

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin

**Divergente Transkriptionskontrolle von HIV-1:
Strukturelle und funktionale Analyse des LTR-Promotors
der Gruppen M, N und O**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
– doctor rerum naturalium –**

vorgelegt von
Sybille Somogyi

Dezember 2002

**Eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1998 bis Dezember 2002 bei Prof. G. Pauli in der Abteilung Retroviren des Robert Koch-Instituts Berlin angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Sybille Somogyi

Berlin, 19.12.2002

1. Gutachter : Prof. Dr. Georg Pauli, Robert Koch-Institut, Berlin
2. Gutachter : Prof. Dr. Rudolf K. Achazi, Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 21.03.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Retroviren	1
1.2	Das humane Immundefizienzvirus – HIV	2
1.2.1	Entdeckung	2
1.2.2	Krankheitsverlauf der HIV-Infektion	3
1.2.3	Morphologie von HIV-1 Virionen	5
1.2.4	Molekularbiologie von HIV-1	5
1.2.4.1	Die LTR -- lange terminale Repetitionen der proviralen DNA	7
1.2.4.2	Gruppenspezifische Antigene (<i>gag</i> -Genprodukte)	7
1.2.4.3	Enzyme (<i>pol</i> -Genprodukte)	8
1.2.4.4	Die Glykoproteine der Virushülle (<i>env</i> -Genprodukte)	8
1.2.4.5	Die regulatorischen Proteine	9
1.2.5	Der Replikationszyklus von HIV-1	10
1.2.6	Evolution und Diversifikation von HIV	12
1.2.6.1	Die Primaten Lentiviren	13
1.2.6.2	Herkunft und Evolution von HIV	15
1.2.6.3	Genetische Variabilität von HIV-1	16
1.2.6.4	Die genetische Klassifizierung von HIV-1	17
1.2.6.5	Verbreitung der HIV-1 Subtypen und Mosaikviren	18
1.2.7	Biologische Eigenschaften von HIV-1 Subtypen	20
1.2.7.1	HIV-1 Subtypen und Übertragungswege	21
1.2.7.2	Subtypen und Pathogenität	21
1.2.7.3	Subtypen, biologischer Phänotyp und Ko-Rezeptorgebrauch	22
1.2.7.4	Subtypen und Transkriptionskontrolle	23
1.2.8	Die Regulation der Transkription bei HIV	23
1.2.8.1	Die Promotorstruktur von HIV-1	23
1.2.8.1.1	Der basale Promotor	25
1.2.8.1.2	Die NF κ B-Enhancer-Region	26
1.2.8.1.3	Stromaufwärts lokalisierte regulatorische Elemente	27
1.2.8.1.4	Stromabwärts lokalisierte regulatorische Elemente	28
1.2.8.1.5	Das TAR-Element	28
1.2.8.1.6	Reprimierende Transkriptionsfaktoren	29
1.2.8.2	Die basale Transkription von HIV-1	29
1.2.8.3	Die Tat-transaktivierte Transkription von HIV-1	30
1.2.9	Ziel der Arbeit	32

2	Material	34
2.1	Chemikalien	34
2.2	Kits	34
2.3	Enzyme	35
2.4	Geräte	35
2.5	Bakterienstämme	35
2.6	Plasmide	36
2.7	Eukaryote Zelllinien	36
2.8	Puffer	37
2.9	Medien	38
2.9.1	Medien für Bakterienkulturen	38
2.9.2	Medien und Puffer für die Kultivierung eukaryoter Zellen	39
2.10	Virusisolate	39
2.10.1	Referenzsequenzen von HIV-1 und SIV	39
2.10.2	Viren des Studienpanels	42
3	Methoden	45
3.1	Arbeiten mit gentechnisch veränderten / infektiösen Organismen	45
3.2	Virusanzucht	45
3.2.1	Isolierung von PBMC über Ficoll-Gradienten	45
3.2.1.1	Isolierung von PBMC gesunder Blutspender aus <i>buffy coat</i>	46
3.2.1.2	Isolierung von PBMC HIV-infizierter Patienten	47
3.2.2	Anzucht von HIV-Primärisolaten auf Spender-PBMC	47
3.2.3	Anzucht des HIV-Isolates O-MVP5180 auf der Zelllinie H9	48
3.2.4	Zellpflege / Mediumwechsel und Verlaufskontrolle der Virusanzucht	48
3.2.5	P24 Antigen-Nachweis (ELISA)	49
3.3	DNA-Extraktion aus HIV-infizierten Zellen	49
3.4	Polymerasekettenreaktion	50
3.4.1	Einführung von Restriktionsschnittstellen mittels PCR	51
3.4.2	Amplifikation der LTR von HIV-1	51
3.5	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	53
3.6	Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren	54
3.6.1	Ethanol-fällung	54
3.6.2	Reinigung von PCR-Produkten	55
3.6.3	Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel	55
3.7	Quantifizierung von DNA	55
3.7.1	Mittels quantitativer Agarose-Gelelektrophorese	55

3.7.2	Mittels photometrischer Bestimmung	56
3.8	Restriktionsanalyse von DNA	56
3.9	Klonierung von PCR-Produkten	57
3.9.1	Herstellung Z-kompetenter Bakterien	58
3.9.2	Transformation von Plasmid-DNA in Z-kompetente Bakterien	58
3.10	Präparation von Plasmid-DNA	59
3.10.1	Minipräparation nach <i>QIAwell Plasmid Purification Protocol</i>	59
3.10.2	Präparation nach <i>Nucleospin Plasmid Standard Protocol</i>	59
3.10.3	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	60
3.10.4	Endofree Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	60
3.11	DNA-Sequenzierung (<i>BigDye Cycle Sequencing-Kit</i>)	60
3.11.1	Vorbereitung und Auftragen der Proben	62
3.11.2	Sequenzierung der LTR-PCR-Produkte und der LTR/pGL3-Konstrukte	62
3.12	Phylogenetische Analysen	63
3.12.1	Neighbour-Joining- Analyse der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O	63
3.12.2	Genetische Distanz der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O	65
3.13	<i>In vitro</i> -Modell zur Untersuchung der Promotoraktivität der LTR	66
3.13.1	Klonierung der LTR- <i>Luziferase</i> -Konstrukte	66
3.13.2	Kultivierung der Zelllinie COS-Z-28 für transiente Transfektionen	68
3.13.2.1	Einfrieren von Zellen aus Zellkultur	68
3.13.2.2	Auftauen von Zellen für Zellkultur	68
3.13.3	Trypanblaufärbung (Vitalfärbung)	69
3.13.4	Mykoplasmen-PCR	69
3.13.5	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA	70
3.13.5.1	Transfektion adhärenter Zellen mit LTR/pGL3-Konstrukten	71
3.13.5.1	Kotransfektion von Plasmid-DNA	71
3.13.6	Aufarbeitung der Zellen und Detektion der Reporterproteine (<i>Luziferase Assay</i>)	72
3.13.7	Standardisierung der Transfektionsergebnisse	72
4	Ergebnisse	74
4.1	Strukturanalyse der Enhancer-/Promotor-Region von HIV-1 Gruppe M, N und O	74
4.1.1	Primerdesign zur subtypgenerischen und gruppenspezifischen Amplifikation der LTR von HIV-1	75
4.1.2	Etablierung einer selektiven 5' und 3'LTR-PCR	78
4.1.3	Sequenzanalyse der Promotorregion von HIV-1 Gruppe M, N und O	80

4.1.3.1	Direkte und klonale Sequenzanalyse	80
4.1.3.2	Sequenzvergleich der 5' und der 3'LTR von HIV-1	81
4.1.4	Genetische Klassifikation der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O	81
4.1.4.1	Vergleichende phylogenetische Analyse der <i>env</i> - und LTR-Region von HIV-1 Referenzviren	82
4.1.4.2	Genetische Klassifizierung der LTR des Studienpanels	85
4.1.4.3	Vergleichende genetische Klassifikation des Studienpanels: LTR, <i>env</i> und <i>gag</i>	89
4.1.4.4	Sequenzvarianz der LTR von HIV-1	91
4.1.5	Vergleichende Promotororganisation in der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O	93
4.1.5.1	Vergleich der basalen Promotorregion	94
4.1.5.2	Vergleich der NF κ B-Enhancer-Region	101
4.1.5.3	Vergleich der stromaufwärts gelegenen Bindungsstellen für Transaktivatoren	102
4.1.5.4	Vergleich des TAR-RNA-Elements	106
4.1.5.5	Vergleich der reprimierenden Strukturelemente	107
4.2	Funktionale Analyse des LTR-Promotors von HIV-1 Gruppe M, N und O	110
4.2.1	Die Konstruktion der LTR/ <i>Luziferase</i> -Vektoren	111
4.2.2	Etablierung des Transfektionsassays (<i>Effectene Transfektions Kit</i>)	113
4.2.2.1	Toxizitätstest des Transfektionsreagenz <i>Effectene</i>	113
4.2.2.2	Optimierung des Transfektionsprotokolls	113
4.2.2.3	Standardisierung der Transfektionseffizienz mit β -Galaktosidase	114
4.2.2.4	Optimierung der DNA-Konzentrationen in der Transfektion	116
4.2.3	Basale und transaktivierte Promotoraktivitäten von HIV-1 Gruppe M, N und O	116
4.2.3.1	Die basale Promotoraktivität	119
4.2.3.2	Die Tat-transaktivierte Promotoraktivität	120
4.2.3.3	Analyse der Strukturmerkmale in Abhängigkeit von der Promotorstärke	121
4.2.3.4	Einfluss der NF κ B-Bindungsstellen auf die Promotoraktivität der LTR	125
4.2.3.5	Vergleich der Promotoraktivitäten von HIV-1 Gruppe M, N und O	126
5	Diskussion	127
5.1	Genetische Klassifikation der LTR von HIV-1 der Gruppe M, N und O	127
5.2	Divergente Promotorstruktur von HIV-1 der Gruppen M, N und O	128

5.3	Isolat-spezifische, aber keine subtyp-spezifische Promotoraktivität von HIV-1 Gruppe M, N und O	134
5.4	Abhängigkeit der Promotorstärke von Strukturmerkmalen der LTR	134
5.5	Ausblick	136
6	Zusammenfassung	138
7	Summary	140
8	Literatur	142
9	Abkürzungsverzeichnis	161
10	Abbildungsverzeichnis	163
11	Anhang	164
12	Danksagung	167

1 Einleitung

1. 1 Retroviren

Der erste Nachweis eines Virus gelang Friedrich Loeffler und Paul Frosch 1898 mit der Entdeckung des Maul-und-Klauenseuche-Virus. Peyton Rous zeigte 1911, dass mit zellfreien, filtrierten Extrakten aus Hühnersarkomen eine Tumorerkrankung auf gesunde Hühner übertragen werden kann (Rous, 1911). Damit unterschied sich dieser virale Erreger als filtrierbares Agens von Bakterien. Dieses erste beschriebene Tumorigen wurde später nach seinem Entdecker *Rous-Sarkom-Virus* benannt. Einen weiteren Beweis für die Assoziation von Viren mit Tumorerkrankungen lieferte J.J. Bittner 1936 durch seine Untersuchungen zur Entstehung von malignen Milchdrüsenerkrankungen der Maus, die durch das *mouse mammary tumor virus* (MMTV) induziert werden. Dieses Virus zeigte einen bis dahin unbekanntem Übertragungsmodus: MMTV kann nicht nur als exogenes Partikel übertragen werden (horizontale Transmission), sondern auch als endogener Bestandteil des Genoms von Keimbahnzellen auf die Folgegeneration (vertikale Transmission). 1970 entdeckte man, dass die Besonderheit dieser RNA-Viren auf die Funktion der Reversen Transkriptase zurückzuführen ist, ein damals unbekanntes Enzym, das RNA in doppelsträngige DNA umschreibt (Temin und Mizumoto, 1970a; Baltimore, 1970). Damit war das bis dahin geltende biologische Dogma widerlegt, der genetische Informationsfluss verlief ausnahmslos von DNA über RNA zum Protein. Die Fähigkeit, den genetischen Informationsfluss umzukehren, gab der Gruppe der Retroviren schließlich ihren Namen. Das erste für den Menschen pathogene Retrovirus entdeckte man 1980 im Zusammenhang mit epidemiologischen Studien über die in Japan endemische adulte T-Zell-Leukämie (Miyoshi *et al.*, 1980) und T-Zell-Neoplasien in der Karibik und in den USA (Poesz *et al.*, 1980).

Die taxonomische Einteilung der Familie *Retroviridae* basiert auf Unterschieden in der Morphologie, der Genomsequenz, den antigenen Eigenschaften, der Wirtsspezifität und der Pathogenese. Aktuell unterscheidet man sieben Genera: *Alpharetroviren*, *Betaretroviren*, *Gammaretroviren*, *Deltaretroviren*, *Epsilonretroviren*, *Spumaviren* und *Lentiviren* (Regenmortel *et al.*, ICTV 1998). Das humane Immundefizienzvirus (HIV) gehört zu den Lentiviren, ein Genus exogener Viren mit einem komplexen Genomaufbau (Sigurdsson, 1954). In der infizierten Zelle wird das RNA-Genom des Virus von der Reversen Transkriptase in provirale DNA umgeschrieben (revers transkribiert) und persistiert in integriertem Zustand im Genom der Wirtszelle.

1.2 Das humane Immundefizienzvirus – HIV

1.2.1 Entdeckung

Im Jahre 1981 wurden in den USA zahlreiche Ärzte auf ein ungewöhnlich häufiges Auftreten des Gefäßtumors *Kaposi-Sarkom* bei jungen homosexuellen Männern aufmerksam (Hymes *et al.*, 1981). Dieser seltene Tumortyp war oftmals kombiniert mit einer durch *Pneumocystis carinii* ausgelösten Lungenentzündung (PcP, *Pneumocystis-carinii*-Pneumonie). Der ersten Publikation zum Krankheitsbild dieser Immunschwäche (Masur *et al.*, 1981) folgten bald ähnliche Berichte über die zunächst als „schwere erworbene Immunschwäche“ (*severe acquired immunodeficiency*) bezeichnete Krankheit, die bald in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen auftrat (Gottlieb *et al.*, 1981; Siegal *et al.*, 1981).

Die mit der Immunschwäche assoziierten Krankheitszustände fasste man unter dem Namen „AIDS“ zusammen (*acquired immunodeficiency syndrome*; erworbenes Immundefekt-Syndrom). Die Krankheit ist charakterisiert durch eine bislang nicht reversible, tödlich verlaufende Störung der Immunabwehr, die mit opportunistischen Infektionen und häufig mit schwer behandelbaren Tumorerkrankungen assoziiert ist.

Das erste Anzeichen dafür, dass AIDS von einem Retrovirus verursacht sein könnte, entdeckte die Arbeitsgruppe um Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris 1983, als sie aus den Lymphknoten von AIDS-Patienten ein Virus isolierten, in dem das Enzym Reverse Transkriptase nachgewiesen wurde (Barré-Sinoussi *et al.* 1983; Chermann *et al.*, 1983). Dieses anfänglich als LAV (*lymphadenopathy-associated virus*) bezeichnete Retrovirus konnte kurze Zeit später als Lentivirus und als Ursache von AIDS identifiziert werden (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984). In den folgenden Jahren dechiffrierten mehrere voneinander unabhängige Arbeitsgruppen das Genom des AIDS-Virus (Wain-Hobson *et al.*, 1985; Ratner *et al.*, 1985; Sanchez-Pescador *et al.*, 1985). Gleichzeitig wurden weitere Lentiviren entdeckt, die in anderen Säugetieren Immundefizienzen auslösen (Letvin *et al.*, 1985; Wain-Hobson *et al.*, 1985; Stephens *et al.*, 1986; Gonda *et al.*, 1987; Olmsted *et al.*, 1989). Noch immer werden neue Immundefizienzviren entdeckt (Simon *et al.*, 1998, Beer *et al.*, 2000; Corbet *et al.*, 2000; Courgnaud *et al.*, 2001).

Im Jahr 1986 nannte die Internationale Kommission für Virus-Taxonomie das Virus, das beim Menschen AIDS verursacht, *humanes Immundefizienzvirus* (HIV, *human immunodeficiency virus*, Coffin *et al.*, 1986).

HIV wird aufgrund unterschiedlicher phylogenetischer und biologischer Eigenschaften in zwei Typen, HIV-1 und HIV-2, unterteilt. Obwohl beide Virustypen eine ähnliche Struktur besitzen und im Menschen Immundefizienzen auslösen, ist HIV-1 weltweit vorherrschend (Markovitz *et al.*, 1993; Coffin *et al.*, 1995a; Ho *et al.*, 1995a). HIV-2-Infektionen sind vorwiegend auf Westafrika beschränkt (Kanki *et al.*, 1987; De Cock *et al.*, 1993). Anfang der neunziger Jahre konnte HIV-2 auch in Indien und Europa nachgewiesen werden (Pfutzner *et al.*, 1992; Rübsamen-Waigmann *et al.*, 1991).

1.2.2 Krankheitsverlauf der HIV-Infektion

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation waren Ende 2001 weltweit etwa 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert, allein 2001 kam es zu ca. 5 Millionen Neuinfektionen (Abb. 4; UNAIDS, *Report on the global HIV/AIDS Epidemic*, Dezember 2002). In der Bundesrepublik Deutschland wird die Gesamtzahl der HIV-Infektionen auf 38.000 geschätzt (Epidemiologisches Bulletin des RKI, Dezember 2002).

Die Übertragung von HIV erfolgt durch infizierte Körperflüssigkeiten (Sperma, Vaginalsekret, Muttermilch, Blut). Die Infektion wird dabei durch Zell-Zell-Kontakt HIV-infizierter und gesunder Zellen (Helfer-T-Lymphozyten, Monozyten/ Makrophagen, Dendritische Zellen, Langerhans-Zellen der Haut) und/ oder durch zellfreies Virus vermittelt. Für das Zustandekommen einer Infektion sind verschiedene Faktoren, vor allem die Menge der übertragenen HIV-infizierten Flüssigkeit und deren Virusgehalt (Viruskonzentration), sowie die Art der Eintrittspforte und die Kontaktzeit maßgeblich.

Der Verlauf einer HIV-Infektion wird nach einem von den „Centers for Disease Control“ (CDC) in den USA aufgestellten Klassifikationssystem in drei klinische Stadien A, B und C unterteilt. Die Einteilung erfolgt anhand klinischer Kriterien, unter Berücksichtigung der CD4-Zell-Zahl und der Viruslast im peripheren Blut der Patienten (HIV/AIDS Surveillance Report, 1993).

Die Primärinfektion mit HIV verläuft vorwiegend inapparent und äußert sich nur in 30 bis 50 Prozent der Fälle ca. zwei bis fünf Wochen nach erfolgter Infektion durch grippeähnliche Symptome oder Lymphknotenschwellungen als *akutes HIV-Syndrom* (Tindall und Cooper, 1991). Durch die hohe Replikationsrate des Virus in dieser virämischen Phase sinkt die Anzahl der CD4-positiven Lymphozyten ab (Gaines *et al.*, 1990). Infektiöse Viren können jetzt in zellfreiem Plasma und in der Zerebrospinalflüssigkeit mit Werten von bis zu 10^7 Virionen/ml detektiert werden. Nach ca. 4 bis 6 Wochen kommt es zur Serokonversion,

d.h. zur Produktion HIV-spezifischer Antikörper. Die serologische HIV-Diagnose basiert auf dem Nachweis der spezifischen Antikörper gegen virale Antigene (reaktiver *ELISA*-Test, Bestätigung durch positiven *Western Blot*). Im Verlauf der anschließenden klinischen Latenzphase, die einige Wochen bis mehrere Jahre andauern kann, findet permanent aktive Virusreplikation in den infizierten Geweben, v.a. in den Keimzentren der Lymphknoten, statt. Dabei werden täglich ca. 10^9 neue infektiöse Partikel im peripheren Blut freigesetzt (Ho *et al.*, 1995a). Mit Hilfe von Genamplifikationstechniken wie der PCR (Polymerasekettenreaktion), lassen sich Viren und infizierte Zellen in jedem Stadium der Infektion nachweisen. Die Höhe der Viruslast, die sich nach der initialen virämischen Phase einstellt, hat für den weiteren Krankheitsverlauf prognostischen Wert. Die Zerstörung CD4-positiver Zellen wird durch die Bildung neuer Zellen kompensiert. Die Viren werden zunächst von dem noch intakten Immunsystem eliminiert, die Patienten bleiben in diesem Stadium weitgehend asymptomatisch.

Im Laufe der Zeit werden kontinuierlich mehr CD4-positive Zellen zerstört als nachgebildet werden können. Sinkt die Zahl der CD4-positiven Zellen unter 500 Zellen/ μ l Blut, treten Krankheiten und Symptome der Kategorie B auf, die bereits mit der Schwächung des Immunsystems assoziiert sind. Patienten der Phase B weisen eine als *AIDS-related complex* bezeichnete Symptomatik auf (z.B. *Candida*-Infektionen des *Oropharynx*, *bazilläre Angiomatose*, *Cervicale Dysplasie*).

