

Dissertation
an der
Biologischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Dr.rer.nat.

**Untersuchungen zum
Transport und Abbau des HIV-1 Envelope Glykoproteins**

vorgelegt
von
Andreas Bültmann
am
16. August 2000

Erstgutachter: Prof. Lutz Gürtler

Zweitgutachter: Prof. Ruth Brack-Werner

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2001

1. EINLEITUNG	6
1.1. Das Humane Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1)	6
1.1.1. Klassifizierung und Phylogenie	6
1.1.2. Klinik	8
1.1.3. Pathogenese	9
1.1.4. Molekularbiologie.....	11
1.1.5. Das Envelope-Glykoprotein.....	14
1.2. Das Endoplasmatische Retikulum.....	15
1.3. Das Golgi-Kompartiment.....	17
1.4. Das Ubiquitin/Proteasomensystem.....	18
1.5. Problemstellung	19
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1. Zellen, Viren und Bakterien	20
2.1.1. Zellen.....	20
2.1.2. Viren.....	20
2.1.3. Bakterien.....	21
2.2. Oligonukleotide.....	21
2.3. Seren und Antikörper	22
2.3.1. Seren.....	22
2.3.2. Monoklonale Antikörper.....	23
2.4. Puffer und Chemikalien	23
2.5. Geräte	23
2.6. Proteinchemische Methoden.....	25
2.6.1. Immunpräzipitation.....	25
2.6.2. Glykosidase-Verdau.....	26
2.6.3. Western Blot.....	26
2.6.3.1. Proteintransfer	26
2.6.3.2. Ponceau-S Färbung.....	26
2.6.3.3. Antigennachweis.....	27
2.7. Molekularbiologische Methoden.....	27
2.7.1. Plasmid-DNA Präparation	27
2.7.1.1. Plasmid-Minipräparation	27
2.7.1.2. Plasmid-Maxipräparation	28
2.7.2. RNA Isolation.....	28
2.7.3. Quantitative Nukleinsäurebestimmung	29
2.7.4. Modifikation von Nukleinsäuren	29
2.7.5. Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	30
2.7.6. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	30
2.7.7. cDNA Synthese.....	30
2.7.8. Klonierung	31
2.7.9. Southern Blot.....	31
2.7.10. Transformation und Transfektion	32
2.7.10.1. Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i>	32

Inhaltsverzeichnis

2.7.10.2. Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i>	32
2.7.10.3. Transfektion eukaryontischer Zellen	33
2.7.11. Sequenzierung.....	34
2.8. Zellbiologische Methoden	34
2.8.1. Mikroinjektion	34
2.8.2. Immunfluoreszenz.....	34
2.8.2.1. Durchflußzytometrie.....	34
2.8.2.2. Immunfluoreszenz Färbung	35
2.8.3. Zellfraktionierung	35
2.8.3.1. Membranfraktionierung.....	35
2.8.3.2. Mikrosomenpräparation.....	35
2.8.3.3. Mikrosomenaufreinigung.....	36
2.8.4. Proteasomenassay	36
2.9. Gelelektrophoresen.....	36
2.9.1. Agarosegelelektrophorese.....	36
2.9.2. Polyacrylamidgelelektrophorese	37
2.9.2.1. SDS-PAGE.....	37
2.9.2.2. Sequenzgel.....	37
3. ERGEBNISSE	38
3.1. Proteasomale Degradation von Env.....	38
3.1.1. Lokalisation des HIV-1 Env-Glykoproteins	38
3.1.2. Ubiquitinierung des Env-Glykoproteins	42
3.1.3. Proteasomale Degradation	48
3.1.4. Sec61p-Assoziation von Env	50
3.2. Golgi Retention/Retrieval von Env	52
3.2.1. Identifikation von inhibitorischen Sequenzelementen im heterologen System	53
3.2.2. Test der inhibitorischen Elemente <i>is1</i> und <i>is2</i> im homologen System	62
3.2.2.1. Herstellung eines synthetischen <i>env</i> Gens	62
3.2.2.2. <i>Is1</i> und <i>is2</i> inhibieren die Oberflächenlokalisation von Env	65
4. DISKUSSION	67
4.1. Degradation von ER-retentiertem Env.....	67
4.1.1. Ubiquitinierung.....	67
4.1.2. Proteasomale Degradation	70
4.2. Oberflächenexpression des HIV-1 Env Glykoproteins.....	72
5. ZUSAMMENFASSUNG	77
6. ABKÜRZUNGEN	79
7. PUBLIKATIONEN	81
8. DANKSAGUNG	82
9. LITERATUR.....	83

10. LEBENSLAUF..... 98

1. Einleitung

1.1. Das Humane Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1)

1.1.1. Klassifizierung und Phylogenie

HIV-1 gehört taxonomisch zur Familie der *Retroviridae*, Genus *Lentivirus*, und zusammen mit SIV und HIV-2 zur Gruppe der Primatenlentiviren (Abb. 1.1). Retroviren sind umhüllte, positivsträngige RNA Viren, für deren Replikation das Enzym Reverse Transkriptase notwendig ist. Dieses Enzym konvertiert das RNA Genom in ein DNA Provirus, das in das zelluläre Genom integriert. HIV-1 ist ein exogenes, nichtonkogenes Retrovirus mit einer Größe von etwa 9200 Nukleotiden. Es ist umhüllt, besitzt eine pleomorphe und sphärische Gestalt und einen Durchmesser von 80 - 100 nm (Abb. 1.2). Der Viruspartikel ist aus Kapsid und Virushülle aufgebaut und enthält zwei Kopien des RNA Genoms. Die retrovirale Hülle ist eine Lipid-Doppelmembran, die von der zelluläre Membran stammt und das virale Glykoprotein Env („*envelope*“) trägt.

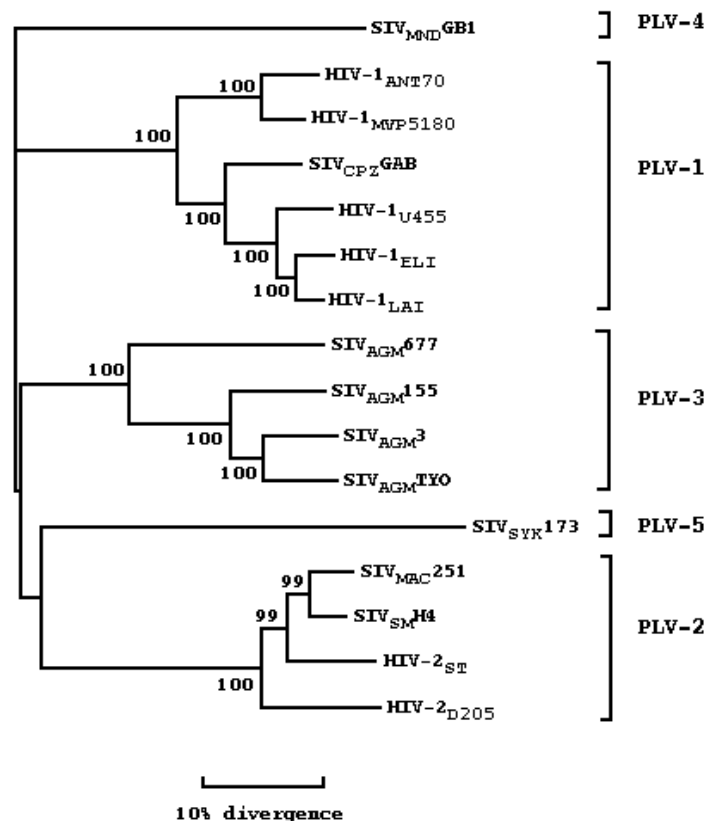


Abb. 1.1: **Phylogenetischer Baum der Primatenlentiviren (PLV)**. Zugrundegelegt wurden die Sequenzvergleiche der Polymerase. Die Klammern auf der rechten Seite indizieren die 5 PLV-Hauptlinien (nach David Robertson, University of Oxford, England, 1999).

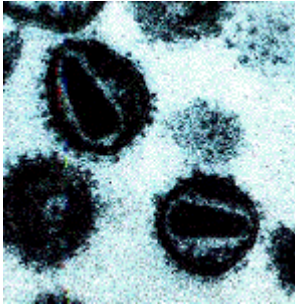


Abb. 1.2: **Elektronenmikroskopische Aufnahme von HIV-1** (nach Department of Microbiology, University of Otaga, Neuseeland)

Im Unterschied zu anderen Retroviren kodiert HIV-1 als Lentivirus auch für mehrere regulatorische und akzessorische Proteine. Ein wichtiges Charakteristikum von HIV-1 ist die Fähigkeit, nichtteilende Zellen zu infizieren (Lewis et al., 1992).

HIV-1 ist durch einen ungewöhnlich hohen Grad an genetischer Variabilität charakterisiert. Anhand der *env*-Gensequenzen von Virusstämmen unterschiedlicher geographischer Herkunft kann HIV-1 in drei Hauptgruppen M („major“), O („outlier“) und N („new“) eingeteilt werden. Die HIV-1 Gruppe M wird weiter eingeteilt in die genetisch unterscheidbaren Subtypen A-J, während die Gruppe O aus einem Pool an hochdivergenten, genetisch verwandten Stämmen besteht, bei denen keine Gruppen von Subtypen definiert werden konnten (Osmanov et al., 1994) (Gurtler et al., 1994; Gurtler et al., 1996; Kostrikis et al., 1995) (Charneau et al., 1994; Vanden Haesevelde et al., 1994). Ein kürzlich in Kamerun entdecktes Virusisolat, das sich sowohl von der Gruppe M als auch von O unterscheidet, repräsentiert die Gruppe N (Simon et al., 1998).

HIV-1 ist seit 1983 als ursächliches Agens für die Entstehung der Krankheit AIDS („*Acquired Immunodeficiency Syndrom*“), die erstmals 1981 bei einer Gruppe homosexueller Männer mit schweren opportunistischen Infektionen beschrieben wurde, bekannt. AIDS wird durch zwei verschiedene Retroviren, das Humane Immundefizienz Virus 1 (HIV-1) und das Humane Immundefizienz Virus 2 (HIV-2), verursacht. HIV-1 ist verantwortlich für die globale Pandemie, während HIV-2 im wesentlichen auf Westafrika beschränkt ist und weniger virulent zu sein scheint. Beide Viren sind phylogenetisch mit anderen Primatenlentiviren verwandt (Desrosiers, 1990a; Desrosiers, 1990b; Doolittle, 1989a; Doolittle et al., 1989b; Gojobori et al., 1990)(Abb. 1.2). Beide Viren haben ihren Ursprung in Afrika (Chitnis et al., 2000; Zhu and Ho, 1995; Zhu et al., 1998). Sie sind als zoonotische Infektionen von Primaten auf Menschen übertragen worden. Im Fall von HIV-1 gelten Schimpansen (*Pan troglodytes troglodytes*), bei HIV-2 Mangaben (*Cercocebus atys*) als Primärreservoir (Chen et al., 1997;

Chen et al., 1996; Gao et al., 1999; Gao et al., 1994; Gao et al., 1992; Hirsch et al., 1989).

1.1.2. Klinik

Die HIV-Epidemie begann Anfang der achtziger Jahre etwa gleichzeitig in den größten Städten Zentralafrikas und den USA. Seitdem hat sich diese Infektion weltweit ausgebreitet und sich insbesondere in den Ländern der Dritten Welt - besonders in Afrika, Indien, Südostasien und Südamerika - zu einer Pandemie entwickelt. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind heute weltweit mehr als 30 Millionen Menschen bei geschätzten 16.000 Neuinfektionen pro Tag mit HIV infiziert und 11,7 Millionen bereits an AIDS gestorben (report of the global HIV/AIDS epidemic, WHO 1998) (Abb.1.3).



Abb. 1.3: **Geschätzte Verteilung HIV-infizierter Erwachsener 1998** (nach WHO Global Programme on AIDS, WHO)

Beim Menschen wird HIV 1 und 2 durch kontaminiertes Blut (Transfusion, kontaminierte Injektionsnadeln) und Blutprodukte (z.B. nicht virus-inaktivierte Blutgerinnungspräparate) sowie durch Samen- und Vaginalflüssigkeit bei homo- oder heterosexuellen Kontakt übertragen. Außerdem kann das Virus auch vertikal von der Mutter auf das Kind übergehen. In Europa und den USA stellen Homosexuelle, intravenös Drogenabhängige, Hämophile, Transfusionspatienten und die nach vertikaler Transmission Infizierten noch immer den größten Anteil der HIV Träger, wohingegen in den Ländern der Dritten Welt die Übertragung durch heterosexuellen Kontakt überwiegt.

Die Primärinfektion verläuft in der Regel inapparent, selten auch als Mononukleose-ähnlicher Infekt, gefolgt von einer ausgedehnten, asymptomatisch verlaufenden Latenz-Phase von gewöhnlich 2 bis mehr als 10 Jahren. Es sind aber auch Fälle bekannt, sogenannte „*long-term survivors*“, bei denen die asymptomatische Phase seit mehr als zwanzig Jahre andauert. In dieser Zeit lassen sich in den Patienten zwar HIV-spezifische Antikörper nachweisen, infektiöses Virus findet man im peripheren Blut nicht, infizierte Zellen nur in geringen Mengen. An die Latenzphase kann sich das Stadium der Lymphadenopathie (LAS=Lymphadenopathie Syndrom) anschließen, das mehrere Wochen bis Jahre andauert und durch eine generalisierte Lymphknotenvergrößerung gekennzeichnet ist. Dieses kann von einer Phase abgelöst werden, die als „*AIDS-related complex*“ (ARC) bezeichnet wird, dessen Symptome (Fieber, Nacht-schweiß, Gewichtsverlust) sich spontan zurückbilden können. Die HIV-Infektion kann in diesen Phasen über Jahre stabil bleiben oder in kürzester Zeit zum Vollbild der AIDS-Erkrankung übergehen. Bei HIV-Infizierten verändern sich viele T- und B-zellspezifische Parameter (Birx et al., 1986; Edelman and Zolla, 1989; Giorgi et al., 1987; Miedema et al., 1988; Yarchoan et al., 1986) (Gurley et al., 1989) als Folge der Abnahme und des funktionellen Verlusts der CD4⁺-T-Helferzellen. Ein Hinweis auf die Verschlechterung der klinischen Situation ist meist der Abfall der CD4-positiven Zellen im Blut (Normalwert: >1000 CD4⁺-Zellen pro Mikroliter Blut). Im Endstadium der HIV-Infektion liegt ein vollständiges Versagen des Immunsystems vor, was sich in rekurrierenden Infektionen mit opportunistischen Erregern und dem Auftreten von malignen Tumoren wie dem Kaposi Sarkom widerspiegelt. In dieser Spätphase der Erkrankung ist eine hohe Viruslast im peripheren Blut nachweisbar, assoziiert mit einer Abnahme HIV-spezifischer Antikörper und der CD4⁺ T-Zellzahl. Die Abnahme der CD4⁺-Zellen korreliert mit der Zunahme der Virusproduktion und virusinfizierter Zellen (Schnittman et al., 1989).

1.1.3. Pathogenese

Das Virus gelangt bei der Infektion in der Regel über Schleimhautläsionen ins Blut. Es wird vermutet, daß Langerhans-Zellen und Makrophagen die primären Zielzellen von HIV sind, und daß sie über Lymphflüssigkeit in die nächstliegenden Lymphorgane und -gewebe transportiert werden. Lymphknoten, die den Hauptvermehrungsort der Viren darstellen, besitzen eine wichtige Rolle für die Ausbildung der zellulären und humoralen Immunantwort. Obwohl während der Latenzphase nur eine geringe Virusmenge im Blut nachweisbar ist,

findet in den Keimzentren der Lymphknoten eine starke Virusreplikation statt. Ungefähr 10^9 neue infektiöse Viruspartikel werden pro Tag gebildet und freigesetzt; ebensoviele $CD4^+$ -Zellen werden zerstört und wieder regeneriert (Ho, 1995a; Ho et al., 1995b).

Da zu diesem Zeitpunkt das Immunsystem noch intakt ist, kann es die massive Virusproduktion unter Kontrolle halten. Beim Übergang in die symptomatische Phase bricht dieses Gleichgewicht zusammen, so daß das Immunsystem nicht mehr in der Lage ist, die Viren in den Lymphknoten zurückzuhalten und zu eliminieren. Ein wichtiger Aspekt in der Pathogenese ist die kontinuierliche Änderung der viralen Epitope. Bedingt durch die Fehlerrate der reversen Transkriptase kommt es zu einer hohen Mutationsrate im Virusgenom, die im Bereich von einem fehlerhaft eingebauten Nukleotid pro Replikation und Genom liegt. Die Viren können so den Abwehrmechanismen der Zelle entkommen.

Durch die hohe Mutationsrate kommt es auch zu phänotypischen Veränderungen und zu veränderten Replikationseigenschaften der Viren (McNearney et al., 1992; Schuitemaker et al., 1992). Während man zu Beginn einer Virusinfektion ausschließlich Virusisolate findet, die in der Zellkultur keine Synzytien induzieren (sogenannte NSI-Isolate), einen Tropismus für Makrophagen besitzen und sich *in vitro* langsam vermehren, sind die Viren des späteren Stadiums T-lymphotrop, induzieren Synzytien (SI) und erreichen in Zellkultur rasch hohe Titer (Fenyo et al., 1988; Tersmette et al., 1988; Tersmette et al., 1989). Im Laufe einer HIV-Infektion entstehen also durch die Hypervariabilität kontinuierlich Virusvarianten, die der Immunantwort entgehen.

Das Oberflächenmolekül CD4 stellt den primären Rezeptor für HIV dar. Das Virus bindet über sein Hüllprotein gp120 gleichzeitig an CD4 (Maddon et al., 1986) (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984) und an Chemokinrezeptoren, die als Korezeptor wirken (Clapham et al., 1999; Deng et al., 1996; Feng et al., 1996). Synzytien-induzierende (SI) und nicht-Synzytien-induzierende (NSI) Isolate verwenden unterschiedliche Chemokinrezeptoren zum Viruseintritt (Bjorndal et al., 1997; Tscherning et al., 1998; Zhang et al., 1997). CD4 wird auf T-Lymphozyten, aber auch auf Monozyten, Kolonzellen, dendritischen Zellen und Gliazellen des Gehirns exprimiert, die von HIV infiziert werden können (Cheng et al., 1987; Collman et al., 1989; Dewhurst et al., 1987a; Dewhurst et al., 1987b; Fantini et al., 1992; Fantini et al., 1991). $CD4^+$ T-Lymphozyten, die Hauptzielzellen des Virus, besitzen im human Immunsystem eine kritische regulatorische Funktion, da sie für die Induktion der humoralen und zellulären Immunantwort notwendig sind. Der Verlust der Anzahl und der Funktion der

CD4⁺ T-Lymphozyten resultiert in einem Versagen des Immunsystems mit der Folge der Ausbildung opportunistischer Erkrankungen und charakteristischer Tumoren.

Die Faktoren, die zur Abnahme und zum Funktionsverlust der CD4⁺-Zellen führen, wurden bisher nicht mit Sicherheit identifiziert. Neben einer direkten zytolytischen Wirkung von HIV wird eine Depletion der CD4⁺-Zellen als Folge der Immunantwort, sowie eine Reihe anderer Mechanismen, zum Beispiel von Makrophagen sezernierte Zytokine, Apoptose durch Bindung von löslichem gp120 an CD4⁺-Zellen oder sezerniertem Tat-Protein („*transactivator of transcription*“), das Vpr-Protein („*viral protein rapid*“), Aktivierung der NO-Synthase, oxidativer Stress, Präsentation von HIV-spezifischen Antigenen und gp120 durch antigen-präsentierende Zellen diskutiert (Adamson et al., 1996; Banda et al., 1992; Casella and Finkel, 1997; Cottrez et al., 1997; Israel and Gougerot, 1997; Kolesnitchenko et al., 1997; Li et al., 1995; Oyaizu and Pahwa, 1995; Piller et al., 1999; Wick, 1999).

1.1.4. Molekularbiologie

Die Genomstruktur von HIV-1 ist komplex und weist mehrere überlappende Leseraster und eine Vielzahl differentiell gespleißter mRNAs auf. Zusätzlich zu den retroviralen Genen *gag* (gruppenspezifische Antigene), *pol* (Polymerase) und *env* (Hüllprotein) besitzt HIV-1 regulatorische und akzessorische Gene. Neben den essentiellen regulatorischen Genen *rev* („*regulator of expression of virion proteins*“) und *tat* („*transactivator of transcription*“) werden die nicht essentiellen akzessorischen Gene *nef* („*negative regulating factor*“), *vpu* („*viral protein out*“), *vpr* („*viral protein rapid*“) und *vif* („*viral infectivity factor*“) kodiert (Abb. 1.4).

Das *gag*-Gen kodiert für das Vorläuferprotein p55_{gag}, das nach der Spaltung durch die virus-kodierte Protease das Viruskapsid durch Selbstassemblierung bildet und mit anderen viralen Komponenten (RNA, Pol-Proteine, Env-Proteine) interagiert. Während des Zusammenbaus des Nukleokapsids wird der *gag*-Vorläufer durch die virale Protease in die vier viralen Proteine p17 (MA), p24 (CA), p7 (NC), p6 (LI) und zwei kleine Proteine, p1_{gag} und p2_{gag} prozessiert. Das *gag*-Protein interagiert mit zusätzlichen zellulären Faktoren wie Cyclophilin A, die für die Ausbildung eines infektiösen Virions notwendig sind (Franke et al., 1994; Luban, 1996).

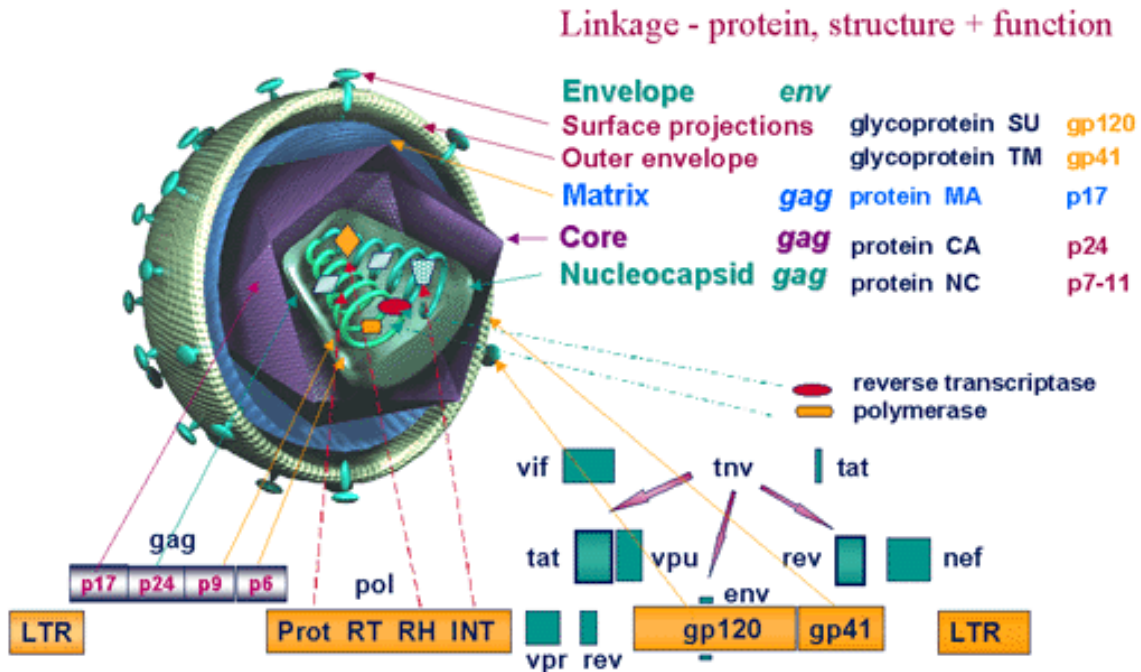


Abb. 1.4: **Genomische Karte von HIV-1** (nach International Committee on Taxonomy of Viruses, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD)

Das phosphorylierte Matrixprotein (MA) wird myristyliert und ermöglicht so die Assoziation des Polyproteins mit der inneren Membranoberfläche (Jacobs et al., 1989). Zudem fördert es den Transport des in doppelsträngige DNA überschriebenen Virusgenoms in den Zellkern und ermöglicht auch die HIV-Infektion ruhender Zellen (Bukrinsky et al., 1993). Das Kapsidprotein CA bildet den kegelstumpfförmigen Anteil des Virus und ist ebenfalls phosphoryliert. Das Nukleokapsidprotein (NC) enthält zwei Cystein-Histidin-Motive, die Ähnlichkeiten mit den Zinkfingerdomänen nukleinsäurebindender Proteine aufweist (South et al., 1991; Summers et al., 1992; South et al., 1991). Es bindet die genomische RNA sequenzunabhängig (Karpel et al., 1987). Das Adapter-Protein wird für den korrekten Zusammenbau des Viruskapsid benötigt und interagiert mit dem viralen Protein Vpr (Paxton et al., 1993; Tessmer and Krausslich, 1998). Die Rolle des p1-Peptids ist nicht bekannt. Das p2-Peptid moduliert die Rate und die Abfolge der gag-Prozessierung (Krausslich et al., 1995; Pettit et al., 1994).

Das *pol*-Gen kodiert für die verschiedene virale Enzymaktivitäten: Protease, Reverse Transkriptase, virale RNase und Integrase. Die Protease ist eine Aspartat-Protease und schneidet das gag-Vorläuferprotein während der Assemblierung. Sie ist nur als Dimer aktiv und besitzt zwei identische Untereinheiten (Kohl et al., 1988). Die Mg^{2+} -abhängige Reverse Transkriptase ist ein Heterodimer aus p66 und p51. Sie besitzt drei enzymatische Aktivitäten:

RNA-abhängige DNA Polymerase, DNA-abhängige DNA Polymerase und Ribonuklease H (RNase H). Die Polymeraseaktivität liegt im N-terminalen Bereich von p51 und p66, während sich die RNase-Aktivität im C-terminalen Teil der größeren Untereinheit befindet. Das Enzym besitzt keine Korrekturaktivität („*proof reading*“), so daß etwa ein fehlerhaft eingebautes Nukleotid pro 2000-4000 Nukleotide auftritt (Preston et al., 1988). Die Integrase ist das virale Protein, das für die Integration der proviralen DNA in die zelluläre DNA verantwortlich ist. Sie besitzt Endonuklease- und Ligaseaktivität.

Die Genprodukte Tat und Rev regulieren auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene die HIV-Expression (Cullen, 1991; Rosen, 1991). Tat aktiviert die Transkription viraler Gene durch Bindung an das cis-aktive TAR-Element (tat-responsive element) auf der naszierenden viralen mRNA. Dieses Element befindet sich auf allen viralen mRNAs und liegt im Bereich von Nukleotid 1 - 44 (Rosen et al., 1985). Tat interagiert auch mit Faktoren, die an Enhancer-/Promotorelemente in der viralen Promotorregion binden (Yu et al., 1995). Rev dagegen ist ein posttranskriptioneller Aktivator und beeinflusst das „*Splicing*“, den mRNA-Transport, die mRNA-Stabilität und die Translation ungespeißter und teilweise gespleißter viraler mRNAs, die für späte und strukturelle Proteine kodieren (D'Agostino et al., 1992; Emerman and Malim, 1998; Lawrence et al., 1991; Malim et al., 1989a; Meyer and Malim, 1994; Pollard and Malim, 1998). Rev bindet an das rev-Bindungselement (RRE) viraler mRNA, welches sich im Bereich des Leserahmens für das gp41 Hüllproteins befindet.

Die akzessorischen Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu sind für die Replikation in einigen Zellkulturen nicht essentiell, obwohl ihr Konservierungsgrad in allen Virusisolaten vermuten läßt, daß sie für den Viruszyklus im Menschen wichtig sind. Nef werden eine Reihe von Wirkungen zugesprochen, zu denen die Herunterregulation von CD4, die Interaktion mit zellulären Kinasen mit Änderung des zellulären Aktivierungsstatus, die Inhibition von Knochenmarkszellen, die Induktion von Interleukin 6 und die Inhibition der Proteinsynthese gehören. Für Vif wurde gezeigt, daß es die Infektivität, jedoch nicht die Produktion von Virus-partikeln beeinflusst. Für Vpr wird angenommen, daß es in den nuklearen Import des Prä-integrationskomplexes involviert ist, zelluläre Gene transaktiviert und Zelldifferenzierung bzw. einen Zellwachstumsstop induziert. Vpu erfüllt wenigstens zwei biologische Funktionen, die Degradation von CD4 im endoplasmatischen Retikulum und die Verstärkung der Virus-freisetzung von der Plasmamembran infizierter Zellen.

1.1.5. Das Envelope-Glykoprotein

Das *env* Gen von HIV-1, das zusammen mit dem *vpu* Gen auf einer gespleißten RNA transkribiert wird, kodiert für das Env-Vorläuferprotein. Die bicistronische mRNA wird in einem späten Stadium der viralen Replikation synthetisiert und ist aufgrund negativer Sequenzelemente abhängig von der Funktion des Rev Proteins. Die Prozessierung von Env geschieht auf dem sekretorischen Weg zur Zelloberfläche. Während des kotranslationellen Transfers in das endoplasmatische Retikulum (ER) wird das Signalpeptid von einer zellulären Endoprotease entfernt und Oligosaccharidketten - vor allen Mannosereste - angehängt. Neben der N-Glykosylierung tritt auch eine O-Glykosylierung auf (Hansen et al., 1992). Für die korrekte Faltung des Proteins und für eine aktive Konformation sind die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbindungen und die Glykosylierung bedeutend (Fennie and Lasky, 1989) (Fenouillet et al., 1994). Im Golgi werden die Mannoseeinheiten getrimmt und andere Zuckerreste wie Fucose, Galaktose und n-Acetylglucosamin angehängt, so daß das virale Glykoprotein sowohl komplexe als auch hybride Karbohydratseitenketten aufweist (Ratner, 1992). Das Vorläuferprotein gp160 wird im TGN-Kompartiment (*transgolgi network*) durch die zellulären Proteasen Furin and PC7 in die Untereinheiten gp120 (SU – „*surface*“) und gp41 (TM – „*transmembrane*“) prozessiert (Kantanen et al., 1995; Moulard et al., 1999; Wouters et al., 1999), die durch nicht-kovalente Bindung ein Heterodimer bilden. Diese Heterodimere lagern sich zu trimeren Komplexen auf der Zellmembran Env-exprimierender Zellen zusammen, wobei die Multimerisierung über die gp41 Transmembranuntereinheit erfolgt (Lu et al., 1995; Shu et al., 1999). Der Transport des Env Proteins über den sekretorischen Weg ist ineffizient, so daß nur 5 – 15 % an die Zelloberfläche gelangt (Willey et al., 1988). Der größte Anteil verbleibt im endoplasmatischen Retikulum oder dem cis-Golgi Kompartiment und wird nachfolgend degradiert, wobei als Orte der Degradation die Lysosomen, Golgi-assoziierte Kompartimente und das ER selbst diskutiert werden (Courageot et al., 1999; Earl et al., 1991; Kimura et al., 1996; Willey et al., 1988). Limitiert wird der Transport sowohl durch die Effizienz der Signalpeptidprozessierung (Li et al., 1996), als auch durch die Glykosylierung und durch die korrekte Faltung und Oligomerisierung im ER (Earl et al., 1991; Fenouillet and Jones, 1995; Otteken et al., 1996a). Während des Wegs durch die zellulären Kompartimente interagiert das Env Protein mit einer Vielzahl von Proteinen, insbesondere mit den zellulären Chaperonen Calnexin, Calreticulin und BiP (Earl et al., 1991; Li et al., 1996; Otteken et al., 1996a; Otteken and Moss, 1996b). Neben der Glykosylierung

kann das Env Protein auch sulfatiert (Bernstein and Compans, 1992) und palmyliert werden (Yang et al., 1997). Der ungewöhnlich lange zytoplasmatische Anteil der Transmembranuntereinheit bindet im Viruspartikel an das Gag Protein, beeinflusst neben Partikelbildung und Infektiösität die Knospungsseite („*budding*“) in polarisierten Zellen und die Oberflächenexpression (Haffar et al., 1990; Rowell et al., 1995) (Lodge et al., 1994; Lodge et al., 1997; Salzwedel et al., 1993). Als zelluläre Bindungspartner des zytoplasmatischen Schwanzes von gp160 sind unter anderem Bestandteile der AP1- und AP-2 Adaptorkomplexe beschrieben worden (Boge et al., 1998; Ohno et al., 1997). Deletion dieser Domäne, wie sie in Kulturen chronisch infizierter Zellen beobachtet worden ist (Zaides et al., 1994), steigert sowohl den Proteintransport als auch die Prozessierung des gp160. Im proximalen Anteil der zytoplasmatischen Domäne konnte ein Internalisierungssignal (YXXL) identifiziert werden, das sowohl bei HIV als auch bei SIV konserviert ist. Neben diesem Signal werden weitere vermutet, die die Internalisierung oder eine Retention induzieren (Berlioz et al., 1999; Haffar et al., 1990; Rowell et al., 1995).

