CTTTTAAATT AAAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA
4301 TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA
4351 CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCTGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC
4401 CGTCGTGTAG ATA ACTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG
4451 CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA
4501 ATAAACCCAG CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC AGAAGTGCTT CTCACACTTT
4551 ATCCGCCCTC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA
4601 GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTGC TACAGGCATC
4651 GTGGTGTGAC GCTCGTCTGT TGGTATGGCT TCATTACAGT CCGGTTCCCA
4701 ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA
4751 GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA
4801 TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC
4851 CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG
4901 AATAGTGTAT CAGCGGACCG AGTTGCTCTT GCCCGGGCTC AATACGGGAT
4951 AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAAACG
5001 TTCTTCGGGG CGAAAACCTC CAAGGATCTT ACCGCTGTG AGATCCAGTT
5051 CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTACAGCATC TTTTACTTTC
5101 ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA
5151 GGAATAAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC
5201 AATATTATTG AAGCATTATC CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA
5251 TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC
5301 CGAAAAGTG CCACCTGACG CGCCCTGTAG CGGCGCATA AGCGCGCGCG
5351 GTGTGGTGGT TACGCGCAGC GTGACCGCTA CACTTGCCAG GCCCCTAGCG
5401 CCCGCTCCTT TCGCTTTCTT CCCTTCTTTT CTGCGCACGT TCGCCGGCTT
5451 TCCCGTCAA GCTCTAAATC GGGGGCTCCC TTTAGGGTTC CGATTTAGTG
5501 CTTTACGGCA CCTCGACCCC AAAAACTTG ATTAGGGTGA TGGTTCAGCT
5551 AGTGGGCCAT CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCCTTGA CGTTGGAGTC
5601 CACGTTCTTT AATAGTGGAC TCTTGTCCA AACTGGAACA AACTCAACC
5651 CTATCTCGGT CTATTTCTTT GATTTATAAG GGATTTTGCC GATTTGCGCC
5701 TATTGGTTAA AAAATGAGCT GATTTAACA AAATTTAAC CGAATTTTAA
5751 CAAAATATTA ACGTTTACAA TTTCCCATTC GCCATTACAG CTGCGCAACT
5801 GTTGGGAAGG GCGATCGGTG CCGGCCTCTT CGCTATTACG CCAGCCCAAG
5851 CTACCATGAT AAGTAAGTAA TATTAAGGTA CGTGGAGGTT TTA CTGCTT
5901 TAAAAAACCT CCCACACCTC CCCCTGAACC TGAACATAA AATGAATGCA
5951 ATTTGTGTTG TTA ACTTGT TATGTCAGCT TATAATGGTT ACAAATAAAG
6001 CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTCA CTGCATTTCA
6051 GTTGTGGTTT GTCCAAACTC ATCAATGTAT CTTATGGTAC TGTA ACTGAG
6101 CTAACATAA

```

Die eingefügte Sequenz mit dem frameshift-Signal (fettgedruckt) von BH10 ist grau schattiert. Der Übergang zur Luciferasesequenz ist durch einen Pfeil markiert. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.