Werden Krankheiten der AIDS-definierenden klinischen Kategorie C diagnostiziert (z.B. *Pneumocystis carinii*-Pneumonie, HIV-Enzephalopathie, *Kaposi-Sarkom*), so spricht man vom Vollbild AIDS. In diesem Stadium sinkt die Zahl der CD4-positiven Zellen auf unter 200 Zellen/ μ l Blut ab. Die Architektur der Lymphknoten wird endgültig zerstört und das Netzwerk der follikulären dendritischen Zellen wird aufgelöst, so dass virusproduzierende T-Lymphozyten in großen Mengen in das periphere Blut entlassen werden. Schließlich bricht auch die humorale Antikörper-vermittelte Immunabwehr zusammen und lebensbedrohende opportunistische Infektionen treten auf.

HIV-Infektionen sind bislang nicht heilbar, können jedoch mit antiretroviralen Medikamenten therapiert werden. In der antiretroviralen Therapie werden derzeit hauptsächlich Wirkstoffe eingesetzt, welche die viralen Enzyme Reverse Transkriptase und/ oder Protease hemmen. Dies führt zu einer Reduktion der Virusvermehrung, wodurch die Viruslast vermindert und der Krankheitsverlauf verlangsamt werden. Trotz der Behandlung mit Mehrfachkombinationen antiretroviraler Wirkstoffe kommt es zur Entwicklung resistenter HIV-Varianten und infolgedessen zu einem möglichen Therapieversagen. Da bislang auch keine

präventiven Impfstoffe gegen HIV zur Verfügung stehen, muss die Infektion mit HIV zum heutigen Zeitpunkt und in nächster Zukunft als tödlich verlaufende Erkrankung verstanden werden.

1.2.3 Morphologie von HIV-1 Virionen

Die infektiösen Partikel (Virionen) aller Retroviren zeichnen sich durch eine charakteristische Morphologie aus (Abb. 1a). Die runden Viruspartikel haben einen Durchmesser von ca. 80 bis 100 nm und sind von einer Lipidmembran umhüllt, die zellulären Ursprungs ist. Darin eingebettet liegen externe und transmembrane Glykoproteine, die bei HIV-1 als gp120 (SU, *surface*) und gp41 (TM, *transmembrane*) bezeichnet werden. Die Innenseite der Membran wird von einer Schicht aus Matrixproteinen (MA) ausgekleidet. Im Partikelinneren befindet sich das virale Capsid oder *Core* (CA), das bei den Lentiviren charakteristisch konisch geformt ist (Gelderblom *et al.*, 1987). Im Capsid eingeschlossen liegt das virale Genom in Form zweier identischer einzelsträngiger RNA-Moleküle mit einer Länge von 9–12 Kilobasen (kb). Weitere wichtige virale Komponenten des Viruspartikels sind die Enzyme Reverse Transkriptase (RT/ RH), Integrase (IN) und Protease (PR).

1.2.4 Molekularbiologie von HIV-1

Das Genom von HIV ist, wie das aller Lentiviren, komplexer aufgebaut als das Genom anderer Retroviren (Coffin *et al.*, 1992a). Die Genomorganisation 5'LTR-*gag-pol-vif-vpr-tat-rev-env-nef*-3'LTR, in der mehrere virale Gene überlappend angeordnet sind, ermöglicht es HIV-1, eine Vielzahl von Proteinen auf einem relativ kleinen Genom zu kodieren (Abb. 1b). Neben den drei großen offenen Leserahmen *gag*, *pol* und *env*, die für die Strukturproteine Gag (gruppenspezifische Antigene) und Env (Hüllglykoproteine) und für die Pol-Enzyme (Polymeraseaktivitäten) kodieren, enthält das HIV-Genom weitere Gene für die regulatorischen Proteine Tat und Rev und die vier nicht essentiellen, akzessorischen Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu (Cohen *et al.*, 1996; Cullen *et al.*, 1990). Diese werden gewöhnlich nicht in das Virion verpackt, sind jedoch in den infizierten Zellen nachweisbar (Subramanian und Cohen 1994). Die Gene *tat* und *rev* bestehen aus jeweils zwei Exons, deren Expression, im Gegensatz zu den Strukturgenen, durch die Translation von mehrfach gespleißter mRNA erfolgt.

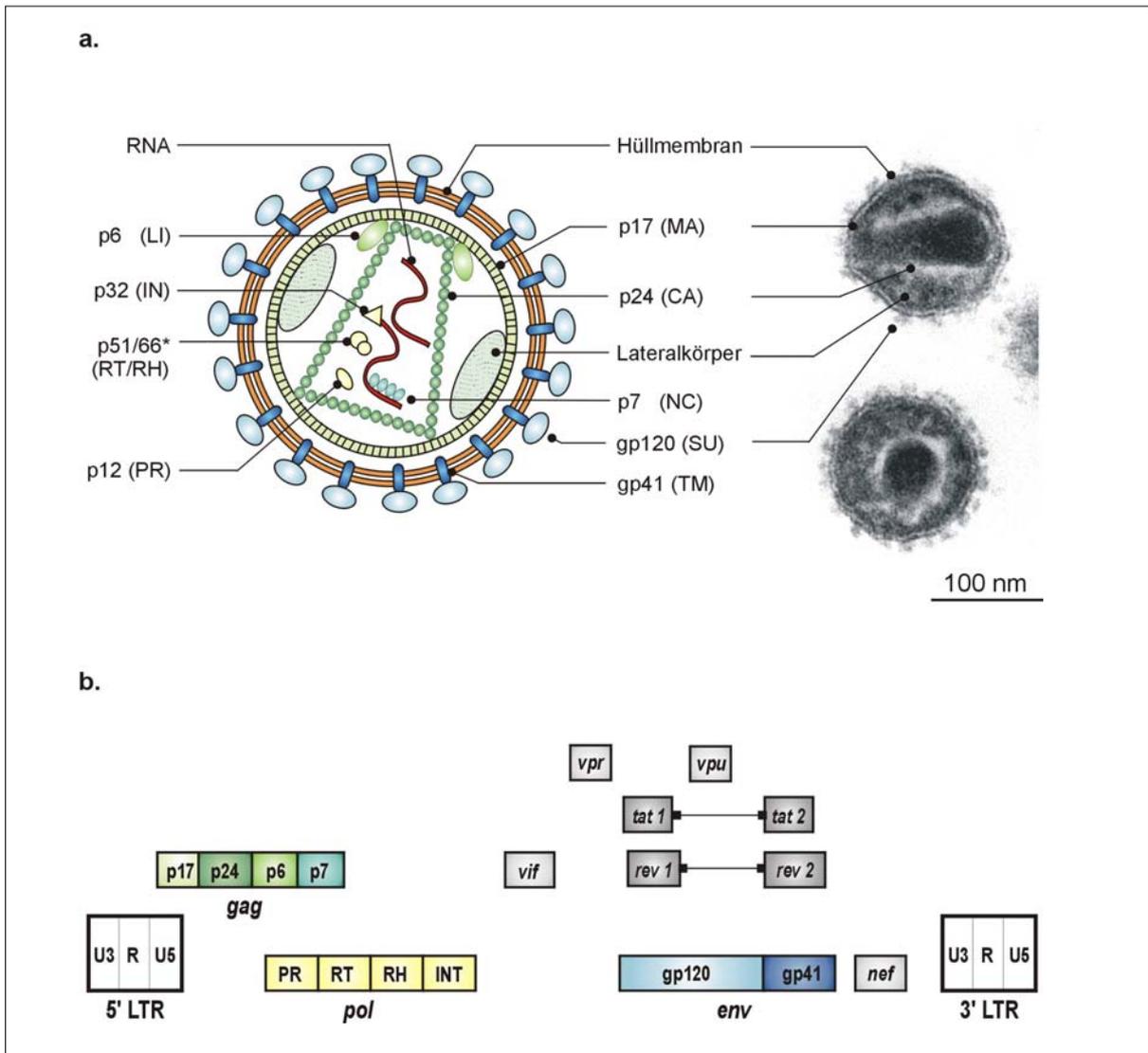


Abb. 1: Morphologie des Viruspartikels und provirales Genom von HIV-1.

a. Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung des Viruspartikels von HIV-1 (die elektronenmikroskopische Aufnahme wurde freundlicherweise von H.R. Gelderblom zur Verfügung gestellt; Gelderblom *et al.*, 1987 und 1991). Hüllmembran mit externen (SU; gp 120) und transmembranen (TM; gp41) Glykoproteinen, konisches Capsid aus Capsidproteinen (CA; p24), zwei virale RNA-Genome im Komplex mit Nukleocapsidproteinen (NC; p7), Matrixprotein (MA; p17), Linkprotein (LI; p6), Lateralkörper (Funktion bislang unbekannt) und die Enzyme Reverse Transkriptase/ RNase H (RT/ RH; p66*/ p51), Integrase (IN; p32) und Protease (PR; p12).

* Heterodimer

b. Genomkarte des Provirus von HIV-1. Das provirale Genom wird von den LTR-Elementen (*long terminal repeat*) flankiert. Die offenen Leseraster (ORF; *open reading frame*) sind in Form von farbigen Kästchen dargestellt, deren Farbe und Beschriftung mit den hiervon exprimierten Genprodukten (Abb. 1a) korrespondiert: Strukturgene *gag* (*group specific antigen*) und *env* (*envelope*), ORF für die Enzyme der *pol* (*polymerase*)-Region (PR, Protease; RT, Reverse Transkriptase; RH, Ribonuklease H; IN, Integrase), ORF für die akzessorischen Gene *vif* (*virion infectivity factor*), *vpr* (*viral protein R*), *vpu* (*viral protein U*), *nef* (*negative factor*) und für die regulatorischen Gene *tat* (*transactivator of transcription*) und *rev* (*regulator of expression*). Die Exons der Proteine Tat (*tat1*, *tat2*) und Rev (*rev1*, *rev2*) sind jeweils durch Striche miteinander verbunden. Die akzessorischen und regulatorischen Genprodukte sind in Abb. 1a nicht dargestellt.

1.2.4.1 Die LTR – lange terminale Repetitionen der proviralen DNA

Das Genom von HIV besteht aus zwei im Partikel verpackten einzelsträngigen RNA-Transkripten, die am 5'-Ende mit einer Cap-Gruppe modifiziert und am 3'-Ende polyadenyliert sind und somit alle Merkmale einer eukaryoten mRNA tragen. Die genomische RNA kodiert für alle viralen Gene, die zur Replikation notwendig sind. Im Verlauf der reversen Transkription im Zytoplasma der infizierten Zelle werden am 5'-Ende und am 3'-Ende regulatorische Kontrollsequenzen (*long terminal repeat*, LTR) generiert, die das integrierte provirale Genom flankieren (Abb. 1b). Diese terminalen Sequenzrepetitionen sind in gleicher Orientierung aus den Regionen U3 (*unique 3*), R (*redundant*) und U5 (*unique 5*) aufgebaut. Sie spielen eine essentielle Rolle bei der Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom, sowie bei der anschließenden viralen Transkription. Obwohl die 5'- und die 3'LTR-Sequenzen identisch sind, üben sie unterschiedliche Funktionen aus. Beide LTRs sind zwar funktionale, induzierbare Promotoren, die 3'LTR erreicht jedoch nur etwa 10% der Transkriptionsaktivität der 5'LTR *in vitro* (Klaver *et al.*, 1994). In der infizierten Zelle kontrolliert die 5'LTR die Transkription der viralen Gene und fungiert somit als Transkriptionspromotor des integrierten Provirus (1.2.8). Die 3'LTR dagegen dient als Polyadenylierungssignal und kontrolliert die Prozessierung und Polyadenylierung der viralen Transkripte.

1.2.4.2 Gruppenspezifische Antigene (*gag*-Genprodukte)

Von der integrierten proviralen DNA werden *full-length* mRNA Transkripte synthetisiert. Da das *gag*-Gen überlappend mit dem *pol*-Gen angeordnet ist, werden von diesen Transkripten sowohl die Gag- als auch Gag/ Pol-Vorläuferproteine translatiert (Jacks *et al.*, 1988). Nach der Knospung (*budding*) von der Zellmembran wird das Gag-Polyprotein durch die virale Protease in die Strukturproteine Matrixprotein (MA, p17), Capsidprotein (CA, p24), Nukleocapsid- und Linkprotein (NC, p7 und LI, p6) gespalten. Erst durch diesen Maturations-schritt entstehen funktionale Proteine und damit reife, infektiöse Virionen.

Die Gag-Proteine üben unterschiedliche Funktionen aus, die zur Infektiosität der Viren beitragen: Durch Interaktionen der Matrix- und Capsidproteinanteile sammeln sich die Gag-Polyproteine an der Zelloberfläche (*assembly*), schnüren sich in Form von Lipid-Proteinpartikeln mit Membrananteilen ab und sind somit für die Freisetzung der Viruspartikel essentiell. Das Matrixprotein p17 fördert den Transport der viralen DNA in den Zellkern (*nucleus*) der infizierten Zelle und ermöglicht die Infektion ruhender Zellen; eine Fähigkeit, die HIV von anderen Retroviren unterscheidet (Valentin *et al.*, 1990; von Schwedler *et al.*, 1994). Zudem vermutet man, dass die auf den Matrix- und Capsidproteinen identifizierten T-Zell-Epitope für die immunologische Kontrolle der Infektion und damit für die Dauer der asymptomatischen Phase eines HIV-Patienten entscheidend sind.

1.2.4.3 Enzyme (*pol*-Genprodukte)

Da die *gag*- und *pol*-Gene überlappen, werden die *pol*-Genprodukte als Gag/ Pol-Vorläuferproteine von *full-length* Transkripten translatiert, wobei es sich um Fusionsproteine zwischen Gag- und Pol-Proteinen handelt. Voraussetzung für die Synthese der Gag/ Pol-Fusionsproteine ist die Verschiebung des ribosomalen Leserasters der *full-length* mRNA-Transkripte (Parkin *et al.*, 1992). Dieser Wechsel des Leserasters ist jedoch nur sehr selten der Fall, so dass nur etwa 2-5% der *full-length* RNA im *pol*-Leseraster translatiert werden (Reil *et al.*, 1993). Der *pol*-Genomabschnitt enthält die Leserahmen für die Gene der drei Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase (Craven *et al.*, 1991; Katz und Skalka, 1994). Während der Maturation schneidet sich die Protease zunächst autokatalytisch aus dem Vorläuferprotein aus, um anschließend die Gag- und Pol-Vorläuferproteine in funktionale Proteine zu prozessieren (Wan *et al.*, 1996).

Die **Protease** (PR) ist als Homodimer aus zwei identischen Proteineinheiten mit einem Molekulargewicht von 12 kD aktiv (Lapatto *et al.*, 1989). Es ist eines der ersten Proteine, von dem synthetische Peptide modelliert wurden, die heute als Protease-Inhibitoren zu Therapie-zwecken eingesetzt werden (Galpin *et al.*, 1994; Bryant *et al.*, 1995).

Die **Reverse Transkriptase** (RT) von HIV-1 ist ein Heterodimer aus zwei unterschiedlich prozessierten Proteineinheiten mit Molekulargewichten von 66 kD und 51 kD (Le Grice *et al.*, 1991). Der karboxyterminale Bereich der 66 kD-Einheit ist mit seiner RNaseH-Aktivität für den Abbau des RNA-Anteils in den RNA/ DNA-Hybridmolekülen verantwortlich, die bei der reversen Transkription als intermediäres Produkt auftreten (Tanese und Goff, 1988). Die Mg²⁺-abhängigen Polymerase-Funktionsdomänen liegen im aminoterminalen Bereich der großen Untereinheit und auf der kleinen Untereinheit.

Das ORF (offenes Leseraster; *open reading frame*) für die **Integrase** (IN) liegt am 3'-Ende des *pol*-Gens. Ausgestattet mit einer Endonuklease- und mit einer Ligase-Funktion, bindet sie an die Enden der doppelsträngigen proviralen DNA und integriert diese in das Wirtsgenom der Zelle (Panganiban und Temin, 1984).

1.2.4.4 Glykoproteine der Virushülle (*env*-Genprodukte)

Die in der Hülle der Retroviren eingelagerten Glykoproteine sind verantwortlich für die Bindung des Virus an die Rezeptoren der Wirtszelle und die Fusion der viralen mit der zellulären Membran. HIV-1 besitzt zwei Glykoproteine, die in einem nicht kovalent verbundenen Komplex aus einem externen (*surface*; SU) und einem transmembranen Protein

(*transmembrane*; TM) vorliegen (Abb. 1a). SU hat ein Molekulargewicht von 120 kD (gp120), TM ist 41 kD groß (gp41). Das Env-Protein zeichnet sich durch hypervariable und immun-dominante Domänen aus, die für die Bildung von spezifischen Antikörpern verantwortlich sind. Die Immunantwort übt einen hohen Selektionsdruck auf das Virus aus. Diese Immunselektion führt in Verbindung mit der hohen genetischen Variabilität der Retroviren durch Rekombination und einer hohen Fehlerrate bei der Reversen Transkription zur kontinuierlichen Bildung neuer HIV-Varianten.

Beide Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprodukt (gp160) von einer einfach gespleißten, bicistronischen mRNA, die neben dem Env-Protein auch für das Vpu-Protein kodiert, am Endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert. Innerhalb des ER findet die Glykosylierung (Pinter und Honnen, 1989) und die Sulfatierung statt (Bernstein *et al.*, 1992). Im Golgi-Apparat wird gp160 durch eine zelluläre Protease in die reifen Proteine gp120 und gp41 gespalten. Obwohl auch das ungespaltene Env-Protein gp160 CD4-Rezeptoren binden kann, ist dieser Schritt notwendig, um das Fusionspotential des Proteins zu aktivieren, das für den Eintritt des Virus in die Zelle essentiell ist (Brody *et al.*, 1994a). Auch an der Verpackung neuer Viruspartikel in der Zelle sind Hüllproteine beteiligt. Die Verankerung der Glykoproteine in der inneren Zellmembran erfolgt über das gp41-Protein.

1.2.4.5 Die regulatorischen Proteine

Das Genom von HIV-1 kodiert für zwei Regulationsproteine Tat und Rev und vier akzessorische Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu. Die Regulationsproteine Tat und Rev, die früh im Infektionszyklus von mehrfach gespleißten mRNA synthetisiert werden, sind *in vitro* essentiell für die Vermehrung von HIV. Im Gegensatz dazu sind die Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu in Zellkultur nicht essentiell, beeinflussen jedoch die Funktionen anderer viraler Proteine sowohl positiv als auch negativ und werden als Hilfsproteine oder akzessorische Proteine bezeichnet (Subbramanian und Cohen, 1994; Cohen *et al.*, 1996). Auf die Funktion der akzessorischen Proteine wird hier nicht weiter eingegangen.

Das **Tat-Protein** (*transactivator of transcription*) von HIV-1 wird durch zwei Exons kodiert. Es wird wie Rev früh im Infektionszyklus synthetisiert und in den Nukleus transportiert, wo es die LTR-Promotoraktivität stark transaktiviert (Jones *et al.*, 1994). Seine Bindung an das TAR-RNA-Element (*transactivation response*) am 5'-Ende der frühen Transkripte führt zur effizienten Durchleseaktivität der RNA-Polymerase II und damit zu einer mehr als hundertfachen Steigerung der Genexpression von HIV (Berkhout *et al.*, 1989a; Laspias *et al.*, 1989; Jones, 1994). Die Tat-Transaktivierung wird in Abschnitt 1.2.8.3 näher erläutert.

Das **Rev-Protein** (*regulator of expression of virion proteins*) wird von zwei Exons kodiert, die mit denen des Tat-Proteins überlappen. Es reichert sich ebenfalls im Zellkern an, wo es an das RRE-Element (*rev responsive element*) bindet, das in allen mRNA-Spezies von HIV-1 enthalten ist. Die Bindung von Rev an RRE verhindert die Interaktion mit zellulären Spleißfaktoren und somit das Spleißen der genomischen *full-length* RNA. Die Rev-Expression bewirkt daher den Export einfach- oder ungespleißter mRNA-Spezies in das Zytoplasma, wo diese translatiert oder als genomische RNA in das Virion verpackt werden.

1.2.5 Der Replikationszyklus von HIV-1

Die Replikation von HIV-1 ist sowohl vom Zelltyp als auch vom Proliferationsstadium der infizierten Zelle abhängig. HIV-1 kann proliferierende, ausdifferenzierte und im Gegensatz zu anderen Retroviren auch ruhende CD4+-Zellen des peripheren Blutes oder des lymphatischen Systems (T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten) infizieren. Dazu bindet HIV-1 über den extrazellulären Teil des Membranproteinkomplexes (SU, gp 120) spezifisch an das *CD4-Rezeptor-Protein* (55kD), ein Mitglied der *Immunglobulinsuperfamilie*, der Zielzellen (Abb. 2). Um den Prozess der Membranfusion, der zum Eintritt des Virus in die Zelle führt, auszulösen, ist die zusätzliche Interaktion des Virus mit einem membranassoziierten, zellulären Korezeptor erforderlich. Durch die Assoziation des gp120 mit dem Korezeptor werden weitere Konformationsänderungen in dem trimären Komplex gp120/ gp41 eingeleitet, die eine Aktivierung der Fusionsdomäne des gp41 bewirken und in die Verschmelzung der viralen Hülle mit der Zytoplasmamembran der Zielzelle münden (Dragic *et al.*, 1996). Je nach Gebrauch der häufigsten Korezeptoren CCR5 und CXCR4 unterscheidet man HIV-1 Isolate nach ihrem Zielzelltropismus in R5-, X4-Viren und dualtrope Viren (X4R5). R5-Viren infizieren hauptsächlich Makrophagen, X4-Viren dagegen hauptsächlich T-Zellen (Deng *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996). Neben den Korezeptoren CCR5 und CXCR4 gibt es noch eine Reihe verwandter Chemokine, die eine Korezeptorfunktion übernehmen können.