Die biologische Funktion des Env Proteins ist die spezifische Erkennung der Zielzelle, die Bindung an die Zelle und die anschließende Membranfusion. Als Rezeptor für HIV-1 wurde das CD4 Molekül, als Korezeptoren verschiedene Chemokinrezeptoren wie CXCR4 und CCR5, die zu der Klasse der sogenannten CXC- oder CC-Chemokinrezeptoren gehören, identifiziert (Deng et al., 1996; Feng et al., 1996). Durch die Bindung des gp120 an die Rezeptoren kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch das N-terminale Fusionsprotein des gp41 exponiert und die Fusion der viralen Membran mit der der Wirtszelle vermittelt wird.

1.2. Das Endoplasmatische Retikulum

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist der Ort der Synthese, der Faltung und der Modifikation der Proteine, die für die Sekretion, die Plasmamembran oder für die sekretorischen und endozytotischen Organellen bestimmt sind. Die neusynthetisierten Proteine werden einer Qualitätskontrolle unterzogen, wobei mißgefaltete oder nicht-assemblierte Proteine retentiert und degradiert werden (Hurtley and Helenius, 1989; Klausner and Sitia, 1990). Die Qualitätskontrolle und die Katalyse der Faltung erfolgt durch die transiente Bindung an die ER-residenten Chaperone und Enzyme wie BiP, Calnexin, Calreticulin und Proteindisulfidisomerase (PDI). Proteine werden kotranslational über den

heterotrimeren Sec61-Komplex in das ER transloziert, wobei durch Bindung von BiP an hydrophobe Bereiche der neusynthetisierte Peptidkette der Rücktransport ins Zytosol und die Aggregation des Proteins im ER verhindert und die Freisetzung vom Translokator ermöglicht wird (Matlack et al., 1999). Die PDI katalysiert abhängig vom Redoxzustand die Bildung oder Auflösung von Disulfidbindungen. Die homologen ER-residenten Lektine, Calnexin und Calretikulin, binden an fast alle löslichen und membrangebundenen neusynthetisierten Glykoproteine. Im Zusammenspiel mit der UDP-Glukose: Glykoprotein-Glykosyltransferase (GT) und der Glucosidase II bilden sie ein Kontrollsystem für deren korrekte Faltung. Bei der N-Glykosylierung der Proteine wird ein Kern-Oligosaccharid aus zwei N-Acetylglucosamin-, neun Mannose- und drei Glukoseresten auf die freie Aminogruppe einer Asparaginseitenkette in einem Schritt übertragen. Durch die Glucosidase I und II werden die Glukoseeinheiten auf eine verkürzt, die dann von Calnexin und Calretikulin erkannt und gebunden wird. Der verbleibende Glukoserest wird von der Glucosidase II abgespalten, woraufhin der Komplex aus Chaperon und Protein dissoziiert. Ist das Protein richtig gefaltet, wird es aus dem ER transportiert. Fehlgefaltet wird es durch GT erkannt, reglykosiliert und tritt durch Calnexin gebunden wiederum in den Kontrollzyklus ein (Parodi, 1999). Es kann aber auch dem Abbau zugeführt werden. Ein möglicher Mechanismus ist die Markierung durch die Mannosidase I für die ER-assoziierte Degradation. Hierbei wird durch das Enzym ein Mannoserest abgespalten, wodurch das Glykoprotein seine Affinität zur Glucosidase II verliert und nicht mehr schnell aus der Calnexinbindung freigesetzt wird (Liu et al., 1999). Daraufhin kommt es zum Rücktransport über den Sec61-Komplex aus dem ER ins Zytoplasma (Plemper and Wolf, 1999a; Plemper and Wolf, 1999b), zur Deglykosylierung und zum Abbau durch das Proteasom. Die Faktoren, die die Verbindung zwischen den einzelnen Schritten bewirken, sind bisher nicht bekannt. Die verbliebenen Zuckerreste können weiter getrimmt werden (Kornfeld and Kornfeld, 1985).

Neben der Glykosylierung können zusätzliche Modifikationen an den Proteinen vorkommen. Zu diesen gehören das Anhängen von Glykosyl-Phosphatidylinositolresten und von Fettsäuren, insbesondere Palmitinsäure (Schultz et al., 1988). Korrekt gefaltete und modifizierte Proteine werden in den Golgi transportiert. Proteine, die ER-resident sind, beeinhalteten Signale, die sie im ER zurückhalten oder auch wieder vom Golgi in das ER zurücktransportieren. Dies ist nötig, da einige ER-Proteine zur vollständigen Reifung im Golgi modifiziert werden müssen. Als Signal kommt oftmals ein karboxyterminales

Tetrapeptid (KDEL), für Typ I-Membran-proteine ein karboxyterminales Dilysinmotiv (KKXX, KXKXX) und für Typ II-Membran-proteine ein Diargininmotiv vor, das in den ersten fünf aminoterminalen Resten zu finden sein muß (Jackson et al., 1990; Pelham, 1990; Schutze et al., 1994). Auch polare Aminosäuren in der Transmembrandomäne können einen Einfluß auf die ER-Lokalisation haben (Grupp et al., 1995).

1.3. Das Golgi-Kompartiment

Der Golgi-Komplex besteht aus einem Stapel von Membransäcken, die ein Set von Subkompartimenten bilden und sich in mindestens drei biochemisch verschiedene Einheiten unterscheiden lassen (Dunphy and Rothman, 1985). Der Golgi erfüllt zwei wichtige Funktionen: Die Veränderung der Oligosaccharideinheiten der Glykoproteine und die Sortierung der Proteine. Ein Kennzeichen des Golgi sind die Enzyme, die die Oligosaccharidseitenketten in die reife Form transformieren. Der cis-Golgi beinhaltet Mannosidasen, die die N-gebundenen Oligosaccharide verkürzen. Im medialen Golgi können weitere Mannosereste entfernt und N-Acetylglukosamin- und Fukosereste angehängt werden. Mit Galaktose und Sialinsäure können Proteine im trans-Golgi modifiziert werden. Im Golgi findet die Sortierung der Proteine und der selektive vesikuläre Transport zu ihrem jeweiligen Bestimmungsort - Lysosom/Endosom, Sekretion oder Plasmamembran - statt. Für die Retention Golgi lokalisierter Proteine werden zwei Modelle angenommen. Das erste basiert auf der Retention durch Oligomerisierung, wobei es zu großen Aggregatbildungen kommt, die nicht mehr transportiert werden können (Nilsson et al., 1993). Dem zweiten liegt die Annahme unterschiedlicher Membrandicken entlang des exozytotischen Wegs zugrunde, so daß Golgi-proteine aufgrund ihrer kürzeren Transmembrandomäne in ihrem Kompartiment verbleiben (Munro, 1995). Der zytoplasmatische Anteil eines Glykoproteins kann eine Golgi Lokalisation bewirken, wie anhand eines viralen Glykoproteins (G1 Membranglykoprotein des Uukuniemi Virus) gezeigt werden konnte (Andersson et al., 1997; Andersson and Pettersson, 1998). Neben den Retentionssignalen existieren Sequenzmotive, die für einen Rücktransport in den Golgi-Komplex verantwortlich sind. Sie enthalten Tyrosinreste oder zwei Leuzine oder bestehen aus sauren oder aus phenylalaninhaltigen Regionen (Bryant and Stevens, 1997; Ponnambalam et al., 1994; Schafer et al., 1995).

1.4. Das Ubiquitin/Proteasomensystem

ER-assoziierte Degradation wird durch das zytoplasmatische 26S Proteasom durchgeführt. Der Prozeß geschieht in mehreren Schritten: Erkennung der zum Abbau bestimmter Proteine im ER, dann Rücktransport über den Sec61-Komplex ins Zytosol, gefolgt von Deglykosylierung, Ubiquitinierung und schließlich dem Abbau durch das Proteasom. Das 26S Proteasom besteht aus dem tonnenförmigen 20S katalytischen Komplex, der von beiden Seiten von den 19S regulatorischen Einheiten flankiert wird. Die Substraterkennung geschieht über diese Einheiten durch Bindung an Ubiquitinreste, die daraufhin abgespalten werden. Der zentrale Komplex beinhaltet die Proteaseaktivität. Die Anheftung von Ubiquitineinheiten an die Proteine erfolgt über einen dreistufigen Prozeß. Nachdem Ubiquitin durch Bindung an das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert worden ist, wird es durch eines mehrerer Ubiquitin-konjugierender Enzyme (E2), die auch membranständig sein können, auf eine der Ubiquitin-Protein Ligasen (E3) übertragen. Diese Enzym katalysiert die Ausbildung einer Peptidbindung zwischen Ubiquitin und der freien Aminogruppe eines Lysinrestes oder dem Aminoende des Zielproteins (Breitschopf et al., 1998). An diesen initialen Ubiquitinrest können weitere Ubiquitineinheiten angehängt werden, wobei Monoubiquitinierung für das weitere Schicksal bereits ausreichend sein kann (Terrell et al., 1998). Als Signal für eine Ubiquitinierung wurden bestimmte Aminosäuren am Aminoterminus (N-End Regel) (Varshavsky, 1996), Protein-phosphorylierung (Kornitzer et al., 1994) und Assoziation mit bestimmten Proteinen wie viralen Onkogenen und Chaperonen (Hershko and Ciechanover, 1998) identifiziert. Möglicherweise besitzt die Modifizierung durch Ubiquitinreste neben der Markierung zur Degradation noch weitere Funktionen, da Ubiquitinmodifizierung auch bei Strukturproteinen und Rezeptoren, die nicht für den Abbau bestimmt sind, gefunden worden ist (Brandimarti and Roizman, 1997; Ott et al., 1998; West and Bonner, 1980; Siegelman et al., 1986; St. John et al., 1986). In diesem Zusammenhang wird die Ubiquitinierung auch als Internalisierungssignal diskutiert (Bonifacino and Weissman, 1998).

1.5. Problemstellung

Die Synthese und der zelluläre Transport des Envelope Glykoproteins von HIV-1 werden sowohl auf der mRNA-Ebene als auch auf der Proteinebene stringent reguliert. Nach der Translation wird nur ein geringer Anteil von Env zur Zelloberfläche transportiert, der größte Teil akkumuliert im ER und erreicht nicht das späte Golgi Kompartiment. Das retentierte und wahrscheinlich mißgefaltete Env wird nachfolgend degradiert. Als Degradationsort wurden in der Literatur Lysosomen, das ER selbst und Golgi assoziierte Kompartimente diskutiert. Nach der aktuellen Vorstellung werden Lysosomen allerdings über späte Golgi Kompartimente oder Endosomen erreicht und haben keine direkte Verbindung zum ER.

Der Mechanismus der ER-assoziierten Degradation wurde anhand mehrerer Proteine aufgeklärt. Sowohl ER-assoziierte als auch mutierte und mißgefaltete Proteine des sekretorischen Transportweges werden aus dem ER zurück ins Zytoplasma transportiert, ubiquitiniert und von Proteasomen abgebaut. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der diskrepanten Daten die Hypothese untersucht, ob ER-retentiertes Env über das Ubiquitin/Proteasomensystem degradiert wird.

Der weitere Transport des korrekt gefalteten Env Glykoproteins durch die Zelle und die Expression auf der Zelloberfläche wird entscheidend durch seine zytoplasmatische Domäne beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, welche Faktoren der zytoplasmatischen Domäne die Proteinexpression und Lokalisation von Env beeinflussen. Insbesondere sollten die Sequenzelemente identifiziert werden, die für die supprimierte Oberflächenexpression verantwortlich sind.

2. Material und Methoden

2.1. Zellen, Viren und Bakterien

2.1.1. Zellen

- a. 293T (Adenovirus transformierte humane Nierenkarzinomzellen) (ATCC, Rockville, MD, USA)
- b. Hela (humane Zervixkarzinomzellen) (ATTC)
- c. CV1 (Affennierenzellen) (ATCC)
- d. C8166 (humane T-Zell-Lymphoblastomzellen) (ATCC)
- e. Jurkat (humane T-Zell-Leukemiezellen) (ATCC)

Die unter a. bis c. aufgeführten Zellen wurden in DMEM (Life Technologies, Paisley, Schottland), die unter d. und e. in RPMI 1640 (Life Technologies) kultiviert. Die Medien wurden dazu mit 10% (v/v) hitzeinaktivierten fötalen Kälberserum (FCS, Bio Whittaker, Belgien), 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin supplementiert.

Zur Kultivierung wurden sterile Kunststoffflaschen und -schalen (Nunc, Greiner, Falcon) verwendet. Alle Zelllinien wurden in einem begasten Feuchtbrutschrank (Water Jacket Incubator 3250, Labotect, Labor-Technik-Göttingen) unter 5% CO₂ bei 37°C inkubiert.

Zur metabolischen Markierung von Zellen wurde Cystein- und Methionin-freies RMPI (Bio Whittaker, Belgien) verwendet.

2.1.2. Viren

- a. HIV MN Virus (NIBSC/MRC AIDS Reagent Project, England)
- b. HIV MvP 899-87 Virus (HIV-B, X 4 Virus) (Institutssammlung)
- c. rekombinante Vaccinia Viren (NIBSC/MRC AIDS Reagent Project, England)

p92/UG/037-8	HIV-1 gp160 Subtyp A
p92/BR/020-4	HIV-1 gp160 Subtyp B
p92/BR/025-9	HIV-1 gp160 Subtyp C

2.1.3. Bakterien

Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F, ϕ 80dlacZDM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17($r_k^- m_k^+$), supE44, relA1, deoR, D(lacZYA-argF)U169	GibcoBRL, Life Technologies, Rockville , MD, USA
MC1061 +/-P3	F, araD139, Δ (ara-leu)7696, galE15, galK16, Δ (lac)X74, rpsL(Str ^r), hsdR2($r_k^- m_k^+$), mcrA, mcrB1	Institutssammlung

2.2. Oligonukleotide

Name	Schnitt- stelle	Sequenz
CD4 for	HindIII	cgcgggaagcttgccgccaccatgaaccggggagtccc
CD4 rev	NotI	cgcggggcggccgcttaaatggggctacatgtcttc
CD4Dcyt Mlu 1	NotI	cgcggggcggccgcttattaccttcggtgccggcaacgcgtacagaagaagatgcc
CD4gp41 Mlu 1 for	MluI	cgcgggacgcgtgtgcgccagggtac
cdm7 rev	-	ccacagaagtaaggttc
gp41 Δ 833 rev	NotI	cgcggggcggccgcttattagacacctcgatcacgc
gp41 Δ 805 rev	NotI	cgcggggcggccgcttattactggctccaatactggag
gp41 Δ 785 rev	NotI	cgcggggcggccgcttattataggagttccacgatgcg
gp41 Δ 763 rev	NotI	cgcggggcggccgcttattagctgcggaggtcgac
gp41 Δ 749 rev	NotI	cgcggggcggccgcttattacctgccgctg
gp41 Δ 738 rev	NotI	cgcggggcggccgcttattagccctcctcctcgatgc
gp41 Δ 728 rev	NotI	cgcggggcggccgcttattaggcccgcgcggcac
CD4gp41:749 for	MluI	cgcgggacgcgtctcgtgcacggcttctgg
gp41 Δ 768 rev	NotI	cgcggggcggccgcttattagctgaacaggaacaggc
CD4gp41:750-763	MluI/NotI	cgcgtgtgcacggcttctggcgatcatctgggtcgacctccgcagctaataagc
CD4gp41:750-763	MluI/NotI	ggccgcttattagctgcggaggtcgaccagatgatgccaggaagccgtgcaca
CD4gp41:763-785	MluI	cgcgggacgcgtctgttctgttcagctaccaccaccgcgacctgctgctgatgcc
CD4gp41:763-785	NotI	cgcggggcggccgcttattataggagttccacgatcggggcggcgatcagcagcaggtcg
gp41 Δ ise1 for	-	gaacaggaacaggagcctgccgctggtgtcg

gp41 Δ ise1 rev	-	gcggcaggctcctgttctgttcagctac
gp41 Δ ise1+2 for	-	gcggcagggggccgccgctggg
gp41 Δ ise1+2 rev	-	cccagccgcgggcccccctgccgtggtgtcgc
gp41 Δ ise2 for	-	gacctccgcagcggccgccgctgg
gp41 Δ ise2 rev	-	cccagccgcgggcccccctgccgtggtgtcga
gp41L776/7A for	-	ctggccgccatcgcccccgcacgtg
gp41L776/7A rev	-	ccacgatgcggggcgatggcgccaggtcgcggtggtgtagc
gp41L784/5A for	-	gaagccgccggccgccgctgg
gp41L784/5 rev	-	cccagccgcgggcccccctgccgtggtgtcga
gp41L776/7/784/5A	-	gccccatcgcccccgcacgtggaagccgccggccgccgctggg
gp41L776/7/784/5A	-	ggcggcttccacgatcgggcgatggcgccaggtcgcggtggtgtagc
syngp160 Δ cyt for	EspI/NotI	tgagcatcgtgaaccgctagc
syngp160 Δ cyt rev	EspI/NotI	ggccgctagcggttcacgatgc
gp41 Esp 1 for	EspI	cgcgggctgagcatcgtgaaccgctgcgccagggcta
pCR3 rev	-	atttaggtgacactatag
β -actin for	-	cgcggggaattcagctgtgctacgtcgc
β -actin rev	-	cgcgggggatcctcgtggatgccacagg
syngp160 for	-	gtgctgaagtactggtgg
wtgp160 for	-	attggtggaatctctac
gp41 Y713A	MluI	cgcgggacgcgtgtgcaccagggcgagccccctgagcctccag
sgp160 Δ TM rev	NotI	cgcggggcgccgcttattaccacagccagttggtgatg
CD4 5'TM	XmnI	cgcggggaactggttcacatcaccaactggctgtggtaccatggccctgattgtgc
pcdm7 rev	-	ccacagaagtaaggttc

2.3. Seren und Antikörper

2.3.1. Seren

Das humane Serum 95-B-2 von einem HIV-infizierten Patienten wurde aufgrund eines hohen Titers gegen Env ausgewählt. Das humane Serum 257-D IV gegen Env wurde vom NIH AIDS Reagent Programm (Rockville, MD, USA) zur Verfügung gestellt. Die Antiseren gegen Ubiquitin wurden von Sigma (U5379; Sigma, St. Louis, MO, USA) und Stressgen (SPA-200; Stressgen, Victoria, Kanada) bezogen; das Kaninchen-Antiserum gegen Sec61p wurde von Dr. B. Dobberstein, Heidelberg (High et al., 1993) und das anti-TAP-2 Antiserum von Drs. F. Momburg und G. Haemmerling, Heidelberg zur Verfügung gestellt.

2.3.2. Monoklonale Antikörper

Der anti-CD4 Antikörper Q4120 wurde von Sigma, der monoklonale Antikörper 2C5 gegen Ubiquitin wurde von Calbiochem (La Jolla, CA, USA) bezogen. Der murine monoklonale Antikörper W6/32 gegen MHC I stammte vom ATCC (Rockville, MD, USA). Der monoklonale Antikörper 1577 gegen den zytoplasmatischen Anteil von gp41 konnte vom NIBSC/MRC AIDS Reagent Project bezogen werden. Die sekundären, konjugierten Antikörper stammten von Dianova (Hamburg, Deutschland).

2.4. Puffer und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in *pro analysis* Qualität von den Firmen Sigma, Merck, Roth und GibcoBRL bezogen.

³⁵S markiertes Cystein und Methionin (Pro-Mix) wurden durch Amersham Pharmacia geliefert.

2.5. Geräte

Bakterienschüttler	B.Braun, Melsungen
β-Counter LS6000TA	Beckman, Fullerton, USA
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Geldokumentationssystem	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Elektroporationsgerät	Bio-Rad, Richmond, USA
Entwicklermaschine	Amersham, Freiburg
FACSCalibur (Durchflußcytometer)	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop Axiovert 35	Zeiss, Oberkochen
γ-Counter (COBRA, Auto-Gamma)	Packard, Groningen, Niederlande
Geltrockner	Bio-Rad, Richmond, USA
Invertmikroskop TMS	Nikon, Düsseldorf
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Leitz DM IRB, Wetzlar
Konfokaler Laser Scanner	Leica TCS NT, Heerbrugg, Schweiz
Kühlfalle	Christ, Osterode
Kühlzentrifuge	Heraeus, Hanau
Microinjector 5242	Eppendorf, Hamburg

Material und Methoden

Micromanipulator 5170	Eppendorf, Hamburg
Mikrowellengerät	AEG, Berlin
PCR-Maschine	Perkin Elmer, Weiterstadt
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer Gene Quant II	Pharmacia/LKB, Freiburg
Pipetten	Gilson, Villies Le Bel, Frankreich; Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Technomara, Zürich, Schweiz
Speed Vac Konzentrator	Savant, Farmingdale, USA
Sterile Bank Lamin Air	Heraeus, Hanau
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Branson Sonic Power Company, Danburg, USA
Ultrazentrifuge L5-75	Vetter, Wiesloch
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	Köttermann, Hängsingen
Zentrifuge GP	Beckman, Palo Alto, USA
Zentrifuge J2-21	Beckman, Palo Alto, USA

2.6. Proteinchemische Methoden

2.6.1. Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen und mit Lysispuffer versetzt. Nach 15 min auf Eis wurde das Lysat für 30 min bei 20.000 g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit einem unspezifischen Antikörper und Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia) versetzt, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Nach 2-stündiger Inkubation bei 4°C unter ständigen Schütteln wurde die Sepharose durch kurze Zentrifugation bei 20.000 g und 4°C entfernt, der Überstand mit spezifischen Antikörper für 1 h und anschließend für eine weitere Stunde mit Protein A-Sepharose bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose je zweimal mit Waschpuffer B, zweimal mit Wasch-puffer C und einmal mit Waschpuffer D gewaschen. Anschließend wurde das Präzipitat in der Regel in Auftragspuffer aufgenommen, für 5 min bei 95°C aufgeköcht und auf ein Poly-acrylamidgel aufgetragen.

Lysispuffer	20 mM Tris/HCl pH 7,6; 1% (v/v) Nonidet-P 40 (NP40); 140 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂
Waschpuffer B	1 mM Tris/HCl pH 7,6; 0,2% (v/v) NP40; 150 mM NaCl; 2mM EDTA
Waschpuffer C	1 mM Tris/HCl pH 7,6; 0,2% (v/v) NP40; 500 mM NaCl; 2 mM EDTA
Waschpuffer D	10 mM Tris/HCl pH 8,0
2 fach Auftragspuffer reduzierend	4% (w/v) SDS; 4% (v/v) 2-Mercaptoethanol; 20% (v/v) Glycerin; 0,025% (w/v) Bromphenolblau

2.6.2. Glykosidase-Verdau

Nach der Immunpräzipitation wurden die Sepharosekomplexe in 40 µl 0,1 M 2-Mercaptoethanol / 0,1% (w/v) SDS aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Mischen und Abkühlen auf Eis wurde die Sepharose durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand in zwei 20 µl-Portionen aufgeteilt, die mit je 20 µl Endo H- oder N-Glykosidase F-Puffer versetzt wurden, wobei sich im Kontrollansatz kein Enzym befand. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde 10 µl 5 fach Auftragspuffer zugegeben und die Probe für 5 min bei 95°C aufgeköcht.

Endo H-Puffer	100 mM Natriumcitrat pH 5,5; 0,5% (w/v) PMSF; 0,025 U/ml Endo H
N-Glykosidase F-Puffer	200 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,5% (w/v) PMSF; 20 mM EDTA; 2% (v/v) NP 40; 1 U N-Glykosidase F
5 fach Auftragspuffer reduzierend	10% (w/v) SDS; 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol; 40% (v/v) Glycerin; 0,025% (w/v) Bromphenolblau

2.6.3. Western Blot

2.6.3.1. Proteintransfer

Nach SDS-Polyacrylamidelektrophorese wurde eine Nitrocellulosemembran (BA 85; 0,2 µm, Schleicher und Schüll) im Transferpuffer blasenfrei auf das Gel aufgelegt und beide Seiten des Stapels mit Filterpapier (3 M, Whatman) bedeckt. Fixiert in einer Blothalterung wurde der Transfer in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer (Bio-Rad Protean II) bei 40 mA für 2 h bei 4°C durchgeführt.

Transferpuffer	25 mM Tris; 200 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol
----------------	---

2.6.3.2. Ponceau-S Färbung

Um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen, wurde die Membran für 3 min in Ponceau-S Lösung inkubiert. Überschüssige Farbe wurde durch Spülen mit destilliertem Wasser

entfernt. Die auf der Membran angefärbten Proteine wurden durch Zugabe von TBS entfärbt.

Ponceau-S Lösung 0,2% (v/v) Ponceau-S (Sigma) in 3% (v/v) Essigsäure

TBS 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl

2.6.3.3. Antigennachweis

Nach überprüften Transfer wurde die Membran mit 5% (w/v) Milchpulver in TBS für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C geblockt. Die Inkubation mit dem verdünnten Erstantikörper erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in TBST. Nach mehrmaligen Waschen in TBST wurde der verdünnte, Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper auf die Membran gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach mehrfachem Waschen wurden die Immunkomplexe durch Zugabe eines Chemolumineszenzsubstrats (ECL Western Blotting Detection Reagent, Amersham Pharmacia) und Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak) sichtbar gemacht. Die Handhabung erfolgte nach den Instruktionen des Herstellers.

TBST 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% (v/v) Tween20

2.7. Molekularbiologische Methoden

2.7.1. Plasmid-DNA Präparation

2.7.1.1. Plasmid-Minipräparation

1 ml einer Übernachtskultur von transformierten *E.coli* wurde zentrifugiert und das Pellet in 200 µl Lösung 1 resuspendiert. Danach wurde 400 µl Lösung 2, dann nach kurzen Mischen 300 µl Lösung 3 zugegeben und die denaturierte genomische DNA abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und die Plasmid-DNA aus der wässrigen Lösung mit dem 0,7 fachen Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach einer Zentrifugation bei 20.000 g und 4°C wurde das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in mit 100 µg/ml RNase A versetzten TE-Puffer aufgenommen.

Lösung 1	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA
Lösung 2	200 mM NaOH; 1% SDS
Lösung 3	3 M Kaliumacetat pH 5,5
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8 ; 1 mM EDTA

2.7.1.2. Plasmid-Maxipräparation

Eine 1 l *E.coli*-Kultur wurde durch Zentrifugation geerntet und das Pellet in 40 ml Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurden zu 80 ml Lösung 2, und 40 ml Lösung 3 zugegeben und die denaturierten Proteine und die genomische DNA abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Gaze filtriert und mit Isopropanol präzipitiert. Das Pellet wurde in 3 ml Lösung 1 resuspendiert, zu 5,4 mg Cäsiumchlorid gegeben und mit 50 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach Ultrazentrifugation über Nacht bei 50.000 rpm oder für 4 h bei 80.000 rpm in einem NVT 90-Rotor (Beckman) wurde die Plasmidbande mit einer Spritze abgenommen, mit einem Volumen H₂O verdünnt und das Ethidiumbromid mit NaCl-gesättigten n-Butanol extrahiert. Die DNA wurde mit 1 Volumen 1 M Ammoniumacetat/1 mM EDTA und 2,5 fachen Volumen Ethanol präzipitiert, und nach Zentrifugation das DNA-Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen.

2.7.2. RNA Isolation

Zur RNA-Isolation wurden transfizierte Zellen abgelöst, mit kaltem PBS gewaschen und in 2 ml Lysepuffer für 5 min auf Eis lysiert. Die Zellkerne und das Zytoplasma wurden durch Zentrifugation (3.000 g, 10 min, 4°C) abgetrennt und 8 ml 4 M Guanidiniumthiocyanatlösung zu der Zellkernfraktion und 6 ml 6 M Guanidiniumthiocyanatlösung zu der Zytoplasmafraktion zugegeben. Nachdem die DNA mit Hilfe einer 20 G Kanüle gesichert worden war, wurden 4 ml 5,7 M CsCl-Lösung mit den Probelösungen überschichtet und im SW40 Rotor zentrifugiert (35.000 rpm, 18 h, 20°C). Das RNA Pellet wurde in H₂O gelöst, mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Alle verwendeten Lösungen wurden zuvor zur Elimination von RNasen mit DEPC behandelt und anschließend autoklaviert.

Lysepuffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5; 5 mM MgCl ₂ ; 10 mM NaCl; 0,5% (v/v) NP40
4 M Guanidiniumthiocyanatlösung	4 M Guanidiniumthiocyanat; 25 mM Natriumcitrat pH 7; 0,5% (w/v) Laurylsarkosin; 0,7% (v/v) 2-Mercaptoethanol
6 M Guanidiniumthiocyanatlösung	6 M Guanidiniumthiocyanat; 37,5 mM Natriumcitrat pH 7; 0,75% (w/v) Laurylsarkosin; 0,7% (v/v) 2-Mercaptoethanol

2.7.3. Quantitative Nukleinsäurebestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurden mittels der optischen Dichte bei 260 nm (OD₂₆₀) am Spektralphotometer (DU 640, Beckman, USA) ermittelt. Hierbei entsprach 1 OD₂₆₀ 40 µg/ml RNA, 50 µg/ml DNA und 30 µg/ml Oligonukleotid, wenn diese in einer Quarzküvette mit einem Durchmesser von 1 cm gemessen wurde.

2.7.4. Modifikation von Nukleinsäuren

Die folgenden *in vitro* Modifikationen von DNA wurden nach Maniatis et al. (Maniatis et al., 1982) durchgeführt:

- a. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Beverly MA, USA; Roche, Deutschland; Fermentas, Wilna, Litauen)
Zu einem 30 µl Standardrestriktionsansatz wurden 1,5 µg DNA, die entsprechende Restriktionsendonuklease und -puffer zugegeben und bei der empfohlenen Temperatur inkubiert.
- b. Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe mittels alkalischer Phosphatase (Roche)
Zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppe wurde die alkalische Phosphatase zu den Restriktionsansatz zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.
- c. Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase (Biolabs)
In der Regel wurden Vektor- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Die Ligation erfolgte für 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C.
- d. Phosphorylierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe von Polynukleotidkinase (Roche)
Die Phosphorylierungsreaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers über Nacht.

e. Entfernung überstehender Enden mit Klenow-Polymerase oder T4-DNA-Polymerase (Roche)

Zu einem Restriktionsansatz wurden 1 µl 0,5 mM dNTP und im Fall von 5' überhängenden Enden Klenow-Polymerase und bei 3' überhängenden Enden T4-DNA-Polymerase zugegeben und für 15 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 minütige Inkubation bei 75°C abgestoppt.

2.7.5. Gelextraktion von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Geextraktionskits (Roche) aus Agarosegelen extrahiert. Die Angaben des Herstellers wurden zur Durchführung herangezogen.

2.7.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA wurde die Taq-Polymerase von Perkin Elmer oder das Expand High Fidelity PCR System von Roche verwendet. Für einen typischen 50 µl-Ansatz wurden 100 ng Template, je 0,1 µM Primer, je 100 µM der einzelnen Desoxynukleotide, 1 fach Reaktionspuffer und 1 µl der entsprechenden Polymerase vermischt. Die Hybridisierungstemperatur der Primer wurde nach folgender Formel ermittelt: $86,35 + 0,41 (\%G + C) - 600/n$ (n=Länge des Oligonukleotids). In der Regel wurden 20 - 30 Temperaturzyklen in einem DNA-Thermo-Cycler (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer) gefahren.