Nach dem Eindringen in die Zelle beginnt der Entpackungsprozess, bei dem das virale Capsid ins Zytoplasma der Zielzelle entlassen wird. Die partikuläre Struktur des Capsids bleibt erhalten, seine Konformation ändert sich jedoch. Im Zytoplasma schreibt die Reverse Transkriptase die beiden identischen Positiv-Strang-RNA-Moleküle in doppelsträngige DNA um. Dieser Vorgang umfasst mehrere Schritte, die von der Reversen Transkriptase katalysiert werden. Die dabei auftretenden Rekombinationen sowie der fehlerhafte Einbau von Nukleotiden bedingen die hohe genetische Varianz von HIV. Die provirale DNA wird jetzt von den im Verlauf der Reversen Transkription generierten regulatorischen repetitiven Kontrollsequenzen LTR (*long terminal repeat*) flankiert.

Das provirale Genom wird anschließend im Komplex mit den Capsid-Komponenten (MA p17) in den Zellkern transportiert. Dort wird das doppelsträngige, provirale DNA-Molekül durch die virale Integrase in das Wirtsgenom integriert (Allan *et al.*, 1987). Je nach Stelle der Integration können zelluläre Gene zerstört werden oder unter der Kontrolle des viralen 5'LTR-Promotors aktiviert werden. Dieser Prozess ist einer der Mechanismen, über den Retroviren Tumore induzieren können (Robinson *et al.*, 1985; Sourvinos *et al.*, 2000).

Im Verlauf der Aktivierung einer infizierten Zelle erfolgt die Bindung zellulärer Faktoren an die *cis*-regulatorischen Elemente der Enhancer-/ Promotor-Region LTR der integrierten proviralen DNA, wodurch die Transkription der viralen Gene durch die zelluläre RNA-Polymerase II ausgelöst wird (Rosen *et al.*, 1985). Das nach der Infektion von T-Lymphozyten durch das Immunsystem aktivierte Protein NF κ B (*nuclear factor B*) leitet zusammen mit dem zellulären Transkriptionsfaktor Sp1 eine Transkription auf niedrigem Niveau ein (basale Transkription; 1.2.8). Durch die Bindung der viralen Tat-Proteine an das TAR-Element (*trans-activation response*) am 5'-Ende der naszierenden viralen RNA wird eine transaktivierende Wirkung auf die Promotorregion der LTR vermittelt, wodurch die RNA-Produktion verstärkt wird (Jones und Peterlin, 1994). Die Rev-Proteine sind dagegen posttranskriptionell wirksam, indem sie durch Bindung an das RRE-Element das vollständige Spleißen der RNA verhindern. In dieser frühen Infektionsphase findet man daher überwiegend mehrfach gespleißte mRNAs, die für die Proteine Tat und Rev kodieren.

Die Akkumulation des Tat- und Rev-Proteins ist die Voraussetzung für den Übergang von der frühen zur späten Phase des Infektionszyklus. Die Env-Proteine werden über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. Die Spaltung der Env-Vorläuferproteine (gp160) erfolgt durch eine zelluläre Protease (Hallenberger *et al.*, 1993) in den externen (gp120) und den transmembranen (gp41) Proteinanteil.

Haben sich genügend Gag- und Gag/ Pol-Proteine an der Zellmembran angehäuft (*assembly*), knospt das unreife Virion unter Mitnahme des zellulären Membrananteils aus (*budding*). Jetzt beginnt der Reifungsprozess der Virionen. Die Proteasedomäne spaltet sich in einem autokatalytischen Schritt aus den Gag/ Pol-Vorläuferproteinen heraus, um die Gag- und Gag/ Pol-Vorläuferproteine anschließend in die Matrix-, Capsid-, Nukleocapsid-, Link-Proteine sowie die Reverse Transkriptase und die Integrase zu prozessieren. Erst bei diesen Maturationsprozessen erlangen die Virionen ihre Infektiosität (Kaplan *et al.*, 1994a).

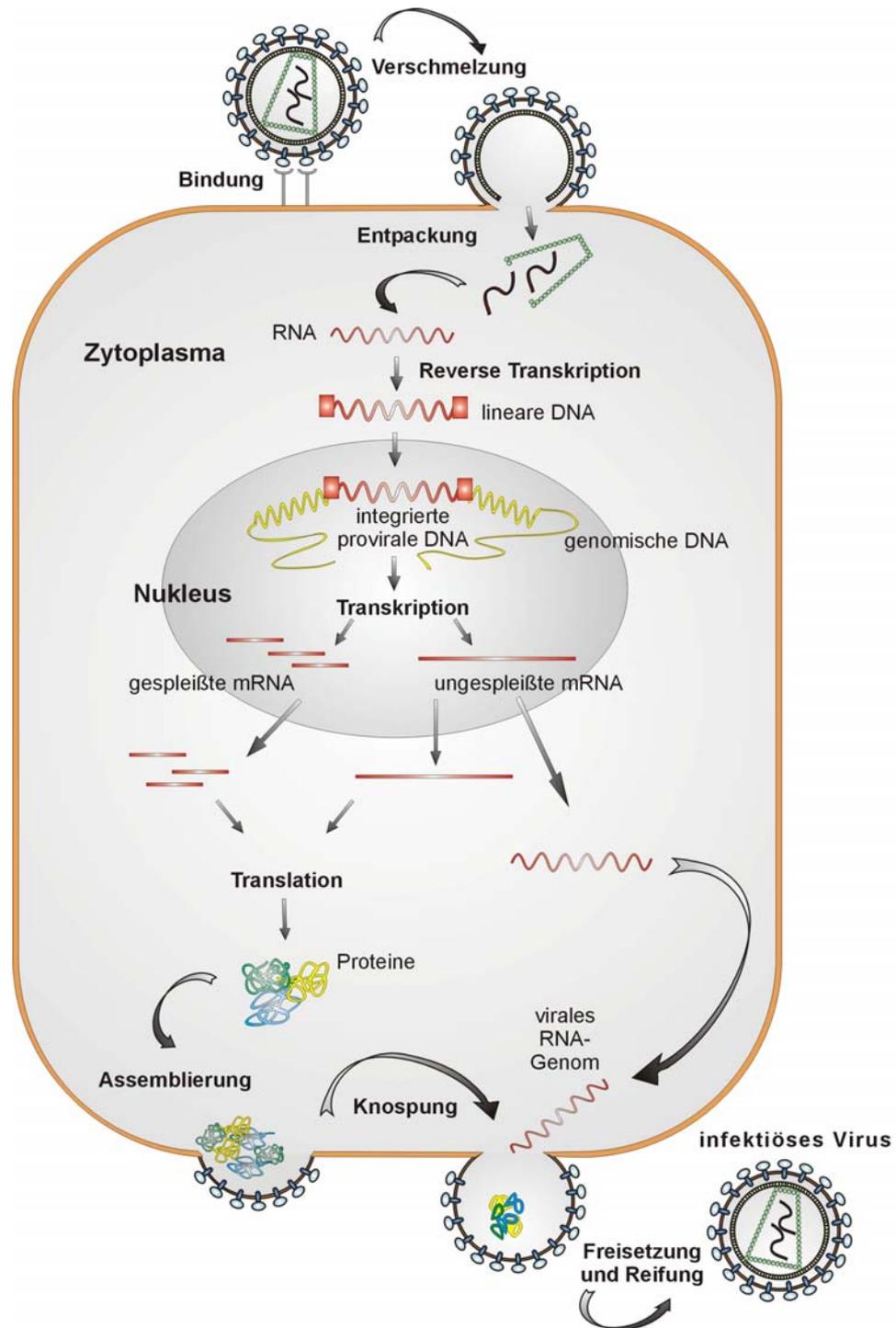


Abb. 2: Replikationszyklus von HIV-1 (Erläuterungen s. 1.2.5).

1.2.6 Evolution und Diversifikation von HIV

Man unterscheidet zwei Typen von humanen Immundefizienzviren, Typ 1 und Typ 2 (HIV-1 und HIV-2). Beide verursachen das *erworbene Immundefekt-Syndrom* AIDS. Gemeinsam mit den verwandten Immundefizienzviren nicht-menschlicher Primaten (SIV, *simian immunodeficiency virus*) bilden sie innerhalb der Familie *Retroviridae* das Genus der Primaten Lentiviren.

1.2.6.1 Die Primaten Lentiviren

Nachdem 1985 das erste SIV aus Makaken isoliert und charakterisiert wurde (Daniel *et al.*, 1985), konnten SIV-Infektionen mittlerweile in mehr als 20 unterschiedlichen Spezies afrikanischer Primaten, z.B. in Makaken, Mandrill und Schimpansen nachgewiesen werden (Beer *et al.*, 2000). Die meisten dieser afrikanischen Primaten sind natürliche Wirte von SIV, einige Infektionen sind jedoch nachweislich das Ergebnis von Transmissionsereignissen zwischen den Primaten-Spezies. Die Durchseuchungsrate kann in den natürlichen Wirten von SIV sehr hoch sein (Hayami *et al.*, 1988; Marx *et al.*, 1991; Beer *et al.*, 2000), wobei wildlebende SIV-infizierte Tiere anscheinend keine klinischen Symptome entwickeln (Kurth und Norley, 1994; Rey-Cuille *et al.*, 1998). SIV-Infektionen mit AIDS-ähnlichen Symptomen sind nur bei asiatischen Makaken (z.B. Rhesusaffen, *Macaca mulatta*) beschrieben (Letvin *et al.*, 1985; Oroszlan *et al.*, 1986; Buckler *et al.*, 1991). Es stellte sich jedoch heraus, dass das pathogene SIV_{mac} auf SIV_{sm} zurückgeht und von Mangaben (*sooty mangabeys*, *Cercocebus atys*) auf Rhesusaffen in Gefangenschaft übertragen wurde (Hirsch *et al.*, 1989a; Novembre *et al.*, 1992).

Bislang konnten SIV-Isolate aus 13 unterschiedlichen Primaten-Spezies vollständig charakterisiert werden. Sequenz- und Stammbaumanalysen des im Genom der Lentiviren hoch konservierten *pol*-Gens demonstrieren, dass diese 13 SIV-Isolate 5 distinkte Abstammungslinien bilden, die sich in der Aminosäuresequenz des Pol-Proteins um ca. 40% unterscheiden (Abb. 3; 1993; Sharp *et al.*, 1995; Hahn, 2000; Beer *et al.*, 2000; McGrath *et al.*, 2001). Die Humanen Immundefizienzviren gehören dabei zwei verschiedenen Abstammungslinien an. Während HIV-1 eine monophyletische Gruppe mit SIV (SIV_{cpz}) aus Schimpansen (*Pan troglodytes*) bildet, zeigt HIV-2 eine hohe Sequenzhomologie mit SIV aus Mangaben (SIV_{sm}, *sooty mangabeys*, *Cercocebus atys*, Hirsch *et al.*, 1989; Huet *et al.*, 1990). Da sie auf Aminosäureebene eine Sequenzdivergenz von 50% bis 60% aufweisen und unterschiedliche biologische Eigenschaften besitzen, werden die Humanen Immundefizienzviren in HIV-1 und HIV-2 eingeteilt (Clavel *et al.*, 1986; Korber *et al.*, 1995; Robertson, 2000).

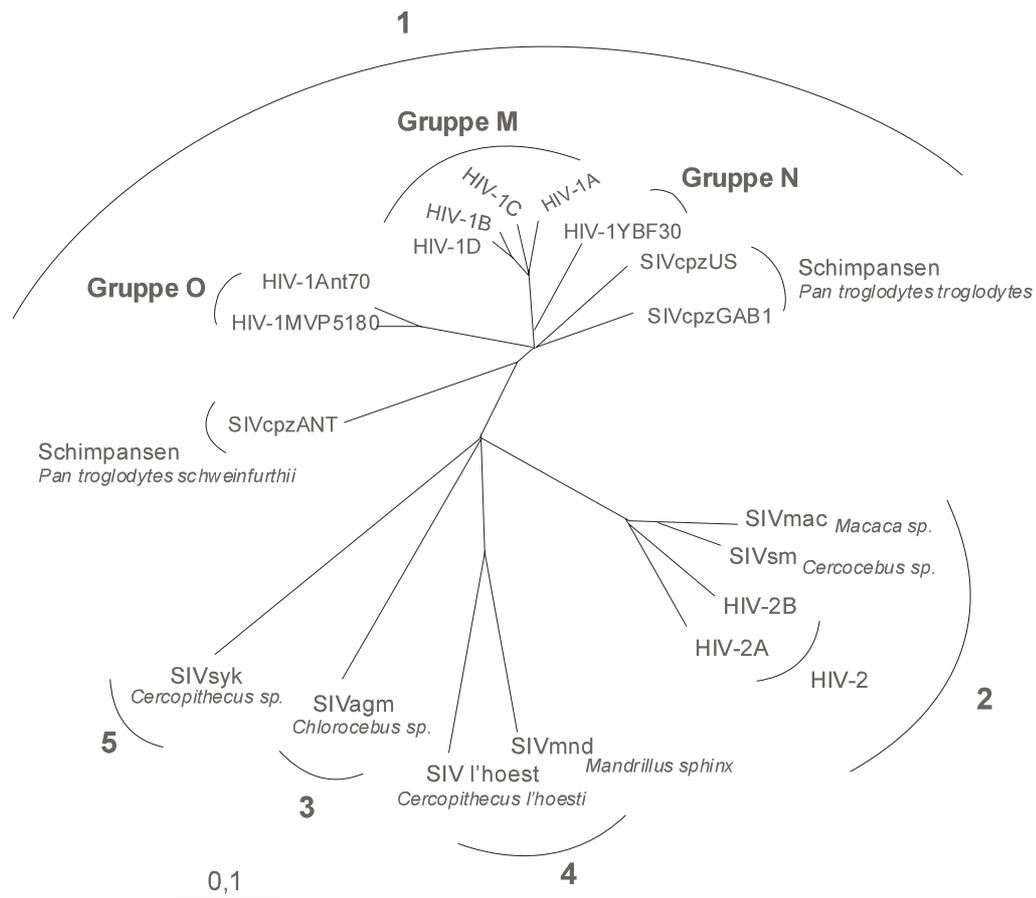


Abb. 3: Phylogenetischer Stammbaum der *pol*-Region der Primaten Lentiviren (nach McGrath et al., 2001). Die fünf Abstammungslinien der Primaten Lentiviren sind von 1 bis 5 numeriert. Innerhalb dieser Abstammungslinien sind die drei HIV-1 Gruppen M (*major*), N (*non-M, non-O*) und O (*outlier*) mit SIV-Isolaten aus Schimpansen zusammengefasst. Die Abstammungslinie 2 setzt sich aus SIV-Isolaten von Makaken (SIVmac, z.B. Rhesusaffen), Mangaben (SIVsm; z.B. Rauchmangaben, *sooty mangabey*) und HIV-2 zusammen. Die Isolate der Abstammungslinie 3 stammen von Grünen Meerkatzen (SIVagm, *african green monkey*), die Viren der Abstammungslinie 4 wurden aus Mandrill (SIVmnd) und Vollbartmeerkatzen (SIVl'hoest, *l'hoest monkey*), die Abstammungslinie 5 wurde aus Weisskehlmeerkatzen (SIVsyk, *sykes monkey*) isoliert.

Der phylogenetische Stammbaum der 5 SIV-Gruppen spiegelt jedoch nicht das Verwandtschaftsverhältnis der Primaten wieder, d.h. die Evolution der SIV verlief nicht parallel zur Evolution seiner Wirte (Beer et al., 2000). Asiatische Primaten wie z. B. Makaken (Genus *Macaca*) und afrikanische Gattungen wie Paviane (Genus *Papio*) sind dagegen nicht mit spezies-spezifischen SIV infiziert. Diese Beobachtung führt zu dem Schluss, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der Altweltaffen und der Menschenaffen (*catarrhines*), der vor etwa 25 Millionen Jahren lebte, nicht mit SIV infiziert war. Vielmehr kann man davon ausgehen, dass eine dieser Primaten-Spezies zu einem späteren Zeitpunkt von einem verwandten nicht-Primaten-Lentivirus infiziert wurde (Hirsch et al., 2000). Nachdem sich SIV in der Population der Primaten etabliert hatte, verbreitete es sich durch Transmission zwischen nicht-menschlichen Primaten.

1.2.6.2 Herkunft und Evolution von HIV

Es gilt heute als gesichert, dass HIV als Zoonose, d.h. durch Transmissionen von nicht-menschlichen Primaten in die menschliche Population eingeführt wurde (Hahn *et al.*, 2000). Der zoonotische Ursprung von HIV wird festgemacht an (1) Übereinstimmungen der viralen Genomorganisation, (2) phylogenetischer Verwandtschaft, (3) Prävalenz im natürlichen Wirt, (4) geographischer Koinzidenz und (5) erklärbarer Transmissionsroute (Hahn *et al.*, 2000).

SIV aus Mangaben (SIVsm) wurde als Quelle für HIV-2 identifiziert. Beide Viren besitzen eine ähnliche Genomstruktur. Sie enthalten beide das Gen *vpx*, das in keinem anderen Primaten-Lentivirus identifiziert wurde, sie sind phylogenetisch eng verwandt und koziirkulieren in den gleichen geographischen Regionen der Westküste Afrikas.

Der Ursprung der HIV-1 Epidemie dagegen lässt sich auf die Transmission von SIV einer Schimpansen-Unterart (*Pan troglodytes troglodytes*) auf den Menschen zurückführen. Die Genome beider Viren kodieren für das akzessorische Protein Vpu, was sie von anderen Lentiviren unterscheidet. Der Ursprung der HIV-1 Epidemie liegt in West Äquatorial-Afrika, wo HIV-1 Viren der Gruppe M, N und O in der menschlichen Population vorkommen (Gürtler *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998). Dort leben auch die mit dem genetisch eng verwandten SIVcpz natürlich infizierten Schimpansen (*P. t. troglodytes*) (Gao *et al.*, 1999). Als Beleg für die Zoonose wird die enge Verwandtschaft von SIVcpzUS, das ursprünglich aus Kamerun stammt, mit dem einzigen *full-length*-Isolat der Gruppe N (N-YBF30) und ihre geographische Kolokalisation gewertet (Abb. 5, Hahn *et al.*, 2000).

Obwohl auch die Schimpansen-Subspezies *Pan troglodytes schweinfurtii* als natürlicher Wirt von SIVcpz gilt, sind die drei Gruppen von HIV-1 M, N und O näher verwandt mit SIVcpz-Isolaten aus *Pan troglodytes troglodytes* (Abb. 5). Diese Beobachtung und die Tatsache, dass sich die SIVcpz-Isolate in phylogenetischen Analysen mit HIV-1-Isolaten vermischen und von anderen SIV abtrennen, sind Hinweise darauf, dass die drei Gruppen M, N und O von HIV-1 auf drei unterschiedliche Transmissionsereignisse von SIVcpz (*P. t. troglydytes*) auf den Menschen zurückzuführen sind (Sharp *et al.*, 2000; Hahn *et al.*, 2000).

Die älteste gesicherte HIV-1 Sequenz konnte aus einer 1959 entnommenen Plasmaprobe eines seropositiven Mannes aus Kinshasa im heutigen Zaire amplifiziert werden (Zhu *et al.*, 1998, Goudsmit und Lukashov, 1999; Sharp *et al.*, 2000; Korber *et al.*, 2000). Wann die Zoonose stattfand, ist Gegenstand aktueller Diskussion. Abhängig davon, welches phylogenetische Modell angewandt und welche Genomregion untersucht wurde, datiert man die erste Transmission von SIVcpz in die menschliche Population auf einen Zeitraum

zwischen 1912 und 1950 (Zhu *et al.*, 1998; Goudsmit und Lukashov, 2000; Korber *et al.*, 2000). Man schätzt, dass der gemeinsame Vorfahre der HIV-1 M-Gruppe um 1930 in Westafrika übertragen wurde; die unterschiedlichen Subtypen der M-Gruppe entwickelten sich wahrscheinlich erst nach der Übertragung auf den Menschen (Sharp *et al.*, 2000). Die Zoonose der HIV-1 Gruppe O wird auf den gleichen Zeitraum datiert, während die erste Infektion eines Menschen mit HIV-1 Gruppe N wahrscheinlich erst um 1960 stattfand (Korber *et al.*, 2000).

Die Übertragung von HIV auf den Menschen lässt sich durch die Haltung und/ oder den Verzehr infizierter Tiere erklären (Hahn *et al.*, 2000). Um sich in einem neuen Wirt zu adaptieren, musste das Virus neue Überlebensstrategien entwickeln. Eine der dramatischen Folgen des Wirtswechsels ist der hochpathogene Verlauf der HIV-Infektion im Menschen.

1.2.6.3 Genetische Variabilität von HIV-1

HIV-1 etablierte im Laufe seiner Evolution ein hohes Maß an genetischer Diversität, ohne essentielle Funktionen bezüglich der Virulenz oder biologische Charakteristika zu verändern (Alizon *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1988; Workshop Report UNAIDS, 1997). Verantwortlich dafür sind hauptsächlich zwei Mechanismen, die während der Reversen Transkription stattfinden. Einerseits kommt es zur Anhäufung von Mutationen (Punktmutation, Deletion, Insertion/ Duplikation) durch fehlerhaften Baseneinbau und durch die fehlende Korrekturfunktion (*proof reading*) der Reversen Transkriptase. Bei HIV-1 führt dies *in vitro* zu einer Mutationsrate von 1×10^{-4} , d.h. eine von 10^4 Basen ist fehlerhaft kopiert (Mansky und Temin, 1995). Die Mutationsrate *in vivo* ist mit $3,4 \times 10^{-5}$ etwas geringer, sodass im Vergleich zum parentalen Genom drei bis vier von 10 neu synthetisierten viralen Kopien eine neue Mutation tragen. Zudem kommt es bei der Reversen Transkription zur Rekombination zwischen unterschiedlichen viralen Varianten. Bei der DNA-Synthese kann die Reverse Transkriptase zwischen beiden RNA-Molekülen hin und her wechseln ("Template-Sprünge"), wodurch stabile Rekombinationen zwischen zwei parentalen Genomen des gleichen Viruspartikels entstehen können (Coffin, 1979). Ist ein Individuum mit zwei Virusvarianten infiziert, so kann es innerhalb einer doppelinfizierten Zelle auch zur Rekombination zwischen unterschiedlichen Virusstämmen und damit zur Produktion von Mosaikviren mit Anteilen unterschiedlicher Subtypen kommen.

Die Evolutionsrate von HIV-1 wird bestimmt durch die Mutationsrate pro Generation (RT-Fehler und Rekombination), die Anzahl der Generationen und die Fixierungsrate der Mutationen durch Selektion (McGrath *et al.*, 2001). Auch die Transkription des proviralen Genoms durch die RNA-Polymerase II trägt durch Kopierfehler zur Variabilität bei. Dadurch

kann HIV der Immunantwort entkommen (*immune escape*) oder auch therapieresistente Varianten entwickeln.

Das Ausmaß der Variabilität innerhalb eines Genoms ist unterschiedlich und hängt mit der Funktion der Gene zusammen. Die Gene *gag* und *pol* sind konservierter als die *env* Gene (Hahn *et al.*, 1986). Die Evolutionsrate wurde für *gag* auf 0,19% Substitutionen pro Basenpaar pro Jahr geschätzt, für das variabelere *env*-Gen auf 0,24% (Korber *et al.*, 2000). Als Folge der fehlerbehafteten Replikation und der Selektion replikationskompetenter Varianten besteht die HIV-1 Population in einem Individuum somit aus einem Gemisch unterschiedlicher Virus-Varianten, der *Quasispezies* (Goodenow *et al.*, 1989; Meyerhans *et al.*, 1989). In der frühen Phase der Infektion ist die Quasispezies innerhalb eines Patienten recht homogen, wahrscheinlich werden bei der Infektion nur eine oder wenige Varianten der Quasispezies übertragen, oder nur eine Variante expandiert besonders stark. Erst im weiteren Verlauf der Infektion nimmt die Heterogenität innerhalb der Viruspopulation wieder zu (Wolfs *et al.*, 1992; Cichutek *et al.*, 1993).

1.2.6.4 Die genetische Klassifizierung von HIV-1

Auf der Grundlage phylogenetischer Analysen zahlreicher Isolate unterschiedlicher geographischer Herkunft wird HIV-1 in die drei **Gruppen M** (*major*), **N** (non M, non O) und **O** (*outlier*) eingeteilt, wobei die N-Gruppe erst kürzlich identifiziert wurde (Abb. 3; Robertson *et al.*, 2000; Leitner *et al.*, 1995; Triques *et al.*, 1999; Triques *et al.*, 2000; Gürtler *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998). Die genetischen Distanzen zwischen den Gruppen sind erheblich. Im *env*-Gen beträgt die Sequenzidentität der Gruppe M und O nur 53% (Gao *et al.*, 1996a).

Die Gruppe M wird zur Zeit in 9 Subtypen A, B, C, D, F, G, H, J und K eingeteilt (HIV Datenbank, Stand 2002; <http://hiv-web.lanl.gov>). Innerhalb der Subtypen wurden phylogenetische Strukturen identifiziert, die zur weiteren Unterteilung in Sub-Subtypen führten. Danach wird Subtyp F in F1 und F2 und einen neuen Subtyp K unterteilt (Triques *et al.*, 1999). Auch Subtyp A wird in A1 und A2 unterteilt, die Zusammenfassung von Subtyp B und D als Untergruppen eines Subtypes wird noch diskutiert (Peeters *et al.*, 2000). Die Subtypen E und I, die in dieser Buchstabenreihe fehlen, wurden in den letzten Jahren als Mosaikviren identifiziert und umbenannt. Man geht davon aus, dass die Subtypen der M-Gruppe von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen. Sie unterscheiden sich zu ca. 25-30% in ihrer Nukleotidsequenz (Korber *et al.*, 2000). Nur Subtyp B und D sind enger miteinander verwandt, weshalb man auf eine spätere Trennung in der Evolution schließen kann (Cornelissen *et al.*, 1997).

Seitdem mehrere Isolate in der O-Gruppe sequenziert wurden, lässt sich auch hier eine Differenzierung in Subtypen erkennen (Gürtler *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 2002). Die Gruppe N besteht bisher aus nur drei vollständig charakterisierten Isolaten und wird somit nicht in Subtypen unterteilt (Charneau *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998).

Zunehmend wurden auch virale Genome identifiziert, die aus mehreren Segmenten von mindestens zwei unterschiedlichen Subtypen zusammengesetzt sind (McCutchan *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 1995a). Solche Viren bezeichnet man als Mosaikviren oder **rekombinante Viren**. Bei rekombinanten Viren stammen einzelne Genomabschnitte von verschiedenen Subtypen ab, die durch Rekombination bei der Koinfektion einer Zielzelle mit zwei Subtypen entstehen können. Rekombinante Viren beobachtet man daher häufiger in menschlichen Populationen, in denen mehrere Subtypen koexistieren (Li *et al.*, 1988; Diaz *et al.*, 1995). Heute kennt man 14 **zirkulierende rekombinante Formen** (CRF, *circulating recombinant forms*, HIV-Datenbank, Stand August 2002), von denen einige epidemisch relevant sind. Dazu gehört das zuerst als Mosaikvirus beschriebene Virus CRF01_AE. Dieses Virus ist die in Thailand dominierende Virusvariante, stammt aus Zentralafrika und wurde ursprünglich als Subtyp E bezeichnet (McCutchan *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 1996). Das Virus besteht aus Subtyp A- und Subtyp E-Segmenten, wobei das parentale Subtyp E-Virus bisher nicht identifiziert wurde. Man geht heute davon aus, dass mindestens 20% aller HIV-Infektionen durch rekombinante Viren verursacht werden (Osmanov *et al.*, 2002; Peeters *et al.*, 2001; McCutchan *et al.*, 2000).

Um einen neuen Subtyp oder CRF zu definieren, müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

(1) Der repräsentative Stamm muss in mindestens drei Individuen, die epidemiologisch nicht in Verbindung stehen, gefunden werden, (2) mindestens zwei Isolate müssen über die gesamte Genomlänge charakterisiert sein, (3) die genetische Distanz zu den anderen Subtypen muss signifikant sein (Robertson *et al.*, 2000).

1.2.6.5 Verbreitung der HIV-1 Subtypen und Mosaikviren

Man nimmt an, dass der Ursprung der HIV-Pandemie in West- und Zentral-Afrika liegt. Die Dynamik der globalen und auch der regionalen Epidemien wird durch virale Determinanten und durch genetische Wirtsfaktoren bestimmt. Zusätzlich beeinflussen soziale, kulturelle und ökonomische Faktoren die Ausbreitung und den Verlauf der Epidemie, was zu einer ungleichen weltweiten Verteilung der HIV-Infektionen führte (Quinn, 1996). Nach Schätzungen der WHO leben ca. 85% der mit HIV infizierten Menschen in den Entwicklungsländern; in den Industrienationen ist die HIV-Prävalenz dagegen relativ gering (Abb. 4a; UNAIDS *Report on the global HIV/AIDS Epidemic 2002*).

Auch die Ausbreitung der verschiedenen Subtypen ist sehr unterschiedlich verlaufen (Louwagie *et al.*, 1992; UNAIDS 2002; Abb. 4b). Subtypen und rekombinante Viren der Gruppe M bestimmen die globale Epidemie, während Viren der Gruppe N und O epidemiologisch nicht relevant sind.

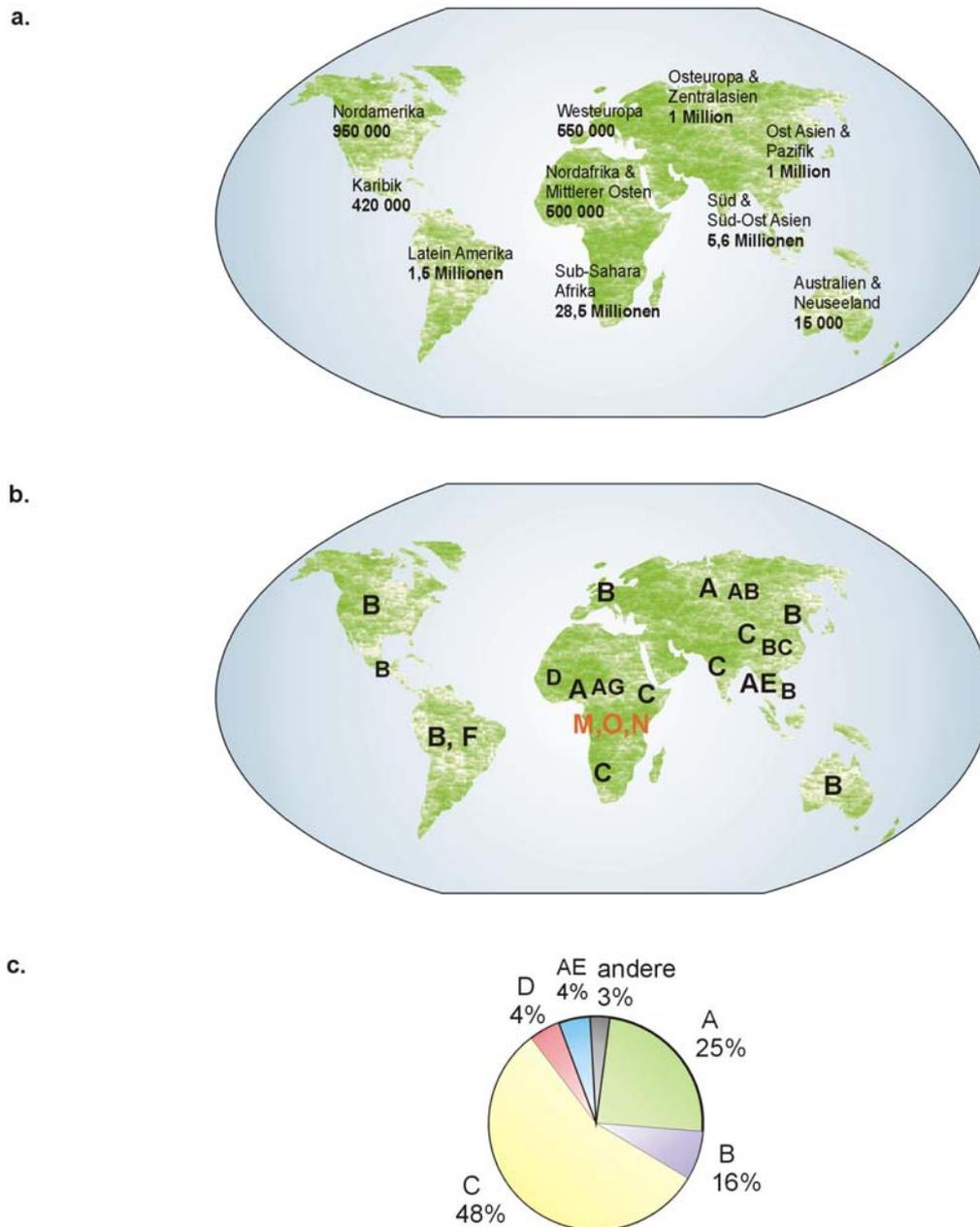


Abb. 4: Globale HIV/AIDS Epidemie (UNAIDS, 2002).

a. Prävalenz von HIV-1. Ende 2001 lebten weltweit schätzungsweise 40 Millionen Menschen mit einer HIV-Infektion (UNAIDS Report 2002). Dargestellt ist die geschätzte Prävalenz der HIV-Infektionen in verschiedenen Regionen der Welt. **b.** Globale Verbreitung der HIV-1 Subtypen. Dargestellt ist die weltweit geschätzte Verbreitung der auf Basis der *env*-Region klassifizierten Subtypen (Osmanov *et al.*, 2002). Die angegebenen Buchstaben stehen für den in der jeweiligen Region/ Kontinent prävalenten Subtyp. Südlich der Sahara wurden alle Gruppen und Subtypen von HIV-1 identifiziert. **c.** Weltweit geschätzte Prävalenz von HIV-1 Subtypen (Osmanov *et al.*, 2002).

Die Subtypen A und D sind die dominierenden Stämme in Westafrika, Subtyp D und C breiten sich an der Ostküste des Kontinents aus und in Südafrika ist Subtyp C prävalent. Infektionen mit Subtyp C-Viren überwiegen weltweit mit ca. 47% aller HIV-Infektionen (Abb. 4c; Osmanov *et al.*, 2002). In West- und Zentralafrika südlich der Sahara kommen alle Gruppen und Subtypen vor, wobei die rekombinante Form CRF02_AG sehr weit verbreitet ist (Carr *et al.*, 1998; C. Kücherer, persönliche Mitteilung; Osmanov *et al.*, 2002). In Süd- und Südostasien ist Subtyp C prävalent; er dominiert insbesondere in Indien und China. In China entpuppte sich ein Teil der Subtyp C-Infektionen als Infektion mit rekombinanten BC-Varianten (Su *et al.*, 2000; Piyasirisilp *et al.*, 2000). CRF01_AE ist epidemisch in Thailand und den angrenzenden Ländern verbreitet. Infektionen mit Subtyp B dominieren in Nordamerika, Europa, Südamerika und in der Karibik, in Afrika dagegen ist Subtyp B eher selten. Die rapide ansteigende Epidemie unter Drogenabhängigen in Kaliningrad wird durch CRF03_AB verursacht (Liitsola *et al.*, 1998; Korovina *et al.*, 1999), und CRF04_cpx repräsentiert eine rekombinante Form aus Zypern und Griechenland, deren komplexe Genomstruktur aus Subtyp A, G, H, K und aus unklassifizierbaren Abschnitten besteht (Paraskevis *et al.*, 1999). Viren der Gruppe O sind hauptsächlich auf Zentralafrika beschränkt (Hunt *et al.*, 1997a und b; Robertson *et al.*, 2000; Kane *et al.*, 2001). In Kamerun haben Gruppe O-Viren eine Prävalenz von 5%. Die drei bislang charakterisierten Isolate der Gruppe N stammen ebenfalls aus Kamerun (Simon *et al.*, 1998).

1.2.7 Biologische Eigenschaften von HIV-1 Subtypen

Als Mitte der achtziger Jahre die intensive genetische Analyse von HIV-1 und HIV-2 begann, stellte man fest, dass es keine 100% identischen Isolate gab. Das Ausmaß an genetischer Variation innerhalb der HIV-1 Stämme führt zu der Frage, ob die genetische Klassifizierung auch mit Unterschieden in biologischen Eigenschaften korreliert, wie es für HIV-1 und HIV-2 beschrieben ist. Im Vergleich zu HIV-1 ist HIV-2 weniger infektiös, hat eine geringere Vermehrungseffizienz und ist weniger pathogen (Kanki *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1993). Die geringere Verbreitung von HIV-2 wird auf diese Eigenschaften zurückgeführt.

Da Unterschiede in den biologischen Charakteristika von HIV-1 Konsequenzen für die weitere Ausbreitung der Subtypen, für den individuellen Krankheitsverlauf, für die Sicherheit der Diagnostik sowie für die Impfstoffentwicklung und Therapie hätten, wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Untersuchungen zur Charakterisierung der biologischen Eigenschaften von HIV-1 Subtypen durchgeführt.

Eine Reihe sich teilweise widersprechender Studienergebnisse zu subtyp-spezifischen Unterschieden bezüglich präferentieller Transmissionswege, Pathogenitätspotential, Zielzell-Tropismus und Korezeptorgebrauch wurden publiziert.

1.2.7.1 HIV-1 Subtypen und Übertragungswege

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass sich die rekombinante Form CRF01_AE in Thailand schneller ausbreitet als Subtyp B (Mastro *et al.*, 1994; Kunanusont *et al.*, 1995; Soto-Ramirez *et al.*, 1996). In diesen Studien war der Subtyp jedoch stark assoziiert mit dem Transmissionsmodus, d.h. Subtyp B wurde in Drogenabhängigen und die Transmission von CRF01_AE bei weiblichen Prostituierten untersucht. Um eine verlässliche Aussage dazu treffen zu können, muss die Ausbreitungsdynamik von Subtypen in Populationen mit demselben Übertragungsrisiko analysiert werden. Kunanusont *et al.* (1995) zeigten, dass bei Ehepaaren, bei denen ein Partner mit HIV-1 infiziert war, CRF01_AE auf den jeweils anderen Partner häufiger übertragen wurde als Subtyp B. Dies führte generell zu der Annahme, dass verschiedene Subtypen vorzugsweise mit einem spezifischen Transmissionsmodus assoziiert sind. Max Essex zeigte, dass Subtyp C und CRF_AE in Langerhans-Zellen effizienter replizieren als Subtyp B (Montano *et al.*, 1997). Da Langerhans-Zellen in der Mukosa der Vagina und auf der Vorhaut des Penis, nicht aber im Rektum vorkommen, werden diese Daten so interpretiert, dass Subtyp C und CRF_AE eventuell ein höheres Potential für die heterosexuelle Transmission haben als Subtyp B, dieser dagegen effektiver über intravenösen Drogengebrauch und homosexuellen Kontakt übertragen wird.

1.2.7.2 Subtypen und Pathogenität

Auch die Studien zur Pathogenität der Subtypen führten zu diskrepanten Ergebnissen, wobei es jedoch deutliche Hinweise darauf gibt, dass der Krankheitsverlauf vom Subtyp abhängen könnte. In einer israelischen Studie konnte bezüglich der Krankheitsprogression kein Unterschied zwischen Subtyp C- und Subtyp B-Infektionen festgestellt werden (Galai *et al.*, 1997), während in einer Studie in Kenia Subtyp C-Infektionen bei schwangeren Frauen zu höheren Viruslasten und niedrigeren CD4-T-Zellzahlen führten als Infektionen mit Subtyp A oder D (Tatt *et al.*, 2001; Peeters und Sharp, 2000). Auch in einer groß angelegten Studie in Uganda wurde Subtyp A mit einer langsameren Krankheitsprogression korreliert als Subtyp D (Kaleebu *et al.*, 2002). In einer schwedischen Studie wurden dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen A-, B-, C- und D-Infektionen festgestellt (Alaeus *et al.*, 1999). Eine

Studie im Senegal fand wiederum eine langsamere Krankheitsprogression bei Subtyp A-Infektionen im Vergleich zu Infektionen mit Subtyp C, D und G (Kanki *et al.*, 1999).

1.2.7.3 Subtypen, biologischer Phänotyp und Korezeptorgebrauch

HIV-Isolate werden entsprechend ihrer Replikationseigenschaften und ihrer zytopathischen Charakteristika *in vitro* in zwei Phänotypen eingeteilt: SI-Viren replizieren schnell und zu hohen Virustitern mit der Eigenschaft, in Zellkulturen Synzytien zu induzieren (*syncytium-inducing*); NSI-Viren sind nicht Synzytien induzierend (*non-syncytium-inducing*) und replizieren langsam zu niedrigen Titern. SI- und NSI-Stämme unterscheiden sich im Zielzelltropismus. NSI-Stämme infizieren vorwiegend Monozyten/ Makrophagen, während SI-Viren primäre T-Zellen und T-Zelllinien infizieren (Cheng-Mayer *et al.*, 1988; Tscherning *et al.*, 1998). In der frühen Infektionsphase liegen häufig NSI-Viren vor, in späten Stadien werden meist SI-Viren isoliert. Es scheint, dass NSI-Viren einen langsameren Krankheitsverlauf verursachen als Viren mit SI-Phänotyp (Keet *et al.*, 1993; Fenyo *et al.*, 1994).