Im Fall einer überlappenden PCR zur Deletion von DNA-Abschnitten und zur Einbringung von Punktmutationen wurden die PCR-Produkte der ersten Reaktion zunächst aus einem Agarosegel extrahiert und im Verhältnis 1:1 gemischt. In einer zweiten PCR-Runde wurden die überlappenden Fragmente zunächst bei hohen Temperaturen mehrfach miteinander hybridisiert und linear amplifiziert und anschließend bei niedrigeren Temperaturen eine PCR mit den äußeren Primern durchgeführt.

Um die amplifizierte DNA zu klonieren, wurden sie über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt.

2.7.7. cDNA Synthese

Vor der cDNA Synthese wurde die RNA zunächst mit RNase freier DNase (Promega, Madison, WI, USA) für 30 min bei 37°C behandelt. Nach Inaktivierung der DNase durch

Inkubation bei 65°C für 10 min wurden 2 µg RNA hitzedenaturiert und 2 µl 10 fach reverse Transkriptase Puffer, 1 µl Didesoxynukleotidmix (25 mM), 1 µl RNasin (RNaseinhibitor; Roche, Mannheim, Deutschland), 1 µl oligo-dT-Primer (250 ng/µl), 1 µl MuLV Reverse Transkriptase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) zugegeben und mit H₂O auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Nach Inkubation für 90 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (67°C, 15 min) gestoppt.

2.7.8. Klonierung

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden diese mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut, die 5'-Phosphatgruppen des Vektors entfernt und nach Gelextraktion beide Fragmente ligiert.

2.7.9. Southern Blot

Nach Elektrophorese wurde das Agarosegel zunächst für 30 min in Denaturierungslösung, anschließend kurz mit H₂O gewaschen und für 30 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Kapillartransfer mit Hilfe von 20 fach SSC Puffer auf eine Nylonmembran geblottet. Die DNA wurde nach dem Transfer durch UV Licht auf der Membran fixiert. Die Prähybridisierung wurde mit Hybridisierungspuffer für 1 h bei 68°C durchgeführt, gefolgt von der Hybridisierung mit der Digoxigenin (DIG)-markierten Sonde im Hybridisierungspuffer über Nacht bei 68°C. Die Sonde wurde mit Hilfe des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben hergestellt. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer I für 5 min bei Raumtemperatur und Waschpuffer II für 15 min bei 68°C wurde die Membran in TBS Puffer äquilibriert. Anschließend wurde sie mit 5% Milchpulver/TBS für 1 h geblockt, für 1 h mit einem Peroxidase konjugierten anti-DIG Antikörper (Roche) inkubiert und viermal mit TBST Puffer gewaschen. Zur Visualisierung wurde ECL Western Blot Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia) eingesetzt.

Denaturierungspuffer 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl

Neutralisierungspuffer 0,5 M Tris/HCl pH 7,5; 3 M NaCl

20 fach SSC 3 M NaCl; 300 mM Natriumcitrat pH 7

Hybridisierungspuffer	5 fach SSC; 1% (w/v) Bocking Reagenz; 0,1% (w/v) N-Laurylsarkosin; 0,02% (w/v) SDS
Waschpuffer I	2 fach SSC; 0,1% SDS
Waschpuffer II	0,1 fach SSC; 0,1% (w/v) SDS
TBS Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8; 150 mM NaCl
TBST Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20

2.7.10. Transformation und Transfektion

2.7.10.1. Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*

Um chemisch kompetente Bakterien herzustellen, wurde 20 ml TYM-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,8 bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Kultur wurde anschließend mit 100 ml TYM verdünnt und bei einer OD_{600} von 0,5 bis 0,9 zu 500 ml TYM gegeben. Bei einer OD_{600} von 0,6 wurde die Kultur auf Eiswasser rasch heruntergekühlt, die Bakterien geerntet und das Pellet in 100 ml kalten Tfb I resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 25 ml kaltem Tfb II aufgenommen und die Bakteriensuspension aliquotiert.

TYM	10 mM $MgSO_4$; 100 mM NaCl; 20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt
Tfb I	30 mM Kaliumacetat; 50 mM $MnCl_2$; 100 mM KCl; 10 m $CaCl_2$; 15% (v/v) Glycerin
Tfb II	10 mM MOPS pH 7,0; 75 mM $CaCl_2$; 10 mM KCl; 15% (v/v) Glycerin

2.7.10.2. Transformation chemisch kompetenter *E.coli*

1 µg des zu amplifizierenden Plasmids oder der zu transformierende Ligationsansatz wurden mit kalten 50 mM CaCl₂ auf 100 µl aufgefüllt und zu 100 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien gegeben. Nach 5 min auf Eis wurde der Ansatz für 1 min auf 37°C gegeben, dann noch einmal für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurde der Ansatz mit 800 µl SOC-Medium aufgefüllt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Teile dieser Bakterienkultur wurden auf antibiotikahaltigen Nährbodenplatten (LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar) ausplattiert und über Nacht kultiviert.

SOB -Medium 20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 2,5 mM KCl;
pH 7 nach autoklavieren 10 ml/l 1 M MgCl₂

SOC-Medium SOB; 20 ml/l 1 M Glukose

LB-Medium 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7

2.7.10.3. Transfektion eukaryontischer Zellen

2.7.10.3.1. Calciumphosphatmethode

10 µg Plasmid-DNA wurde in 250 µl 250 mM CaCl₂ gelöst und unter Schütteln tropfenweise mit 250 µl 2 fach HEBS-Puffer vermischt. Nach 5 - 10 min wurde 3 ml DMEM mit 10% FCS zu der leicht opaleszierenden Lösung gegeben und der Ansatz auf eine 6 cm Schale 50 - 70% konfluenten Zellen ausgebracht. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert und die Zellen eine weitere Nacht kultiviert.

2 fach HEBS 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; 50 mM HEPES pH 7,05

2.7.10.3.2. Elektroporation

Zur Elektroporation wurden 5x10⁶ Zellen, die einen Tag zuvor umgesetzt worden waren, mit Trypsin abgelöst, gewaschen und in 800 µl DMEM aufgenommen. Nachdem 20 µg Plasmid-DNA zugesetzt worden war, wurden die Zellen in eine Elektroporationsküvette mit einem

Durchmesser von 0,4 mm gegeben und mit einer Kapazität von 1200 μF und einer Spannung von 280 V in einem Elektroporator (Easyjec T, EquiBio, England) transfiziert.

2.7.11. Sequenzierung

DNA wurde entweder unter Verwendung des T7 Sequencing Systems (Amersham Pharmacia) und radioaktiv markierten dATP oder eines ABI PRISMTMDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmar) mittels fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Didesoxynukleotiden sequenziert. Die Reaktionen wurden nach den Protokollen der Hersteller durchgeführt.

2.8. Zellbiologische Methoden

2.8.1. Mikroinjektion

Zur Mikroinjektion wurden Zellen für 1-2 Tage auf Glasplättchen kultiviert. Mit Hilfe eines Mikromanipulators (Modell 5170/5242, Eppendorf, Hamburg) wurde den Zellen 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Plasmid-DNA mit einem Druck von 50 hPa und einer Injektionszeit von 0,5 s injiziert. Dazu wurden Femtotips (Eppendorf) als Injektionsnadeln verwendet.

2.8.2. Immunfluoreszenz

2.8.2.1. Durchflußzytometrie

Die für die Durchflußzytometrie bestimmten Zellen wurden mit 1 mM EDTA/PBS abgelöst, mit FACS-Puffer gewaschen und portioniert. Danach wurden sie mit im FACS-Puffer verdünnten Erstantikörper für 30 min auf Eis inkubiert, mehrfach gewaschen und in verdünnten, fluoreszenzfarbstoffmarkierten Zweitantikörper aufgenommen. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde wiederum mehrfach mit FACS-Puffer gewaschen, und die Zellen wurden anschließend in 500 μl FACS-Puffer aufgenommen. Für die entsprechenden Kontrollen wurde statt Erstantikörper nur FACS-Puffer zugesetzt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde Propidiumjodid (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration) zugegeben. Die Auswertung erfolgte am Durchflußzytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA) mit Hilfe der Software Cell Quest (Becton Dickinson).

FACS-Puffer

PBS; 0,03% (w/v) Natriumazid; 0,5% (v/v) FCS

2.8.2.2. Immunfluoreszenz Färbung

Zur Immunfärbung wurden auf Glasplättchen kultivierte Zellen mit PBS gewaschen und für 20 min mit 3% (w/v) Paraformaldehyd/PBS fixiert. Nach Waschen mit PBS wurde noch vorhandenes Paraformaldehyd mit 50 mM Ammoniumchlorid/20 mM Glycin/PBS pH 7,0 für 10 min neutralisiert und im Fall einer intrazellulären Färbung die Zellen mit 0,2% (v/v) Triton X-100/PBS für 10 min permeabilisiert. Nach erneuten Waschen mit PBS wurde mit 0,2% (v/v) Gelatine/PBS für 10 min geblockt und danach für 30 min mit dem Erstantikörper inkubiert. Die Inkubation mit den farbstoffmarkierten Zweitantikörpern erfolgte nach fünfmaligen Waschen mit PBS und erneuten Blocken für 30 min im Dunkeln. Nachdem die Zellen wiederum fünfmal gewaschen wurden, wurde das Präparat in Histosafe (Camon, Wiesbaden) auf einem Objektträger eingebettet.

2.8.3. Zellfraktionierung

2.8.3.1. Membranfraktionierung

Zur Membranfraktionierung wurden die zu untersuchenden Zellen geerntet, mit PBS gewaschen, in 500 µl hypotonischen Puffer aufgenommen und durch fünfzehnmaliges Auf- und Abziehen mit einer Spritze (25 G Kanüle) auf Eis aufgeschlossen. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 1.000 g, 10 min, 4°C entfernt. Zur Entfernung der Membrantrümmer wurde für 10 min bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert. Die Zytoplasmafraktion im Überstand wurde für die Immunpräzipitation mit 50 µl 10% (v/v) NP-40 und 20 µl 5 M NaCl versetzt. Das Pellet wurde mit hypotonischen Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Immunpräzipitation wurde das Pellet in Lysepuffer aufgenommen.

hypotonischer Puffer 10 mM HEPES; 10 mM KCl; 10 mM MgCl₂; pH 7,6

2.8.3.2. Mikrosomenpräparation

Zur Mikrosomenpräparation wurden Zellen geerntet, gewaschen und in 1 ml Lysepuffer ohne NP-40 (20 mM Tris/HCl pH 7,6; 140 mM NaCl; 5 mM MgCl₂) aufgenommen. Mittels Kugelhomonisator wurden die Zellen geschert und Zellkerne und Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 1.000 g) entfernt. Die Mikrosomen wurden entweder weiter aufgereinigt oder zur Proteinase K-Behandlung für 1 h bei 4°C und 100.000 g pelletiert. Das

Pellet wurde in 500 µl Lysispuffer gelöst, 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) und gegebenenfalls NP40 (1 % (v/v)) zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Verdau wurde durch Zupipettieren eines Inhibitorcocktails (Protease Inhibitor Cocktail Set I, Calbiochem) beendet und anschließend die Immunpräzipitation durchgeführt.

2.8.3.3. Mikrosomenaufreinigung

Die Mikrosomenpräparation wurde zur weiteren Aufreinigung mit Hilfe eines Refraktometers auf einen Zuckergehalt von 1,2 M Saccharose eingestellt. 4 ml dieser Probelösung wurden anschließend mit 3 ml 1,1 M Saccharose und 2 ml 1,0 M Saccharose überschichtet und das Röhrchen mit 0,5 M Saccharose aufgefüllt. Der „*flow-up*“-Gradient wurde für 2 h bei 4°C und 100.000 g zentrifugiert und die sichtbaren Mikrosomenbanden abgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.8.4. Proteasomenassay

Zur *in vitro*-Darstellung des Transports aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma und die nachfolgende Degradation durch die Proteasomen wurden 40 µl aufgereinigte Mikrosomen mit 5 µl eines 10-fach ATP-regenerierenden Puffersystems und 5 µl aufgereinigten 26S Proteasomen versetzt und bei 37°C unter leichten Schütteln inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden aus diesen Ansätzen Proben entnommen und im Western Blot auf die Menge des spezifischen Proteins getestet.

50-fach ATP-regenerierender Puffer	50 mM ATP; 2,5 mM GDP-Mannose; 0,57 g/ml Creatin-Phosphat; 10 mg/ml Creatin-Phosphokinase in TEA-Puffer
------------------------------------	---

TEA-Puffer	50 mM Trisethanolamin pH 7,5
------------	------------------------------

2.9. Gelelektrophoresen

2.9.1. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Gele aus Agarose (GibcoBRL) verwendet, deren Konzentration nach der Größe der zu trennenden Fragmente variierte. Als Lauf- und als Agaroselösungspuffer diente TAE-Puffer, der mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurde.

Nach Lauf in einer Horizontalgelapparatur (Universitätswerkstatt Heidelberg/Biorad, Hercules, CA, USA) wurde die DNA mit UV-Licht sichtbar gemacht und durch Photographieren dokumentiert (Eagle Eye II, Stratagene).

10 fach TAE-Puffer 0,4 M Tris; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; pH 7,6

2.9.2. Polyacrylamidgelelektrophorese

2.9.2.1. SDS-PAGE

Proteine wurden in einem denaturierenden, diskontinuierlichen Elektrophoresesystem aufgetrennt (Maniatis). Die Acrylamidkonzentrationen des Trenngels orientierten sich an der Größe der zu trennenden Proteine. Die Auftrennung erfolgte in einem Vertikalkammersystem (Renner GmbH, Darmstadt, Deutschland). Gradientengele wurden mit einem Gradientenmischer (GibcoBRL) in den angegebenen Acrylamid-Konzentrationen hergestellt.

2.9.2.2. Sequenzgel

Die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzreaktionsprodukte erfolgte auf vertikalen, denaturierenden, 6 %igen Polyacrylamidgelen. Die Elektrophorese wurde in einem TBE-Puffersystem durchgeführt. Nach 45 min Präelektrophorese bei 80 Watt wurden 4 µl der Proben in die Probentasche aufgetragen. Die Auftrennung der Proben fand bei 60 - 100 W statt, die Lauflänge betrug 2 - 4 Stunden. Das Gel wurde fixiert und bei 80°C für 2 h unter Vakuum getrocknet und über Nacht auf einem Röntgenfilm exponiert.

Bei der Sequenziermethode unter Verwendung von fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Nukleotiden wurde die Elektrophorese auf einem ABI Perkin Elmer 377 Sequenzierautomaten durchgeführt und die Reaktion mit Hilfe der ABI PRISM Navigator/DNA Sequencing Software ausgewertet.

Acrylamid-Stammlösung 6% Acrylamid (w/v); 0,3% N', N-Methylen-Bis-Acrylamid
(w/v); 42% Harnstoff (w/v) in TBE pH 8,3

10 fach TBE-Puffer 0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 25 mM EDTA

3. Ergebnisse

3.1. Proteasomale Degradation von Env

3.1.1. Lokalisation des HIV-1 Env-Glykoproteins

Um das zelluläre Kompartiment zu bestimmen, in dem das gp160 im „steady-state“ akkumuliert ist, wurden Hela Zellen mit einem für Env kodierenden Plasmid, bei dem der Kodongebrauch bei gleichbleibender Proteinsequenz verändert wurde, mikroinjiziert und anschließend mit einem Env-spezifischen Antikörper angefärbt. Die Zellen wurden im permeabilisierten Zustand mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht. Der überwiegende Anteil von Env kolokalisiert mit Calnexin, einem ER-residenten Chaperon. Eine Lokalisation an der Zell-oberfläche konnte in permeabilisierten Zellen nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte ohne Permeabilisierung der mikroinjizierten Zellen eine geringe Menge von Env kolokalisierend mit MHC Klasse I auch an der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 3.1). Daher kann davon ausgegangen werden, daß der überwiegende Anteil von Env im ER lokalisiert und nur ein geringer Teil weiter zur Zelloberfläche transportiert wird.

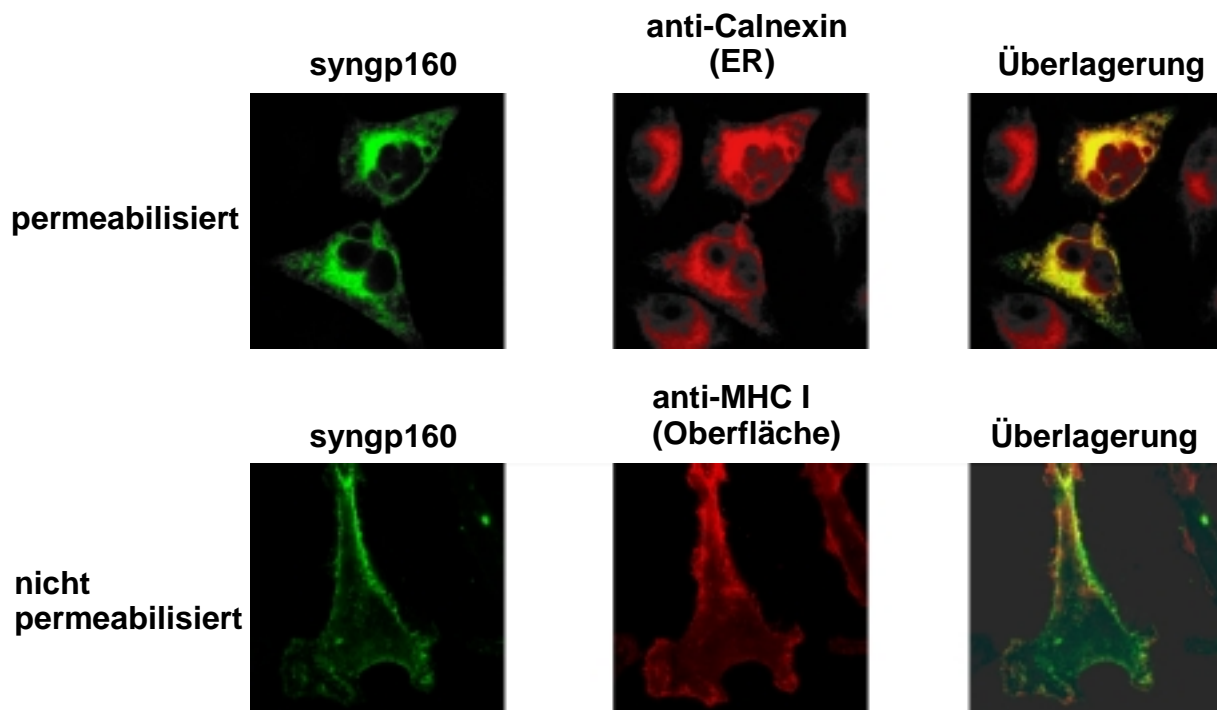


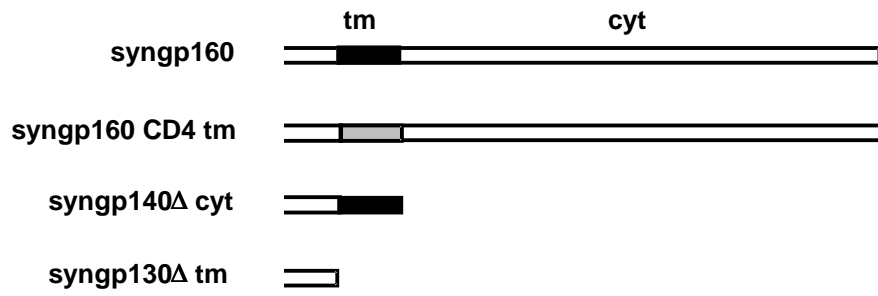
Abb. 3.1: Immunfluoreszenz *env* exprimierender Zellen

Hela Zellen wurden mit Env mikroinjiziert und mit primären Antikörpern gegen Env, Calnexin und MHC Klasse I und sekundären FITC- und Texas Red-konjugierten Antikörpern gefärbt. Zur Permeabilisierung wurde 0,2% Triton X-100 eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch konfokale Laserscanning

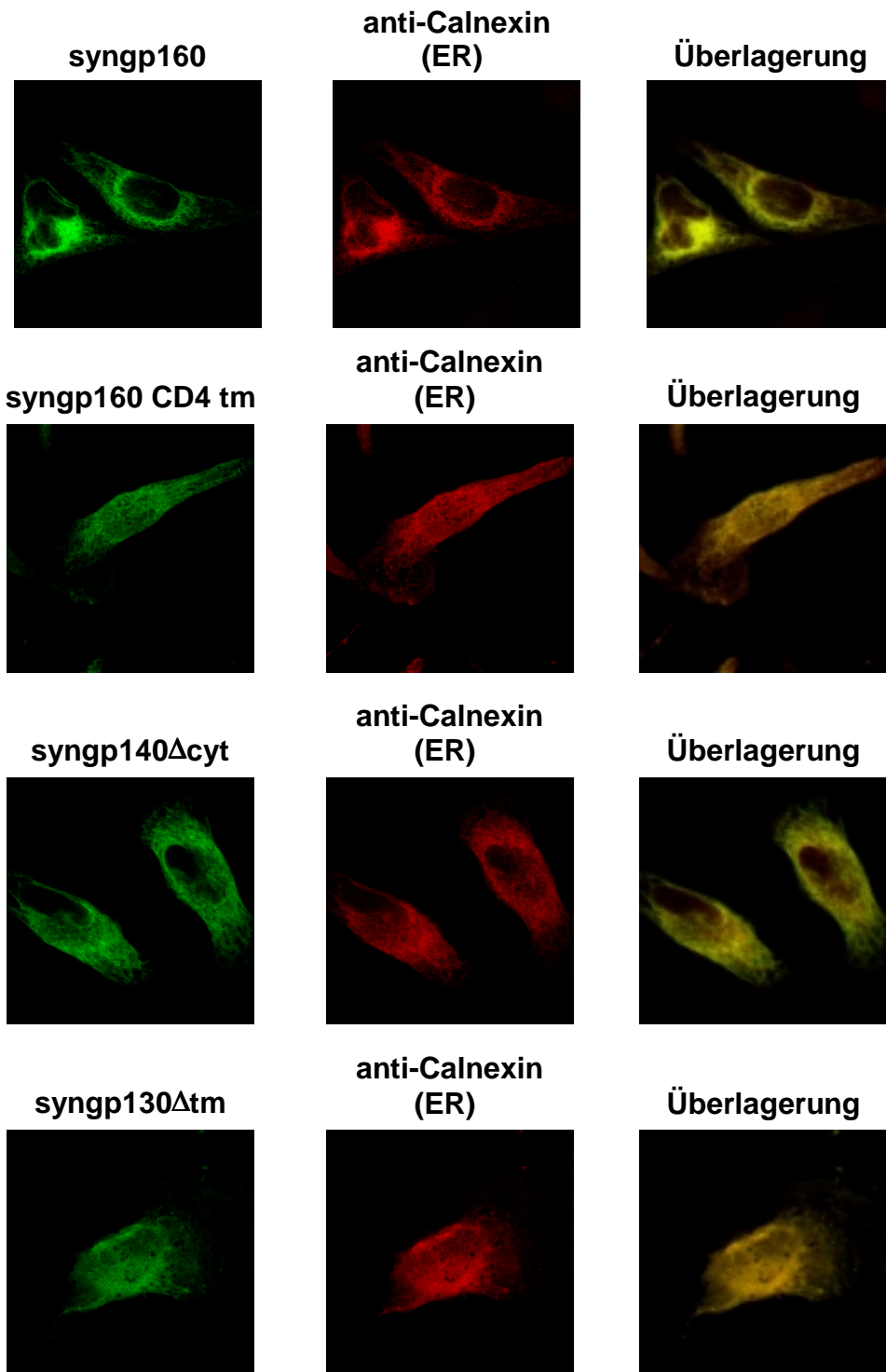
Um die Frage zu klären, ob der zytoplasmatische Anteil oder die Transmembrandomäne ursächlich für die ER-Akkumulation ist, wurde die zytoplasmatische Domäne (syngp140 Δ cyt) und die Transmembrandomäne (syngp130 Δ tm) deletiert oder die Transmembranregion gegen diejenige von CD4 (syngp160 CD4 tm) ausgetauscht (Abb. 3.2). Keine der vorgenommenen Mutationen hatte jedoch einen Einfluß auf die „*steady-state*“-Lokalisation der entsprechenden Proteine im Vergleich zum nicht deletierten Env.

-Mikroskopie. Das für Env kodierende Plasmid beruhte auf einer synthetischen, kodonoptimierter *env*-Sequenz (syngp160) (Abb. 3.20).

a



b



Die Akkumulation des größten Teils von Env konnte biochemisch mittels Verdau mit dem Enzym Endoglykosidase H gezeigt werden, das N-Glykane des Mannosetyps hydrolysiert und so eine Unterscheidung zwischen ER-ständigen, sensitiven und weitertransportierten, resistenten Proteinen ermöglicht. Dazu wurden in einem „*pulse-chase*“ Experiment transient transfizierte Zellen radioaktiv markiert und für unterschiedliche Zeiten mit nicht radioaktivem Medium inkubiert. Die Zell-Lysate wurden mit einem anti-Env spezifischen Antiserum präzipitiert und mit Endo H behandelt. Auch nach 24 Stunden konnte keine relevante Menge der Endo H-resistenten Form von gp160 detektiert werden. Weiterhin findet man im Vergleich zur gp160 Menge kaum gp120, das im Golgi Kompartiment aus dem Vorläuferprotein gp160 gebildet wird. Da die Prozessierung durch eine zelluläre Furinprotease im Golgi Kompartiment erfolgt, wird folglich nur ein geringer Anteil von Env aus dem ER heraus zur Zelloberfläche transportiert (Abb. 3.3).

Das Chaperon Calnexin bindet im endoplasmatischen Retikulum an Glykoproteine und ist an der Proteinfaltung und der Qualitätskontrolle beteiligt. Die transiente Bindung von gp160 an dieses ER-membranständige Chaperon wurde bereits beschrieben (Otteken and Moss, 1996; Li et al., 1996). Um die Frage zu klären, ob unter den gewählten Bedingungen Calnexin und gp160 nicht nur kolokalisieren sondern auch interagieren, und ob die ER Akkumulation von gp160 mit einer zeitlich ausgedehnten Interaktion mit Calnexin einhergeht, wurde ein „*pulse-chase*“ Experiment durchgeführt. Dazu wurden transient transfizierte Zellen radioaktiv markiert, anschließend in Medium ohne Radioaktivität überführt und zu definierten Zeitpunkten lysiert. Das Lysat wurde mit einem anti-Calnexin Antikörper präzipitiert und das Präzipitat nachfolgend mit einem anti-Env spezifischen Antiserum repräzipitiert (Abb. 3.3). Die Bindung zwischen gp160 und Calnexin hatte ihr Maximum nach einer Stunde und nahm danach sukzessive ab. Eine Interaktion war auch nach 12 Stunden noch detektierbar.

Die Spezifität der Bindung zwischen Calnexin und gp160 konnte durch das in Abbildung 3.11 dargestellte Experiment gezeigt werden, da das ebenfalls membranständige, ER-residente Tap, das nicht mit gp160 interagiert, nicht kopräzipitiert werden konnte.

Abb. 3.2: Immunfluoreszenz von Env-Mutanten

Hela Zellen wurden mit mutierten *env* Konstrukten mikroinjiziert und nach Permeabilisierung mit primären Antikörpern gegen Env und Calnexin und sekundären FITC- und Texas Red-konjugierten Antikörpern gefärbt. Die Analyse erfolgte durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie. Das für Env kodierende Plasmid beruhte auf einer synthetischen, kodonoptimierter *env*-Sequenz (Abb. 3.20).

(a) Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. **(b)** Immunfluoreszenzaufnahmen

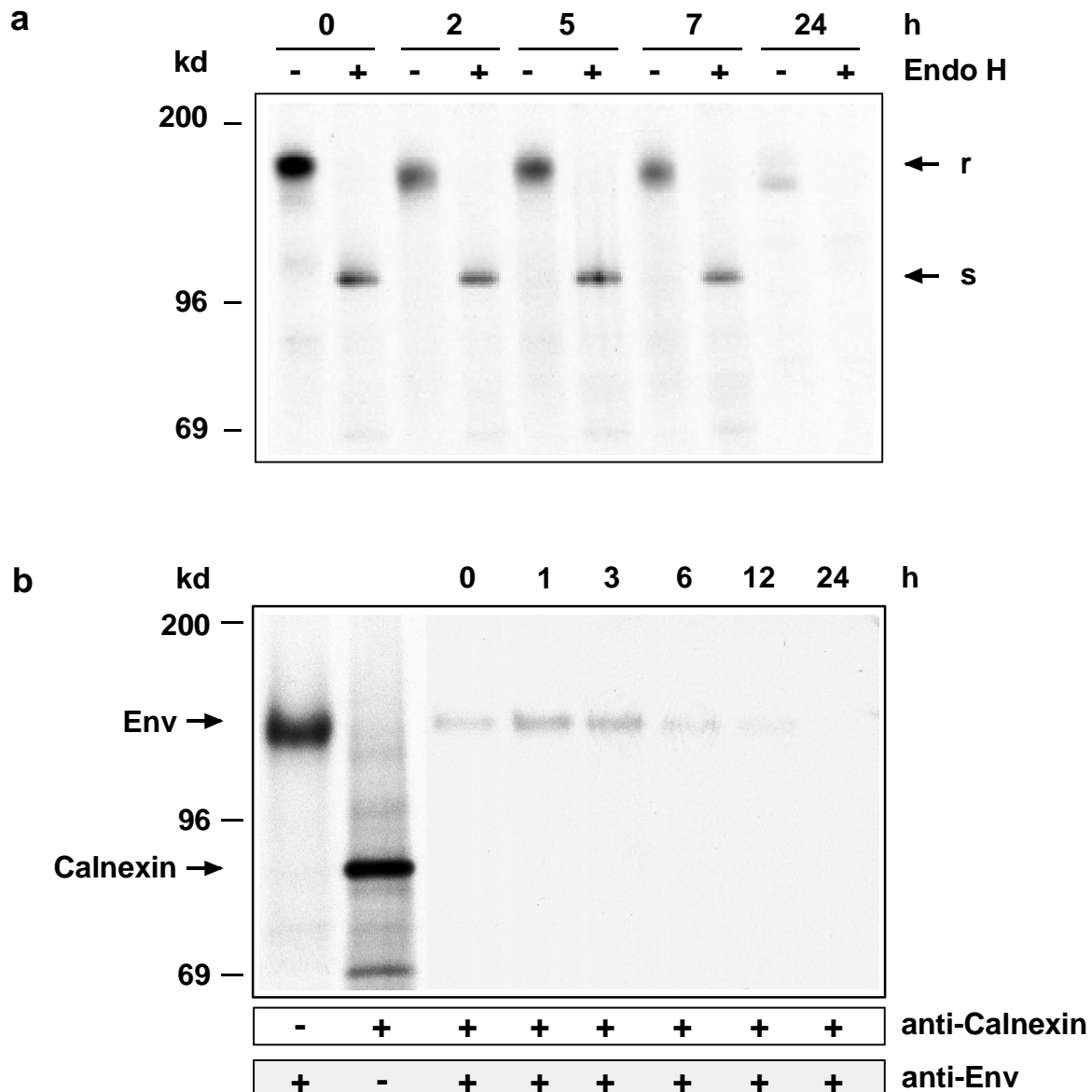


Abb. 3.3: **Biochemische Charakterisierung der Env-Retention im ER**

(a) Kinetik der Endo H-Sensitivität von Env. Transient transfizierte 293T Zellen wurden für 1 h metabolisch markiert und anschließend für die angegebenen Zeiten in nicht radioaktivem Medium inkubiert. Die Zell-Lysate wurden mit einem anti-Env spezifischen Antikörper präzipitiert, die Präzipitate aufgeteilt und mit oder zur Kontrolle ohne Endo H inkubiert. Mit r wurden die EndoH-resistenten mit s die sensitiven bezeichnet. **(b)** Kinetik der Env-Calnexin Interaktion. Transient transfizierte Zellen wurden für 1 h metabolisch markiert und für die angegebenen Zeiten in kaltem Medium inkubiert. Die Lysate wurden sequentiell mit einem anti-Calnexin Antikörper und anschließend mit einem anti-Env Serum präzipitiert.