Untersuchungen zur Korrelation zwischen Subtyp und biologischem Phänotyp, Zielzelltropismus sowie Korezeptorgebrauch lieferten ebenfalls kontroverse Ergebnisse. Eindeutig ist bisher nur der Zusammenhang zwischen biologischem Phänotyp und Rezeptorgebrauch bzw. dem Zielzelltropismus. Ein Zusammenhang zwischen Korezeptorgebrauch und Subtyp ist bislang nicht belegt. Der Korezeptorgebrauch wird durch das Env-Protein des Virus determiniert: R5-Viren benutzen ausschließlich CCR5 als Korezeptor und sind überwiegend makrophagentrope NSI-Viren (Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996). R4-Viren dagegen benutzen CXCR4 und sind überwiegend T-Zell-trope SI-Viren (Zhang *et al.*, 1998). Es gibt jedoch Hinweise, dass Viren vom Subtyp C und Viren der Gruppe O präferentiell CCR5 als Korezeptor verwenden (Tscherning *et al.*, 1998; Björndal *et al.*, 1999; Dittmar *et al.*, 1999). Bei Subtyp D-Isolaten wurde kein Dualtropismus für CCR5 und CXCR4 nachgewiesen, wie es teilweise bei anderen Subtypen beobachtet wurde (Tscherning *et al.*, 1998; Tscherning-Casper *et al.*, 2000). Dem gegenüber stehen Studien, in denen die Synzytienbildung oder der CCR5-Gebrauch verschiedener HIV-1-Isolate nicht in Abhängigkeit vom Subtyp auftrat (Dittmar *et al.*, 1997a und b). In Untersuchungen, die am Robert Koch-Institut durchgeführt wurden, konnte kein Zusammenhang zwischen Subtyp und Korezeptorgebrauch hergestellt werden, da keine präferentielle Infektion von Langerhans-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten/ Makrophagen und T-Zellen durch bestimmte Subtypen beobachtet wurde (Rokos *et al.* in Vorbereitung).

1.2.7.4 Subtypen und Transkriptionskontrolle

Ein weiterer Kontrollmechanismus, der die Vermehrungseffizienz beeinflussen kann, ist die Transkriptionskontrolle des proviralen Genoms. Aus Sequenzanalysen viraler Genome und einigen funktionalen Analysen zur Promotoraktivität ergaben sich Hinweise auf eine subtypspezifische Regulation des Promotors von HIV-1.

Im LTR-Promotor von Subtyp C wurden in einigen Untersuchungen mehr Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF κ B als in anderen Subtypen identifiziert (Montano *et al.*, 1997; Naghavi *et al.*, 1999). Dies könnte die Transkriptionsaktivität des viralen Promotors verstärken, was zu einer Steigerung der Replikationsrate und damit zur erhöhten Pathogenität des Subtyps C führen könnte (Gao *et al.*, 1996a; Salminen *et al.*, 1996; Montano *et al.*, 1997). Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die LTR von CRF_AE, in der meist nur eine NF κ B-*site* vorhanden ist, eine anscheinend geringere Promotoraktivität als die LTR anderer Subtypen besitzt; eine Beobachtung, die jedoch kontrovers diskutiert wird (Montano *et al.*, 1997; Jeeninga *et al.*, 2000). Auch die LTR von HIV-2 und SIV ist mit nur einer NF κ B-*site* ausgestattet und ist nachweislich gering bzw. nicht pathogen. Der Struktur und Funktion des LTR-Promotors wird somit eine wichtige Bedeutung für die Biologie von HIV-1 zugesprochen.

1.2.8 Die Regulation der Transkription bei HIV

Nach der Integration des Virusgenoms in die chromosomale DNA der Wirtszelle unterliegt die Transkription des proviralen HIV-Genoms der komplexen Kontrolle zellulärer Transkriptionsfaktoren und viraler Regulationsproteine. Diese interagieren mit der LTR-Region, die das provirale Genom flankiert und zahlreiche funktionale Elemente für DNA-bindende Transkriptionsfaktoren besitzt. Obwohl die beiden LTR-Elemente eine identische Sequenz besitzen, wird die Transkription des proviralen Genoms an der 5'LTR initiiert, die damit als Enhancer-/ Promotor-Region der viralen Genexpression fungiert (Gaynor, 1992; Klaver *et al.*, 1994).

1.2.8.1 Die Promotorstruktur von HIV-1

Der LTR-Promotor besteht, wie jeder eukaryote Promotor, aus basalen Strukturelementen und solchen, die zur Modulation der Transkriptionsaktivität beitragen (1.2.8.1.3). Die Interaktion mit zellulären und viralen Faktoren wirkt sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die HIV-Transkription ein. Maßgebend für die virale Replikation ist die antigene

Stimulation von infizierten Immunzellen, die zur Aktivierung des 5'LTR-Promotors durch wirtszell-spezifische und HIV-spezifische Transkriptionsregulatoren führt (Gaynor, 1992).

Die LTR von HIV-1 besteht aus den drei funktional unterschiedlichen Regionen U3 (*unique sequences 3*), R (*repeat*) und U5 (*unique sequences 5*) (Abb. 5). In der U3-Region und im Übergang zur R-Region sind die für die Transkription essentiellen Enhancer-/ Promotor-Elemente enthalten: (1) Der Kernpromotor (*core*), bestehend aus der TATAA-Box und drei Sp1-Bindungsstellen, (2) Enhancer-Region, bestehend aus Bindungsstellen für den T-Zell-spezifischen aktivierenden Transkriptionsfaktor NF κ B, (3) stromaufwärts lokalisierte regulatorische Elemente (AP-1/ COUP-1, NF-AT, USF, ETS, LEF-1) und (4) die stromabwärts gelegenen regulatorischen Elemente („5'-untranslatierte Region“, 5'UTR).

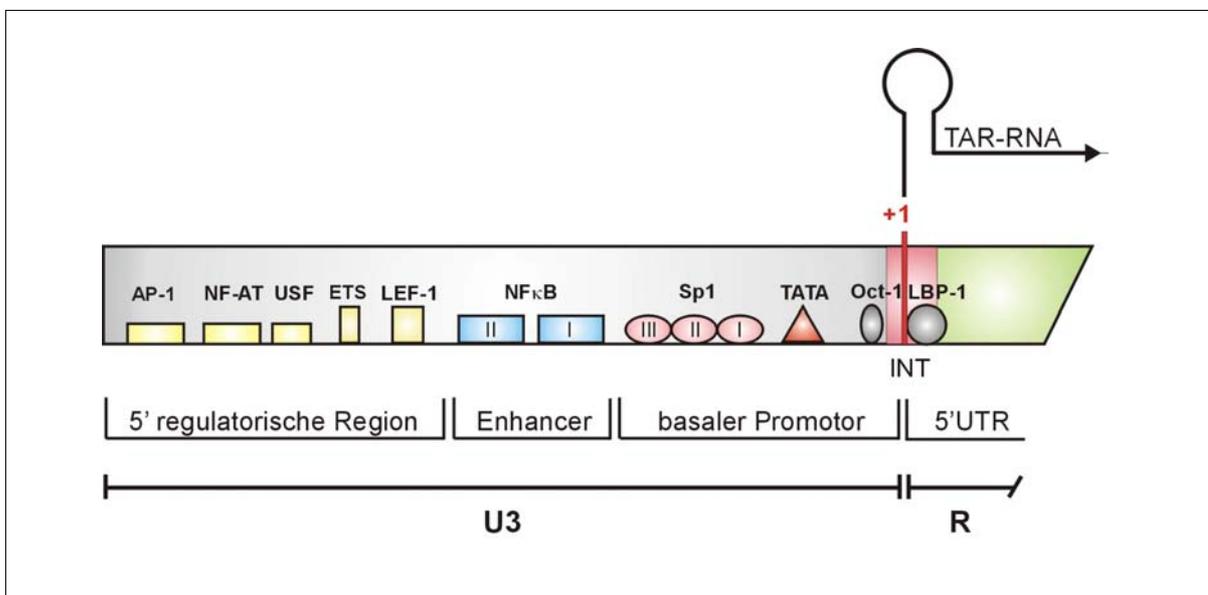


Abb. 5: Die Promotorstruktur von HIV-1. In der U3 (*unique 3*)- und in der R-Region (*repeat*) der 5'LTR sind die 4 funktionalen Elemente für die Bindung zellulärer Transkriptionsfaktoren lokalisiert: (1) Basaler Promotor (*core*), (2) Enhancer-Region, (3) stromaufwärts gelegene regulatorische Region und die 5'-untranslatierte Region (5'UTR). Die Haarnadelstruktur (*stem-loop*) am 5'-Ende der TAR-RNA-Transkripte dient als Bindungsstelle für das transaktivierende virale Tat-Protein.

In der 5'LTR sind alle *cis*-aktiven Sequenzen lokalisiert, die von *trans*-aktiven viralen und zellulären Faktoren für die Steuerung der basalen und der induzierten viralen Genexpression benötigt werden. Die TATAA-Box und die Sp1-Motive sind für die Anlagerung des Prä-initiationskomplexes und damit für die basale Transkription wesentlich. Zur Aktivierung der Transkription ist die Bindung T-Zell-spezifischer Transkriptionsaktivatoren wie NF κ B, NF-AT und ETS an entsprechende *cis*-regulatorische Elemente der LTR erforderlich (Gaynor *et al.*, 1992; Holzmeister *et al.*, 1993; Verdin *et al.*, 1995; Al-Harhi *et al.*, 1998).

Gemeinsam mit dem HIV-1-spezifischen TAR-Element, das als RNA-Struktur vorliegt und deshalb nicht direkt zum LTR-Promotor gezählt wird, regulieren die LTR-Elemente die basale wie auch die transaktivierte Transkription von HIV-1. Das HIV-1-spezifische TAR-Element dient als Bindungsstelle für das virale transaktivierende Tat-Protein. Die Bindung des Tat-Proteins an die TAR-RNA steigert die Transkriptionsrate auf ein effektives Niveau und ist daher essentiell für die maximale Aktivierung der viralen Genexpression (Rosen *et al.*, 1991a; Verhoef *et al.*, 1993 und 1997a). Im Bereich der Initiationsstelle der Transkription sind Bindungsstellen für reprimierende Transkriptionsfaktoren beschrieben (Oct-1, LBP-1). Auch 3'-abwärts von der Initiationsstelle der Transkription in der nicht translatierten *leader*-Region sind modulierende Elemente vorhanden.

1.2.8.1.1 Der basale Promotor

Der minimale funktionale Promotor von HIV-1 setzt sich zusammen aus dem TATAA-Element, dem Initiatorelement INT, in dem der Transkriptionsstart +1 lokalisiert ist, und drei Sp1-Bindungsstellen.

Das TATAA-Element. Das kanonische TATAA-Motiv der HIV-1 LTR liegt im Bereich –23 bis –27 stromaufwärts des Transkriptionsstarts +1 (Pereira *et al.*, 2000). Das TATAA-Element ist die Erkennungssequenz des Transkriptionsfaktors TFII-D, dessen Bindung essentiell für die Initiation der Transkription ist. Bei dem Faktor TFII-D handelt es sich um einen Multiproteinkomplex, bestehend aus dem TATA-Bindungsprotein (TBP) und zahlreichen TBP-assoziierten Faktoren (TAF; Kashanchi *et al.*, 1994a). Die TAFs fungieren im Transkriptionskomplex als Adapter-Proteine, indem sie die Interaktionen zwischen transkriptionsaktivierenden und transkriptions-reprimierenden Proteinen vermitteln (Verrijzer *et al.*, 1996). Die Bindung von TBP an die LTR initiiert die Bildung des Präinitiationskomplexes und ist somit für die Aktivierung der Transkription von HIV-1 essentiell (Roebuck und Saifuddin, 1999). Durch die Interaktion mit Tat ist TBP auch für die Transaktivierung der HIV-1 LTR von Bedeutung (Kashanchi *et al.*, 1994b; Majello *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000).

Das Initiator-Element. Initiator-Elemente (INR) wurden ursprünglich zur Identifizierung des Transkriptionsstarts in Promotoren benutzt, die keine TATAA-Box besitzen (Gaynor, 1992). Sie wurden auch im LTR-Promotor von HIV-1 identifiziert, wo sie vor allem die Stärke der Promotoraktivität regulieren (Gaynor, 1992; Montano *et al.*, 1996). Obwohl die meisten Initiator-Elemente pyrimidinreiche Sequenzen enthalten, ist es schwierig, eine einheitliche Konsensussequenz zu definieren.

Sp1. Direkt stromaufwärts des TATAA-Elementes, im Bereich –46 bis –78 der HXB2R-LTR ist eine GC-reiche Sequenz mit drei Bindungsstellen für den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 (*stimulating protein 1*) lokalisiert (Jones *et al.*, 1986). Der Sp1-Faktor hat einen aktivierenden Einfluss auf die Transkription von HIV-1 und ist für die basale sowie für die Tat-vermittelte Transaktivierung der HIV-1 LTR wesentlich (Sune und Garcia-Blanco, 1995a).

1.2.8.1.2 Die NFκB-Enhancer-Region

Stromaufwärts der Sp1-Bindungsstellen sind in der LTR üblicherweise zwei Bindungsstellen für den in HIV-infizierten T-Zellen und Monozyten induzierbaren zellulären Transkriptionsfaktor NFκB (*nuclear factor B*), der von der NFκB/ Rel-Genfamilie kodiert wird, lokalisiert (Kawakami *et al.*, 1988; Griffin *et al.*, 1989; Hennighausen *et al.*, 1990). Er wird durch zelluläre Aktivierungssignale der infizierten Zelle aktiviert, gelangt in den Zellkern und steigert die Transkriptionsaktivität der LTR durch spezifische Bindung, z.T. in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren, im Enhancer-Element der LTR (Kretzschmar *et al.*, 1992; Bassuk *et al.*, 1997). NFκB-Proteine werden durch inflammatorische Zytokine wie z.B. TNF-α, IL-1β und IL-6 aktiviert. Sie dienen vorwiegend der Erhöhung der Transkriptionsrate von HIV-1 während der Zellaktivierung (Roebuck und Saifuddin, 1999). NFκB kann zudem von dem viralen Protein Tat aktiviert werden, was die virale Transkription durch eine Art positiver Rückkopplung steigert und aufrecht erhält (Biswas *et al.*, 1995; Demarchi *et al.*, 1996).

Das Inhibitorprotein IκB reguliert die Funktion von NFκB negativ, indem es mit NFκB-Dimeren im Zytoplasma interagiert und dessen Eintritt in den Nukleus verhindert (Baeuerle und Baltimore, 1988a). Die Aktivierung von T-Zellen und Monozyten durch Zytokine wie TNF-α (*Tumor necrosis factor-α*) oder IL-1 (Interleukin-1) induzieren die Phosphorylierung und eine schnelle proteolytische Degradation von IκBα, wodurch die Translokation der NFκB-Dimere in den Nukleus wiederum möglich wird (Satake *et al.*, 1995).

Zahlreiche Studien belegen die essentielle Bedeutung von NFκB für die Transkription von HIV (Nabel und Baltimore, 1987; Montano *et al.*, 1996). Anhand von Mutationsanalysen der Bindungsstelle von NFκB wurde gezeigt, dass verschiedene Stimuli, die nukleäres NFκB induzieren, die LTR von HIV aktivieren (Nabel und Baltimore, 1987; Antoni *et al.*, 1994). Die Deletion der NFκB-Bindungsstelle führte dazu, dass die HIV-LTR nur noch teilweise oder überhaupt nicht von diesen Stimuli aktiviert werden konnte. Die Aktivierung der Expression latenter HIV-Proviren durch TNF-α oder IL-1 kann *in vitro* in T-Zell und in Monozyten-Zelllinien mit der Induktion von nukleärem NFκB korreliert werden (Osborn *et al.*, 1989). T-Zelllinien, die Deletionsmutanten von HIV ohne NFκB-Bindungsstellen enthalten, können durch Zytokine nicht stimuliert werden (Antoni *et al.*, 1994). Jedoch können HIV-Proviren mit

Mutationen oder Deletionen in den NF κ B-Bindungsstellen sowohl in primären T-Zellen als auch in T-Zelllinien in Kultur replizieren (Leonard *et al.*, 1989). Dies zeigt, dass die Bindung von NF κ B zwar eine Steigerung der viralen Genexpression von HIV-1 in T-Zellen und Makrophagen bewirkt, die Bindungsstellen für NF κ B auf der LTR sind jedoch nicht essentiell für die Replikation von HIV-1 (Roebuck und Saifuddin, 1999).

1.2.8.1.3 Stromaufwärts lokalisierte regulatorische Elemente

Stromaufwärts des NF κ B-Enhancers sind mehrere spezifische Bindungsstellen für modulierende Transkriptionsfaktoren lokalisiert, die je nach Zelltyp und Aktivierungsstadium der Zelle aktivierend oder reprimierend auf die Transkriptionsaktivität der LTR einwirken (Gaynor, 1992; Roebuck und Saifuddin, 1999).

LEF-1. LEF-1 ist ein Mitglied der Familie der T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren (TCF/ LEF), das mit hoher Affinität an eine zwischen dem NF κ B-Enhancer und der ETS-*site* lokalisierte Erkennungssequenz bindet (Jones und Peterlin, 1994). Die Bindung von LEF-1 wirkt transkriptionsaktivierend, indem die Protein-Protein-Interaktion von ETS-1 mit dem NF κ B p50 Protein erleichtert wird (Dickinson *et al.*, 1999).

ETS. ETS-1 Proteine gehören zu einer multigenen Familie von Transkriptionsfaktoren mit zwei getrennten DNA-Bindungs- und Transaktivationsdomänen. Die Bindung des Proteins ETS-1 an die U3-Region der LTR aktiviert die Transkription von HIV-1, wobei die Sequenz C/A GGA A/T als Kernsequenz der Bindungsstelle identifiziert wurde (Holzmeister *et al.*, 1993; Seth *et al.*, 1993).

USF. USF (*upstream stimulating factor*), ein Transkriptionsfaktor mit Helix-Loop-Helix/ Leuzin-Zipper-Struktur, wurde ursprünglich als positiver Aktivator der Transkription von Adenoviren Typ 2 charakterisiert (Miyamoto *et al.*, 1985; Sawadago *et al.*, 1988). Im Kontext von HIV-1 konnte dagegen gezeigt werden, dass USF sowohl positive als auch negative Effekte auf die LTR-gesteuerte Transkription in Abhängigkeit vom Zelltyp, aber unabhängig vom Subtyp der LTR haben kann (Lu *et al.*, 1989 und 1990; Moses *et al.*, 1994). USF reprimierte die Transkription von HIV-1 in einer Epithelzelllinie, wirkte jedoch aktivierend auf die Transkription in einer T-Zelllinie (Naghavi *et al.*, 2001).

NF-AT. Eine purinreiche Sequenz stromaufwärts der Enhancer-Region dient in der HIV-1 LTR als Bindungsstelle für den induzierbaren, T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*; Shaw *et al.*, 1999; Gaynor, 1992; Pereira *et al.*, 2000).

NF-AT ist in unstimulierten T-Zellen nur in geringen Mengen vorhanden, in aktivierten T-Zellen nimmt die Bindung von NF-AT an die LTR jedoch stark zu, weshalb dieser Faktor eine aktivierende Rolle bei der Transkription von HIV-1 zu spielen scheint (Gaynor, 1992).

AP-1. AP-1 (*activator protein-1*) ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor der bZip-Familie (*basic leucine zipper*), der am 5'-Ende der HIV-1 LTR bindet (Gaynor, 1992; Roebuck *et al.*, 1996). Neuere Daten belegen einen zelltyp-spezifischen, aktivierenden Einfluss von AP-1 auf die Transkription von HIV-1 (Pereira *et al.*, 2000).

1.2.8.1.4 Stromabwärts lokalisierte regulatorische Elemente

Zahlreiche Studien belegen, dass die Sequenzen stromabwärts des Transkriptionsstarts +1, also in der 5'-UTR-Region (*5'-untranslated leader region*), ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Transkription von HIV-1 spielen (Mallardo *et al.*, 1996; Roebuck und Saifuddin, 1999). Diese Elemente scheinen entweder direkt oder durch die Interaktion mit den Enhancer-/Promotor-Elementen der LTR eine Aktivierung der HIV-1 Transkription zu bewirken (Roebuck und Saifuddin, 1999).

1.2.8.1.5 Das TAR-Element

Das TAR-Element (*trans activation response*) ist eine regulatorische Sekundärstruktur der TAR-RNA, deren Sequenz am Transkriptionsstart +1 beginnt und bis zur Position +59 reicht (Verhoef *et al.*, 1997a). Diese Haarnadel-Struktur (*stem-loop*) wird am 5'-Ende der anfänglich kurzen mRNA-Transkripte gebildet. Die TAR-RNA besteht aus einem Stamm (*stem*), einer Blase aus 3 Nukleotiden (*bulge*) am Stamm und aus einer Schleife (*loop*) und dient als Bindungsstelle für den viralen Transkriptionsaktivator Tat sowie für zelluläre Transkriptionsfaktoren (Gaynor, 1992; Karn 1999). Durch die Bindung von HIV-1 Tat an die *bulge*-Sequenz werden die kurzen Transkripte stabilisiert und der Elongationsprozess der Transkription kann fortgesetzt werden. Dies führt zur Synthese langer, im Zytoplasma translatierbarer mRNA-Moleküle (Zhou und Sharp, 1995). Bezüglich der eukaryotischen Transkriptionskontrolle ist das TAR-Element einzigartig, da es als RNA-Struktur funktional ist (Kingsman *et al.*, 1996). Diese Transaktivierung der Transkription durch die Tat/ TAR-Interaktion kann die Transkriptionsrate in Reporter-Systemen um 200 bis 300-fach steigern (Sodroski *et al.*, 1985).