3.1.2. Ubiquitinierung des Env-Glykoproteins

Die wichtigste Funktion von Proteinen mit Ubiquitinresten ist die Markierung für die proteasomale Degradation. Da die überwiegende Menge an Env im ER lokalisiert ist und damit eine lysosomale Degradation ohne Durchlaufen des Golgi Kompartments als

unwahrscheinlich erscheint, wurde durch Repräzipitationsexperimente nach radioaktiver Markierung von transient transfizierter Zellen getestet, ob in diesen Zellen ubiquitiniertes Env nachweisbar ist. Dazu wurde zuerst mit einem anti-Env spezifischen Antiserum präzipitiert und anschließend das erhaltene Präzipitat mit drei verschiedenen anti-Ubiquitin Antikörpern repräzipitiert (Abb. 3.4). Mit jedem dieser Antikörper konnte gp160 repräzipitiert werden, so daß von einer spezifischen Reaktion und nicht von Kreuzreaktivität ausgegangen werden kann. Dies konnte auch dadurch bestätigt werden, daß weder die Reihenfolge der zur sequentiellen Präzipitation eingesetzten Antikörper einen Einfluß hatte, noch daß ein Repräzipitat gefunden wurde, wenn einer der Antikörper durch ein unspezifisches Antiserum ersetzt wurde.

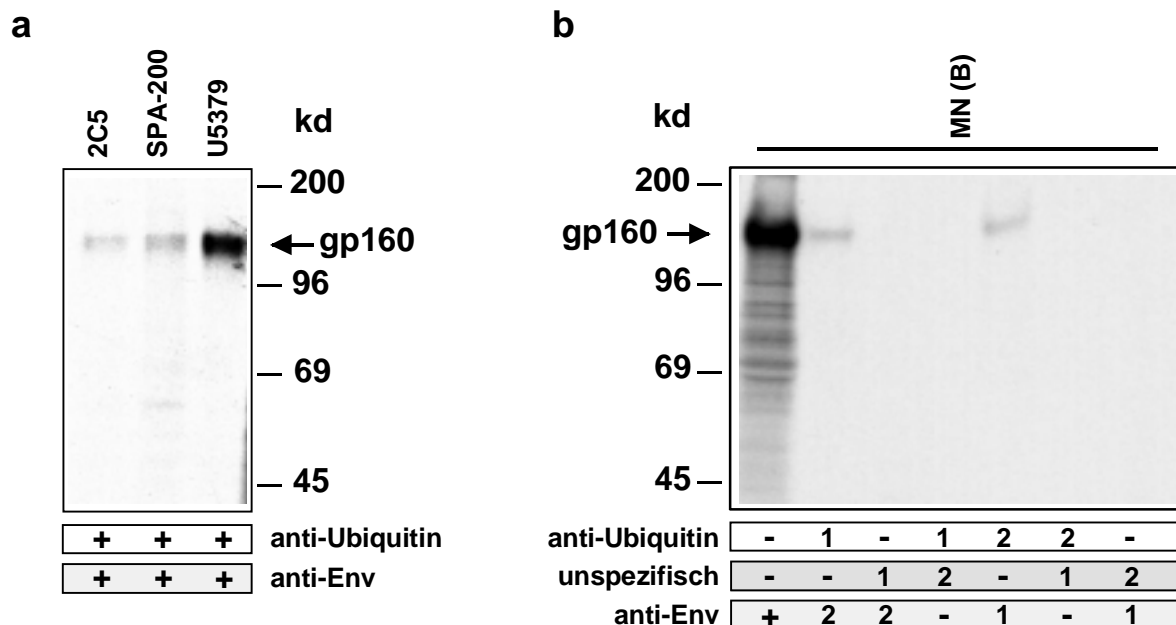


Abb. 3.4: Ubiquitinierung von Env

(a) Sequentielle Präzipitation von Env-Protein nach metabolischer Markierung aus transient transfizierten 293T Zellen mit dem anti-Ubiquitin Antikörper 2C5 (Calbiochem) und den anti-Ubiquitin Antiseren SPA-200 (Stressgen) sowie U5379 (Sigma) und nachfolgend mit einem anti-Env Antiserum (95-B-2). (b) Sequentielle Präzipitation aus Lysaten Env-exprimierender transient transfizierter Zellen mittels anti-Ubiquitin Antiserum (U5379), anti-Env Antiserum (95-B-2) und einem unspezifischen Serum in unterschiedlicher Reihenfolge. Die Zahlen geben die verwendete Reihenfolge an.

Die nicht subtyp-spezifische Ubiquitinierung konnte anhand von insgesamt 4 Glykoproteinen der Subtypen A, B und C gezeigt werden (Abb. 3.5). Das Env Glykoprotein jedes dieser Isolate konnte mit dem anti-Ubiquitin Antikörper U5379 repräzipitiert werden, wobei auch das Expressionssystem - Expression nach transienter Transfektion oder nach Infektion mit

rekombinanten Vaccinia Viren - keinen Einfluß auf die Ubiquitinierung hatte.

Da das exakte Molekulargewicht aufgrund der Glykosylierung des Env-Proteins schwer zu bestimmen ist, konnte keine große Differenz zwischen dem gesamten Glykoprotein und der ubiquitinierten Form festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, daß nur ein Ubiquitinmolekül (8,4 kD) angefügt wird. Um die Anzahl der assoziierten Ubiquitinreste exakter zu bestimmen, wurden die Präzipitate mit der Endoglykosidase PNGase F inkubiert, mit der alle Zuckereinheiten entfernt werden können (Abb. 3.5). Ein Größenunterschied von etwa 8,5 kD konnte zwischen der deglykosylierten Form des Gesamtproteins und des ubiquitinierten festgestellt werden. Innerhalb des deglykosylierten Gesamtproteins konnte keine ubiquitinierte Form detektiert werden, was die im Vergleich zum Gesamtprotein geringe Menge an ubiquitiniertem Env-Glykoprotein widerspiegelt.

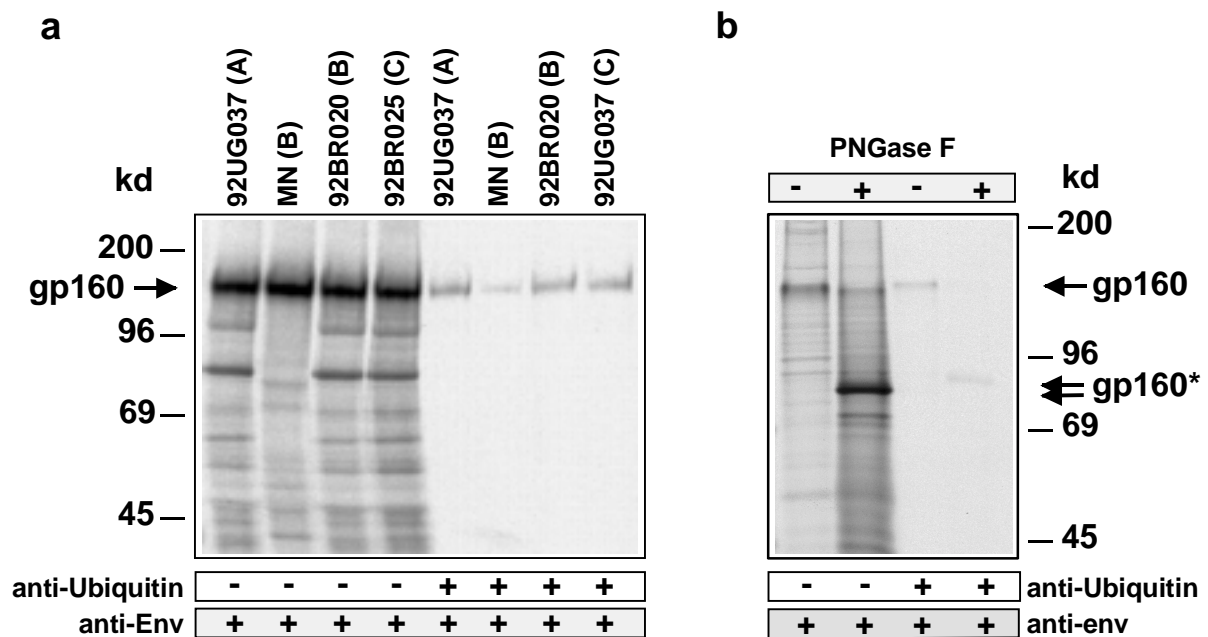


Abb. 3.5: Test auf Subtypspezifität der Ubiquitinierung und Anzahl der konjugierten Ubiquitinreste

(a) 293T Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia Viren infiziert, die Env der Subtypen A (92UG037), B (92BR020) und C (92BR025) exprimieren, oder transient mit einem Env-exprimierenden Plasmid (MN, Subtyp B) transfiziert. Nach radioaktiver Markierung wurden die Zell-Lysate mit einem anti-Env Antiserum (95-B-2) oder sequentiell mit einem anti-Ubiquitin Antiserum (U5379) und 95-B-2 präzipitiert. (b) Nach metabolischer Markierung wurde mit dem anti-Env Antiserum 95-B-2 oder sequentiell mit dem anti-Ubiquitin Antiserum U5379 und mit dem anti-Env Antiserum 95-B-2 präzipitiert, die Präzipitate geteilt und mit der Glykosidase PNGase F (gp160*) behandelt.

Da die zu degradierenden Proteine aus dem ER ins Zytoplasma zurücktransportiert werden, wurde durch Zellfraktionierung getestet, ob ubiquitiniertes Env membranassoziiert ist oder im

Ergebnisse

Zytoplasma gefunden werden kann (Abb. 3.6). Dazu wurden transient transfizierte Zellen metabolisch mit [³⁵S]-Methionin/Cystein für eine Stunde markiert und danach für 0 und 5 Stunden in nicht radioaktivem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen und durch Zentrifugation in Membran- und Zytoplasmafraktion getrennt. Sowohl nach 0 als auch nach 5 Stunden „chase“ konnte die ubiquitinierte Form von gp160 nur in der Membranfraktion, aber nicht im Zytoplasma nachgewiesen werden, so daß das ubiquitinierte Env membranständig oder zumindest membranassoziiert bleibt und nicht in einer löslichen Form im Zytoplasma vorkommt. Als Kontrolle für eine saubere Fraktionierung wurden beide Fraktionen auf das Vorhandensein von MHC Klasse I durch Präzipitation mit einem MHC Klasse I-spezifischen Antikörper getestet. MHC Klasse I konnte nur in der Membranfraktion nachgewiesen werden, was für eine korrekte Trennung der Fraktionen spricht. Zugabe von Lactacystin erhöhte sowohl die Menge des gesamten Env Glykoproteins, als auch an ubiquitinierten Env nach 0 und nach 5 Stunden, wobei auch nach Inhibition der Proteasomen durch den spezifischen Inhibitor Lactacystin keine Anreicherung von Env im Zytoplasma nachgewiesen werden konnte.

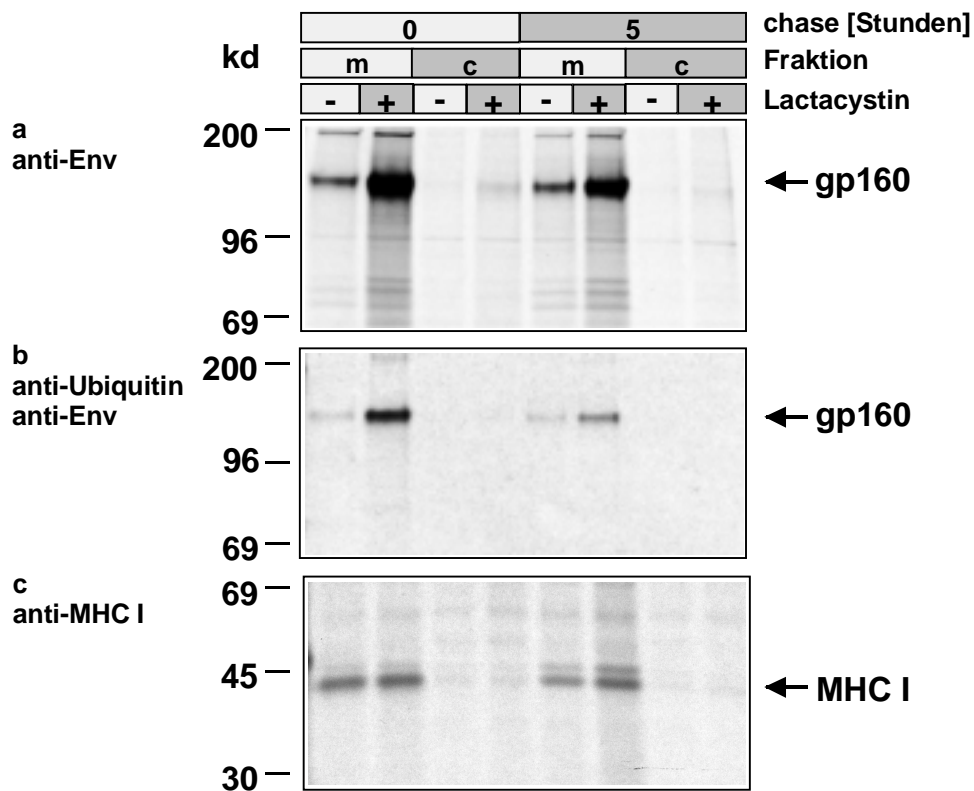


Abb. 3.6: Zelluläre Fraktionierung Env-exprimierender Zellen

Transient mit Env transfizierte 293T Zellen wurden für eine Stunde radioaktiv mit [³⁵S]-Cystein/Methionin markiert und für 0 und 5 Stunden in Medium ohne Radioaktivität überführt.

Ubiquitin wird in der Regel an freie Aminogruppen von Lysinresten oder an den Amino-terminus von Proteinen gehängt. Um zu bestimmen, in welchem Bereich Env ubiquitiniert wird, wurden C-terminale Env-Deletionsmutanten nach metabolischer Markierung durch sequentielle Präzipitation mittels anti-Ubiquitin und anti-Env spezifischen Antikörpern auf ubiquitinierte Formen getestet (Abb. 3.7). Ubiquitinierung konnte bei Env (gp160), nach Deletion des zytoplasmatischen Anteils (gp140 Δ cyt) und nach weiterer Deletion der Transmembrandomäne (gp130 Δ tm) detektiert werden, aber nicht nach Expression von gp120. Dies impliziert, daß Env im luminalen Anteil des gp41 ubiquitiniert wird. Um diesen Befund zu bestätigen, wurden Mikrosomen von Env-exprimierenden Zellen isoliert und mit Proteinase K behandelt, so daß die zytoplasmatische Domäne abgedaut wird, während der luminaler Anteil durch die ER Membran geschützt bleibt. Ubiquitiniertes Env konnte sowohl in unbehandelten Mikrosomen als auch nach Inkubation mit der Protease präzipitiert werden und hatte in beiden Fällen ein Molekulargewicht im Bereich des nicht ubiquitinierten Env. Daher wurden bei beiden Formen nur der zytoplasmatische Anteil abgedaut. Die vollständige Entfernung der zytoplasmatischen Domäne durch die Proteinase K-Behandlung konnte durch Western Blot-Analyse mit Hilfe eines Antikörpers gezeigt werden, dessen Epitop im proximalen Bereich der zytoplasmatischen Domäne liegt (Abb. 3.7 d).

Lactacystin (5 μ M) wurde bereits eine Stunde vor Markierung zugegeben und war sowohl während der „pulse“- als auch „chase“-Zeiten anwesend. Die Zellen wurden in hypotonischem Puffer aufgenommen, mittels mehrfachen Pressen durch eine 25 G Kanüle aufgeschlossen und durch Zentrifugation (20.000 g, 15 min) in Membran- und Zytoplasmafraktion getrennt. Die Fraktionen wurden lysiert, die Lysate geteilt und **(a)** mit dem anti-Env Antiserum 95-B-2 präzipitiert, **(b)** mit dem anti-Ubiquitin Antiserum U5379 und mit dem anti-Env Antiserum 95-B-2 sequentiell präzipitiert oder **(c)** mit einem monoklonalen Antikörper gegen MHC Klasse I (W6/32) präzipitiert.

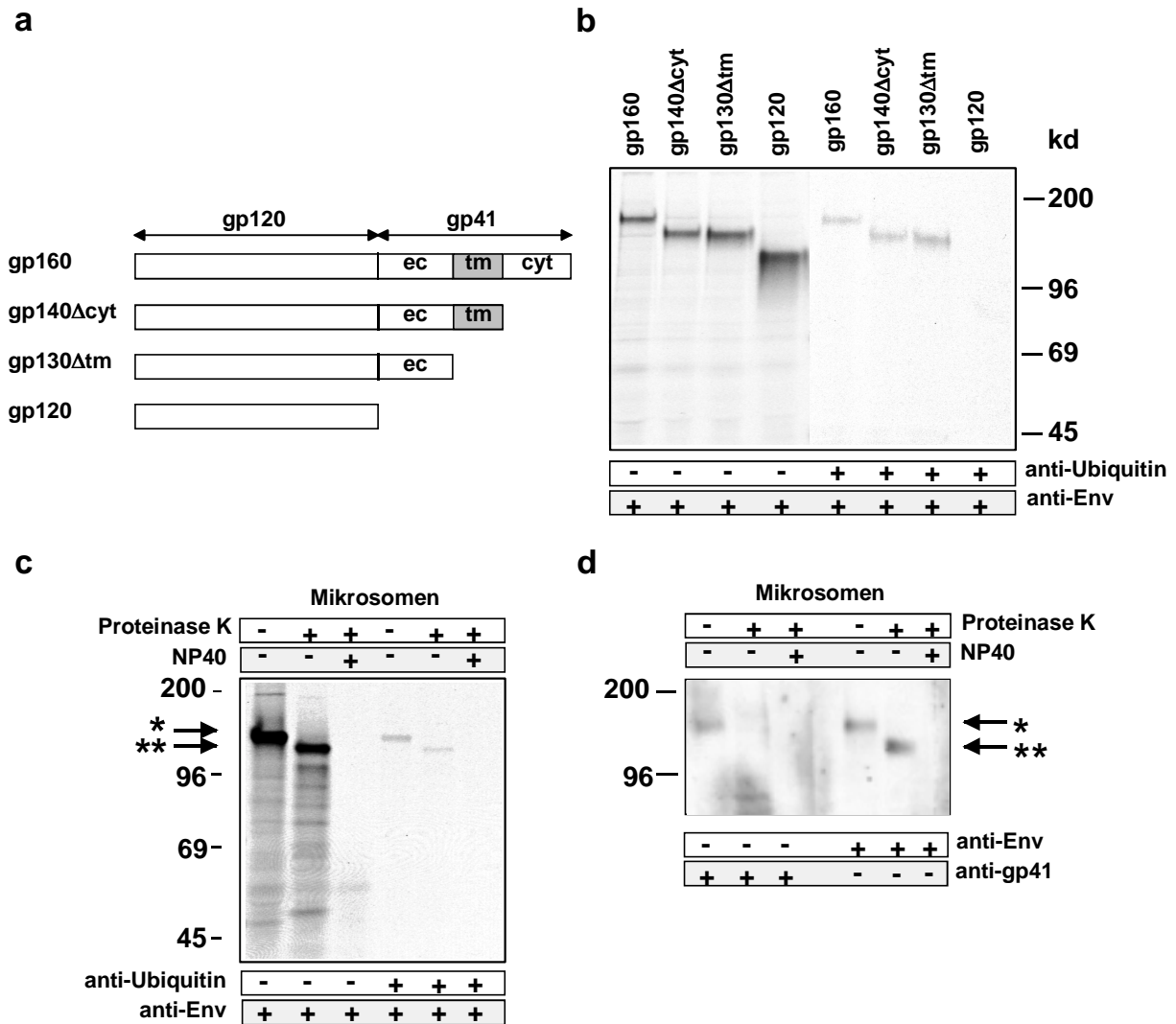


Abb. 3.7: Ubiquitinierung von Env-Verkürzungsmutanten

(a) Schematische Darstellung der verwendeten Env Deletionsmutanten. (b) Die Env-Verkürzungsmutanten wurden transient in 293T Zellen transfiziert, radioaktiv markiert und mit dem anti-Env Antiserum 95-B-2 oder sequentiell mit dem anti-Ubiquitin Antiserum U5379 und mit 95-B-2 präzipitiert. (c) Mikrosomen wurden aus transient mit *env* transfizierten, metabolisch markierten 293T Zellen isoliert und Env ohne (*) oder nach Proteinease K Behandlung (0,4 mg/ml Endkonzentration) (**) mit dem anti-Env Antiserum 95-B-2 oder sequentiell mit dem anti-Ubiquitin Antiserum U5379 und 95-B-2 präzipitiert. (d) Die identischen Proben wurden im Western Blot mit Hilfe des anti-Env Antiserums 95-B-2 oder des monoklonalen anti-gp41 Antikörpers 1577, der den zytoplasmatischen Anteil erkennt, analysiert.

Zum Nachweis der Ubiquitinierung von Env in HIV-infizierten Zellen wurde mittels metabolischer Markierung von mit HIV-1 MN und HIV-1 MvP 899 Zellen überprüft (Abb. 3.8). Nach Präzipitation mit anti-Ubiquitin und anti-Env Antikörpern konnte bei beiden Virusisolaten ubiquitiniertes gp160, nicht jedoch gp120 oder gp41 gefunden werden, konsistent mit den Befunden der Deletionskonstrukte (Abb. 3.13). Dies zeigte, daß die bisherigen Ergebnisse nicht auf einem Artefakt aufgrund der verwendeten Expressionssysteme

(Transfektion, Vaccinia-Infektion) beruhen, sondern daß eine Ubiquitinierung von Env auch in infizierten Zellen nachweisbar ist.

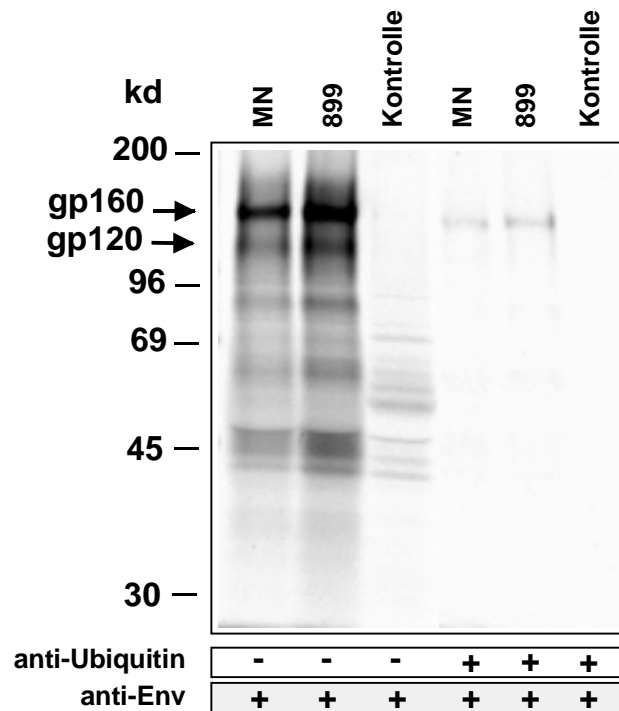


Abb. 3.8: **Ubiquitinierung in HIV-1 infizierten Zellen**

C8166 Zellen wurden entweder mit HIV-1 MN oder mit HIV-1 MvP 899 infiziert und metabolisch für 15 Stunden mit [³⁵S]-Cystein/Methionin markiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und mit dem anti-Env Antiserum 95-B-2 oder sequentiell mit dem anti-Ubiquitin Antiserum U5379 und mit 95-B-2 präzipitiert.

3.1.3. Proteasomale Degradation

Ein Großteil von Env wird im ER retentiert und nachfolgend degradiert. Um die Halbwertszeit von gp160 zu bestimmen, wurde ein „pulse-chase“ Experiment über 20 h durchgeführt (Abb.3.9). Anhand der ermittelten Bandenintensitäten konnte die Halbwertszeit von Env mit etwa 2,5 h ermittelt werden. Da das Ubiquitin/Proteasomensystem als Weg der Degradation ER-ständiger oder ER-retentierter Proteine identifiziert worden ist, wurde der Einfluß des spezifischen Proteasomeninhibitors Lactacystin auf die Halbwertszeit getestet. Durch Zugabe des Inhibitors konnte eine Verdopplung der Halbwertszeit auf etwa 5 h erreicht werden, so daß man davon ausgehen kann, daß *in vivo* ein Teil von gp160 durch Proteasomen degradiert wird.

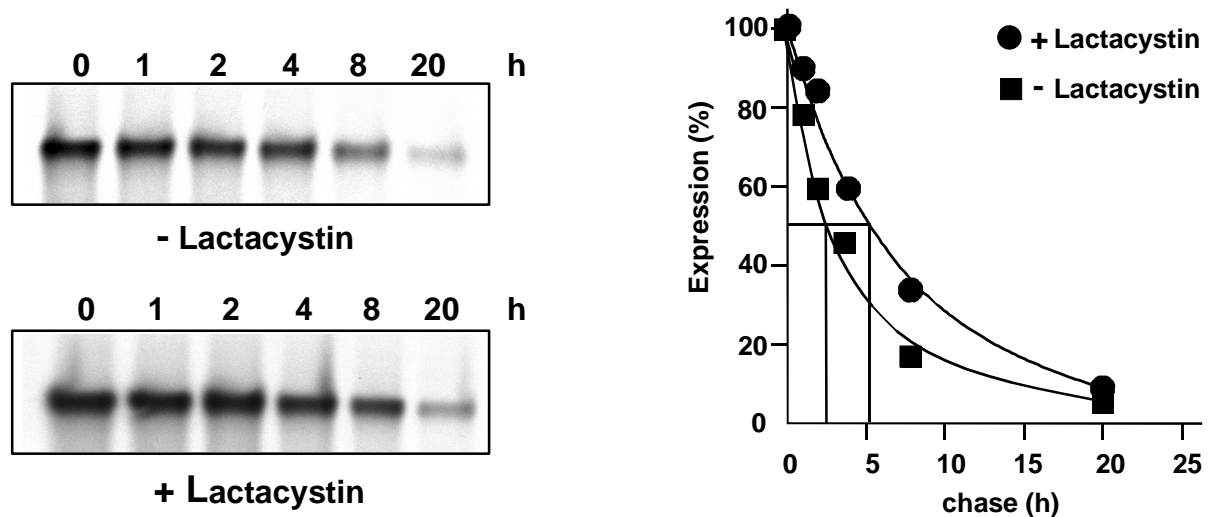


Abb. 3.9: **Halbwertszeitbestimmung**

Transient transfizierte 293T Zellen wurden für 1 h mit [35 S]-Cys/Met markiert und für 0 - 20 Stunden ohne Radioaktivität inkubiert. Lactacystin wurde 1 Stunde sowohl vor und während der Markierungsphase als auch während des „chase“ in einer Endkonzentration von 2 μ M eingesetzt.

Um diesen Befund zu bestätigen, wurde die proteasomale Degradation *in vitro* untersucht. Dazu wurden Mikrosomen von transient mit *env* transfizierten Zellen durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und mit aufgereinigten 26S Proteasomen in einem ATP-regenerierenden Puffersystem mit und ohne Inhibitor inkubiert (Abb. 3.10). Um die Stabilität und die Abwesenheit von Proteasen zu testen, wurden in einem Kontrollansatz keine Proteasomen zugesetzt. Die Proben wurden in einem Western Blot mit Hilfe von anti-Env und anti-Calnexin Antikörpern analysiert. Während die Calnexinmenge im untersuchten Zeitraum von 5 h nahezu gleich blieb, konnte bei gp160 nach Zugabe von 26S Proteasomen eine Reduktion auf etwa 30% festgestellt werden. Diese Degradation konnte durch Inkubation mit dem Proteasomeninhibitor MG132, der nicht wie Lactacystin durch zelluläre Modifikation aktiviert werden muß, verhindert werden.

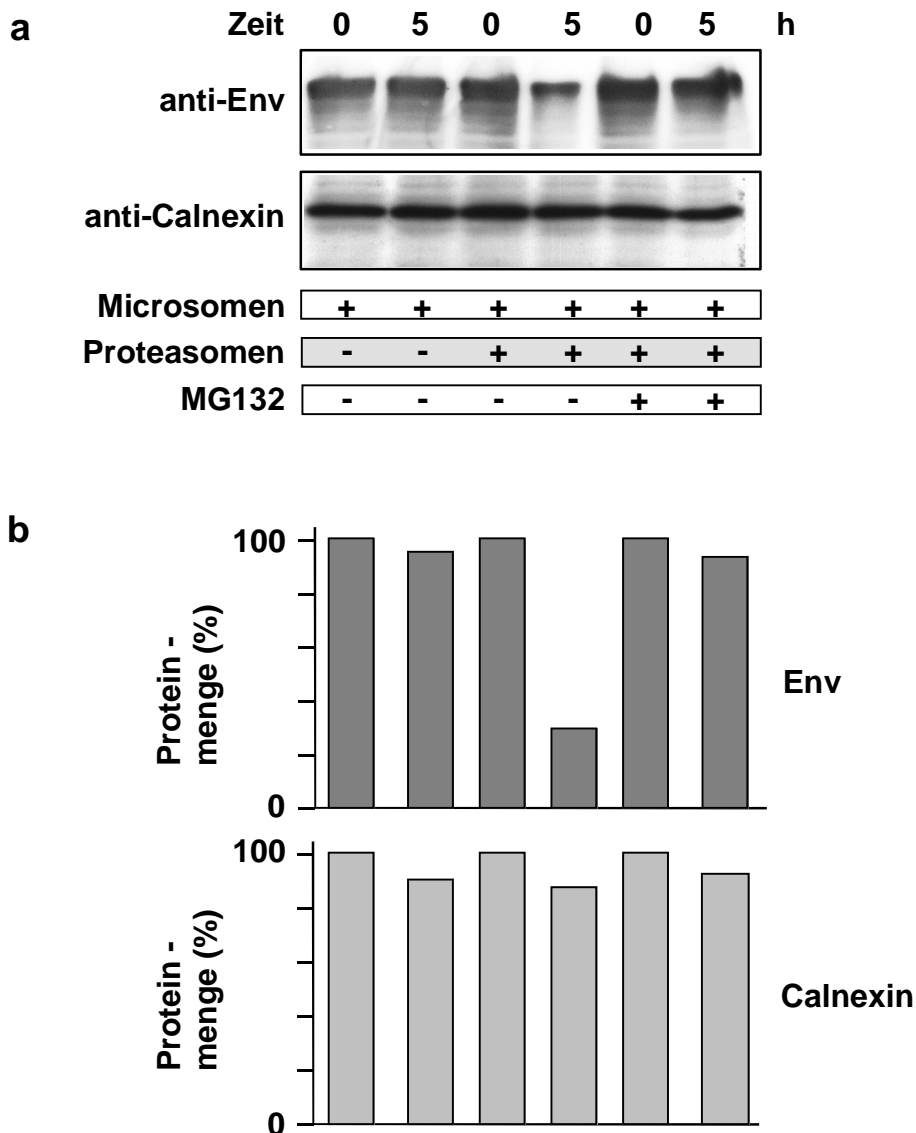


Abb. 3.10: *in vitro*-Test auf proteasomale Degradation von Env

(a) Mikrosomen transient transfizierter 293T Zellen wurden mit aufgereinigten 26S Proteasomen für die angegebenen Zeiten in Gegenwart oder ohne den proteasomalen Inhibitor MG132 (20 μ M Endkonzentration) inkubiert und anschließend durch Western Blot mittels anti-Calnexin Antikörper und anti-Env Antiserum analysiert. (b) Quantitative Analyse des *in vitro* Degradationsexperiments. Zur Auswertung wurde der Western Blot eingescannt und die Bandenintensitäten mit Hilfe der Eagle Sight Software (Stratagen, La Jolla, CA, USA) quantifiziert.