1.2.8.1.6 Reprimierende Transkriptionsfaktoren

In latent infizierten Zellen ist die Transkription von HIV-1 minimal und wahrscheinlich aktiv durch die Chromatin-Struktur und/ oder die Bindung negativ regulierender Transkriptionsfaktoren unterdrückt (Roebuck und Saifuddin, 1999). Diese reprimierenden Faktoren spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der viralen Latenz.

Oct-1. Zwischen dem TATAA-Element und dem Initiator INT der LTR befindet sich eine Bindungsstelle für den Faktor Oct-1 (*octamer binding protein-1*), der sowohl die basale als auch die Tat-aktivierte Transkription von HIV-1 unterdrückt (Liu *et al.*, 1997).

LBP-1. Die Bindungsstelle für den zellulären Transkriptionsfaktor LBP-1 (*leader binding protein*) ist zwischen dem Initiator-Element des Kernpromotors und der TAR-DNA lokalisiert (Parada *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2000). In Kooperation mit dem multifunktionalen humanen Transkriptionsfaktor YY1 (*Yin Yang 1*) wirkt LBP-1 reprimierend auf die Transkription von HIV-1 (Margolis *et al.*, 1994; Romerio *et al.*, 1997). LBP-1 bindet dabei an die LTR und rekrutiert YY1 sekundär, das somit an LBP-1 und nicht selbst an die LTR bindet.

1.2.8.2 Die basale Transkription von HIV-1

Während das integrierte Provirus in replizierenden Zellen exprimiert wird, kann es in ruhenden infizierten T-Zellen in einem transkriptionsinaktiven, latenten Stadium verbleiben, bis die Zelle ein Signal zur Zellteilung erhält. In ruhenden T-Zellen wird der Transkriptionsfaktor NF κ B im Komplex mit dem Inhibitorprotein I κ B α im Zytoplasma zurückgehalten (Baldwin *et al.*, 1996). Kommt es im Verlauf der Infektion jedoch zur Aktivierung des Immunsystems und damit zur Proliferation der Immunzellen (Antigen-Stimulation *in vivo* oder Mitogen-Stimulation *in vitro*) wird NF κ B von I κ B α freigesetzt, wandert in den Nukleus und stimuliert die zelluläre Transkription. In HIV-infizierten Immunzellen bindet NF κ B an den NF κ B-Enhancer der integrierten proviralen LTR, wodurch auch die HIV-Transkription aktiviert wird (Abb. 6).

Um die Transkription der HIV-LTR einzuleiten, müssen jedoch zunächst strukturelle Veränderungen stattfinden: Nach der Integration in das Wirtsgenom ist die provirale DNA in Chromatin eingebunden. Das erste Nukleosom (Nuc-1) stromabwärts des Transkriptionsstarts verdeckt in diesem Zustand die Initiationsstelle und verhindert damit die Transkription des HIV-Genoms (Sheridan *et al.*, 1997). Nach der Bindung an die HIV-LTR interagiert NF κ B mit einer Histon Acetylase, wodurch die Chromatinstruktur verändert und Nuc-1 vom Initiationstart entfernt wird. Das RNA-Polymerase II Holoenzym wird durch seine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor TFIID und anderen Komponenten des basalen

Transkriptionsapparates an die TATAA-Box des Promotors geleitet (Abb. 6a). Gleichzeitig stimuliert NF κ B die Aktivität der CDK-7 Kinase des zellulären Transkriptionsfaktors TFIID, die die Phosphorylierung der CTD (*carboxy terminal domain*) der RNA-Polymerase II katalysiert. Durch die Phosphorylierung aktiviert, löst sich die jetzt als Form II₀* bezeichnete RNA-Polymerase II vom LTR-Promotor und beginnt mit der mRNA-Synthese (Isel und Karn, 1999; West *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Bei der auf geringem Niveau verlaufenden basalen Transkription findet zwar eine durch NF κ B gesteigerte, effektive Transkriptionsinitiation statt, die Transkription bricht jedoch vorzeitig ab, sodass zunächst überwiegend kurze, nicht translatierbare mRNA-Moleküle transkribiert werden (Karn, 1999).

Die optimale Struktur der *core*-Elemente macht die HIV-LTR zu einem Promotor mit effektiver Initiation der Transkription, bezüglich der Elongation kann die HIV-LTR jedoch als „fehlerhafter“ Promotor betrachtet werden, da ihr essentielle Enhancer-Elemente zur Steigerung der Elongation fehlen. Mit der Tat-Transaktivierung der LTR entwickelte HIV-1 eine spezifische Strategie zur Steigerung der Transkriptionsrate.

1.2.8.3 Die Tat-transaktivierte Transkription von HIV-1

Die Faltung der frühen TAR-RNA-Transkripte in die für HIV typische Haarnadelstruktur (*stem-loop*) bewirkt eine vorzeitige Termination der Transkription. Dadurch entstehen vorwiegend kurze mRNA-Moleküle, die lediglich die 5'-terminalen Sequenzen der TAR-Elemente enthalten (Karn 1999; Abb. 6b). Von den wenigen *full-length*-Transkripten, die gespleißt aus dem Zellkern gelangen, werden die frühen viralen Proteine Rev und Tat synthetisiert und in den Zellkern zurücktransportiert. Dort werden die Tat-Proteine zum Transkriptionskomplex geleitet und binden an die Blase U-C-U (*bulge*) des TAR-Elementes (Abb. 6c). Infolge dieser Bindung kommt es zur Konformationsänderung der RNA-Struktur, und der Transkriptionsinitiationskomplex wird stabilisiert. Dadurch wird der Abbruch der Transkription verhindert, und die effiziente Synthese sämtlicher viraler mRNAs wird ermöglicht (Abb. 6d). Das Umschalten (*shift*) von kurzen auf lange Transkripte lässt vermuten, dass Tat nicht die Initiation, sondern die Elongation der Transkription von HIV-1 aktiviert (Selby *et al.*, 1989; Karn, 1999). Die durch die Strukturänderung zusätzlich verbesserte Bindungsaffinität von Tat an die TAR-RNA ermöglicht die Steigerung der Transkriptionsrate auf ein hohes Niveau (Berkhout *et al.*, 1989; Dingwall *et al.*, 1989; Sodroski *et al.*, 1985; Bohan *et al.*, 1992).

An der Spitze des TAR-Elementes befindet sich zudem eine Schleife (*loop*) aus 6 ungepaarten Nukleotiden, die als Erkennungssequenz für zelluläre Kofaktoren (*loop factor*),

fungiert (Verhoef *et al.*, 1997a). Die Bindung solcher Faktoren, wie beispielsweise Zyklin T1 an die Loop-Sequenz, wirkt sich zusätzlich positiv auf die Tat-Transaktivierung der LTR aus (Karn, 1999; Liu *et al.*, 2002).

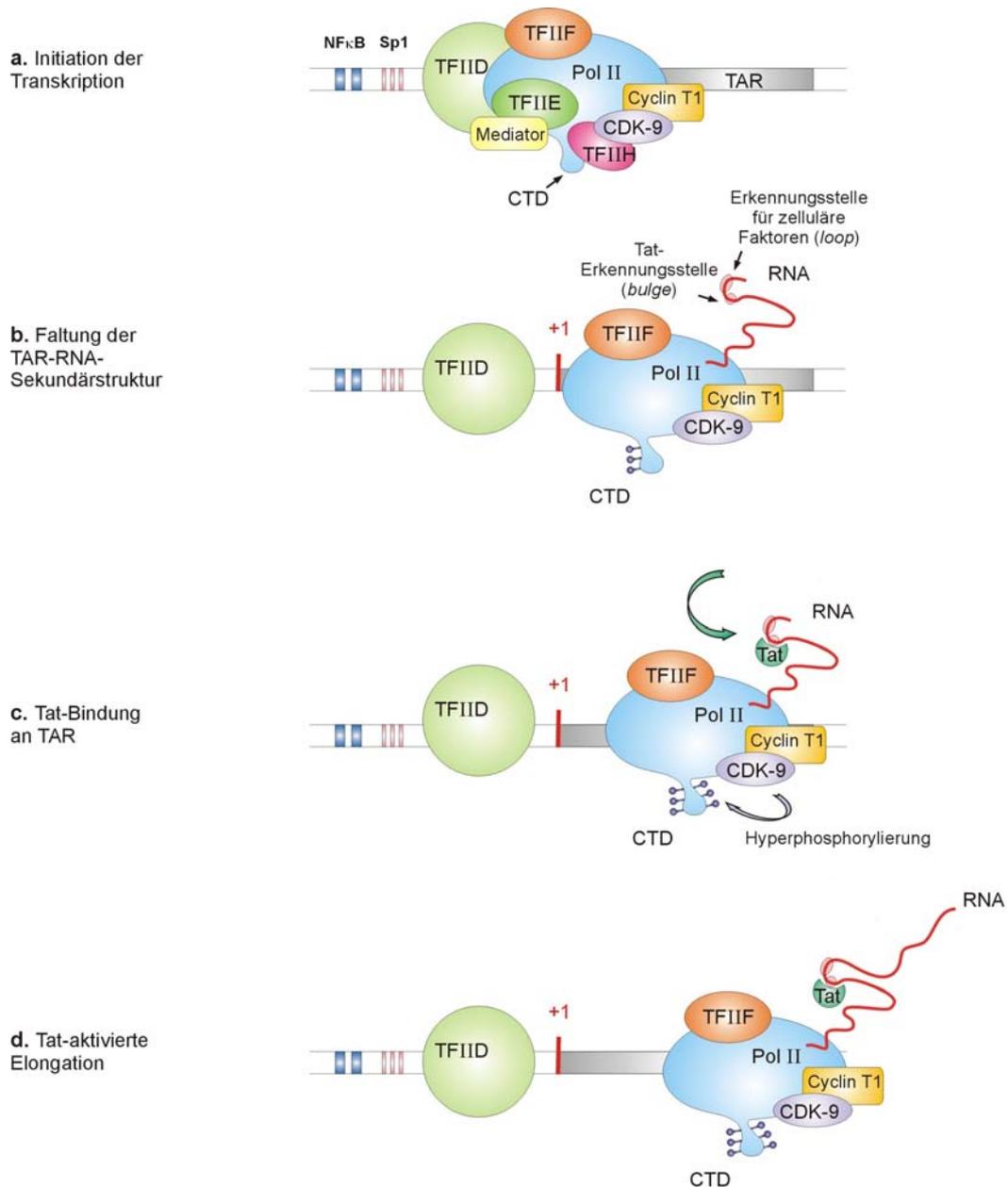


Abb. 6: Modell für die Aktivierung der Transkription von HIV-1. a. Das RNA Polymerase II Holoenzym bindet durch die Interaktion mit TFIID und anderen Komponenten des basalen Transkriptionsapparates an die LTR von HIV-1. Die CTD-Domäne (*carboxy terminale Domäne*) der RNA Pol II wird durch die CDK-7 Kinase, ein Bestandteil von TFIIH phosphoryliert, wodurch RNA Pol II den Promotor verlässt und die Transkription der TAR-DNA beginnt. b. Das naszierende TAR-RNA-Transkript faltet sich in die charakteristische *stem-loop*-Struktur und bindet RNA Pol II. c. Tat wird an den Transkriptionskomplex geleitet, bindet an die *bulge*-Sequenz der TAR-RNA und formt einen ternären Komplex mit TAK. Die aktivierte TAK-Kinase katalysiert die Phosphorylierung der CTD-Domäne und TAR wird von der Polymerase verschoben. d. Der aktivierte Transkriptionskomplex kann das gesamte HIV-1-Genom transkribieren (Darstellung modifiziert nach Karn, 1999).

1.2.9 Ziel der Arbeit

Entsprechend der aktuellen Klassifizierung wird HIV-1 in die unterschiedlichen genetischen Gruppen M, N, und O eingeteilt. Die Subtypen und rekombinanten Formen der Gruppe M bestimmen die globale Epidemie und sind in Bezug auf die geographischen Regionen und die Transmissionsgruppen ungleichmäßig über den gesamten Globus verteilt. Neben sozio-demographischen Faktoren werden biologische Eigenschaften des Wirtes und des Virus als Ursache der unterschiedlichen Prävalenz der Subtypen angesehen. Der derzeitige Kenntnisstand über die Diversität von HIV-1 Varianten führte zu der Frage, inwieweit sich die verschiedenen Subtypen von HIV-1 hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften unterscheiden. Ein Parameter, der die Übertragung und die Pathogenese von HIV wesentlich beeinflusst, ist die Vermehrungseffizienz des Virus. Bei HIV hängt die Vermehrungseffizienz von der Replikationsrate ab, die von dem proviralen LTR-Promotor gesteuert wird.

Die LTR von HIV-1 enthält alle für einen funktionalen Promotor essentiellen *cis*-regulatorischen Elemente zur Kontrolle der Transkription des proviralen Genoms. Die Transkriptionsaktivierung von HIV-1 steht unter der komplexen Kontrolle zellulärer und virus-spezifischer Transkriptionsfaktoren. Subtyp-spezifische Sequenzvariationen im LTR-Promotor von HIV-1 könnten zu einer divergenten Transkriptionskontrolle der Genexpression führen. Subtyp-spezifische Unterschiede der Replikationseffizienz und die präferentielle Vermehrung in bestimmten Zielzellen von HIV-1 könnten die Folge sein.

Die Analyse der Transkriptionskontrolle in verschiedenen HIV-1 Subtypen war daher Ziel der vorliegenden Arbeit. Da zu Beginn der Studie Informationen zu strukturellen Unterschieden der LTR nur von einer begrenzten Anzahl an Isolaten zur Verfügung standen, wurde anhand ausgewählter HIV-1-Isolate aus dem *AIDS Research and Reference Panel* und anhand von Primärisolaten von Lutz Gürtler (Universität Greifswald) eine strukturelle und funktionale Analyse der LTR-Promotoraktivität der Subtypen der Gruppe M (A, B, C, D, F, G und der CRF_AE) und der Gruppe N und O durchgeführt. Zusätzlich standen Patientenproben aus der HIV-Serokonverterstudie des Robert Koch-Institutes zur Verfügung, die mit HIV-1 nonB-Viren infiziert waren. Die Serokonverterstudie wird in der Arbeitsgruppe Retrovirologie seit 1997 durchgeführt (BMG-Förderung, Projektleiter Prof. G. Pauli). Unter Serokonversion versteht man das erstmalige Auftreten von erreger-spezifischen Antikörpern im Blut nach einer Infektion oder einer Schutzimpfung (Umwandlung einer negativen in eine positive Seroreaktion). Das Serokonverterkollektiv besteht aus Patienten mit bekanntem Infektionszeitpunkt, sodass Faktoren, die den Verlauf der Erkrankung beeinflussen, wie z. B. der Subtyp der Infektion, analysiert werden können. In dieser Studie sollte zum einen die Ausbreitungsdynamik von HIV-1 Subtypen und therapieresistenter Viren in Deutschland untersucht werden. Ein weiteres Ziel der Studie war die Charakterisierung der biologischen

Eigenschaften von HIV-1 Gruppen und Subtypen. Die vorliegende Dissertation ist Teil dieser Untersuchungen und hat folgende Arbeitsziele:

- Vergleichende Strukturanalyse der regulatorischen Elemente des LTR-Promotors von HIV-1 Gruppen und Subtypen.

- Funktionale Charakterisierung der LTR-Promotoren verschiedener Gruppen und Subtypen. Zum Vergleich der basalen und der Tat-transaktivierten Promotoraktivität wurde ein Reporter-System in transfizierten eukaryoten Zellen verwendet.

2 Material

2.1 Chemikalien

Agarose, ultra pure	Bio-Rad, USA
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Gibco BRL, USA
Bacto-Trypton	Gibco BRL, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM	Gibco BRL, Eggenstein
DTT	Gibco BRL, Eggenstein
Essigsäure, 100% p.a	Merck, Darmstadt
Ethanol, p.a	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, EtBr	Serva, Heidelberg
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, Eggenstein
Interleukin-2 (Proleukin)	Chiron, Emmerlyville California
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Mineralöl (PCR)	Sigma, Deisenhofen
Molekulargewichts-Standards	Gibco BRL, Eggenstein
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide	TIB Molbiol, Berlin
RCLB	Biochrom KG, Berlin
RPMI	Biochrom KG, Berlin
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin/ EDTA 10x	Biochrom KG, Berlin

2.2 Kits

ABI PRISM™ AmpliTaq® FS	Applied Biosystems, Weiterstadt
BigDye Terminator	
Dual-Light® Combined Reporter Gene Assay System	Tropix/ Applied Biosystems, Weiterstadt
Gel-Extraktions-Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
NucleoSpin® Plasmid	Machery Nagel/ Rapidozym, Berlin
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN EndoFree™ Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAwell® Plasmid Purification System	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN <i>Effectene</i> Transfection Reagent	QIAGEN GmbH, Hilden

2.3 Enzyme

CombiPol DNA-Polymerase Mix	Invitex, Berlin-Buch
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase	Promega, Deisenhofen
T4 DNA-Ligase	Promega, Deisenhofen

2.4 Geräte

Tischzentrifuge	Eppendorf
Laborzentrifugen	Sorvall RC 28S, Heareus Sepatech, Eppendorf Centrifuge 5402
Thermozykler	Perkin Elmer; Gene Amp® PCR Cyclers 9700, DNA Thermal Cyclers 480
Speedvac	Savant, Refrigerated Condensation Trap RT490
Spektrometer	LKB Ultraspec III, Pharmacia
Gelelektrophorese-Kammer	Horizon 58, Gibco/ BRL
Zellzählapparatur Easy Count 1	Schärfe, Reutlingen
MicroLumat <i>Plus</i>	LB 96 V, Bertold
SLT Spectra Photometer	SLT Labinstrument GmbH, Deutschland
Zellkultur-Flaschen (steril)	Nunc Intermed, Roskilde, Dänemark
Glas-Pipetten (autoklaviert)	Precicolor HBG, Western Germany

2.5 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Gibco/ BRL, USA
<i>Escherichia coli</i> XL1 blue	Stratagene GmbH, Heidelberg

2.6 Plasmide

pGL3-Basic

Expressionsvektor (Promega); cDNA (*luc+*), die für modifizierte *firefly* Luziferase kodiert, ohne eukaryotischen Promotor, f1 origin, β -lactamase-Gen (Amp^r), Größe 4818 bp.

pGL3-Promotor

Expressionsvektor (Promega); cDNA (*luc+*), die für modifizierte *firefly* Luziferase kodiert, wird unter der Kontrolle des SV40-Promotors exprimiert, f1 origin, β -lactamase-Gen (Amp^r), Größe 5010 bp.

pBluescript SK+

Klonierungsvektor (Stratagene GmbH); pUC origin, f1 (+) origin, β -Galaktosidase α -Fragment, *lac*-Promotor, β -lactamase-Gen (Amp^r), multiple Klonierungsstelle flankiert von T3- und T7-Promotoren, Größe 3,0 kb.

pNL4.3

Rekombinanter infektiöser molekularer pUC-18 Klon mit proviralem HIV-1 Genom (NL.4.3), flankiert von genomischer DNA, Ampicillinresistenz, Größe 15 kb (*NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*; HIV-Datenbank Acc. M19921).

pRSV- β -Gal

Expressionsvektor; pBR-origin, *lac*-Z-Gen (*E. coli*) unter der Kontrolle des RSV-Promotors, β -lactamase-Gen (Amp^r), Größe 7,8 kb (erhalten von H. Schäfer, Robert Koch-Institut, Berlin; Gorman *et al.*, 1982; MacGregor *et al.*, 1987).

pcDNA3-tat

Expressionsvektor, der das von *tat* Exon1 kodierte Tat-Protein von HIV-1 Subtyp B (Isolat LAI) unter der Kontrolle des CMV immediate-early-Promotors exprimiert (erhalten von B. Berkhout, Universität Amsterdam, Niederlande; Verhoef *et al.*, 1997b).

2.7 Eukaryote Zelllinien

COS-Z-28

Die Zelllinie COS (*CV1 Origin SV40*) stammt aus Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze. Sie ist transformiert mit einer Mutante des Affen-Virus SV40, d.h. diese Zellen

enthalten ein in das zelluläre Chromosom integriertes, aber nicht voll funktionsfähiges SV40-Genom, von dem aus die Synthese des sog. T-Antigens gesteuert wird. Dieses Protein steigert die Expression von viralen wie auch von Fremd-Genen unter der Kontrolle des SV40-Promotors.

Bei der Zelllinie COS-Z-28 handelt es sich um eine von COS-7-Zellen abstammende adhärent wachsende Zelllinie, die durch stabile Transfektion das *lac-Z*-Gen aus *E. coli* unter der Expressionskontrolle der HIV-1 LTR exprimiert (erhalten von M. Alizon, ICGM Paris, Frankreich; Dragic *et al.*, 1992).