3.1.4. Sec61p-Assoziation von Env

Da der proteasomale Abbau im Zytoplasma oder an der zytosolischen Seite des ER stattfindet, muß das zu degradierende Protein von der luminalen zur zytosolischen Seite des ER transportiert werden. Der Export erfolgt über den Sec61-Membranporenkomplex, über den auch Proteine importiert werden. Um eine mögliche Assoziation zwischen Env und dem Sec61 Komplex zu zeigen, wurde die Bindung zwischen gp160 und Sec61p, einem

Bestandteil des Exportkomplexes, in einem Repräzipitationsexperiment untersucht (Abb. 3.11). Damit die Interaktion auf dem Export des Proteins beruht, wurden transient transfizierte Zellen radioaktiv markiert und 30 min vor der Zell-Lyse mit Puromycin versetzt, was zu einer Dissoziation der Ribosomen und damit zum Stop der Neusynthese und des Proteinimports führt. Zur Stabilisierung der Bindung zwischen Env und Sec61p wurde der durch Reduktion reversible „Crosslinker“ DSP eingesetzt. Die Spezifität des „crosslinkings“ und damit der Ko-präzipitation konnte durch sequentielle Präzipitation mit anti-Env und anti-Calnexin bzw. anti-Tap2 Antikörpern sichergestellt werden. Die Präzipitation mit dem anti-Calnexin Antikörper fungierte aufgrund der Bindung von gp160 an Calnexin im ER als Positivkontrolle. Da gp160 nicht an den membranständigen, ER residenten Tap-Transporter bindet, wurde die Präzipitation mit dem anti-Tap2 Antikörper als Negativkontrolle durchgeführt. Während Ko-präzipitate nach Repräzipitation mit anti-Sec61p und mit anti-Calnexin detektiert werden konnten, konnte das ER-residente Protein Tap2 unter entsprechenden Bedingungen nicht mit Env kopräzipitiert werden. Nach Zugabe von Lactacystin konnte eine leichte Zunahme der Interaktion zwischen Env und Sec61p festgestellt werden, was weiterhin für eine spezifische Interaktion spricht.

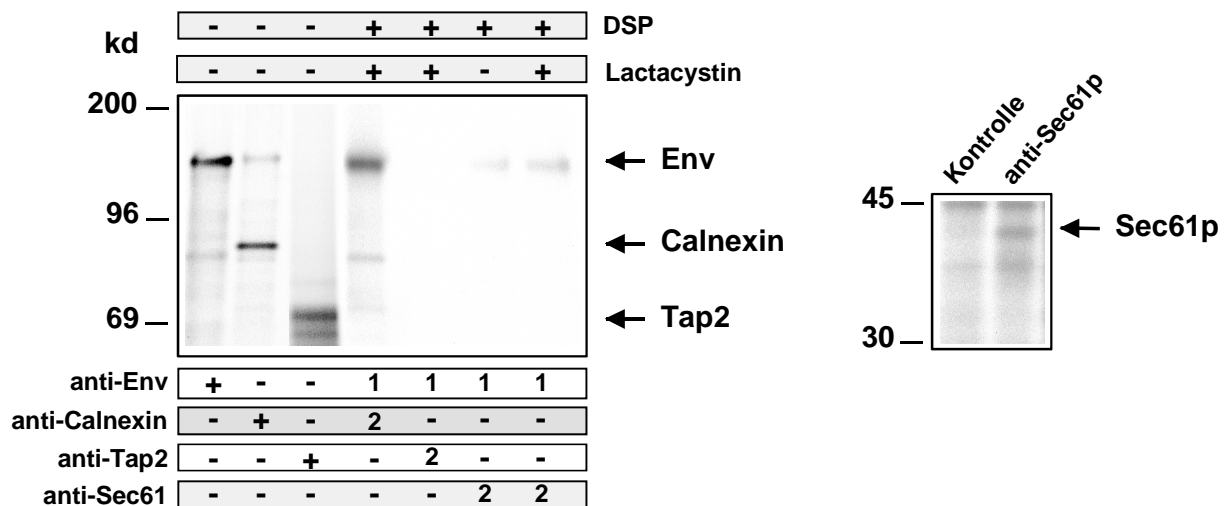


Abb. 3.11: **Kopräzipitation von Env mit dem Sec61p-Translokonprotein**

Transient transfizierte 293T Zellen wurden metabolisch über Nacht markiert. Zur Steigerung der Tap2-Expression wurde Interferon γ (IFN γ) zugesetzt. Durch Zugabe von Puromycin (10 μ M) wurde 30 min vor Zell-Lyse die Neusynthese von Proteinen inhibiert. Nach der Lyse wurde mit anti-Env, anti-Calnexin, anti-Sec61p oder anti-Tap2 Antikörpern oder sequentiell in der angegebenen Reihenfolge präzipitiert. Zur Repräzipitation wurde dem Lysepuffer der *Crosslinker* DSP (0,3 mM) zugegeben.

3.2. Golgi Retention/Retrieval von Env

Im Unterschied zu den meisten zellulären Transkripten retentiert der größte Anteil an *env* mRNA im Zellkern (Abb. 3.12). Mittels RT-PCR von mRNA aus nukleären und zytosolischen Extrakten transient transfizierter Zellen und nachfolgendem Southern Blot konnte gezeigt werden, daß die mRNA von gp160 im Nukleus zurückgehalten wird. Nur etwa 15% der viralen mRNA kann im Zytoplasma gefunden werden, während sich etwa 85% im Kern befindet. Im Gegensatz zu gp160 kann etwa 50% an zellulärer Aktin-mRNA in Zytoplasol detektiert werden. Die Identifikation von Sequenzmotiven, die auf der Proteinebene wirken und einen Einfluß auf den Transport haben, gestaltet sich daher bei gp160 von HIV-1 schwierig, da ein überlagernder Effekt der nicht näher definierten Retentionssequenzen, die die Inhibition des nukleozytoplasmatischen Transports der mRNA bewirken, nicht ausgeschlossen werden kann. Weiterhin akkumuliert der größte Anteil von Env im ER (Abb. 3.2), so daß nachfolgende Schritte des weiteren Transports von Env aufgrund der Überlagerung durch ER-ständiges Env nicht getestet werden konnten.

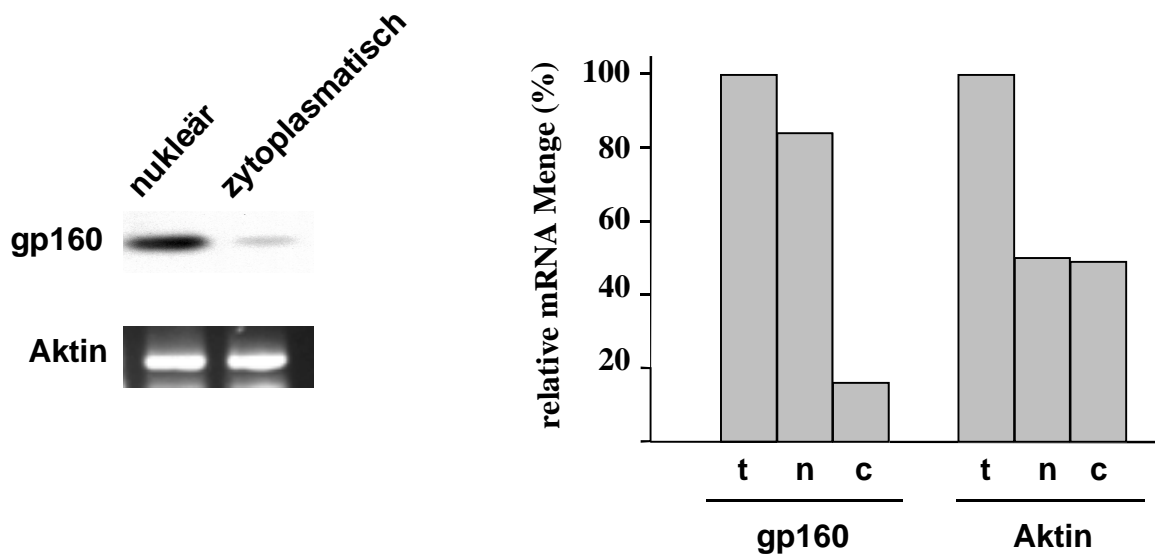


Abb. 3.12: **Nukleozytoplasmatischer *env* mRNA Transport**

RT-PCR Analyse nukleärer (n) und zytoplasmatischer RNA (c) von 293T Zellen, welche transient mit wildtyp gp160 transfiziert wurden. Die RNA wurde über einen CsCl-Gradienten isoliert und nach DNase-Behandlung in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde in einer PCR mit Aktin- und gp160-spezifischen Primern eingesetzt und die PCR-Produkte geblottet und mit einer gp160 spezifischen Sonde hybridisiert. Die quantitative Analyse erfolgte mittels Image Master 1D Elite Software (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und wurde in Relation zur Gesamt-*env* mRNA (t) dargestellt. Diese Abbildung ist identisch mit der Abbildung 3.21 a.

3.2.1. Identifikation von inhibitorischen Sequenzelementen im heterologen System

Zur Eliminierung des überlagernden Effekts wurden daher chimäre Konstrukte aus dem zytoplasmatischen Anteil des gp160 und der Transmembran- und extrazellulären Domäne von CD4 hergestellt. Die zelluläre Lokalisation dieser Konstrukte wurde durch Immunfluoreszenzanalyse mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie nach Mikroinjektion von Hela Zellen getestet. Durch Mikroinjektion einzelner Zellen mit definierten Mengen an DNA konnte im Vergleich zur transienten Transfektion hohe Reproduzierbarkeit und vergleichbare Expressionslevel erzielt werden. Um nukleäre Retention durch die RNA des zytoplasmatischen Anteils von gp160 zu verhindern, wurde eine synthetische DNA-Sequenz mit synonymen Kodons für diesen Genabschnitt konstruiert (Abb. 3.20). Durch das Anhängen der zytoplasmatischen gp41-Domäne wurde die Oberflächenexpression des chimären Moleküls supprimiert, so daß in permeabilisierten Zellen nur noch eine Golgi-Lokalisation beobachtet werden konnte (Abb.3.13).

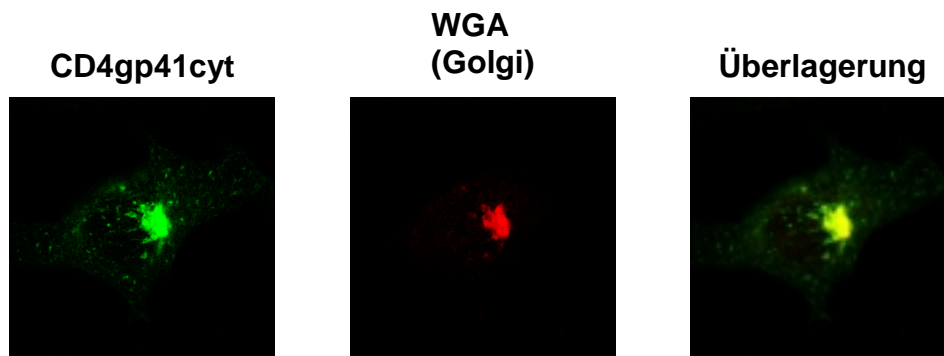


Abb. 3.13: Immunfluoreszenz des chimären CD4-gp41

Hela Zellen wurden mit CD4-gp41 kodierenden Plasmiden mikroinjiziert, anschließend nach Permeabilisierung mit dem CD4-spezifischem monoklonalen Antikörper Q4120, Rhodamin markiertem WGA (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper gefärbt und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert.

Während das CD4-gp41 und alle karboxyterminalen Deletionen zwischen Aminosäure 856 (CD4gp41cyt) und 763 (CD4gp41 Δ 763) keine Oberflächenfärbung zeigten, konnte bei kürzeren Mutanten ab Aminosäure 749 (CD4gp41 Δ 749) eine Oberflächenlokalisierung nachgewiesen werden. Daher scheint die Proteinsequenz zwischen Aminosäure 749 und 763 (*isI*) Einfluß auf die zelluläre Lokalisation des Proteins zu nehmen und eine effiziente Oberflächenexpression zu verhindern (Abb. 3.14). Bei der Mutation des als Internalisierungs-

motiv beschriebenen Tyrosinmotivs YXXL durch Austausch des Tyrosinrests durch einen Alaninrest konnte ebenfalls nur Golgi Lokalisation und keine Oberflächenfärbung nachgewiesen werden.

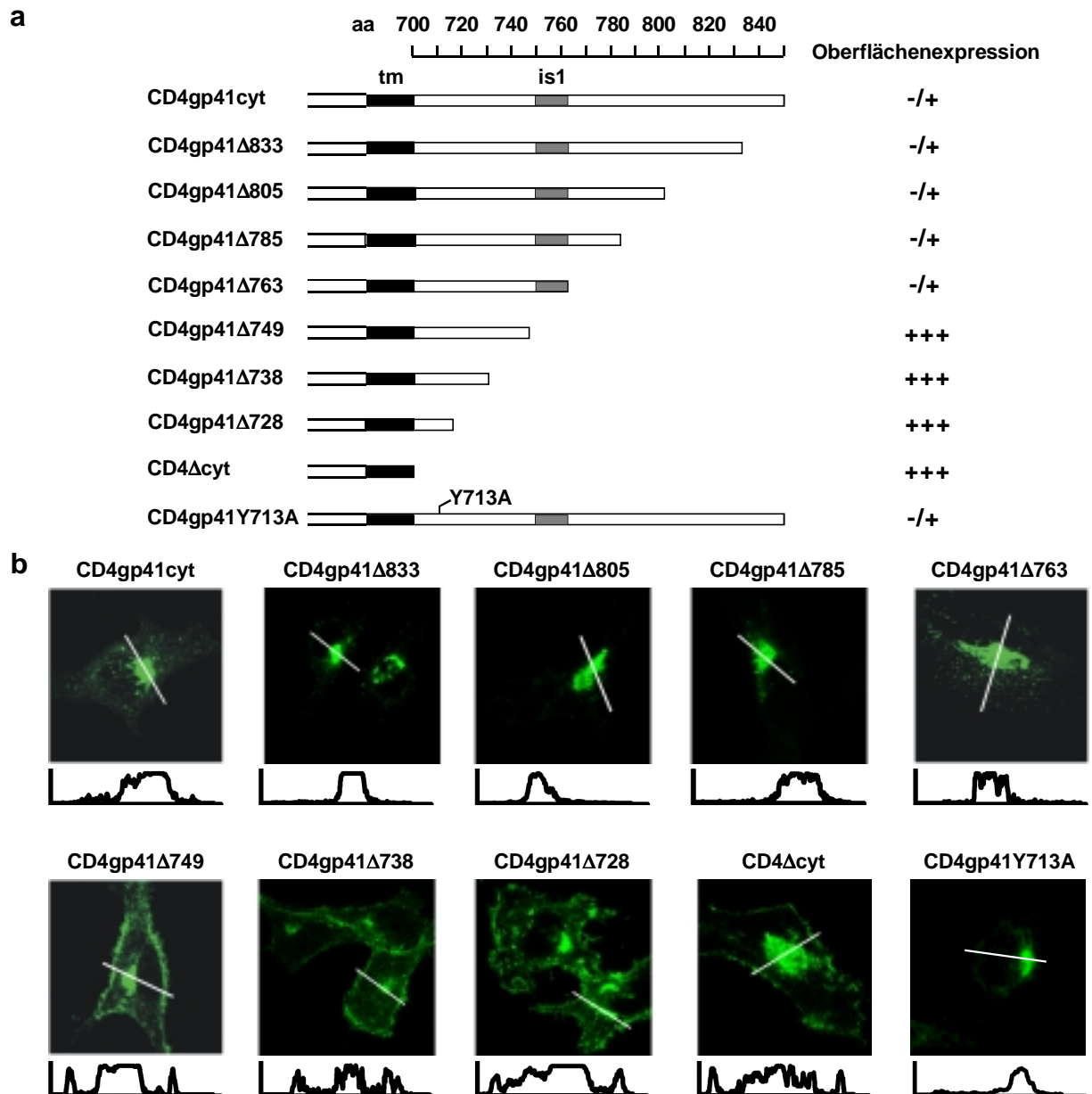


Abb. 3.14: Immunfluoreszenz von chimären CD4-gp41 Verkürzungs- und Tyrosinaustauschmutanten

(a) Schematische Darstellung der verwendeten chimären CD4-gp41 Konstrukte. (b) HeLa Zellen wurden mit den unter (a) gezeigten Konstrukten mikroinjiziert, anschließend nach Permeabilisierung mit dem CD4-spezifischem monoklonalen Antikörper Q4120 und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper gefärbt und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Der weiße Strich gibt jeweils den Verlauf der dargestellten Profilanalysen an.

Um zu überprüfen, ob dieses Proteinmotiv *is1* ausreichend ist, um Oberflächenlokalisierung zu

verhindern, wurde es direkt an die Transmembranregion angehängt. Das Konstrukt CD4gp41:749-763 zeigte nach Mikroinjektion in Hela Zellen in der Immunfluoreszenz eine Oberflächenlokalisierung (Abb. 3.15), so daß diese Region allein außerhalb des Gesamtkontexts für eine Proteinretention nicht ausreichend ist. Ein chimäres Konstrukt mit einer Deletion von aa707 bis aa749 (CD4gp41:749-856) zeigt dagegen keine Oberflächenexpression. Daher scheinen weitere Bereiche karboxyterminal von Aminosäure aa763 Einfluß auf die Lokalisation zu nehmen, während die Sequenzen aminoterminal von Aminosäure aa749 im verwendeten System keine Auswirkungen haben. Durch weitere karboxyterminale Verkürzung des Konstrukts CD4gp41:749-856 konnte eine weitere, zweite Region (*is2*) identifiziert werden, die notwendig und zusammen mit *is1* ausreichend für die Suppression der Oberflächen-expression und für die Golgi Lokalisation ist (Abb. 3.15).

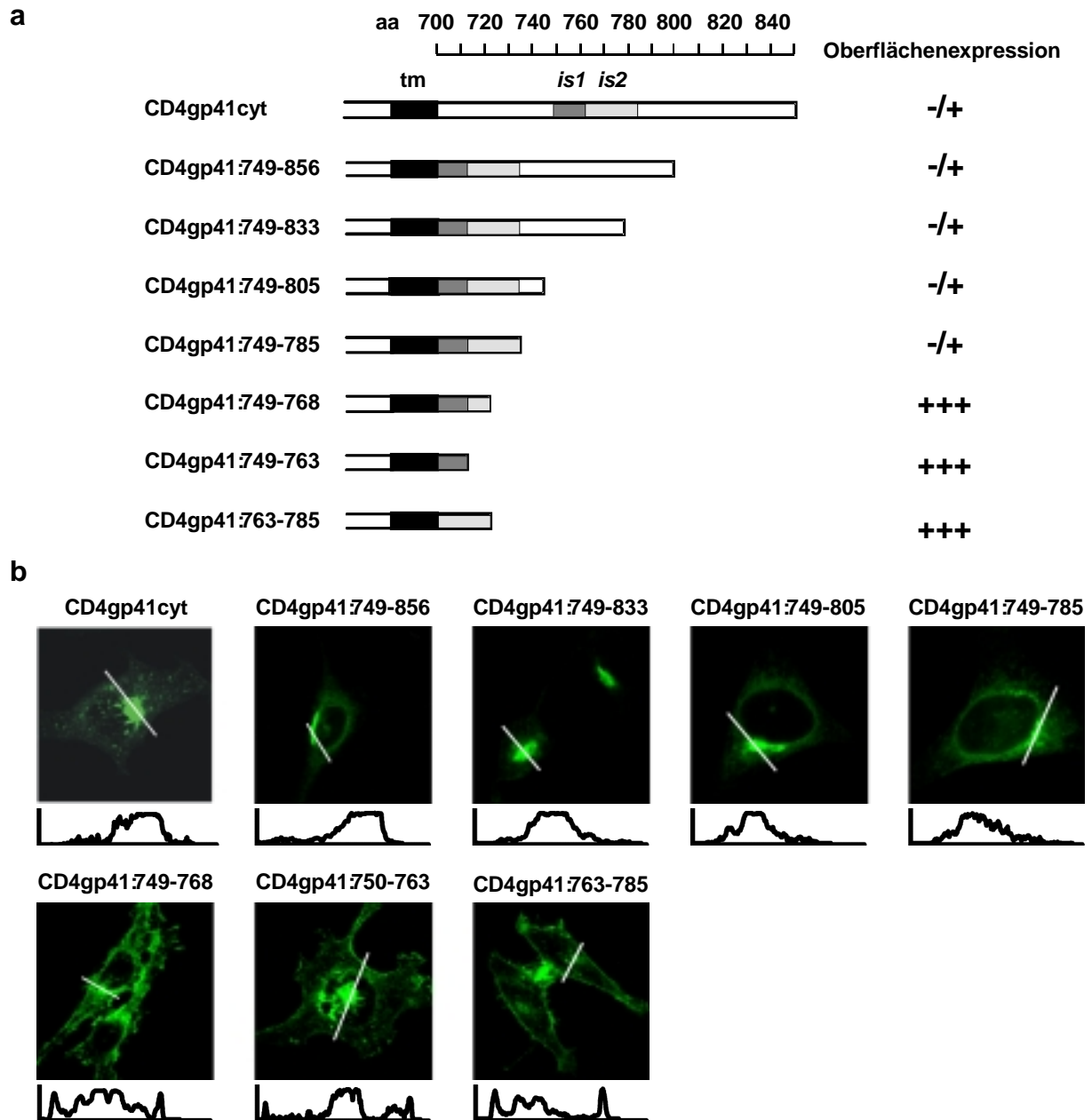


Abb. 3.15: Immunfluoreszenz von chimären CD4-gp41 Mutanten

(a) Schematische Darstellung der verwendeten chimären CD4-gp41 Konstrukte. (b) HeLa Zellen wurden mit den unter (a) gezeigten Konstrukten mikroinjiziert, anschließend nach Permeabilisierung mit dem CD4-spezifischem monoklonalen Antikörper Q4120 und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper gefärbt und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Der weiße Strich gibt jeweils den Verlauf der dargestellten Profilanalysen an.

Um diese Befunden im Gesamtkontext der zytoplasmatischen Domäne von gp41 zu überprüfen, wurden die beiden Elemente *is1* oder *is2* entweder allein oder zusammen deletiert (Abb. 3.17). Jedes der beiden Elemente konnte allein eine Oberflächenexpression verhindern, und nur bei gleichzeitiger Deletion beider Regionen wurde das entsprechende Protein an der Zelloberfläche detektiert.

Ergebnisse

	710	720	730	740	750
mn	NRVRQGYSP	SLQTRPPVPR	G.PDRPEGIE	EEGGERDRDT	SGRLVHGFLA
A	NRVRQGYSP	SFQTLTPXPR	XXPDRPERIE	EEGGEQDRDR	SIRLVSGFLA
B	NRVRQGYSP	SFQTXLPAPR	G.PDRPEGIE	EEGGERDRDR	SGRLVXGFLA
C	NRVRQGYSP	SFQTLTPNPR	GXPDRLGRIE	EEGGEQDRDR	SIRLVSGFLA
D	NRVRQGYSP	SFQTLTPAPR	G.PDRPEGIE	EEGGEQGRDR	SIRLVNGFSA
	760	770	780	790	
mn	IIWVDLRSLF	LFSYH.HRDL	LLIAARIVEL	LG.....R	RGWEVLKYWW
A	LAWDDLRSLC	LFSYHRLRDF	ILLAARTVEL	LGHSSLKGLR	LGWEGLKYLW
B	LIWDDLRSLC	LFSYHRLRDL	LLIVARXVEL	LG.....R	RGWEALKYWW
C	LAWDDLRSLC	LFSYHRLRDF	ILIAARAVEL	LGRSSLRGLQ	RGWEALKYLG
D	LIWDDLRLNC	LFSYHRLRDL	ILIAARIVEL	LGX.....R	RGWEALKYLW
	<i>is1</i>	<i>is2</i>			
	800	810	820	830	840
mn	NLLQYWSQEL	KSSAVSLLNA	TAIAVAEGTD	RVIEVLQORAG	RAILHIPTRI
A	NLLLYWGREL	KXSAINLLDT	IAIAVAGWTD	RVIEIGQRIG	RAILNIPPRI
B	NLLQYWSQEL	KNSAVSLLNA	TAIAVAEGTD	RVIEVVQORAX	RAILHIPXRI
C	SLVQYWGLEL	KKSAISLLDT	IAIAVAEGTD	RIIEXXQRIX	RAIXNIPPRI
D	NLLQYWXQEL	KNSAISLLDT	IAIAVAEGTD	RXIEXVQORAX	RAVLHIPXRI
	850				
mn	RQGLERALL				
A	RQGLERALL				
B	RQGLERALL				
C	RQGFEEALQ				
D	RQGLERALL				

Abb. 3.16: **Proteinsequenz des zytoplasmatischen Anteils von gp41**

Aufgelistet sind die Sequenz des verwendeten Konstrukts (Subtyp mn) und die Konsensussequenzen der Gruppen A,B,C und D. Die konservierten Aminosäuren wurden grau unterlegt.

Die Sequenz des Elementes *is1* weist kein bekanntes Retention- oder Internalisierungsmotiv auf, während *is2* in der mn-Sequenz zwei Dileuzine in der Position aa776/7 und aa784/5 besitzt, wobei das letztere konserviert ist (Abb. 3.16). Da Dileuzinmotive Einfluß auf den zellulären Transport und damit auf die zelluläre Verteilung von Proteinen haben können, wurden die Dileuzine in Position aa776/7 (CD4gp41cytL776/7A) und aa784/5 (CD4gp41cytL784/5A) einzeln und zusammen (CD4gp41cytL776/7/784/5A) durch Alaninreste ausgetauscht. Diese Austausche hatten keine Auswirkung auf die Lokalisation der mutierten Proteine und zeigten ebenfalls eine verminderte Oberflächenexpression (Abb. 3.17).

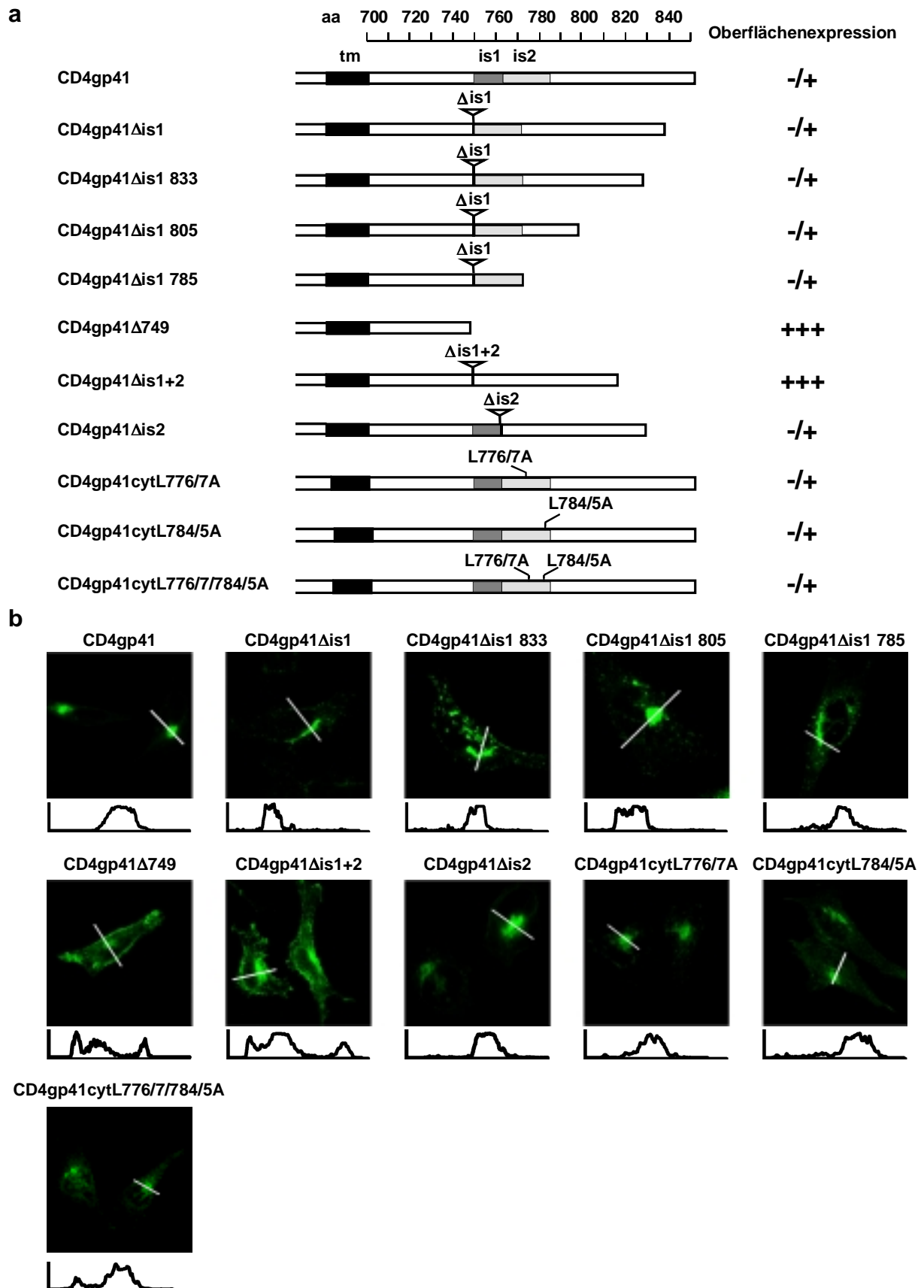


Abb. 3.17: Immunfluoreszenz von chimären CD4-gp41 Deletions- und Leuzinaustauschmutanten
 (a) Schematische Darstellung der verwendeten chimären CD4-gp41 Konstrukte. (b) HeLa Zellen

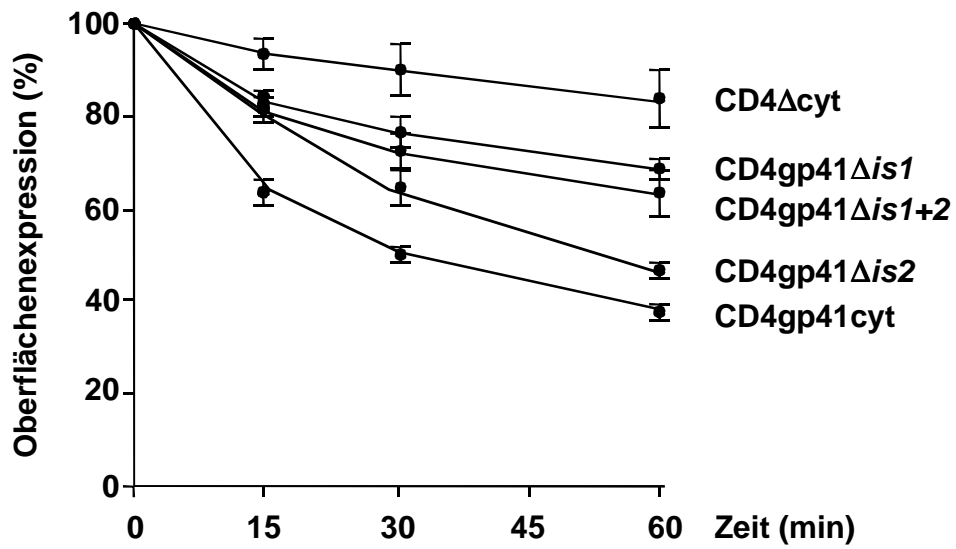
Die durchgeführten Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten eine unterschiedliche zelluläre Verteilung der mutierten Proteine in einem „*steady state*“ Zustand. Die verminderte Oberflächenexpression kann durch Retention des betreffenden Proteins im Golgi und Blockierung des Transports zur Zelloberfläche oder durch Internalisierung des Proteins und Rücktransport verursacht werden.

Um diesen dynamischen Prozeß verfolgen zu können, wurde in einem Internalisierungsexperiment der Einfluß des zytoplasmatischen Anteils von gp41 auf die Internalisierung der chimären CD4-gp41 Konstrukte getestet (Abb. 3.18). Durch das Anfügen der zytoplasmatischen Domäne wurde nach einer Stunde noch 40% des markierten Proteins an der Zelloberfläche gefunden, während das CD4 ohne zytoplasmatische Domäne noch zu etwa 90% auf der Zelloberfläche vorhanden ist. Das Anhängen weiterer Reste bis Aminosäure aa749 (CD4gp41 Δ 749) führte nicht zu einer deutlichen Steigerung der Internalisierung. Wurden die Elemente *is1* und *is2* deletiert, so erhielt man nach Deletion von *is1* und beider Motive eine schwächere Internalisierung als nach Entfernung von *is2*. Während die *is2* Deletionsmutante nur eine gering reduzierte und relativ hohe Internalisierungsrate aufwies, sind die der *is1* Deletionsmutante und der Doppeldeletionsmutante deutlich niedriger und zwischen denen des CD4 Δ cyt und des CD4gp41cyt. Die Dileuzinaustauschmutanten zeigten eine 50 %ige Internalisierung nach einer Stunde und damit im Vergleich zum CD4gp41cyt ebenfalls nur eine gering reduzierte Internalisierung, die im Bereich der *is2* Deletionsmutante lag. Somit führt der zytoplasmatische Anteil des gp41 zu einer deutlichen Internalisierung, die durch die Deletions- und Austauschkonstrukte jedoch nur teilweise aufgehoben werden konnte, und bei diesen Mutanten einen intermediären Phänotyp bewirkte. Das Element *is1* zeigte einen deutlich stärkeren Effekt auf die Endozytose als das *is2*.

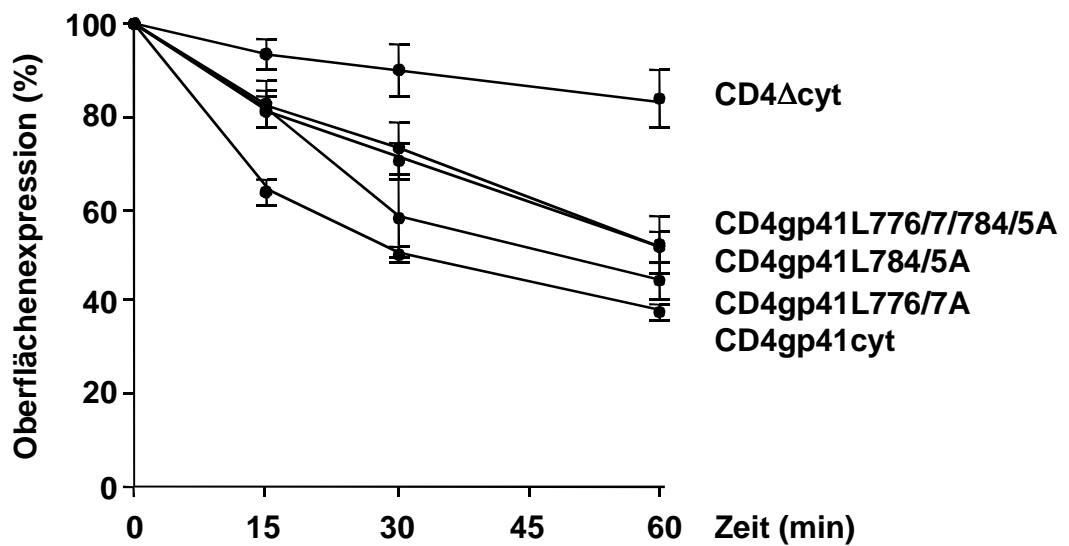
Das als Internalisierungsmotiv beschriebene YXXL (Rowell et al., 1995), das sich im proximalen Anteil der zytoplasmatischen Domäne befindet, war in einem auf Aminosäure aa749 verkürzten Protein nicht wirksam. Durch eine Verlängerung um das *is1* Element konnte jedoch eine starke Internalisierung beobachtet werden. Wurde das Tyrosin durch einen Alanin-rest ersetzt, so konnte immer noch eine wenn auch schwächere Internalisierung beobachtet werden, die somit unabhängig von dem mutierten Motiv geschieht.

wurden mit den unter (a) gezeigten Konstrukten mikroinjiziert, anschließend nach Permeabilisierung mit dem CD4-spezifischem monoklonalen Antikörper Q4120 und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper gefärbt und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Der weiße Strich gibt jeweils den Verlauf der dargestellten Profilanalysen an.

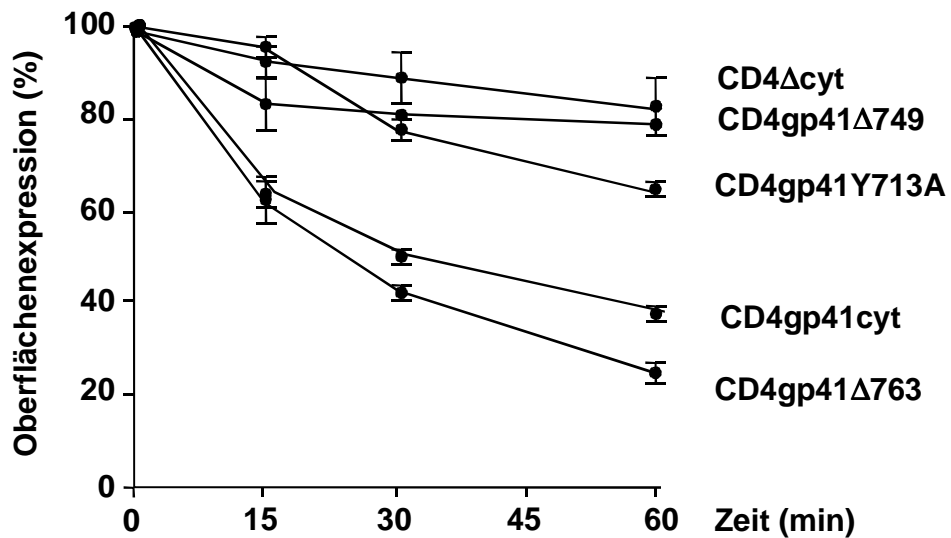
a



b



c



Um den bei den chimären CD4-gp41 Konstrukten beobachteten Effekt in einem weiteren, heterologen Reportersystem zu kontrollieren, wurde ein zweiter Satz an chimären Konstrukten konstruiert, die aus einem zellmembranständigen Immunglobulin G-Anteil und der zytoplasmatischen Domäne des gp41 bestehen (Kolanus et al., 1993) (Abb. 3.19). Analog zu den CD4 Chimären konnte eine reduzierte Oberflächenexpression durch das Anhängen des gesamten zytoplasmatischen Anteils von gp41 oder der beiden Elemente *is1* und *is2* beobachtet werden. Durch Deletion von *is1* und *is2* konnte eine Oberflächenexpression wiederhergestellt werden.

In beiden verwendeten Systemen verursachten die Elemente *is1* und *is2* also ähnliche Effekte, die sich in einer verminderten Oberflächenexpression und Golgi-Akkumulation ausdrückten. Während jedes der Motive im gp41 Kontext für eine verminderte Oberflächenexpression ausreichend ist, kann dieser Effekt nur durch die Deletion beider Elemente wieder aufgehoben werden.

Abb. 3.18: Internalisierung von chimären CD4-gp41 Konstrukten

Transient mit den jeweils angegebenen Konstrukten transfizierte 293T Zellen wurden mit dem CD4 spezifischen Antikörper Q4120 ohne vorherige Permeabilisierung für 30 min auf Eis inkubiert, aufgeteilt und für unterschiedliche Zeiten in Kulturmedium bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper auf Eis gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die quantitative Darstellung der Oberflächenexpression zeigt die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM), resultierend aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. **(a)** Analyse der *is1* und *is2* Deletionsmutanten. **(b)** Analyse der Dileuzin/Dialanin-Austauschmutanten. **(c)** Analyse der Verkürzungsmutanten CD4gp41 Δ 749, CD4gp41 Δ 763 und der Tyrosin/Alanin-Austauschmutante.

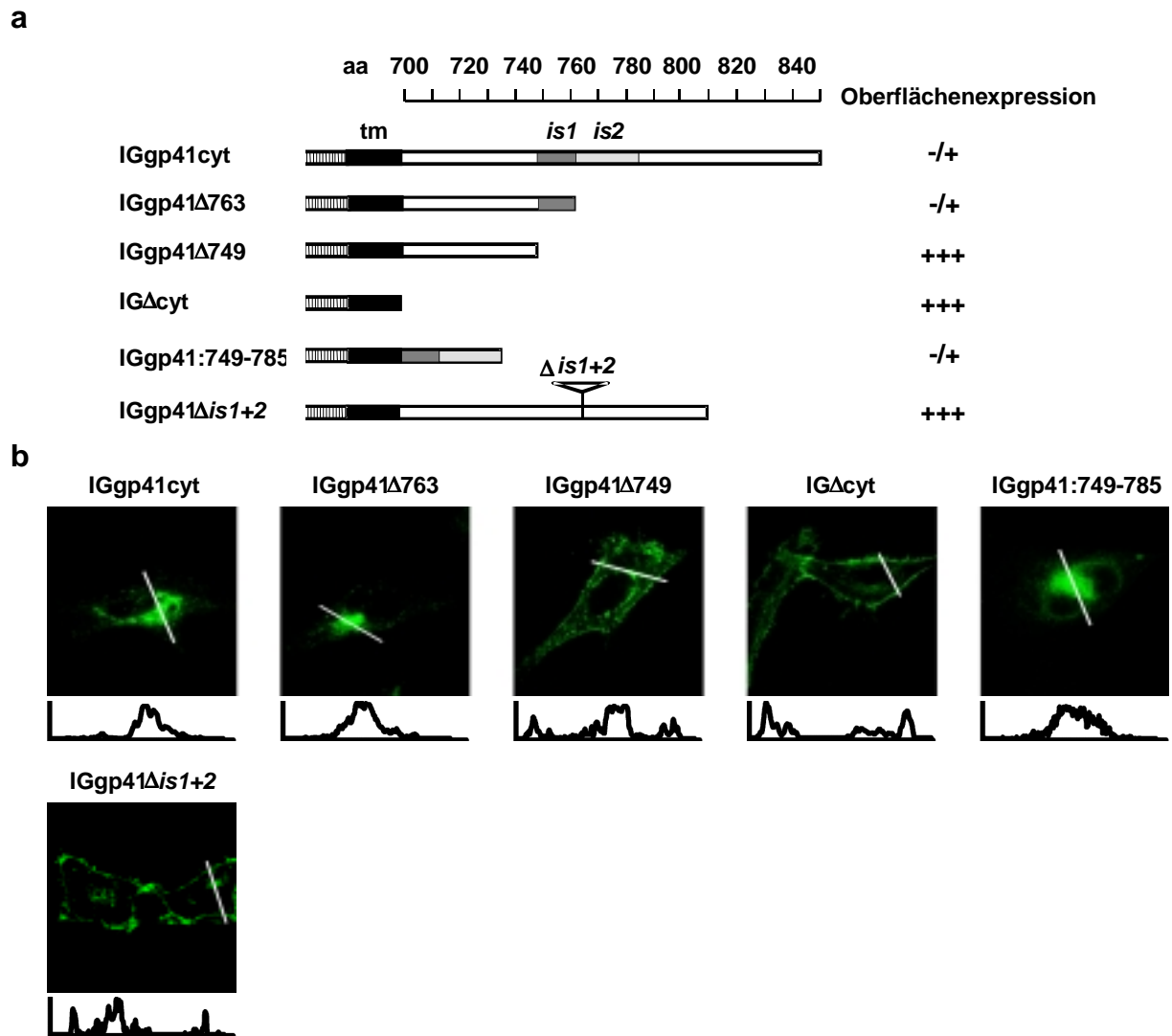


Abb. 3.19: Immunfluoreszenz von chimären Ig-gp41 Konstrukten

(a) Schematische Darstellung der verwendeten chimären Ig-gp41 Konstrukte. (b) HeLa Zellen wurden mit den Konstrukten unter (a) mikroinjiziert, anschließend nach Permeabilisierung mit einem FITC-konjugierten Antikörper gefärbt und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Der weiße Strich gibt jeweils den Verlauf der dargestellten Profilanalysen an.

3.2.2. Test der inhibitorischen Elemente *is1* und *is2* im homologen System

3.2.2.1. Herstellung eines synthetischen *env* Gens

Um die durch die chimären Konstrukte erzielten Ergebnisse im homologen Kontext des gp160 zu überprüfen, wurde ein synthetisches *env*-Gen verwendet, bei dem bei gleichbleibender Proteinsequenz die viralen Kodons durch die hochexprimierter humaner Gene ersetzt wurden (Haas et al., 1996) (Abb.3.20). Die synthetische *env* Sequenz wurde mittels langer Oligonukleotide hergestellt, die zunächst durch PCR amplifiziert und anschließend subkloniert wurden.

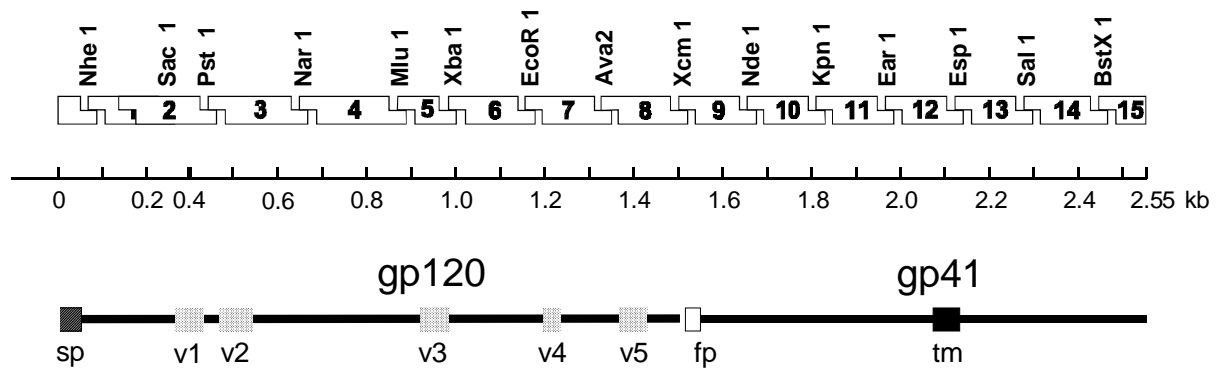


Abb.3.20: **Konstruktion des synthetischen gp160**

Mittels RT-PCR von mRNA aus transient transfizierter Zellen und nachfolgendem Southern Blot konnte gezeigt werden, daß die mRNA von *syngp160* nicht im Nukleus zurückgehalten wird und der Export der synthetischen mRNA aus dem Kern in das Zytoplasma im Vergleich zur wildtyp mRNA gesteigert ist. Während sich annähernd 40% der synthetischen *env*-mRNA im Zytoplasma befand, waren es bei der wildtyp *env* mRNA etwa 15%. Als Referenz diente die mRNA des humanen Aktins, welche bei beiden Ansätzen gleiche Transportraten aufwies und im Kern und Zytoplasma in etwa gleichen Mengen vorlag (Abb. 3.21).

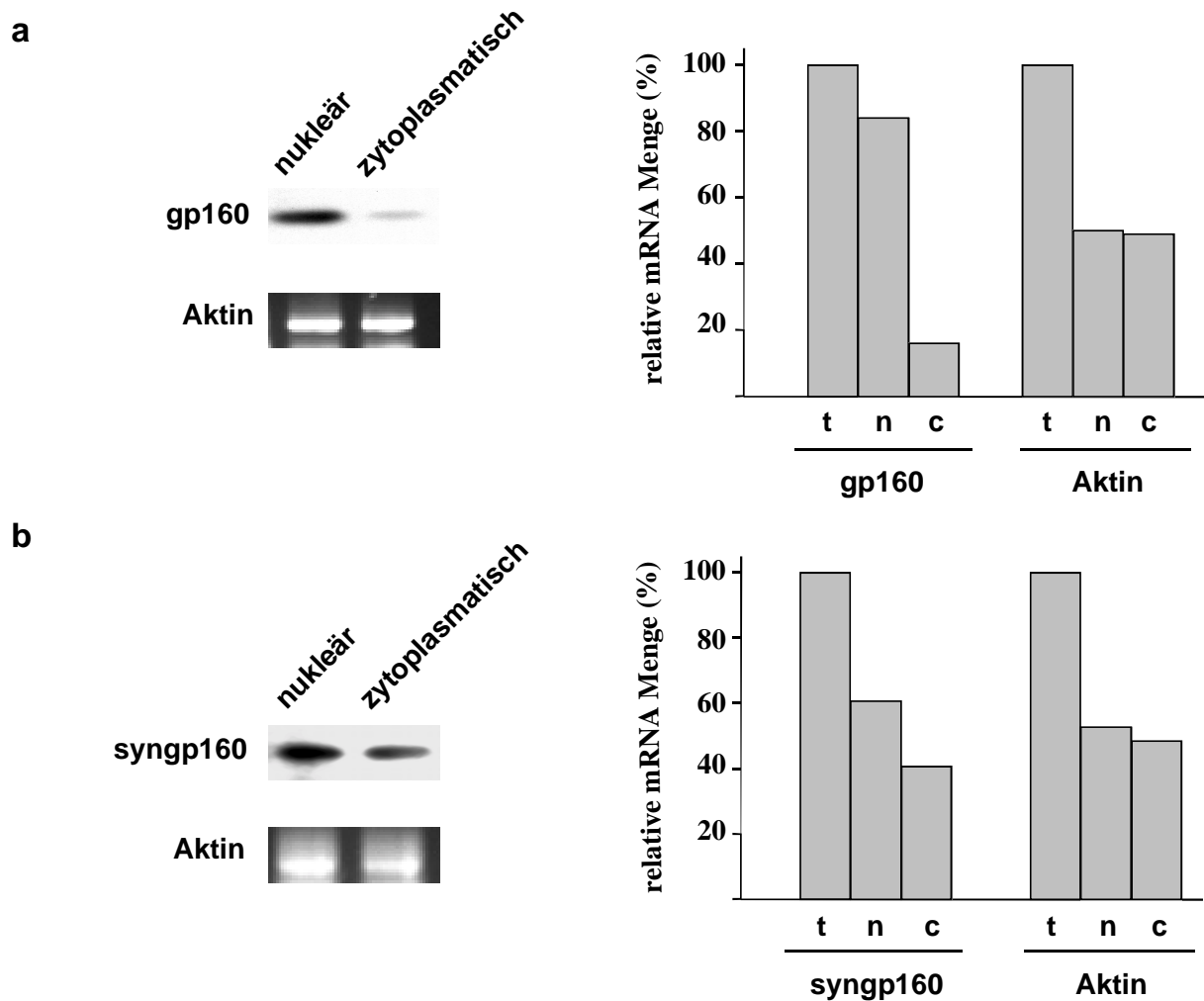


Abb.3.21: **Nukleozytoplasmatischer *env* mRNA Transport**

RT-PCR Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA isoliert aus 293T Zellen, die transient mit wildtyp gp160 **(a)** und synthetischen gp160 **(b)** transfiziert worden sind. Die RNA wurde über einen CsCl-Gradienten isoliert und nach DNase-Behandlung in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde in einer PCR mit Aktin- und gp160-spezifischen Primern eingesetzt und die PCR-Produkte geblottet und mit einer gp160 spezifischen Sonde hybridisiert. Die quantitative Analyse erfolgte mittels Image Master 1D Elite Software (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die Abbildung 3.21 a ist identisch mit der Abbildung 3.12.

Um die Proteinexpression des synthetischen und des wildtyp gp160 zu testen, wurden transient transfizierte Zellen radioaktiv markiert und aus dem Zell Lysat das Env-Protein mit einem anti-Env Serum immunpräzipitiert. Die Proteinsynthese des synthetischen gp160 war im Vergleich zum Wildtypprotein erheblich gesteigert. Die zusätzliche Expression des HIV-1 Regulator-proteins Rev, das den Export viraler *env* mRNA aus dem Kern ins Zytoplasma induziert, hatte keinen merklichen Effekt auf das synthetische Protein, steigerte jedoch die Expression des wildtyp gp160 signifikant (Abb. 3.22).

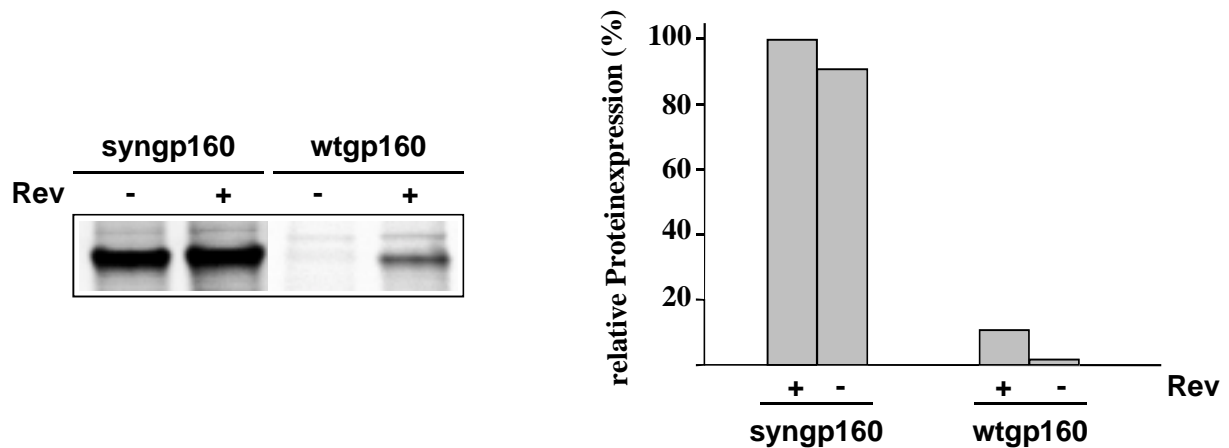


Abb. 3.22: **Proteinexpression des wtgp160- und des syngp160-Gens**

Transient transfizierte 293T Zellen wurden für 4 h radioaktiv mit [35 S]-Methionin/Cystein markiert, lysiert und das Lysat mit einem anti-Env Antikörper präzipitiert. Wtgp160 und syngp160 wurden jeweils mit rev bzw. mit einem leerem Kontrollvektor transfiziert. Die quantitative Analyse erfolgte nach Einscannen durch einen Phosphoimager (Storm 860, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) mit Hilfe der ImageQuant Software (Version 4.2, Molecular Dynamics).

3.2.2.2. *Is1* und *is2* inhibieren die Oberflächenlokalisierung von Env

Die Deletion des zytoplasmatischen Anteils von gp160 erhöhte die Oberflächenexpression sowohl in stabil als auch in transient transfizierten Zellen (Abb. 3.23). Während die durch Western Blot bestimmte Gesamtmenge an Glykoprotein bei mit syngp160 und syngp160 Δ cyt transfizierten Zellen ähnlich war, war die Expression des gp160 an der Zelloberfläche im Vergleich zum deletierten Glykoprotein um etwa 80% reduziert. Wie im heterologen System führte die Eliminierung der Elemente *is1* und *is2* (syngp160 Δ *is1+2*) zu einer Zunahme der Env Expression an der Zelloberfläche um etwa das vierfache.

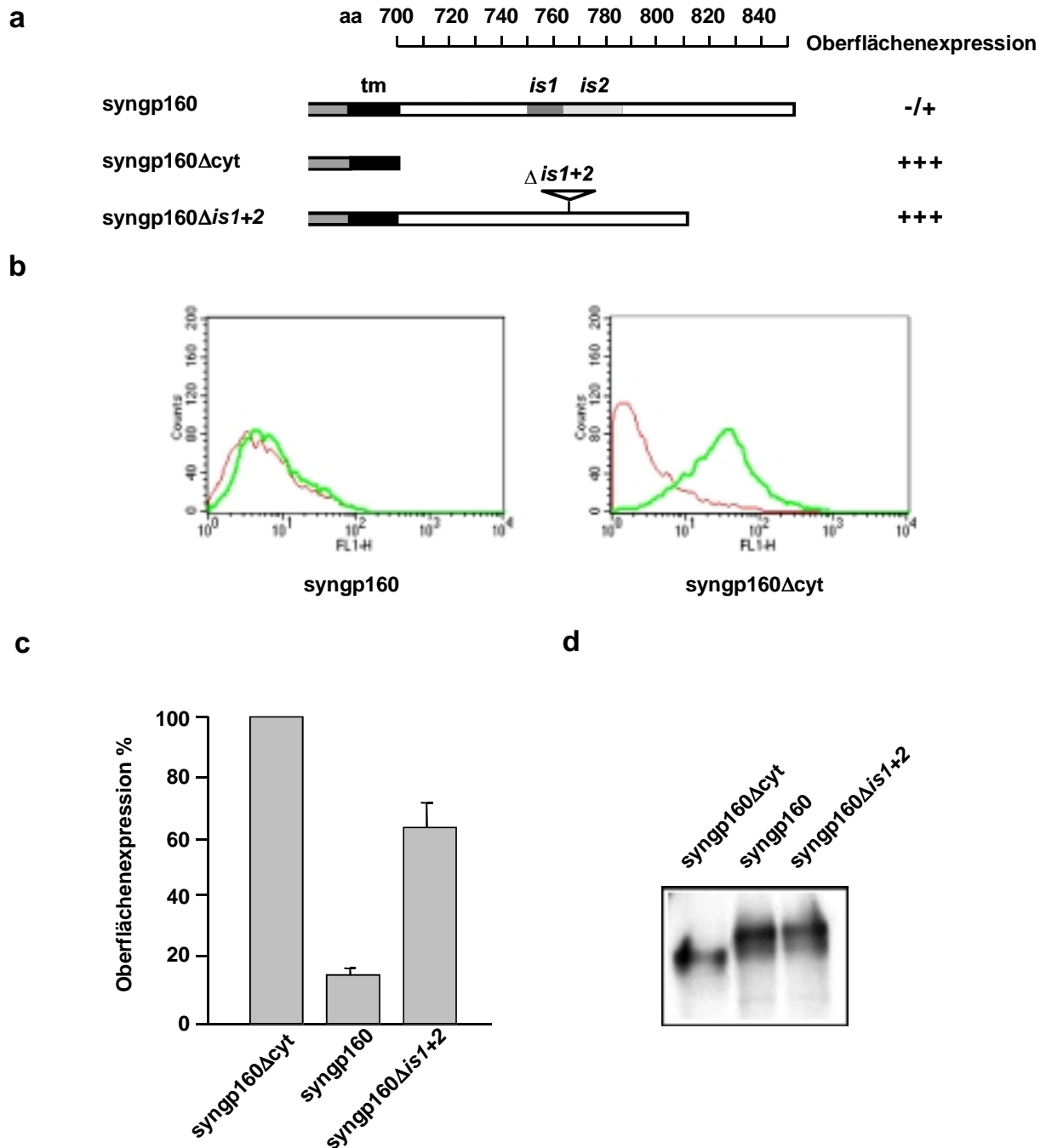


Abb. 3.23: Oberflächenexpression von *env*-Mutanten

(a) Schematische Darstellung der verwendeten *env*-Konstrukte. (b) Mit syngp160 und syngp160 Δ cyt stabil transfizierte Hela Zellen wurden ohne vorherige Permeabilisierung mit dem *env*-spezifischen Antiserum 95-B-2 und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper angefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert. (c) Quantitative Analyse der Env-Oberflächenexpression. Mit syngp160, syngp160 Δ cyt und syngp160 Δ is1+2 transient transfizierte 293T Zellen wurden mit dem Env-spezifischen Antiserum 95-B-2 und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper angefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die quantitative Darstellung der Oberflächenexpression zeigt die Mittelwerte und den Standardfehler (SEM), resultierend aus sieben unabhängigen Experimenten. (d) Western Blot-Analyse von transient mit syngp160, syngp160 Δ cyt und syngp160 Δ is1+2 transfizierten 293T Zellen.

4. Diskussion

4.1. Degradation von ER-retentiertem Env

Das ER ist die Eintrittsstelle für sezernierte und membranständige Proteine. Sie unterliegen in diesem Kompartiment einer Qualitätskontrolle, die zur Eliminierung mißgefalteter und nichtassemblierter Proteine führt (Hammond and Helenius, 1995; Kopito, 1997) (Abb 4.2). Das Ubiquitin/Proteasomensystem wurde als Hauptort zur Degradation dieser Proteine identifiziert (Biederer et al., 1996; Ward et al., 1995). Der Ausgangspunkt der hier vorgelegten Untersuchungen waren frühere Beobachtungen (Kimura et al., 1996; Willey et al., 1988), in denen gezeigt worden war, daß der größte Anteil des HIV-1 Env im ER retentiert wird und weder in das Golgi Kompartiment noch an die Zelloberfläche gelangt, sondern abgebaut wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob gp160 durch das Ubiquitin/Proteasomensystem degradiert wird und die einzelnen Schritte zur Degradation – Translokation, Ubiquitinierung, proteasomale Degradation – durchläuft.

4.1.1. Ubiquitinierung

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß das Glykoprotein gp160 von HIV-1 ubiquitiniert wird, sowie daß dieser Prozeß weder subtyp- noch zelltypspezifisch ist und nicht vom Expressionssystem abhängt. Der Nachweis der Ubiquitinierung von Env in HIV-1 infizierten Zellen zeigt, daß der Effekt nicht auf eine artifizielle Überexpression des isolierten *env* Gens zurückzuführen ist, sondern auch im Kontext der Expression aller HIV-spezifischen Gene stattfindet. Die Ubiquitinierung erfolgt am luminalen Anteil der gp41 Untereinheit, wobei ein einzelner Ubiquitinrest angehängt wird. Ubiquitin wird an freie Aminogruppen, wie sie Lysinreste oder der Aminoterminus eines Proteins darstellen, kovalent gebunden. Der Sequenzvergleich zwischen den verwendeten unterschiedlichen Env-Subtypen läßt drei konservierte Lysinreste als potentielle Stellen für die Ubiquitinbindung vermuten. Gewöhnlich wird Ubiquitin in langen polymeren Ketten an diese Aminosäuren angehängt (Ciechanover, 1994). Obwohl eine Monoubiquitinierung seltener vorkommt, wurde sie in früheren Befunden für eine Reihe von Proteinen (p6Gag Protein von HIV-1 und SIV, p12Gag Protein von Moloney Murine Leukemia Virus, Histon 2B) bereits nachgewiesen (Ott et al., 1998; West and Bonner, 1980). Die Menge an ubiquitiniertem gp160 Glykoprotein konnte nach Inhibition der proteasomalen Degradation durch einen spezifischen Inhibitor gesteigert werden, wodurch

es aber nicht zu einer zytoplasmatischen Anreicherung dieses Proteins kam. Dies zeigt zum einen, daß ubiquitiniertes gp160 durch Proteasomen degradiert wird, und darüber hinaus, daß nach Blockierung der Proteasomen der retrograde Transport des gp160 ins Zytoplasma unterbleibt. Sowohl ohne als auch mit Inhibitor konnte gp160 nur membranassoziiert nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, daß die „Markierung“ zur Degradation, der Transport aus dem ER zum Ort der Degradation und die Degradation selbst ein gekoppelter Prozeß ist, wie er auch für andere luminaire und membranständige Proteine diskutiert wird (Biederer et al., 1997; Plemper et al., 1998; Plemper and Wolf, 1999b).

Es sind verschiedene Möglichkeiten denkbar, zu welchem Zeitpunkt der Biosynthese gp160 ubiquitiniert werden könnte (Abb. 4.1). Die Ubiquitinierung könnte an der zytoplasmatischen Seite der ER Membran simultan mit dem Export aus dem ER verlaufen (Abb. 4.1 a). Als ubiquitinierende Enzyme kämen Proteine wie Ubc6p und Ubc7p/Cue1p in Frage, die ER-membranassoziiert sind und eine zytoplasmatische, katalytische Domäne besitzen (Biederer et al., 1997). Da sich die ubiquitinierte Domäne des Env Glykoproteins zumindest zeitweise im ER Lumen befindet, was nach Proteasebehandlung von isolierten Mikrosomen aus Env exprimierenden Zellen gezeigt werden konnte, muß die Ubiquitinierung jedoch dem Export vorangehen, was gegen diese Erklärung spricht. Alternativ könnte ein Komplex aus Translokon, Proteasom und ubiquitinierendem Enzym das ubiquitinierte gp160 vor dem Verdau durch die zugesetzte Protease schützen.