293 EBNA

Humane Nierenzellen, die EBNA-1 Protein von Epstein-Barr Virus (EBV) konstitutiv exprimieren (Invitrogen, San Diego, USA).

H9

H9-Zellen stammen von einem Zellklon der neoplastischen T-Zelllinie HUT 78 und eignen sich aufgrund ihrer Fähigkeit zu hoher Virusproduktion für die Anzucht von HIV-1-Isolaten (Popovic *et al.*, 1984; *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*).

2.8 Puffer

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Standardpuffer (Prozentangaben in w/v).

Puffer	Zusammensetzung	
TAE 50x (pH 7,9)	Tris	400 mM
	Natriumacetat Na ₂	200 mM
	EDTA x 2H ₂ O	20 mM
	Essigsäure	296 mM
TBE 10x (pH 8,3)	Trisbase	90 mM
	H ₃ BO ₃	90 mM
	EDTA	2 mM
TE 1x (pH 8,0)	Tris/ HCL	10 mM
	EDTA	1 mM
STET (pH 7,9)	Tris/ HCL	10 mM
	EDTA	50 mM
	Triton X-100	0,5 %
	Saccharose	8,0 %

Puffer	Zusammensetzung	
STE-Puffer	NaCl	0,1 mM
	Tris/ HCL (pH 7,4)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
PBS (pH 7,2)	NaCl	137 mM
	K ₂ HPO ₄	0,7 mM
	KH ₂ PO ₄	5 mM
PBS „ohne“ (ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺)		
Probenpuffer für Gelelektrophorese	Tris/ HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	2 mM
	Glycerin	15 %
	Bromphenolblau	0,1 %

2.9 Medien

2.9.1 Medien für Bakterienkulturen

Tab. 2: Zusammensetzung der Medien für *E. coli*-Kulturen (Prozentangaben in w/v).

Medium	Zusammensetzung	
2 x TY (pH 7,0)	Bakto-Trypton	1,6 %
	Bakto-Hefe-Extrakt	1,0 %
	NaCl	86 mM
LB (Luria Bertani Medium)	Bakto-Trypton	1,0 %
	Bakto-Hefe-Extrakt	0,5 %
	NaCl	172 mM
SOC (pH 7,0)	Bakto-Trypton	2,0 %
	Bakto-Hefe-Extrakt	0,5 %
	NaCl	8,6 mM
	KCl	2,5 mM
	→ autoklavieren	
	→ nach dem Abkühlen Zugabe von	
	MgCl ₂	10 mM
Glukose	20 mM	

2.9.2 Medien und Puffer für die Kultivierung eukaryoter Zellen

Die adhärent wachsenden Zelllinien COS-Z-28 und 293 EBNA wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) kultiviert (Folkman *et al.*, 1979).

Die zur Virusanzucht verwendete Zelllinie H9 sowie die aus HIV-negativen Blutspendern isolierten PBMCs wurden in „RPMI 1640“ (*Rosewell Park Memorial Institute*) kultiviert.

Tab. 3: Zusammensetzung der Medien und Puffer für die Kultivierung eukaryoter Zellen (Prozentangaben in w/v).

Medium	Zusammensetzung	
RPMI 1640 (<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>); Basislösung	Nystatin in DMSO	0,05 ml
	(0,1 ml = 100 E)	
	Glutamin (200 mM)	1,0 ml
	FKS (inaktiviert)	10,0 ml
	Aqua Bidest	ad 100 ml
	→ Lagerung bei 4°C	
RPMI 1640 gebrauchsfertig	Humanes Interleukin-2	0,75 ml
	FKS	1,5 ml
	RPMI Basismedium	ad 15 ml
RCLB (<i>Red-Cell-Lysis-Buffer</i>)	NH ₄ CL	8,29 g
	KHCO ₃	1,00 g
	EDTA	0,372 g
	Aqua Bidest	ad 1000 ml
	→ (autoklavieren / steril filtrieren)	
	→ Lagerung bei 4°C	
„Waschpuffer“	FKS (inaktiviert)	5,0 ml
	PBS	ad 100 ml

2.10 Virusisolate

2.10.1 Referenzsequenzen von HIV-1 und SIV

Für die phylogenetische und die vergleichende Strukturanalyse der LTR von HIV-1 wurden Virussequenzen des aktuellen Subtypen-Referenz-Panels und Referenzsequenzen mit komplettem Genom der HIV-Datenbank benutzt (<http://hiv-web.lanl.gov>).

Tab. 4: Referenzsequenzen aus der Los Alamos Datenbank, Release 2001.

Subtyp	Isolat	Acc. Nr.	Herkunft
HIV-1 Gruppe M			
A1	U455	M62320 ^{1,2}	Uganda
A1	92UG037.1	U51190	Uganda
A1	Q2317	AF004885 ¹	Kenia
A1	SE7253	AF069670	Schweden (Somalia)
A2	94CY017.41	AF286237	Zypern
A2	97CDKTB48	AF286238 ¹	Dem. Republik Kongo
B	HXB2R	K03455 ^{1,2}	Frankreich
B	NL4-3	M19921 ¹	USA/ Frankreich
B	JRFL	U63632	USA
B	RF	M17451	USA (Haiti)
B	WEAU160	U21135 ¹	USA
C	ETH2220	U46016 ^{1,2}	Äthiopien
C	92BR025.8	U52953 ^{1,2}	Brasilien
C	IN21068	AF067155 ¹	Indien
C	BW05.02	AF110967	Botswana
D	NDK	M27323 ^{1,2}	Dem. Republik Kongo
D	ELI	K03454 ¹	Dem. Republik Kongo
D	94UG114.1	U88824 ¹	Uganda
F1	93BR020.1	AF005494 ^{1,2}	Brasilien
F1	VI850	AF077336 ¹	Dem. Republik Kongo
F1	FIN9363	AF075703	Finnland
G	SE6165	AF061642	Dem. Republik Kongo
G	HH8793.1.1	AF061640	Finnland (Kenia)
G	92NG0083	U88826 ^{1,2}	Nigeria
G	G-DRCBL	AF084936 ¹	Belgien
H	H-90CF056.1	AF005496 ^{1,2}	Zentral Afrikanische Republik
H	VI991	AF190127	Belgien
H	VI997	AF190128 ¹	Belgien
J	SE9280.9	AF082394 ^{1,2}	Schweden
J	SE9173.3	AF082395 ¹	Schweden (Dem. Rep. Kongo)
CRF01_AE	CM240	U54771 ¹	Thailand
CRF01_AE	93TH253.3	U51189 ^{1,2}	Thailand
CRF01_AE	90CF402.1	U51188 ^{1,2}	Zentral Afrikanische Republik
CRF01_AE	90CF11697	AF197340	Zentral Afrikanische Republik

Subtyp	Isolat	Acc. Nr.	Herkunft
CRF01_AE	90CF4071	AF197341 ¹	Zentral Afrikanische Republik
CRF02_AG	IBNG	L39106 ¹	Nigeria
CRF02_AG	DJ264	AF063224	Frankreich (Djibouti)
CRF02_AG	98SEMP1211	AJ251056	Senegal
CRF02_AG	98SEMP1213	AJ251057 ¹	Senegal
CRF03_AB	KAL153	AF193276 ¹	Russland
CRF03_AB	98RU001	AF193277	Russland
CRF04_cpx	PVMY	AF119819 ¹	Zypern
CRF05_DF	VI1310	AF193253 ¹	Belgien
CRF06_cpx	96AUBFP90	AF064699 ¹	Australien (Burkina Faso)
CRF06_cpx	97SE1078	AJ288981	Senegal
CRF07_BC	97CN001	AF286226 ¹	China
CRF08_BC	Gx-7F	AY008716	China
CRF10_CD	TZBFL061	AF289548 ¹	Tansania
CRF11_cpx	97CM-MP818	AJ291718	Kamerun
CRF12_BF	MA159	AF385936 ¹	Argentinien
HIV-1 Gruppe N			
N	YBF30	AJ006022 ^{1,2}	Kamerun
HIV-1 Gruppe O			
O	SEMP1300	AJ302647 ¹	Senegal
O	MVP5180	L20571 ^{1,2}	Kamerun
O	ANT70	L205887 ¹	Kamerun
SIV-CPZ (<i>Pan troglodytes troglodytes</i> und <i>Pan troglodytes schweinfurtii</i>)			
CPZ (<i>P.t.t.</i>)	CPZGAB	X52154	Gabun
CPZ (<i>P.t.t.</i>)	US	AF103818 ¹	USA (Afrika) *
CPZ (<i>P.t.t.</i>)	CAM3	AF115393	Kamerun
CPZ (<i>P.t.s.</i>)	CPZANT	U42720	Dem. Republik Kongo
SIV-AGM (African Green Monkey, <i>Chlorocebus</i>)			
SIV-AGMVer	SIVagmVer155	M29975 ¹	Kenia

¹ ausgewählte Isolate für die Darstellung der phylogenetischen LTR-Analyse (Abb. 11)

² ausgewählte Isolate für die Darstellung des Sequenzalignments zur vergleichenden Promotororganisation der LTR (Abb. 12)

* Virus wurde aus einem Schimpansen isoliert, der in Afrika (genaue Herkunft unbekannt) gefangen und in die USA importiert worden war.

2.10.2 Viren des Studienpanels

Für die phylogenetischen, strukturellen und funktionalen Analysen der LTR von HIV-1 wurde ein Studienpanel von insgesamt 30 Isolaten zusammengestellt (Tab. 5).

Acht Isolate und der rekombinante molekulare Klon pNL4.3 stammen aus dem *AIDS Research and Reference Reagent Program* (National Institute of Health, USA; www.aidsreagent.org), 16 Primärisolate stammen von L. Gürtler (Universität Greifswald, ehemals Max von Pettenkofer-Institut, München). Diese Isolate waren auf primären Blutzellen (PBMC, *mononukleäre Zellen des peripheren Blutes*) HIV-negativer Blutspender vermehrt worden und standen in Form infizierter Zellen zur Verfügung (erhalten von K. Rokos, Robert Koch-Institut, Berlin).

Weitere fünf Isolate stammen von Patienten der Serokonverterstudie des Robert Koch-Institutes. Diese fünf Serokonverter waren in den Genomregionen *gag* (p17) und *env* (C2V5) typisiert worden und gehörten zu den nonB-Viren der Gruppe M. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Anzucht auf PBMC HIV-negativer Spender vermehrt (3.2.2). Die Virusvermehrung wurde mittels p24 Antigen-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) im Kulturüberstand nachgewiesen und quantifiziert (3.2.5).

Der Vertreter der Gruppe O-Viren (O-MVP5180) war bereits auf die Zelllinie H9 adaptiert und wurde auf H9-Zellen weiter vermehrt (3.2.3).

Tab. 5: Zusammenstellung der untersuchten HIV-1-Isolate (Studienpanel).

a. HIV-1-Isolate (*NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*).

Virusstock mLC						Virusanzucht	
Revidierte Zuordnung 1/98						p24	TCID ₅₀ /
Subtyp	Isolat	Acc. Nr.	Labor-Code	Biotyp	Herkunft	[ng/ml]	ml
A	92UG029	U08821	A-2	SI	Uganda	17	3,8x10 ⁴
	92UG035	U08823	A-5	NSI	Uganda	10,5	1,3x10 ⁴
	92RW009	U88823	A-6	NSI	Ruanda	204	1,1x10 ⁵
B	92TH026	U08802	B-4	NSI	Thailand	102	2,0x10 ⁵
C	92BR025	U52953	C-7	NSI	Brasilien	20	3,8x10 ⁴
D	92UG021	U08821	D-1	SI	Uganda	17	2,0x10 ⁵
AE	92TH022	U09131	AE-3	NSI	Thailand	3,9	4,7x10 ²
F	93BR020	U51290	F-9	SI	Brasilien	81	1,4x10 ⁵
	93BR029	AF005495	F-10	NSI	Brasilien	81	1,1x10 ⁵
N	YBF30	AJ006022	N-1	n.b. ²	Kamerun	n.d. ¹	n.d. ¹

b. Primärisolate (bezogen von L. Gürtler, Universität Greifswald)

Subtyp	Isolat	Acc.	Labor- Code	Biotyp	Herkunft	p24 [ng/ml]	TCID ₅₀ / ml
A	13035/93	n.e. ³	A-11	SI	Elfenbein- küste	31	1,0x10 ⁶
	11562/96	n.e. ³	A-14	SI	Kenia	26,6	1,3x10 ⁴
	695/97	n.e. ³	A-16	SI	Zaire	41,5	1,3x10 ⁴
	8268A/98	n.e. ³	A-23	n.b. ²	n.b. ²	n.d. ¹	1,1x10 ⁵
	4237A/98	n.e. ³	A-24	n.b. ²	n.b. ²	n.d. ¹	1,1x10 ⁵
B	3858/96	n.e. ³	B-18	NSI	Griechenland	82	1,3x10 ⁴
	14885/95	n.e. ³	B-19	NSI	Paraguay	204	3,4x10 ⁵
	6960/95	n.e. ³	B-22	NSI	Paraguay	121	3,8x10 ⁴
C	484/97	n.e. ³	C-15	NSI	Äthiopien	14,4	1,3x10 ⁴
D	8863/95	n.e. ³	D-20	NSI	Tansania	3,7	3,8x10 ⁴
	3971/95	n.e. ³	D-21	SI	Tansania	275	3,8x10 ⁴
AE	3429A/98	n.e. ³	AE-25		Thailand	n.d. ¹	n.d. ¹
F	9475/96	n.e. ³	F-13	NSI	Elfenbein- küste	51	1,1x10 ⁵
G	8206/96	n.e. ³	G-12	NSI	Togo	7,9	1,6x10 ²
	264/96	n.e. ³	G-17	NSI	Äthiopien	111	3,8x10 ⁴
O	MVP5180	L20571	O-1	SI	Kamerun	n.d. ¹	n.d. ¹

c: Primärisolate (Serokonverterstudie des Robert Koch-Institutes)

Patient	Herkunft	Genotyp		Transmissionsgruppe/ Herkunft	Jahr der Infektion
		<i>env</i> C2V5	<i>gag</i> p17		
97-03493	Deutschland	E	A	heterosexuell / Thailand	1992
97-03746	Deutschland	A	A	heterosexuell / Kenia	1996
97-04095	Äquatorial Guinea	C	C	heterosexuell / HPR	n.b. ²
97-04599	Deutschland	A	IBNG	IVDA	1996
98-00164	Togo	A	A	HPR	1994

d: Molekularer Klon (*NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*)

B	pNL4.3	M19921	NL4-3	SI	USA/ Frankreich	n.d. ¹	n.d. ¹
----------	--------	--------	-------	----	--------------------	-------------------	-------------------

¹ n.d.: nicht durchgeführt

² n.b.: nicht bekannt

³ n.e.: Sequenz noch nicht in der HIV-Datenbank eingereicht

m : männlich

w : weiblich

HPR : Hochprävalenzregion

IVDA : intravenös Drogenabhängiger

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit gentechnisch veränderten / infektiösen Organismen

Alle gentechnischen Arbeiten, inklusive der Kultivierung gentechnisch veränderter Zellen sowie der Arbeiten mit infektiösen Materialien (Virusanzucht), wurden in Laboratorien der Sicherheitsstufe S2 und S3 nach den Bestimmungen der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) und des Seuchenschutzgesetzes durchgeführt. Die Klonierungsarbeiten erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen, die Arbeiten mit Zellkulturen und mit infektiösen Materialien wurden an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II (*Laminar-Flow-Box*) durchgeführt.

Um beim Arbeiten mit DNA Kontaminationen mit DNasen zu vermeiden, wurden alle dafür benötigten Lösungen mit autoklaviertem Aqua bidest. hergestellt. Zur Sterilisation der benötigten Substanzen und Geräte und zur Gewährleistung sterilen Arbeitens wurden unterschiedliche Methoden angewendet:

- (1) Glas- und Plastikmaterial, Aqua bidest., Bakterienmedien und Zellkulturmedien wurden nach der Methode der Hochdruckdampfsterilisation (121°C, 1,2 bar, 30 min) sterilisiert.
- (2) Zur Sterilisation nicht autoklavierbarer Puffer und Chemikalien wurden Sterilfilter \varnothing 45 μm (Nalgene, Hamburg) verwendet.
- (3) Für die Sterilisation von Antibiotikallösungen wurden Sterilfilter \varnothing 0,22 μm (Nalgene, Hamburg) verwendet.

Laborkittel und Einweghandschuhe wurden bei sämtlichen Labor-Arbeiten getragen. Feste Abfälle und gebrauchte Glasgefäße wurden in Metalleimern gesammelt und autoklaviert. Alle Flüssigabfälle wurden gesammelt und autoklaviert. Überstände von Bakterienkulturen und Zellkulturüberstände wurden zuvor mit Chloramin T (2,5% finale Konzentration) inaktiviert.

3.2 Virusanzucht

Ziel der Virusanzucht ist die Isolierung und Anreicherung von Viren, indem Zelllinien oder PBMC gesunder Spender mit HIV-infizierten Zellen oder virushaltigen Überständen infiziert werden.

3.2.1 Isolierung von PBMC über Ficoll-Gradienten

Die Gewinnung von PBMC (*mononukleäre Zellen des peripheren Blutes*) erfolgte nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation. Als Lymphozytentrennmedium wurde Ficoll benutzt. Bei der Zentrifugation des Ficollgradienten entstehen vier Phasen: die obere

Plasma-Phase, die darunter liegende opaque weißliche Bande enthält die Lymphozyten und Monozyten, dann folgt das Trennmedium Ficoll, und unterhalb des Ficollkissens sammeln sich Erythrozyten und Granulozyten an.

Für die Virusanzucht wurden große Mengen PBMC gesunder Blutspender aus *buffy coat* isoliert; die Isolierung von PBMC HIV-infizierter Patienten erfolgte aus dem *buffy coat* kleinerer Volumina EDTA-Blut. „Buffy coat“ ist die Bezeichnung für die Zellschicht aus Leukozyten und Thrombozyten, die durch Zentrifugation von EDTA-Blut als mittlere Fraktion zwischen Plasma und Erythrozyten gewonnen wird. Diese Fraktion eignet sich zur Isolierung peripherer Lymphozyten, wie sie für die Anzucht und Anreicherung von HIV benötigt werden. Nach der Isolierung und Zellzählung wurden die PBMC entweder sofort für eine Virusanzucht verwendet oder bei -180°C gelagert (3.13.2.1).

3.2.1.1 Isolierung von PBMC gesunder Blutspender aus *buffy coat*

Die Isolierung der PBMC erfolgte aus dem *buffy coat* HIV-negativer Stammspender, die von der Blutbank des Virchow-Klinikums Berlin zur Verfügung gestellt wurden.

Pro Spender wurde ein Blutbeutel mit ca. 50-80 ml *buffy coat* aufgearbeitet. Dieser wurde nach dem Umgießen in einen Erlenmeyerkolben mit PBS „ohne“ (ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} ; Tab. 1) auf 100 ml aufgefüllt und in 50 ml Falcon-Röhrchen vorsichtig auf 12 ml vorgelegtes Ficoll überschichtet. Der Ficollgradient wurde bei 1600 rpm und Raumtemperatur für 30 min zentrifugiert (Heraeus). Die oberhalb des Ficolls angesammelten PBMC wurden in ein frisches 50 ml Falcon überführt. Zur Entfernung des Ficolls wurden die Zellen mit Puffer PBS „ohne“ (Tab. 1) gewaschen und bei 1600 rpm für 10 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde noch zweimal in jeweils 30 ml Puffer gewaschen und bei 1200 rpm und 1000 rpm für 10 min sedimentiert.

Nach der Resuspension in 20 bis 40 ml Medium (RPMI + 10% FKS + 1% Glutamin; Tab. 3) wurde die Zellzahl im Cell-Counter CASY-1 bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot von 10 μl PBMC in 10 ml CASY-Puffer 1 : 1000 verdünnt. Die Messeinstellung richtete sich nach der Zellgröße von PBMC (6-30 μm). Die Festlegung des Messbereiches für PBMC wurde durch Platzieren des Cursors vor den T-Lymphozyten-Peak (Zählung der T-Lymphozyten und Monozyten) erreicht.

3.2.1.2 Isolierung von PBMC HIV-infizierter Patienten

Die Isolierung der PBMC serokonvertierter HIV-Patienten für die Virusanzucht erfolgte aus frischem peripherem EDTA-Blut (2x10 ml).