Weiterhin könnte Env kotranslational durch zytosolische oder ER-membranständige Enzyme ubiquitiniert werden (Abb. 4.1 b). Hierbei würde der Import der wachsenden Polypeptidkette gestoppt und das Protein über dasselbe Translokon zurück ins Zytosol transloziert. Das Glykoprotein wäre in diesem Fall membranassoziiert, jedoch nicht durch die hydrophobe Transmembranregion in der Membran verankert. Eine kotranslationale Ubiquitinierung wurde für das Apolipoprotein B100 beschrieben (Liao et al., 1998; Zhou et al., 1998). Es gibt jedoch auch Hinweise aus Experimenten mit *S. cerevisiae*, daß der Proteinimport und -export mechanistisch verschieden sind (Brodsky et al., 1999). Da allerdings in den hier dargestellten Untersuchungen ubiquitiniertes Env das Molekulargewicht des reifen Proteins besaß und die ubiquitinierte, extrazelluläre Domäne des Proteins sich vollständig im Lumen des ER befand, kann diese Erklärungsmöglichkeit nur dann stimmen, wenn kein Importstop des kotranslational ubiquitinierten Env stattfindet. Eine mögliche Zwischenstufe eines bereits

ubiquitinierten, aber noch nicht vollständig translatierten oder translozierten Proteins konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Schließlich könnte das Env durch Enzyme ubiquitiniert werden, die an der luminalen Seite des ER lokalisiert sind (Abb. 4.1 c). Für diese Hypothese spricht zum einen, daß ubiquitiniertes Env die volle Länge der reifen Proteins aufwies und keine kleinere Variante gefunden werden konnte, so daß offensichtlich nur vollständig synthetisiertes Glykoprotein ubiquitiniert wird. Zweitens konnte ubiquitiniertes Env auch nach Proteinase K-Behandlung der isolierten Mikrosomen detektiert werden, so daß der ubiquitinierte Anteil des Proteins und das Ubiquitin selbst durch die ER Membran vor dem Verdau geschützt wurde und sich im Lumen des ER befinden muß.

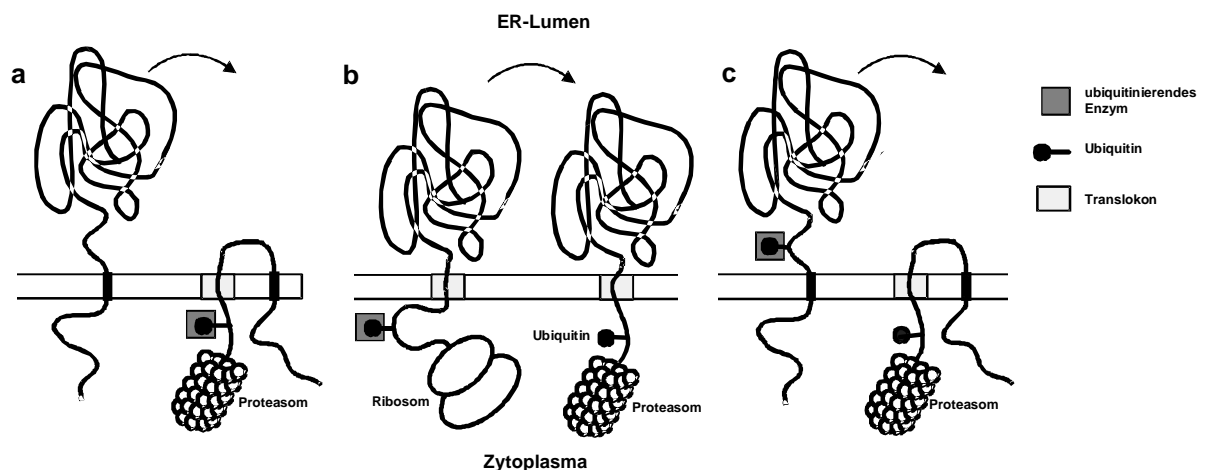


Abb. 4.1: **Modell der möglichen Ubiquitinierungsmechanismen**

(a) Die Ubiquitinierung könnte entweder während des ER Exports an der zytoplasmatischen Seite der ER Membran oder (b) kotranslational an der zytoplasmatischen Seite der ER Membran bei gleichzeitigem Importstopp oder im ER Lumen stattfinden.

Neben der Markierung zur Degradation wurden in aktuellen Berichten alternative Erklärungen für ubiquitinierte virale Proteine vorgeschlagen. Es wurde gezeigt, daß p6gag von HIV-1 und SIV wie auch p12gag von MLV und US9 von Herpes Simplex Virus 1 ubiquitiniert werden und sich neben freiem Ubiquitin in Viruspartikeln nachweisen lassen (Arthur et al., 1992; Brandimarti and Roizman, 1997; Ott et al., 1998). Die Bedeutung dieser ubiquitinierten Proteine im Viruspartikel ist im Moment unklar. Sie könnten der Degradation in Zellen, die mit viralen Proteinen überschwemmt werden, entkommen sein. Alternativ wird diskutiert, ob sie eine spezifische Rolle in der viralen Pathogenese spielen könnten (Brandimarti and Roizman, 1997; Ott et al., 1998).

4.1.2. Proteasomale Degradation

Nachdem es in der vorliegenden Arbeit gelungen war, ubiquitiniertes gp160 nachzuweisen, wurde im weiteren der Einfluß der Proteasomen auf das virale Env Glykoprotein untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß HIV-1 Env durch das proteasomale System *in vitro* und *in vivo* degradiert wird. Durch den spezifischen proteasomalen Inhibitor Lactacystin konnte die Halbwertszeit von Env *in vivo* verdoppelt werden. Dieser Effekt konnte *in vitro* anhand isolierter mikrosomaler ER Fraktionen transfizierter Zellen und aufgereinigten Proteasomen bestätigt werden. Bereits für eine Reihe von sekretorischen und membranständigen Proteinen wurde die Degradation durch Proteasomen beschrieben. Es handelt sich hierbei zumeist um künstlich mutierte (Pdr5, CPY*, pro-a-Faktor, α 1-Antitrypsin Z und Sec61-2) und krankhaft veränderte Proteine (CFTR), oder um Proteine, die durch virale Proteine (MHC Klasse 1 durch HCMV US2 und US11, CD4 durch HIV-1 vpu) modifiziert beziehungsweise gebunden werden. Der T-Zellrezeptor ist dagegen ein Beispiel für ein unveränderter Zellproteinkomplex, dessen nichtassemblierte Untereinheiten proteasomal degradiert werden (Yu et al., 1997; Yang et al., 1998). Das untersuchte Env ist ebenfalls ein unmutiertes Protein, das durch Proteasomen abgebaut wird. Der Degradation geht die Retention des Env im ER voraus. Als Determinanten für diese Retention kommen weder der zytoplasmatische Anteil noch die Transmembran-domäne in Frage, da sowohl nach Deletion des zytoplasmatischen Anteils als auch nach Austausch der Transmembrandomäne der größte Anteil des Env im ER verblieb. Die Ursache könnte in der komplexen Faltung und Glykosylierung des Env Glykoproteins liegen, was zu einer ungewöhnlich langen Assoziation des Env mit dem ER-Chaperon Calnexin führt. Mehrere Arbeiten konnten nachweisen, daß schon kleine Veränderungen in der Glykosylierung oder Faltung ER-Retention bei HIV-1 Env auslösen können (Bolmstedt et al., 1991; Dash et al., 1994; Fenouillet and Jones, 1995). Die zeitlich ausgedehnte Bindung an Calnexin führt nach dem aktuell diskutierten Modell der Qualitätskontrolle im ER zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, als mißgefaltetes Proteins erkannt und nachfolgend der Degradation zugeführt zu werden (Liu et al., 1999; Parodi, 1999). Auch scheint die Bindung an Calnexin zwingend notwendig für den proteasomalen Abbau zu sein (McCracken and Brodsky, 1996).

Voraussetzung für eine zytoplasmatische Degradation von Transmembranproteinen durch die Proteasomen ist der Export aus dem ER ins Zytoplasma. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Assoziation von Env mit dem Protein sec61p nachgewiesen werden, wobei eine Bindung

zwischen diesen Proteinen infolge eines Imports durch einen entsprechenden Inhibitor ausgeschlossen wurde. Sind der Export über das Translokon und die Degradation miteinander gekoppelt und retrograder Transport und Abbau ein integrierter Prozeß, dann sollte ein Degradationsstop einen Stau im Translokon bewirken. Sind sie dagegen nur hintereinander geschaltet, dann sollte es nach Inhibition des Abbaus zu einer Freisetzung des zu degradierenden Proteins vom Translokon kommen. Durch Zugabe eines proteasomalen Inhibitors konnte die Assoziation zwischen gp160 und sec61p verstärkt und somit eine Akkumulation am Translokon, aber keine Freisetzung ins Zytosol beobachtet werden. Neben sec61p, das als Bestandteil des Translokons eine Rolle im Import und Export des ER spielt, sind noch weitere Proteine wie sec63p und grp78 Bip oder die in Hefen entdeckten ER Membranproteine Der1p, Der3p/Hrd1p und Hrd3p in den retrograden Transport involviert (Bordallo et al., 1998; Sommer and Wolf, 1997). Eine mögliche Aufgabe eines dieser Proteine könnte - im Zusammenspiel mit den ER-ständigen Chaperonen und eventuell vermittelt durch Ubiquitinierung - die Erkennung von fehlerhaften Proteinen sein. Auch der Transport zum Translokon, die Regulation des Translokons und die Verbindung zu den Proteasomen ist bisher nicht geklärt.

4.2. Oberflächenexpression des HIV-1 Env Glykoproteins

Env Glykoprotein, das korrekt gefaltet, modifiziert und multimerisiert wurde, und das die Qualitätskontrolle des ER passiert hat, wird weiter über das Golgi Kompartiment zur Zelloberfläche transportiert (Abb. 4.2). Dieser Weitertransport wird maßgeblich durch den zytoplasmatischen Anteil des Glykoproteins beeinflusst. In dieser Arbeit konnten zwei, *is1* und *is2* bezeichnete Sequenzelemente innerhalb der zytoplasmatischen Domäne identifiziert werden, die Einfluß auf die Env Oberflächenexpression nehmen und eine verminderte Oberflächenexpression durch Golgi Retention oder Proteinrückführung von der Zellmembran in die Zelle („*retrieval*“) bewirken. Um post-ER Ereignisse zu untersuchen, die nicht durch die ER-Retention und Akkumulation des gp160 überlagert werden, wurde zur Identifizierung von auf die Oberflächenexpression wirkender Sequenzelemente ein heterologes System benützt. Beide Elemente vermitteln eine Golgi Lokalisation der chimären Proteine und wirken wenigstens zum Teil als „*retrieval*“-Motive. Retentionssignale Golgi-residenter Transmembranproteine sind hauptsächlich in ihren Transmembrandomänen zu finden (Munro, 1995; Nilsson et al., 1993). Zwei Mechanismen der Golgi-Retention werden zur Zeit diskutiert. Der erste basiert auf einer Retention durch Oligomerisierung der Proteine zu großen Aggregaten; der zweite postuliert einen Retentionsmechanismus aufgrund der Längen der Transmembrandomänen und der unterschiedlichen Membranstärken der zellulären Kompartimente. Alternativ kann die Golgi Lokalisation durch eine Proteinrückführung von der Zelloberfläche ins Golgi verursacht werden. Entsprechende Signale wurden in den zytoplasmatischen Domänen einiger trans-Golgi Proteine gefunden, die zwischen Zelloberfläche und Golgi „*recycled*“ werden. Sie bestehen entweder aus Motiven, die einen Tyrosinrest oder zwei Leuzine enthalten, oder können aus sauren oder aus phenylalaninhaltigen Regionen bestehen. Die Signale können gleichzeitig vorhanden und miteinander kombiniert sein (Bryant and Stevens, 1997; Schafer et al., 1995b; Stroh et al., 1999; Zhu et al., 1996).

Das membranproximale, tyrosinhaltige Motiv YXXL des gp160 (aa713-716) wurde als ein Env Internalisierungsmotiv beschrieben (Berlioz et al., 1999; Rowell et al., 1995). Über diese Aminosäureabfolge scheint das Env Glykoprotein an Clathrin-assoziierte $\mu 1$ und $\mu 2$ Untereinheiten des AP Adaptor Komplexes zu binden und somit in entsprechenden Vesikeln verpackt von der Zelloberfläche abgeräumt zu werden (Berlioz et al., 1999). Die Bindung unterbleibt, wenn gleichzeitig HIV-1 Gag Vorläuferprotein anwesend ist (Egan et al., 1996).

Beide Gruppen berichten allerdings von nicht näher charakterisierten zusätzlichen Determinanten, die distal zu dem beschriebenen Tyrosin Motiv liegen, und die ebenfalls Adaptor Komplexe unabhängig vom YXXL Motiv binden, beziehungsweise Einfluß auf die Oberflächenexpression nehmen können. In der vorliegenden Arbeit konnte nur ein geringer oder kein Effekt der Aminosäuren zwischen aa707 bis aa749 des gp160, welche das YXXL Motiv einschließen, auf die Internalisierung und die „*steady state*“ Oberflächenexpression festgestellt werden, so daß dieses Motiv zumindest in einem bis auf Aminosäure aa749 verkürztem Protein (CD4gp41 Δ 749) kaum Wirkung zeigt und das YXXL Motiv weitere Sequenzen benötigt, um funktionell zu sein. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Befunden überein (Rowell et al., 1995). Bei Austausch des Tyrosinrests durch Alanin und daraus resultierender Zerstörung des Internalisierungsmotivs konnte die Oberflächenexpression nicht wiederhergestellt und eine immer noch deutliche, wenn auch geringere Internalisierung beobachtet werden, die somit YXXL unabhängig erfolgen mußte. Ein bis auf Aminosäure aa763 verkürztes Protein (CD4gp41 Δ 763), das das Element *is1* beinhaltet, zeigt im Vergleich zum CD4gp41 Δ 749 eine deutlich verringerte „*steady state*“ Oberflächenexpression und gleichzeitig eine erheblich stärkere Internalisierungsrate. Somit muß zumindest das Element *is1* vorhanden sein, damit das Signal YXXL als Internalisierungsmotiv erkannt wird. Offensichtlich ergänzen sich beide Motive beziehungsweise verstärken sich. Die hier beschriebenen Elemente *is1* und *is2* bewirken bereits im Kontext der gesamten zytoplasmatischen Domäne jedes einzeln, und als isolierte Elemente zusammen verminderte Oberflächenexpression. *is1* und *is2* nehmen beide Einfluß auf die Internalisierung, wobei die Internalisierung durch die Deletion von *is1* wesentlich stärker vermindert werden kann als durch Eliminierung von *is2*. Somit induziert *is1* im Vergleich zu *is2* eine stärkere Endozytose. Dieser Mechanismus scheint jedoch nicht allein für den beobachteten „*steady state*“ Phänotyp verantwortlich zu sein, da die Konstrukte CD4 Δ cyt, CD4gp41 Δ 749 und CD4gp41 Δ *is1*+2 eine verstärkte Oberflächenexpression aufweisen, während CD4gp41 Δ *is1*, das dem CD4gp41 Δ *is1*+2 ähnliche Internalisierungsraten besitzt, vor allem im Golgi lokalisiert ist. Erklärt werden könnte dies damit, daß *is2* seine Wirkung entfaltet, bevor das Protein an die Zellmembran gelangt und internalisiert werden kann. Daher kommt *is1* eher eine Bedeutung für den Transport von der Zelloberfläche in die Zelle hinein zu, während *is2* offensichtlich vor allem den Transport aus dem Golgi heraus oder zur Zelloberfläche hin beeinflusst.

Die gp41 zytoplasmatische Domäne enthält mehrere Dileuzinmotive, die in einigen Proteinen

als Internalisierungssignal wirksam sind (Aiken et al., 1994; Haft et al., 1994; Kil et al., 1999; Marsh et al., 1995; Matter et al., 1994). Die zwei Dileuzine im Bereich von *is2* scheinen verantwortlich für die wenn auch geringe Internalisierungskapazität dieses Elements zu sein, da die Internalisierungsrate nach Deletion von *is2* oder nach Mutation der Dileuzine zu Dialaninen annähernd gleich ist. Diese Dileuzinmotive sind zwischen verschiedenen Isolaten konserviert. Das Motiv an der Aminosäureposition aa784/85 ist innerhalb der Konsensussequenzen von Subtyp A bis D vollständig konserviert. Dies korreliert mit seiner größeren Aktivität als Golgi „retrieval“ Signal im Vergleich zum Motiv an Position aa776/7. Im letzteren Motiv ist das erste Leuzin in den Konsensussequenzen der Subtypen A, C und D durch ein Isoleuzin ersetzt. Für entsprechende Isoleuzin-Leuzin Motive wurde ein ähnlicher Wirkmechanismus wie für Dileuzinmotive beschrieben.

Is2 ist weitgehend identisch mit dem „*lentivirus lytic peptide*“ LLP2 (aa768-88), das zusammen mit dem „*lentivirus lytic peptide*“ LLP1 (aa828-855) als eine amphipatische Struktur beschrieben wurde, die mit Membranen wechselwirken kann und die Membranpermeabilität durch Ausbildung von Kanälen verändert (Miller et al., 1993a; Srinivas et al., 1992; Venable et al., 1989). Für die LLP Domänen wurde weiterhin die Fähigkeit beschrieben, das regulatorische, zytoplasmatische Protein Calmodulin zu binden, und dadurch die intrazelluläre Signaltransduktion zu modulieren und zum zytopathischen Effekt von Env beizutragen (Beary et al., 1998; Kort, 1998; Miller et al., 1993b; Srinivas et al., 1993).

Das auf die Internalisierung stärker wirkende *is1* besitzt jedoch keine Dileuzine oder andere, für Zellen beschriebene Internalisierungssignale. Es weist jedoch einen hohen Anteil an hydrophoben, apolaren Aminosäuren und drei Leuzinreste in einem Abstand von jeweils sieben Aminosäuren auf, die eine „*leucin-zipper*“ ähnliche Region ausbilden könnten. Für die beiden Isoleuzine an Position aa756/7 und die Leuzin/Valin-Abfolge bei Aminosäure aa749/50 ist ein Dileuzin ähnlicher Wirkmechanismus nicht auszuschließen. Da zumindest einzelne Leuzinreste wirkungsneutral durch Isoleuzine ausgetauscht werden können, scheint weniger die exakte Aminosäureabfolge, sondern die Hydrophobizität des Signals wichtig zu sein, so daß weitere hydrophobe Aminosäuren wie zum Beispiel Valin als Ersatz in Frage kommen könnten. Die zwei Isoleuzine sind allerdings innerhalb der verschiedenen Subtypen nicht konserviert, so daß es als generelles Signal unwahrscheinlich ist. Dagegen ist die Leuzin-Valin Sequenz an Position aa749/50 innerhalb der Konsensussequenzen (Abb. 3.16) konserviert und zudem in Hefen als vakuolares Transportsignal und in polarisierten Zellen als

regulatives Motiv für die basolaterale Lokalisation beschrieben worden (Vowels and Payne, 1998; Sheikh and Isacke, 1996; Rodionov et al., 2000).

In HIV-1 und anderen Retroviren ist die Oberflächenexpression der Glykoproteine stringent reguliert. Die gp41 zytoplasmatische Domäne von HIV-1 spielt dabei eine große Rolle, da sie den intrazellulären Transport, die Oberflächenexpression und die Inkorporation in den Viruspartikel beeinflusst (Haffar et al., 1990; Rowell et al., 1995) (Lodge et al., 1994; Lodge et al., 1997; Salzwedel et al., 1993). Es gibt mehrere Hinweise darauf, daß die regulierte und niedrige Oberflächenexpression des Glykoproteins für das Virus *in vivo* entscheidend ist. Während *in vitro* Kulturen von SIV und HIV-2 auf Verkürzungen der zytoplasmatischen Domäne selektionieren, können nach Gabe von SIV Mutanten mit verkürztem Env in Rhesusaffen Revertanten, die das vollständige Protein exprimieren, beobachtet werden (Luciw et al., 1998). Das Virus hat offensichtlich mehrere verschiedene Strategien auf unterschiedlichen Ebenen entwickelt, um die Glykoproteinexpression zu regulieren. Auf der Nukleinsäureebene wird der mRNA Transport und auf der Proteinebene der Proteintransport durch Retentions- und „*retrieval*“-Signale inhibiert. Beide Mechanismen sind koordinierte und regulierte Prozesse, die von den viralen Proteinen Rev und Gag Vorläuferprotein beeinflusst werden (Egan et al., 1996; Emerman et al., 1989; Felber et al., 1989; Malim et al., 1989b). Da beide Strategien trotz der hohen Mutationsrate in HIV-1 konserviert sind, kommt ihnen wahrscheinlich eine wichtige Bedeutung zu.

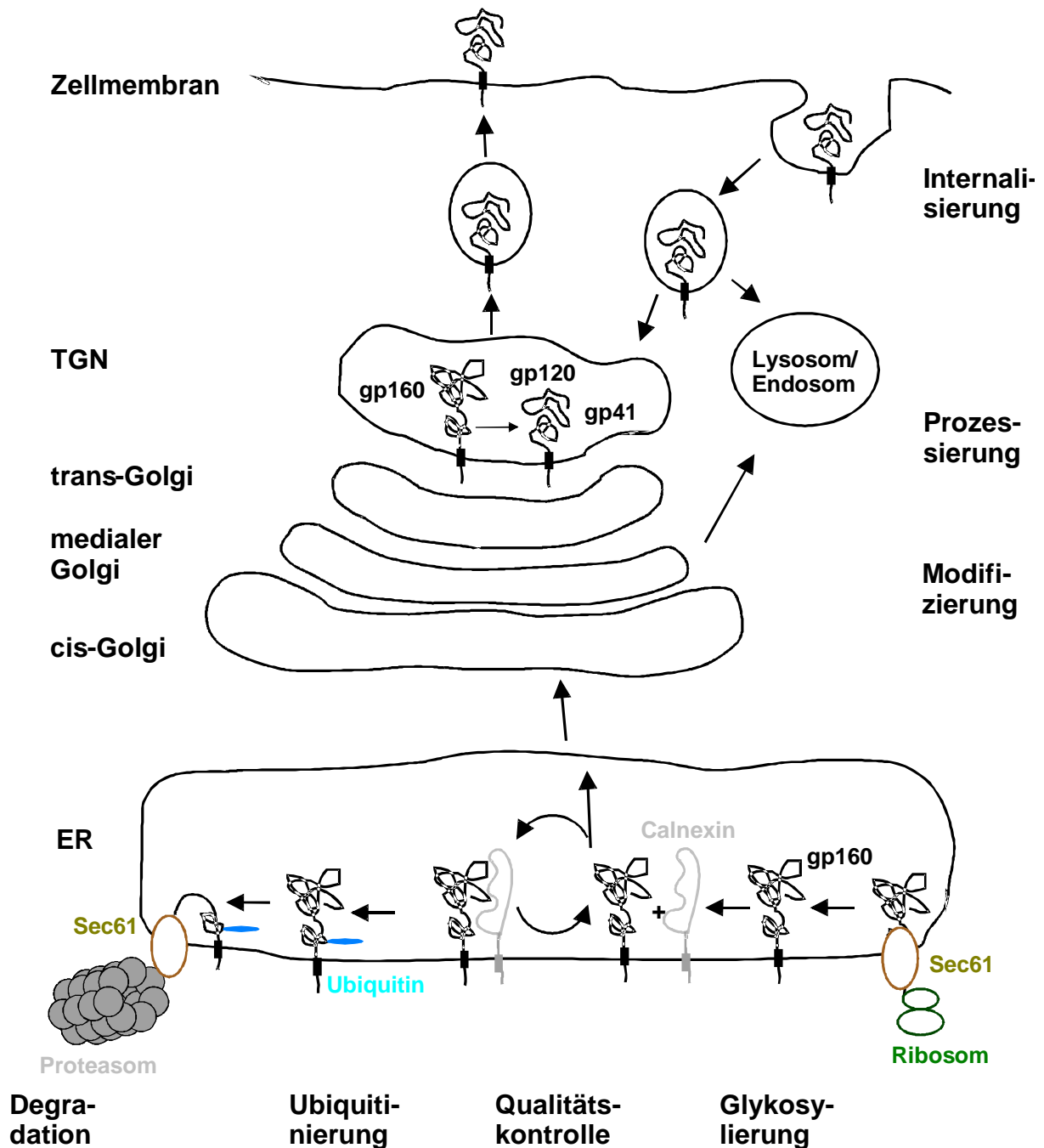


Abb. 4.2: Schema zum Transport und zur Degradation von gp160

Das gp160 wird kotranslational in das ER transportiert, wo es glykosyliert und durch Chaperone unterstützt gefaltet wird. Nach reversibler, transientser Bindung an Komponenten des Qualitätskontrollsystems wie Calnexin wird fehlerhaftes Protein ubiquitiniert, retrograd transportiert und durch das Proteasom abgebaut. Korrekt gefaltetes gp160 wird über den Golgi, in den es weiter modifiziert und prozessiert wird, an die Zellmembran transportiert. Die Zellmembranexpression wird maßgeblich durch den zyttoplasmatischen Anteil des gp41 beeinflusst.

5. Zusammenfassung

Die Expression des HIV-1 Env Glykoproteins wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, die sowohl auf die Env mRNA als auch auf das Glykoprotein wirken. Diese Faktoren verursachen eine sehr effiziente Suppression des Glykoproteins, weshalb nur ein geringer Anteil von Env auf der Zelloberfläche exprimiert wird, während der größte Teil im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten und nachfolgend degradiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die auf der Proteinebene wirksamen Faktoren untersucht, die die Expression von Env auf der Zelloberfläche beeinflussen.

Wahrscheinlich aufgrund seiner komplexen Faltung und Modifikation wird ein ungewöhnlich großer Teil des Env Glykoproteins nicht von den während der Proteinsynthese bindenden Chaperonen, die Bestandteile des Qualitätskontrollsystems des ER sind, freigesetzt und in das Golgi Kompartiment transportiert, sondern bleibt im ER und wird nachfolgend degradiert. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß ER-assoziiertes Env ubiquitiniert und nachfolgend von Proteasomen abgebaut wird. Die extrazelluläre Domäne der gp41 Untereinheit wird monoubiquitiniert, und der ubiquitinierte Anteil des Glykoproteins befindet sich im Lumen des ER. Da ubiquitiniertes Env das Molekulargewicht des reifen Proteins aufweist und dessen extrazelluläre Domäne vollständig das Lumen des ER erreicht, wird es entweder kotranslational ohne Importstop oder innerhalb des ER Lumens ubiquitiniert. Die ubiquitinierte Form bleibt mit der ER-Membran assoziiert und ist auch nach Inhibition der proteasomalen Degradation nicht im Zytosol nachweisbar, was für einen gekoppelten Prozeß des retrograden Transports und des proteasomalen Abbaus spricht. Während des Proteinexports ist außerdem eine Assoziation mit dem Sec61p Translokon-Protein nachweisbar, welches beim retrograden Transport mißgefalteter Proteine eine Rolle spielt. Die proteasomale Degradation von Env konnte sowohl *in vivo* als auch mit Hilfe eines *in vitro* Systems mit isolierten Mikrosomen und aufgereinigten Proteasomen nachgewiesen werden.

Korrekt synthetisiertes und prozessiertes Env Glykoprotein, das die ER Qualitätskontrolle erfolgreich passiert hat, wird über das Golgi Kompartiment zur Zelloberfläche transportiert. Dieser Weitertransport und die Oberflächenexpression des Glykoproteins wird entscheidend von der zytoplasmatischen Domäne beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Proteinmotive *is1* (aa750 - 763) und *is2* (aa764 - 785) identifiziert werden, die sowohl in einem heterologen, chimären Protein, als auch im gp160 Glykoprotein zu einer Inhibition der Oberflächenexpression und zur Golgi Lokalisation führen. Der Mechanismus konnte

zumindest teilweise auf eine Internalisierung des auf der Zelloberfläche exprimierten Proteins zurück-geführt werden.

6. Abkürzungen

aa	Aminosäuren (<i>aminoacid</i>)
Abb	Abbildung
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
AP	Adaptor Protein
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	<i>immunoglobulin binding protein</i>
bp	Basenpaare
CA	Capsidprotein
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
CT	<i>cytoplasmic tail</i>
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
DSP	Dithio-bis-succinimidylpropionat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (Durchflußzytometer)
FITC	Fluoresceinisocyanat
g	Erdbeschleunigung
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HCMV	humanes CMV
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV	Herpes simplex Virus
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
is	inhibitorische Sequenz
kD	Kilodalton
LI	Linkprotein
MA	Matrixprotein
mAk	monoklonaler Antikörper
Met	Methionin
MetOH	Methanol
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NC	Nucleocapsidprotein

Abkürzungen

ORF	Offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDI	Proteindisulfidisomerase
PNGase F	Peptid- <i>N</i> -Glykosidase F
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TGN	<i>trans</i> -Golgi <i>network</i>
TM	Transmembranregion
U	Einheiten
WHO	Weltgesundheitsorganisation
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp

7. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden oder werden veröffentlicht in:

Bültmann A., Eberle J., Haas J. (2000). Ubiquitination of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Env Glycoprotein. *J Virol* 74, 5373-5376

Bültmann A., Muranyi W., Seed B., Haas J. (2001). Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein that inhibit cell surface expression. *J Virol* 75, 5263-5276

Bültmann A., Haas J.. Proteasomal Degradation of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Env Glycoprotein. *J Biol Chem*, eingereicht

Weitere Publikationen:

Wittchen K.D., Strey J., Bültmann A., Reichenberg S., Meinhardt F. (1998). Molecular characterization of the operon comprising the *spoIV* gene of *Bacillus megaterium* DSM319 and generation of a deletion mutant. *J Gen Appl Microbiol* 44, 317-326

André S., Seed B., Eberle J., Schraut W., Bültmann A., Haas J. (1998). Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol* 72, 1497-1503

8. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Jürgen Haas für die Vergabe des Themas, die Betreuung der Arbeit, die stete Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung im Labor. Herrn Prof. L. Gürtler danke ich für die Übernahme der Doktorvaterschaft und für die kritische Überprüfung der vorliegenden Arbeit. Bei Herrn Prof. U.H. Koszinowski bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Walter Muranyi für die technische Unterstützung bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie und Frau Anja Bubeck für die Hilfsbereitschaft bei dem *in vitro* Degradationsexperiment.

Außerdem danke ich Herrn Prof. B. Dobberstein für die Bereitstellung des anti-sec61p Antiserums, Frau Dr. M. Schmidt und Herrn Prof. P.M. Kloetzel für die aufgereinigten 26S Proteasomen, Herrn Prof. F. Momburg und Herrn Prof. G. Hämmerling für das anti-Tap2 Antiserum, Herrn Dr. H. Hengel für Interferon γ und Herrn Dr. J. Eberle für die Überlassung des HIV Stamms MvP 899.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern im Genzentrum für alle Hilfeleistungen, das gute kollegiale Verhältnis und das freundliche Arbeitsklima.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Frau, ohne deren Geduld und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9. Literatur

- Adamson, D.C., Wildemann, B., Sasaki, M., Glass, J.D., McArthur, J.C., Christov, V.I., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (1996). Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41. *Science* 274, 1917-1921.
- Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E., and Trono, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76, 853-864.
- Andersson, A.M., Melin, L., Bean, A., and Pettersson, R.F. (1997). A retention signal necessary and sufficient for Golgi localization maps to the cytoplasmic tail of a Bunyaviridae (Uukuniemi virus) membrane glycoprotein. *J Virol* 71, 4717-4727.
- Andersson, A.M. and Pettersson, R.F. (1998). Targeting of a short peptide derived from the cytoplasmic tail of the G1 membrane glycoprotein of Uukuniemi virus (Bunyaviridae) to the Golgi complex. *J Virol* 72, 9585-9596.
- Arthur, L.O., Bess-JW, J., Sowder, R.C., Benveniste, R.E., Mann, D.L., Chermann, J.C., and Henderson, L.E. (1992). Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines [see comments]. *Science* 258, 1935-1938.
- Banda, N.K., Bernier, J., Kurahara, D.K., Kurrle, R., Haigwood, N., Sekaly, R.P., and Finkel, T.H. (1992). Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* 176, 1099-1106.
- Beary, T.P., Tencza, S.B., Mietzner, T.A., and Montelaro, R.C. (1998). Interruption of T-cell signal transduction by lentivirus lytic peptides from HIV-1 transmembrane protein. *J Pept.Res* 51, 75-79.
- Berlioz, T.C., Shacklett, B.L., Erdtmann, L., Delamarre, L., Bouchaert, I., Sonigo, P., Dokhelar, M.C., and Benarous, R. (1999). Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J Virol* 73, 1350-1361.
- Bernstein, H.B. and Compans, R.W. (1992). Sulfation of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J Virol* 66, 6953-6959.
- Biederer, T., Volkwein, C., and Sommer, T. (1996). Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 15, 2069-2076.
- Biederer, T., Volkwein, C., and Sommer, T. (1997). Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface [see comments]. *Science* 278, 1806-1809.
- Birx, D.L., Redfield, R.R., and Tosato, G. (1986). Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related disorders. *N Engl J Med* 314, 874-879.

- Bjorndal, A., Deng, H., Jansson, M., Fiore, J.R., Colognesi, C., Karlsson, A., Albert, J., Scarlatti, G., Littman, D.R., and Fenyo, E.M. (1997). Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* 71, 7478-7487.
- Boge, M., Wyss, S., Bonifacino, J.S., and Thali, M. (1998). A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *J Biol Chem* 273, 15773-15778.
- Bolmstedt, A., Hemming, A., Flodby, P., Berntsson, P., Travis, B., Lin, J.P., Ledbetter, J., Tsu, T., Wigzell, H., Hu, S.L., and et, a. (1991). Effects of mutations in glycosylation sites and disulphide bonds on processing, CD4-binding and fusion activity of human immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 72, 1269-1277.
- Bonifacino, J.S., Weissman, A.M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 19-57
- Bordallo, J., Plemper, R.K., Finger, A., and Wolf, D.H. (1998). Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* 9, 209-222.
- Brandimarti, R. and Roizman, B. (1997). Us9, a stable lysine-less herpes simplex virus 1 protein, is ubiquitinated before packaging into virions and associates with proteasomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13973-13978.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., and Ciechanover, A. (1998). A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J* 17, 5964-5973.
- Brodsky, J.L., Werner, E.D., Dubas, M.E., Goekeler, J.L., Kruse, K.B., and McCracken, A.A. (1999). The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem* 274, 3453-3460.
- Bryant, N.J. and Stevens, T.H. (1997). Two separate signals act independently to localize a yeast late Golgi membrane protein through a combination of retrieval and retention. *J Cell Biol* 136, 287-297.
- Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., and Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells [see comments]. *Nature* 365, 666-669.
- Casella, C.R. and Finkel, T.H. (1997). Mechanisms of lymphocyte killing by HIV. *Curr Opin Hematol.* 4, 24-31.
- Charneau, P., Borman, A.M., Quillent, C., Guetard, D., Chamaret, S., Cohen, J., Remy, G., Montagnier, L., and Clavel, F. (1994). Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* 205, 247-253.

- Chen, Z., Luckay, A., Sodora, D.L., Telfer, P., Reed, P., Gettie, A., Kanu, J.M., Sadek, R.F., Yee, J., Ho, D.D., Zhang, L., and Marx, P.A. (1997). Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Virol* *71*, 3953-3960.
- Chen, Z., Telfer, P., Gettie, A., Reed, P., Zhang, L., Ho, D.D., and Marx, P.A. (1996). Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J Virol* *70*, 3617-3627.
- Cheng, M.C., Rutka, J.T., Rosenblum, M.L., McHugh, T., Stites, D.P., and Levy, J.A. (1987). Human immunodeficiency virus can productively infect cultured human glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 3526-3530.
- Chitnis, A., Rawls, D., and Moore, J. (2000). Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses* *16*, 5-8.
- Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* *79*, 13-21.
- Clapham, P.R., Reeves, J.D., Simmons, G., Dejuq, N., Hibbitts, S., and McKnight, A. (1999). HIV coreceptors, cell tropism and inhibition by chemokine receptor ligands. *Mol Membr Biol* *16*, 49-55.
- Collman, R., Hassan, N.F., Walker, R., Godfrey, B., Cutilli, J., Hastings, J.C., Friedman, H., Douglas, S.D., and Nathanson, N. (1989). Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types. *J Exp Med* *170*, 1149-1163.
- Cottrez, F., Manca, F., Dalgleish, A.G., Arenzana, S.F., Capron, A., and Groux, H. (1997). Priming of human CD4+ antigen-specific T cells to undergo apoptosis by HIV-infected monocytes. A two-step mechanism involving the gp120 molecule. *J Clin Invest* *99*, 257-266.
- Courageot, J., Fenouillet, E., Bastiani, P., and Miquelis, R. (1999). Intracellular degradation of the HIV-1 envelope glycoprotein. Evidence for, and some characteristics of, an endoplasmic reticulum degradation pathway. *Eur J Biochem* *260*, 482-489.
- Cullen, B.R. (1991). Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB J* *5*, 2361-2368.
- D'Agostino, D.M., Felber, B.K., Harrison, J.E., and Pavlakis, G.N. (1992). The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs. *Mol Cell Biol* *12*, 1375-1386.
- Dalgleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* *312*, 763-767.

- Dash, B., McIntosh, A., Barrett, W., and Daniels, R. (1994). Deletion of a single N-linked glycosylation site from the transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 stops cleavage and transport of gp160 preventing env-mediated fusion. *J Gen Virol* 75, 1389-1397.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di, M.P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R., and Landau, N.R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 [see comments]. *Nature* 381, 661-666.
- Department of Microbiology, University of Otago, Neuseeland. Elektronenmikroskopische Aufnahme von HIV-1. http://www.virology.net/Big_Virology/BVretro.html
- Desrosiers, R.C. (1990a). HIV-1 origins. A finger on the missing link [news; comment]. *Nature* 345, 288-289.
- Desrosiers, R.C. (1990b). The simian immunodeficiency viruses. *Annu Rev Immunol* 8, 557-578.
- Dewhurst, S., Bresser, J., Stevenson, M., Sakai, K., Evinger, H.M., and Volsky, D.J. (1987a). Susceptibility of human glial cells to infection with human immunodeficiency virus (HIV). *FEBS Lett* 213, 138-143.
- Dewhurst, S., Sakai, K., Bresser, J., Stevenson, M., Evinger, H.M., and Volsky, D.J. (1987b). Persistent productive infection of human glial cells by human immunodeficiency virus (HIV) and by infectious molecular clones of HIV. *J Virol* 61, 3774-3782.
- Doolittle, R.F. (1989a). Immunodeficiency viruses: the simian-human connection [news]. *Nature* 339, 338-339.
- Doolittle, R.F., Feng, D.F., Johnson, M.S., and McClure, M.A. (1989b). Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Q.Rev Biol* 64, 1-30.
- Dunphy, W.G. and Rothman, J.E. (1985). Compartmental organization of the Golgi stack. *Cell* 42, 13-21.
- Earl, P.L., Moss, B., and Doms, R.W. (1991). Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* 65, 2047-2055.
- Edelman, A.S. and Zolla, P.S. (1989). AIDS: a syndrome of immune dysregulation, dysfunction, and deficiency. *FASEB J* 3, 22-30.
- Egan, M.A., Carruth, L.M., Rowell, J.F., Yu, X., and Siliciano, R.F. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *J Virol* 70, 6547-6556.
- Emerman, M. and Malim, M.H. (1998). HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 280, 1880-1884.

- Emerman, M., Vazeux, R., and Peden, K. (1989). The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell* 57, 1155-1165.
- Fantini, J., Yahi, N., Baghdiguian, S., and Chermann, J.C. (1992). Human colon epithelial cells productively infected with human immunodeficiency virus show impaired differentiation and altered secretion. *J Virol* 66, 580-585.
- Fantini, J., Yahi, N., and Chermann, J.C. (1991). Human immunodeficiency virus can infect the apical and basolateral surfaces of human colonic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9297-9301.
- Felber, B.K., Hadzopoulou, C.M., Cladaras, C., Copeland, T., and Pavlakis, G.N. (1989). rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1495-1499.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* 272, 872-877.
- Fennie, C. and Lasky, L.A. (1989). Model for intracellular folding of the human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* 63, 639-646.
- Fenouillet, E., Gluckman, J.C., and Jones, I.M. (1994). Functions of HIV envelope glycans. *Trends Biochem Sci* 19, 65-70.
- Fenouillet, E. and Jones, I.M. (1995). The glycosylation of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein (gp41) is important for the efficient intracellular transport of the envelope precursor gp160. *J Gen Virol* 76, 1509-1514.
- Fenyo, E.M., Morfeldt, M.L., Chiodi, F., Lind, B., von, G.A., Albert, J., Olausson, E., and Asjo, B. (1988). Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol* 62, 4414-4419.
- Franke, E.K., Yuan, H.E., and Luban, J. (1994). Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions [see comments]. *Nature* 372, 359-362.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes* [see comments]. *Nature* 397, 436-441.
- Gao, F., Yue, L., Robertson, D.L., Hill, S.C., Hui, H., Biggar, R.J., Neequaye, A.E., Whelan, T.M., Ho, D.D., Shaw, G.M., and et, a. (1994). Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* 68, 7433-7447.
- Gao, F., Yue, L., White, A.T., Pappas, P.G., Barchue, J., Hanson, A.P., Greene, B.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., and Hahn, B.H. (1992). Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 358, 495-499.

- Giorgi, J.V., Nishanian, P.G., Schmid, I., Hultin, L.E., Cheng, H.L., and Detels, R. (1987). Selective alterations in immunoregulatory lymphocyte subsets in early HIV (human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus) infection. *J Clin Immunol* 7, 140-150.
- Gojobori, T., Moriyama, E.N., Ina, Y., Ikeo, K., Miura, T., Tsujimoto, H., Hayami, M., and Yokoyama, S. (1990). Evolutionary origin of human and simian immunodeficiency viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4108-4111.
- Grupp, S.A., Mitchell, R.N., Schreiber, K.L., McKean, D.J., and Abbas, A.K. (1995). Molecular mechanisms that control expression of the B lymphocyte antigen receptor complex. *J Exp Med* 181, 161-168.
- Gurley, R.J., Ikeuchi, K., Byrn, R.A., Anderson, K., and Groopman, J.E. (1989). CD4+ lymphocyte function with early human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1993-1997.
- Gurtler, L.G., Hauser, P.H., Eberle, J., von, B.A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J.M., and Kaptue, L. (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* 68, 1581-1585.
- Gurtler, L.G., Zekeng, L., Tsague, J.M., van, B.A., Afane, Z.E., Eberle, J., and Kaptue, L. (1996). HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. *Arch Virol Suppl* 11, 195-202.
- Haas, J., Park, E.C., and Seed, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol* 6, 315-324.
- Haffar, O.K., Nakamura, G.R., and Berman, P.W. (1990). The carboxy terminus of human immunodeficiency virus type 1 gp160 limits its proteolytic processing and transport in transfected cell lines. *J Virol* 64, 3100-3103.
- Haft, C.R., Klausner, R.D., and Taylor, S.I. (1994). Involvement of dileucine motifs in the internalization and degradation of the insulin receptor [published erratum appears in *J Biol Chem* 1995 Dec 15;270(50):30235]. *J Biol Chem* 269, 26286-26294.
- Hammond, C. and Helenius, A. (1995). Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7, 523-529.
- Hansen, J.E., Clausen, H., Hu, S.L., Nielsen, J.O., and Olofsson, S. (1992). An O-linked carbohydrate neutralization epitope of HIV-1 gp 120 is expressed by HIV-1 env gene recombinant vaccinia virus. *Arch Virol* 126, 11-20.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- High, S., Martoglio, B., Gorlich, D., Andersen, S.S., Ashford, A.J., Giner, A., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A., Dobberstein, B., and et, a. (1993). Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence. *J Biol Chem* 268, 26745-26751.

- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey, C.M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389-392.
- Ho, D.D. (1995a). HIV-1 dynamics in vivo. *J Biol Regul. Homeost. Agents* 9, 76-77.
- Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., and Markowitz, M. (1995b). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection [see comments]. *Nature* 373, 123-126.
- Hurtley, S.M. and Helenius, A. (1989). Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* 5, 277-307.
- International Committee on Taxonomy of Viruses, NCBI. Genome organization and replication of HIV-1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/61060000.htm>
- Israel, N. and Gougerot, P.M. (1997). Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. *Cell Mol Life Sci* 53, 864-870.
- Jackson, M.R., Nilsson, T., and Peterson, P.A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 9, 3153-3162.
- Jacobs, E., Gheysen, D., Thines, D., Francotte, M., and de, W.M. (1989). The HIV-1 Gag precursor Pr55gag synthesized in yeast is myristoylated and targeted to the plasma membrane. *Gene* 79, 71-81.
- Kantanen, M.L., Leinikki, P., and Kuismanen, E. (1995). Endoproteolytic cleavage of HIV-1 gp160 envelope precursor occurs after exit from the trans-Golgi network (TGN). *Arch Virol* 140, 1441-1449.
- Karpel, R.L., Henderson, L.E., and Oroszlan, S. (1987). Interactions of retroviral structural proteins with single-stranded nucleic acids. *J Biol Chem* 262, 4961-4967.
- Kil, S.J., Hobert, M., and Carlin, C. (1999). A leucine-based determinant in the epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain is required for the efficient transport of ligand-receptor complexes to lysosomes. *J Biol Chem* 274, 3141-3150.
- Kimura, T., Nishikawa, M., and Fujisawa, J. (1996). Uncleaved env gp160 of human immunodeficiency virus type 1 is degraded within the Golgi apparatus but not lysosomes in COS-1 cells. *FEBS Lett* 390, 15-20.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C., and Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312, 767-768.
- Klausner, R.D. and Sitia, R. (1990). Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* 62, 611-614.
- Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M., and Sigal, I.S. (1988). Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4686-4690.

- Kolanus, W., Romeo, C., and Seed, B. (1993). T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* 74, 171-183.
- Kolesnitchenko, V., King, L., Riva, A., Tani, Y., Korsmeyer, S.J., and Cohen, D.I. (1997). A major human immunodeficiency virus type 1-initiated killing pathway distinct from apoptosis. *J Virol* 71, 9753-9763.
- Kopito, R.R. (1997). ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* 88, 427-430.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-664.
- Kornitzer, D., Raboy, B., Kulka, R.G., and Fink, G.R. (1994). Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *EMBO J* 13, 6021-6030.
- Kort, J.J. (1998). Impairment of excitatory amino acid transport in astroglial cells infected with the human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14, 1329-1339.
- Kostrikis, L.G., Bagdades, E., Cao, Y., Zhang, L., Dimitriou, D., and Ho, D.D. (1995). Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol* 69, 6122-6130.
- Krausslich, H.G., Facke, M., Heuser, A.M., Konvalinka, J., and 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.
- Lawrence, J.B., Cochrane, A.W., Johnson, C.V., Perkins, A., and Rosen, C.A. (1991). The HIV-1 Rev protein: a model system for coupled RNA transport and translation. *New Biol* 3, 1220-1232.
- Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle [published erratum appears in *EMBO J* 1992 Nov;11(11):4249]. *EMBO J* 11, 3053-3058.
- Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Metelev, V., and Pardee, A.B. (1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268, 429-431.
- Li, Y., Bergeron, J.J., Luo, L., Ou, W.J., Thomas, D.Y., and Kang, C.Y. (1996). Effects of inefficient cleavage of the signal sequence of HIV-1 gp 120 on its association with calnexin, folding, and intracellular transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9606-9611.
- Liao, W., Yeung, S.C., and Chan, L. (1998). Proteasome-mediated degradation of apolipoprotein B targets both nascent peptides cotranslationally before translocation and full-length apolipoprotein B after translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273, 27225-27230.

- Liu, Y., Choudhury, P., Cabral, C.M., and Sifers, R.N. (1999). Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J Biol Chem* 274, 5861-5867.
- Lodge, R., Gottlinger, H., Gabuzda, D., Cohen, E.A., and Lemay, G. (1994). The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J Virol* 68, 4857-4861.
- Lodge, R., Lalonde, J.P., Lemay, G., and Cohen, E.A. (1997). The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J* 16, 695-705.
- Lu, M., Blacklow, S.C., and Kim, P.S. (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct.Biol* 2, 1075-1082.
- Luban, J. (1996). Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* 87, 1157-1159.
- Luciw, P.A., Shaw, K.E., Shacklett, B.L., and Marthas, M.L. (1998). Importance of the intracytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus (SIV) envelope glycoprotein for pathogenesis. *Virology* 252, 9-16.
- Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A., and Axel, R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333-348.
- Malim, M.H., Bohnlein, S., Fenrick, R., Le, S.Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R. (1989a). Functional comparison of the Rev trans-activators encoded by different primate immunodeficiency virus species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8222-8226.
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R. (1989b). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254-257.
- Marsh, B.J., Alm, R.A., McIntosh, S.R., and James, D.E. (1995). Molecular regulation of GLUT-4 targeting in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biol* 130, 1081-1091.
- Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97, 553-564.
- Matter, K., Yamamoto, E.M., and Mellman, I. (1994). Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol* 126, 991-1004.
- McCracken, A.A. and Brodsky, J.L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* 132, 291-298.

- McNearney, T., Hornickova, Z., Markham, R., Birdwell, A., Arens, M., Saah, A., and Ratner, L. (1992). Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10247-10251.
- Meyer, B.E. and Malim, M.H. (1994). The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* 8, 1538-1547.
- Miedema, F., Petit, A.J., Terpstra, F.G., Schattenkerk, J.K., de, W.F., Al, B.J., Roos, M., Lange, J.M., Danner, S.A., Goudsmit, J., and et, a. (1988). Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 82, 1908-1914.
- Miller, M.A., Cloyd, M.W., Liebmann, J., Rinaldo-CR, J., Islam, K.R., Wang, S.Z., Mietzner, T.A., and Montelaro, R.C. (1993a). Alterations in cell membrane permeability by the lentivirus lytic peptide (LLP-1) of HIV-1 transmembrane protein. *Virology* 196, 89-100.
- Miller, M.A., Mietzner, T.A., Cloyd, M.W., Robey, W.G., and Montelaro, R.C. (1993b). Identification of a calmodulin-binding and inhibitory peptide domain in the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9, 1057-1066.
- Moulard, M., Hallenberger, S., Garten, W., and Klenk, H.D. (1999). Processing and routage of HIV glycoproteins by furin to the cell surface. *Virus Res* 60, 55-65.
- Munro, S. (1995). An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J* 14, 4695-4704.
- Nilsson, T., Slusarewicz, P., Hoe, M.H., and Warren, G. (1993). Kin recognition. A model for the retention of Golgi enzymes. *FEBS Lett* 330, 1-4.
- Ohno, H., Aguilar, R.C., Fournier, M.C., Hennecke, S., Cosson, P., and Bonifacino, J.S. (1997). Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family. *Virology* 238, 305-315.
- Osmanov, S., Belsey, E.M., Heyward, W., Esparza, J., Galvao, C.B., Van-de, P.P., Karita, E., Wasl, C., Sempala, S., Tugume, B., Biryahwaho, B., Rubsamen, W.H., Von, B.H., Esser, R., Grez, M., Holmes, H., Bradac, J., McCutchan, F., Louwagie, J., and et al. (1994). HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains. WHO Network for HIV Isolation and Characterization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10, 1327-1343.
- Ott, D.E., Coren, L.V., Copeland, T.D., Kane, B.P., Johnson, D.G., Sowder, R.C., Yoshinaka, Y., Oroszlan, S., Arthur, L.O., and Henderson, L.E. (1998). Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* 72, 2962-2968.

- Otteken, A., Earl, P.L., and Moss, B. (1996a). Folding, assembly, and intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein analyzed with monoclonal antibodies recognizing maturational intermediates. *J Virol* 70, 3407-3415.
- Otteken, A. and Moss, B. (1996b). Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin. *J Biol Chem* 271, 97-103.
- Oyaizu, N. and Pahwa, S. (1995). Role of apoptosis in HIV disease pathogenesis. *J Clin Immunol* 15, 217-231.
- Parodi, A.J. (1999). Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1426, 287-295.
- Paxton, W., Connor, R.I., and Landau, N.R. (1993). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol* 67, 7229-7237.
- Pelham, H.R. (1990). The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* 15, 483-486.
- Pettit, S.C., Moody, M.D., Wehbie, R.S., Kaplan, A.H., Nantermet, P.V., Klein, C.A., and Swanstrom, R. (1994). The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J Virol* 68, 8017-8027.
- Piller, S.C., Ewart, G.D., Jans, D.A., Gage, P.W., and Cox, G.B. (1999). The amino-terminal region of Vpr from human immunodeficiency virus type 1 forms ion channels and kills neurons. *J Virol* 73, 4230-4238.
- Plempner, R.K., Egner, R., Kuchler, K., and Wolf, D.H. (1998). Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol Chem* 273, 32848-32856.
- Plempner, R.K. and Wolf, D.H. (1999a). Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. *Mol Biol Rep.* 26, 125-130.
- Plempner, R.K. and Wolf, D.H. (1999b). Retrograde protein translocation: Eradication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci* 24, 266-270.
- Pollard, V.W. and Malim, M.H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 52, 491-532.
- Ponnambalam, S., Rabouille, C., Luzio, J.P., Nilsson, T., and Warren, G. (1994). The TGN38 glycoprotein contains two non-overlapping signals that mediate localization to the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 125, 253-268.
- Preston, B.D., Poiesz, B.J., and Loeb, L.A. (1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242, 1168-1171.

- Ratner, L. (1992). Glucosidase inhibitors for treatment of HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 165-173.
- Robertson, D. (1999). Phylogenetic tree of primate lentiviruses (PLV). University of Oxford, England. http://igs-server.cnrs-mrs.fr/anrs/phylogenetics/hiv_evolution/pol_5.html
- Rodionov, D.G., Nordeng, T.W., Kongsvik, T.L., and Bakke, O. (2000). The cytoplasmic tail of CD1d contains two overlapping basolateral sorting signals. *J Biol Chem* 275, 8279-82.
- Rosen, C.A. (1991). Tat and Rev: positive modulators of human immunodeficiency virus gene expression. *Gene Expr. 1*, 85-90.
- Rosen, C.A., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1985). The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* 41, 813-823.
- Rowell, J.F., Stanhope, P.E., and Siliciano, R.F. (1995). Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J Immunol* 155, 473-488.
- Salzwedel, K., Johnston, P.B., Roberts, S.J., Dubay, J.W., and Hunter, E. (1993). Expression and characterization of glycopospholipid-anchored human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J Virol* 67, 5279-5288.
- Schafer, W., Stroh, A., Berghofer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M.L., Kern, H.F., Klenk, H.D., and Garten, W. (1995a). Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J* 14, 2424-2435.
- Schnittman, S.M., Psallidopoulos, M.C., Lane, H.C., Thompson, L., Baseler, M., Massari, F., Fox, C.H., Salzman, N.P., and Fauci, A.S. (1989). The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4 [published erratum appears in *Science* 1989 Aug 18;245(4919):preceding 694]. *Science* 245, 305-308.
- Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, N.A., Dercksen, M.W., de, G.R., van, S.R., Lange, J.M., Schattenkerk, J.K., Miedema, F., and Tersmette, M. (1992). Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 66, 1354-1360.
- Schultz, A.M., Henderson, L.E., and Oroszlan, S. (1988). Fatty acylation of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 4, 611-647.
- Schutze, M.P., Peterson, P.A., and Jackson, M.R. (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 13, 1696-1705.

- Sheikh, H. and Isacke, C.M. (1996). A di-hydrophobic Leu-Val motif regulates the basolateral localization of CD44 in polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 271, 12185-90.
- Shu, W., Ji, H., and Lu, M. (1999). Trimerization specificity in HIV-1 gp41: analysis with a GCN4 leucine zipper model. *Biochemistry* 38, 5378-5385.
- Siegelman M., Bond M.W., Gallatin W.M., St John T., Smith H.T., Fried V.A., Weissman I.L. (1986). Cell surface molecule associated with lymphocyte homing is a ubiquitinated branched-chain glycoprotein. *Science* 231, 823-9.
- Simon, F., Mauclore, P., Roques, P., Loussert, A.I., Muller, T.M., Saragosti, S., Georges, C.M., Barre, S.F., and Brun, V.F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 4, 1032-1037.
- Sommer, T. and Wolf, D.H. (1997). Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB J* 11, 1227-1233.
- South, T.L., Blake, P.R., Hare, D.R., and Summers, M.F. (1991). C-terminal retroviral-type zinc finger domain from the HIV-1 nucleocapsid protein is structurally similar to the N-terminal zinc finger domain. *Biochemistry* 30, 6342-6349.
- Srinivas, S.K., Srinivas, R.V., Anantharamaiah, G.M., Compans, R.W., and Segrest, J.P. (1993). Cytosolic domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoproteins binds to calmodulin and inhibits calmodulin-regulated proteins. *J Biol Chem* 268, 22895-22899.
- Srinivas, S.K., Srinivas, R.V., Anantharamaiah, G.M., Segrest, J.P., and Compans, R.W. (1992). Membrane interactions of synthetic peptides corresponding to amphipathic helical segments of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. *J Biol Chem* 267, 7121-7127.
- St John T., Gallatin W.M., Siegelman M., Smith H.T., Fried V.A., Weissman I.L. (1986). Expression cloning of a lymphocyte homing receptor cDNA: ubiquitin is the reactive species. *Science* 231, 845-50.
- Stroh, A., Schafer, W., Berghofer, S., Eickmann, M., Teuchert, M., Burger, I., Klenk, H.D., and Garten, W. (1999). A mono phenylalanine-based motif (F790) and a leucine-dependent motif (LI760) mediate internalization of furin. *Eur J Cell Biol* 78, 151-160.
- Summers, M.F., Henderson, L.E., Chance, M.R., Bess-JW, J., South, T.L., Blake, P.R., Sagi, I., Perez, A.G., Sowder, R.C., Hare, D.R., and et, a. (1992). Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Sci* 1, 563-574.
- Terrell, J., Shih, S., Dunn, R., and Hicke, L. (1998). A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol Cell* 1, 193-202.

- Tersmette, M., de Goede, R.E., Al, B.J., Winkel, I.N., Gruters, R.A., Cuypers, H.T., Huisman, H.G., and Miedema, F. (1988). Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* 62, 2026-2032.
- Tersmette, M., Lange, J.M., de Goede, R.E., de Wolf, F., Eeftink, S.J., Schellekens, P.T., Coutinho, R.A., Huisman, J.G., Goudsmit, J., and Miedema, F. (1989). Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1, 983-985.
- Tessmer, U. and Krausslich, H.G. (1998). Cleavage of human immunodeficiency virus type 1 proteinase from the N-terminally adjacent p6* protein is essential for efficient Gag polyprotein processing and viral infectivity. *J Virol* 72, 3459-3463.
- Tscherning, C., Alaeus, A., Fredriksson, R., Bjorndal, A., Deng, H., Littman, D.R., Fenyo, E.M., and Albert, J. (1998). Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* 241, 181-188.
- Vanden Haesevelde, M., Decourt, J.L., De Leys, R.J., Vanderborght, B., van der Groen, G., van Heuverswijn, H., and Saman, E. (1994). Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol* 68, 1586-1596.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12142-12149.
- Venable, R.M., Pastor, R.W., Brooks, B.R., and Carson, F.W. (1989). Theoretically determined three-dimensional structures for amphipathic segments of the HIV-1 gp41 envelope protein. *AIDS Res Hum Retroviruses* 5, 7-22.
- Vowels, J.J. and Payne, G.S. (1998). A dileucine-like sorting signal directs transport into an AP-3-dependent, clathrin-independent pathway to the yeast vacuole. *EMBO J* 17, 2482-93.
- Ward, C.L., Omura, S., and Kopito, R.R. (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83, 121-127.
- West, M.H. and Bonner, W.M. (1980). Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucleic Acids Res* 8, 4671-4680.
- WHO, WHO Global Programme on AIDS (1998). Report on the global HIV/AIDS epidemic June 1998.
- Wick, D. (1999). The disappearing CD4(+)T cells in HIV infection: a case of over-stimulation? *J Theor Biol* 197, 507-516.
- Willey, R.L., Bonifacino, J.S., Potts, B.J., Martin, M.A., and Klausner, R.D. (1988). Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9580-9584.

- Wouters, S., Decroly, E., Vandenbranden, M., Shober, D., Fuchs, R., Morel, V., Leruth, M., Seidah, N.G., Courtoy, P.J., and Ruyschaert, J.M. (1999). Occurrence of an HIV-1 gp160 endoproteolytic activity in low-density vesicles and evidence for a distinct density distribution from endogenously expressed furin and PC7/LPC convertases. *FEBS Lett* 456, 97-102.
- Yang, M., Ellenberg, J., Bonifacino, J.S., and Weissman, A.M. (1997). The transmembrane domain of a carboxyl-terminal anchored protein determines localization to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 272, 1970-1975.
- Yang, M., Omura, S., Bonifacino, J.S., and Weissmann, A.M. (1998). Novel aspects of degradation of T cell receptor subunits from the endoplasmic reticulum (ER) in T cells: Importance of oligosaccharide processing, ubiquitination, and proteasome-dependent removal from ER membranes. *J Ex Med* 187, 835-846.
- Yarchoan, R., Guo, H.G., Reitz, M., Maluish, A., Mitsuya, H., and Broder, S. (1986). Alterations in cytotoxic and helper T cell function after infection of T cell clones with human T cell leukemia virus, type I. *J Clin Invest* 77, 1466-1473.
- Yu, H., Kaung, G., Kobayashi, S., and Kopito, R.R. (1997). Cytosolic degradation of T-cell receptor α chains by the proteasome. *J Biol Chem* 272, 20800-20804.
- Yu, L., Zhang, Z., Loewenstein, P.M., Desai, K., Tang, Q., Mao, D., Symington, J.S., and Green, M. (1995). Molecular cloning and characterization of a cellular protein that interacts with the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator and encodes a strong transcriptional activation domain. *J Virol* 69, 3007-3016.
- Zaides, V., Yagello, M., Veselovskaya, T., Schmitt, D., Rykova, L., Fenouillet, E., and Gluckman, J.C. (1994). Extensive C-terminal deletion in human immunodeficiency virus type 1 Env glycoprotein arising after long-term culture of chronically infected cells. *J Gen Virol* 75, 2963-2975.
- Zhang, L., Carruthers, C.D., He, T., Huang, Y., Cao, Y., Wang, G., Hahn, B., and Ho, D.D. (1997). HIV type 1 subtypes, coreceptor usage, and CCR5 polymorphism. *AIDS Res Hum Retroviruses* 13, 1357-1366.
- Zhou, M., Fisher, E.A., and Ginsberg, H.N. (1998). Regulated Co-translational ubiquitination of apolipoprotein B100. A new paradigm for proteasomal degradation of a secretory protein. *J Biol Chem* 273, 24649-24653.
- Zhu, T. and Ho, D.D. (1995). Was HIV present in 1959? [letter]. *Nature* 374, 503-504.
- Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M., and Ho, D.D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic [see comments]. *Nature* 391, 594-597.
- Zhu, Z., Hao, Y., Gershon, M.D., Ambron, R.T., and Gershon, A.A. (1996). Targeting of glycoprotein I (gE) of varicella-zoster virus to the trans-Golgi network by an AYRV sequence and an acidic amino acid-rich patch in the cytosolic domain of the molecule. *J Virol* 70, 6563-6575.

10. Lebenslauf

Name	Andreas Bültmann
geboren in am	Warstein 10. April 1968
wohhaft in	Claude-Lorrain Straße 35, 81543 München
Familienstand	verheiratet
Konfession	römisch-katholisch
Nationalität	deutsch
Schulbildung	1974 – 1978 Katholische Grundschule Kallenhardt 1978 – 1987 Städtisches Gymnasium Rüthen 1987 Abitur
Wehrdienst	1987 - 1988 Grundwehrdienst
Studium	1988 – 1994 Diplom-Biologie, Westfälische Wilhelmsuniversität Münster 1990 Vordiplom 1993 – 1994 Diplomarbeit und -prüfung, Institut für Mikrobiologie, WWU Münster, AK Prof. Meinhardt, Vorstand Prof. Rehm 1994 Diplom 1994 Beginn der Doktorarbeit am Hygiene-Institut, Universität Heidelberg, AK Dr. Haas, Abtl. Virologie, Vorstand Prof. Koszinowski seit 1996 Fortsetzung der Doktorarbeit am Max-von-Pettenkofer Institut, LMU München, AK Dr. Haas, Abtl. Virologie, Vorstand Prof. Koszinowski
Beschäftigung	05.-11. 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im DHZ, TU München seit 12.2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der ProCorde GmbH, Martinsried

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

München, im August 2000