Nach der Sedimentation der PBMC wurde das Plasma abgenommen, gepoolt, zu je 500 µl in sterile Eppendorfgefäße überführt und bei -70°C gelagert. Der *buffy coat* wurde mit PBS-Puffer „ohne“ auf 10 ml aufgefüllt. In 15 ml-Falcon-Röhrchen wurden 4 ml vorgelegtes Ficoll vorsichtig mit jeweils 5 ml des Blut/ Puffer-Gemisches überschichtet. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 1600 rpm wurden die PBMC sofort vorsichtig an der Phasengrenze abgesaugt, in ein frisches 15 ml-Falcon überführt, mit „Waschpuffer“ (Tab. 3) auf 15 ml (mindestens 6-faches Volumen) aufgefüllt und gemischt. Durch die anschließende Zentrifugation für 10 min bei 1600 rpm wurden die PBMC erneut sedimentiert und Ficoll-Reste und Puffer wurden entfernt. Waren in diesem gewaschenen Sediment noch viele Erythrozyten vorhanden, erfolgte deren Lyse mit 5 ml Lysispuffer RCLB (Tab. 3) für 15 min bei 4°C und deren Abtrennung bei 1200 rpm für 10 min. Nach zwei weiteren Waschschrinen mit 15 ml Waschpuffer bei 1200 rpm für 10 min wurden die PBMC in 1-3 ml Medium RPMI (Tab. 3) resuspendiert.

Um den Cell-Counter CASY-1 nicht mit infektiösem Material zu kontaminieren, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl HIV-infizierter PBMC mittels Zählkammer. Dazu wurden die Zellen 1:10 in 3%iger Essigsäure verdünnt (Virusinaktivierung) und bei 10-facher Vergrößerung in einer Bürker-Türk-Zählkammer (9 mm²) ausgezählt. Die Zellzahl wurde aus dem Mittelwert von 2-4 ausgezählten Klein-Quadraten (1 mm²) bestimmt.

$$\text{Zellzahl/ ml} = \frac{\text{Mittelwert der Zellzahl der Kleinquadrate}}{\text{Verdünnung (1/10) x Kammerhöhe (1/10)}} \times 1000$$

3.2.2 Anzucht von HIV-Primärisolaten auf Spender-PBMC

Fünf Patienten mit HIV-1 nonB-Infektionen (Isolat ist nicht als Subtyp B klassifiziert) wurden aus der Serokonverterstudie des RKI für eine Virusanzucht ausgewählt (nonB-Serokonverter; Tab. 5). Vor der Aufarbeitung des Patientenblutes wurde ein Teil der Probe (5-10 ml) für die DNA-Extraktion abgefüllt.

Die isolierten Patienten-PBMC (Tab. 5; 3.2.1.2) wurden in gebrauchsfertigem RPMI-Medium (Tab. 3) in 24-*well*-Platten ausgesät und jeweils in Form einer autologen Kultur wie auch als Kokultur mit gesunden Spender-PBMC kultiviert. Diese waren entweder frisch isoliert (3.2.1.1) oder schonend aufgetaut (3.13.2.2) und mit PHA (5 µg/ml; 2-3 Tage) vorstimuliert worden.

Für das Anlegen einer autologen Kultur wurden $3-4 \times 10^6$ Patienten-Zellen pro *well* ausgesät, mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 2 ml/ *well* aufgefüllt und bei 37°C im CO₂-begasten Brutschrank inkubiert.

Für die Kokultivierung wurden 2×10^6 Patienten-Zellen mit 2×10^6 Spender PBMC pro *well* ausgesät, ebenfalls mit Medium auf 2 ml/ *well* aufgefüllt und bei 37°C im CO₂-begasten Brutschrank inkubiert.

Nach jeweils 72-96 h erfolgte ein Mediumwechsel; je nach Zustand der Kulturen wurden frische Spender-PBMC zugesetzt (3.2.4). Der Kulturüberstand wurde mittels p24-Antigen-ELISA auf Anwesenheit von Virus untersucht (3.2.5).

3.2.3 Anzucht des HIV-Isolates O-MVP5180 auf der Zelllinie H9

Die H9-Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 mit 10% FKS (Tab. 3) in kleinen Kulturflaschen (25 cm²) kultiviert, in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei 1200 rpm (Heraeus) sedimentiert. Nachdem der Überstand dekantiert war, wurden die Zellen in 1 ml PBS „ohne“ resuspendiert, auf 15 ml aufgefüllt und nochmals für 10 min bei 1200 rpm (Heraeus) sedimentiert. Nachdem der Virusüberstand aufgetaut war (3.13.2.2), wurde das Zellpellet der H9-Zellen mit 1 ml Virusüberstand resuspendiert. Die Infektion der Zellen mit HIV erfolgte durch die Inkubation des Virus/ Zell-Gemisches für 2 h bei 37°C im CO₂-begasten Brutschrank. Anschließend wurde das Virus/ Zell-Gemisch mit 1 ml gebrauchsfertigem RPMI-Medium in 12-Loch-Platten (12-*well*-Platten) überführt und bei 37°C im CO₂-begasten Brutschrank inkubiert. Nach 72-96 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel oder, nach Teilung der Kultur, ein Zusatz frischer H9-Zellen im Verhältnis 1:1 (3.2.4).

3.2.4 Zellpflege / Mediumwechsel und Verlaufskontrolle der Virusanzucht

Nach jeweils 72-96 h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, wobei 50% des Mediums ausgetauscht wurden. Die Zellen der Kokulturen wurden mit frisch aufgetauten Spender-MNCs nachgefüttert (kokultiviert), um die Viren effizient zu vermehren. Dazu wurden frisch aufgetaute Spenderzellen gewaschen, in RPMI-Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:1

mit den Viruskulturen gemischt. Damit eine konstante Zellzahl von ca. 4×10^6 Zellen/ well erhalten blieb, wurde zuvor jeweils 1 ml Zellsuspension entnommen.

Zur Verlaufskontrolle der Virusanzucht wurde die Vitalität der Zellen anhand morphologischer Kriterien unter dem Mikroskop überprüft, die Virusvermehrung wurde aus den Überständen mittels p24-Antigen-ELISA nachgewiesen. Pro Loch wurden dazu 1000 μ l Überstand entnommen und zu je 500 μ l aus jedem Parallelansatz über Kreuz auf 2 Röhrchen verteilt, so dass jedes Röhrchen letztendlich 1000 μ l Überstand-Gemisch aus den beiden Parallelansätzen enthielt.

Zum Virusnachweis aus Kulturüberstand wurde aus einem der Parallelansätze 110 μ l Überstand in ein frisches Röhrchen überführt, in das zuvor 22 μ l Lysispuffer vorgelegt wurden. Die Probe wurde bis zur Durchführung des p24-Antigen-ELISA bei -20°C gelagert. Der Überstand wurde zu je 500 μ l portioniert und bei -70°C gelagert.

3.2.5 P24 Antigen-Nachweis (ELISA)

Zum Nachweis der Virusproduktion in HIV-infizierten Virusanzuchten wurde der p24-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Coulter). Bis zur Durchführung der Messung wurden die Überstände bei -20°C gelagert.

3.3 DNA-Extraktion aus HIV-infizierten Zellen

Da die LTR von HIV erst vor der Integration in das Wirtsgenom generiert wird, kann sie nicht aus den freien Viruspartikeln im Plasma HIV-infizierter Patienten isoliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb die aus Virusanzuchten erhaltenen HIV-infizierten Zellen für die Extraktion der chromosomalen DNA benutzt. Aus der integrierten proviralen DNA wurde die LTR von HIV-1 mit der PCR-Methode amplifiziert (3.4).

Zur DNA-Extraktion aus Zellen können unterschiedliche Ausgangsmaterialien verwendet werden:

- (1) EDTA-Blut von Patienten wurde in den gelieferten Röhrchen für 10 min bei 3000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Leukozyten werden dabei in einer dünnen Trennschicht zwischen Plasma und *buffy coat* angereichert. Sie wurden vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, gesammelt und zu je 200 μ l auf 4 Eppendorfgefäße verteilt.
- (2) Zellsuspensionen aus Virusanzucht enthalten ca. 5×10^6 Zellen in 1 ml Freeze-Mix. Um das DMSO zu entfernen, wurden die Zellen schonend aufgetaut, in 10 ml Waschpuffer (Tab. 3) gewaschen, bei 1200 rpm für 10 min sedimentiert und in 200 μ l PBS resuspendiert.

(3) Zellen, die als Pellet ohne Freeze-Mix eingefroren waren, wurden direkt in 200 µl PBS resuspendiert.

Die DNA wurde aus jeweils 200 µl Zellsuspension nach dem Protokoll „Blood and Body Fluid Spin Protocol“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers extrahiert.

3.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung einer definierten DNA-Sequenz aus einem Gemisch von DNA-Molekülen. Das Prinzip der Methode basiert auf einer zyklischen, enzymatischen DNA-Amplifikation (Mullis und Faloona, 1987). Durch Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase, Combi-Polymerase) können alle Reaktionsschritte im gleichen Reaktionsansatz und daher als automatisiertes Verfahren durchgeführt werden.

Das Zielsegment der Matrizen-DNA wird so gewählt, dass es von gen-spezifischen Oligosequenzen flankiert ist. Komplementär dazu werden spezifische Oligonukleotide (*Primer*) synthetisiert, die der Polymerase als Startpunkt für die DNA-Synthese dienen. PCR-Primer sind so gewählt, dass sie strang-spezifisch an jeweils einen der beiden DNA-Stränge hybridisieren. Als Substrat für die DNA-Polymerasen werden dem Reaktionsansatz dNTP (2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate) im Überschuss zugegeben. Im ersten Reaktionszyklus wird die DNA durch Hitzebehandlung in Einzelstränge getrennt (*Denaturierung* bei 94°C). Anschließend wird die Temperatur so weit gesenkt, dass die beiden Primer mit ihrer jeweiligen Zielsequenz spezifisch hybridisieren können (*Annealing* bei 40–60°C). Dieser doppelsträngige Bereich dient als Startpunkt für die DNA-Polymerase, die durch Ausbildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe des neu synthetisierten DNA-Stranges und einer 5'-Phosphatgruppe eines dNTPs die wachsenden DNA-Einzelstränge komplementär zum Matrizenstrang verlängert (*Elongation* bei 72°C). Als Reaktionsprodukt erhält man zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle. Über den Primerbereich hinausragende Elongationsprodukte können nur im ersten Reaktionszyklus, also von den Originalmatrizen erzeugt werden. Nach dem ersten Reaktionszyklus entstehen nur noch neu synthetisierte DNA-Kopien, die mit der Primersequenz enden. Die Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte (Denaturierung - Hybridisierung der Primer - Elongation) führt bei jedem Reaktionszyklus zu einer Verdopplung der vorhandenen DNA-Moleküle. Bei dieser Kettenreaktion kommt es zur exponentiellen, selektiven und im Verlauf von ca. 30 Zyklen zu einer 10⁶- bis 10⁷-fachen Anreicherung der Zielsequenz.

3.4.1 Einführung von Restriktionsschnittstellen mittels PCR

Da die PCR-Primer im PCR-Produkt eingebaut sind, können durch die Wahl geeigneter Primer definierte Mutationen in die Endbereiche der amplifizierten DNA-Region eingeführt werden. Wichtig dabei ist, dass die letzten 8-10 Basen des 3'-Bereiches der Primer exakt komplementär zum DNA-Matrizen-Strang sind, da dieser Bereich kritisch für die stabile Hybridisierung des Primers und für die Initiation der DNA-Synthese ist. Über den 5'-Bereich des Primers dagegen können Mutationen eingeführt werden. Dies können Punktmutationen oder auch Deletionen/ Insertionen mehrerer Nukleotide sein. Auf diese Weise können in das PCR-Produkt Restriktionsschnittstellen für eine anschließende Klonierung eingeführt werden.

3.4.2 Amplifikation der LTR von HIV-1

Der Sequenzbereich zur Etablierung einer LTR-PCR wurde so gewählt, dass alle *cis*-aktiven Elemente der HIV-LTR amplifiziert und Restriktionsschnittstellen für die anschließende Klonierung in den Luziferase-Reportervektor pGL3-Basic eingeführt wurden. Da vergleichbare LTR-Amplifikate der Gruppe M, N und O erzeugt werden sollten, wurden die PCR-Primer in konservierten Sequenzbereichen der Gruppe M, N und O lokalisiert (Tab. 6).

Das Primerdesign erfolgte anhand eines Sequenzalignments (Abb. 8), bestehend aus Sequenzen der Regionen *nef*-3'LTR und 5'LTR-*gag* von Isolaten des Referenzpanels der HIV-Datenbank Los Alamos, Release 1997 (<http://hiv-web.lanl.gov>). Mit der äußeren Runde der *semi-nested* PCR konnte ein spezifisches 5'LTR- bzw. ein 3'LTR-Produkt amplifiziert werden (Abb. 9). Für die Amplifikation der LTR der Gruppe O wurden spezifische Primer ausgewählt (Tab. 6). Bei den hier verwendeten PCR-Primern handelt es sich somit um *sense*- und *antisense* Mutagenese-Primer zur gruppen- und subtyp-generischen Amplifikation der LTR von Gruppe M und N und zur spezifischen Amplifikation der Gruppe O LTR von HIV-1 (Tab. 6 und Abb. 8). Über die 5'-Enden der Primer wurden Restriktionsschnittstellen für *Xho*I und *Mlu*I eingeführt, um die anschließende Klonierung in den Vector pGL3-Basic (Promega) zu ermöglichen (Tab. 6 und Abb. 9).

Die Etablierung der 5'LTR-PCR erfolgte anhand der Zelllinie ACH-2, die pro Zelle ein provirales Genom des HIV-Isolates BRU (Subtyp B) enthält. Diese Zelllinie wurde in PBMC verdünnt und in einer Verdünnung von 5×10^2 Genomäquivalenten pro 500 ng Gesamt-DNA in die PCR eingesetzt (Schweiger *et al.*, 1996).

Die Etablierung der 3'LTR erfolgte anhand des Plasmides pNL4.3 (*NIH AIDS Research and Reference Program*), verdünnt in humaner Plazenta-DNA. Pro PCR wurden 5×10^2 Genomäquivalente des Plasmides in 500 ng Gesamt-DNA eingesetzt.

Tab. 6: PCR-Primer zur subtyp- und gruppen-generischen Amplifikation der LTR von HIV-1.

Name	Locus ^{1; 2}	Sequenz 5'- 3' ³
<i>Mlul</i>_13s	9010-9035 ¹ (<i>nef</i>)	GCA <u>CGC GTT</u> CAG GTA CCT TTA AGA CCA ATG AC
<i>XhoI</i>_627as	522-541 ¹ (5'LTR) 9608-9627 ¹ (3'LTR)	<u>TCT CGA GAA</u> GGC AAG CTT TAT TGA GGC
<i>Mlul</i>_172s	86-108 ¹ (5'LTR) 9172-9193 ¹ (3'LTR)	TAA <u>CGC GTG</u> AAC TAC ACA CCA GGG CCA GGG
<i>XhoI</i>_733as	629-647 ¹ (5'LTR)	<u>TCT CGA GGT</u> TCG GGC GCC ACT GCT AG
O-<i>Mlul</i>_13s	9125-9144 ² (<i>nef</i>)	GCA <u>CGC GTT</u> CAA GTG CCT CTA AGG CCA ATG AC
O-<i>XhoI</i>_627as	530-549 ² (5'LTR) 9725-9744 ² (3'LTR)	<u>TCT CGA GAA</u> GGC AAG CTT TAT TGA GCG
O-<i>Mlul</i>_172s	86-108 ² (5'LTR) 9281-9303 ² (3'LTR)	TAA <u>CGC GTA</u> GTG TTA CAC ACC GGG ACC AGG A

¹ Koordinaten bezüglich Isolat HXB2R (Accession K03455) aus der HIV-Datenbank (<http://hiv-web.lanl.gov>).

² Koordinaten bezüglich Isolat O-MVP5180 (Accession L20571) aus der HIV-Datenbank.

³ die eingefügten Restriktionsschnittstellen *XhoI/ Mlul* sind unterstrichen und kursiv dargestellt.

Tab. 7: Zusammensetzung einer Standard-PCR.

Reagenz	DNA / Ansatz	Konzentration (Stock)	Konzentration (final)	μ l/ Ansatz
Primer <i>sense</i>		25 μ M	0,25 μ M	0,5
Primer <i>antisense</i>		25 μ M	0,25 μ M	0,5
Puffer III		10 x	1 x	5
dNTPs		2,5 mM	0,2 mM	4
MgCl ₂		50 mM	2,5 mM	2,5
Optimizer		5 x	1 x	10
Combi-Pol.		5 U/ μ l	2,5 U	0,5
DNA	500 ng		5,0 ng/ μ l	
H ₂ O				7,0
Master-Mix				30 μl
DNA + H₂O				20 μl
Volumen				50 μl

Standard-Protokoll für die Amplifikation der LTR im Thermozykler:

Denaturierung	:	94°C →	5'	x 30
Denaturierung	:	94°C →	1'	
Annealing	:	55°C →	1'	
Elongation	:	72°C →	1'	
Ende der Reaktion und Lagerung	:	4°C →	∞	

Die PCR-Ansätze wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um Verdampfungen zu verhindern. Die PCR-Reaktionen wurden in Thermozyklern der Firma Perkin Elmer (Weiterstadt) durchgeführt, die verwendeten Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) und Metabion (Berlin) bezogen.

Nach der PCR wurden die amplifizierten Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert (3.5).

3.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Elektrophorese ist ein Trennverfahren, bei dem die größenabhängige Wanderung geladener Moleküle durch eine Matrix in einem elektrischen Feld ausgenutzt wird. Das Verfahren wird sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt. Als Gelmatrix wurde die elektrisch neutrale Agarose (Sigma) verwendet.

Das Prinzip der Methode beruht auf den chemischen Eigenschaften von Nukleinsäuren, die aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates bei physiologischen pH-Werten negativ geladen sind. Sie wandern daher im elektrischen Feld in einer Matrix zur positiv geladenen Kathode, wobei das Molekül umso langsamer wandert, je größer es ist. Unter den Standardbedingungen einer Gelelektrophorese (pH~8,0) können Gemische von Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe oder ihrer Konformation aufgetrennt oder von Verunreinigungen abgetrennt werden.

Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{6}$ Vol. 6 x Probenpuffer (25% Ficoll 400, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenylnanol, 10 x TAE) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5-10 V/cm Elektrodenabstand in horizontalen Gelelektrophoresekammern (Gibco BRL), in 1 x TAE Laufpuffer, mit dem auch die Agarosegele angesetzt wurden (je nach DNA-Fragmentgröße 0,8-2% Agarose). Dem Agarosegel wurde Ethidiumbromid (EtBr), eine DNA-interkalierende Substanz zugesetzt (0,25 µg/ml). Deren fluoreszierende Eigenschaften ermöglichen den Nachweis der DNA-Fragmente durch UV-Bestrahlung (254 nm-300 nm) auf einem Transluminator (Herolab). Die Dokumentation erfolgt über eine Videokamera in Verbindung mit einer Auswertungssoftware (Herolab).

3.6 Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren

3.6.1 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung ist ein Verfahren zur Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen. Dabei kommt es in Gegenwart relativ hoher Kationenkonzentrationen (0,5-2 M) zur Aggregation der Nukleinsäuremoleküle und damit zur Präzipitation, während niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze weitgehend in Lösung bleiben.

Jede Probe wurde mit 10 x STE-Puffer (1/10 Vol.), NH₄-Acetat 4 M (1 Vol.) und Ethanol (abs., 2,5 Vol.) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert, um die DNA zu präzipitieren. Nach der Zentrifugation (14000 rpm, 4°C, 15 min) wurde das Pellet mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen (14000 rpm, 4°C), 5 min unter Vakuum getrocknet und in einem geeigneten Volumen Puffer 1 x TE aufgenommen.

3.6.2 Reinigung von PCR-Produkten

Nach der PCR werden die Amplifikate nach dem Protokoll *QIAquick PCR Purification Kit* gereinigt, um Primer, überschüssige Nukleotide, Polymerasen und Salze zu entfernen. Dieses Protokoll eignet sich ebenfalls zur Entfernung abgespaltener Nukleotide nach einer DNA-Restriktionsanalyse.

3.6.3 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gel

Diese Methode wird generell angewandt, um definierte DNA-Fragmente aus einem Gemisch verschiedener Fragmente zu isolieren und aufzureinigen. Damit eignet sich die Methode zur Isolierung von PCR-Fragmenten aus einem Gemisch von Artefakten und zur Aufreinigung von Vektor-DNA nach einem Restriktionsverdau.

Zunächst wurde die DNA im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (3.5). Danach wurde das gewünschte Fragment unter UV-Bestrahlung (Wellenlänge 366nm) mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Bei diesem Schritt wurde darauf geachtet, dass die DNA dem UV-Licht so kurz wie möglich ausgesetzt wird, um Mutationen durch ionisierende Strahlung zu vermeiden.

Nachdem die Masse des Gelblöckchens auf einer Laborwaage bestimmt war, erfolgte die weitere Reinigung der DNA nach dem Protokoll *Gel-Extraction Purification Kit* nach Angaben des Herstellers.

Pro 100 mg Gel-Masse wurden 300 µl Puffer P1 zugegeben. Durch eine Inkubationszeit von 20-30 min bei 52°C im Wasserbad wurde die Agarose aufgelöst. Von dieser Agarose-DNA-Lösung wurden bis zu 700 µl auf eine Jetquick-Säule (Genomed) überführt und für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge). Anschließend wurde die an die Säule gebundene DNA zweimal mit 700 µl Puffer gewaschen (2 min, 14.000 rpm) und mit 50 µl sterilem, auf 65°C erwärmtem Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0) von der Säule eluiert (2 min, 14000 rpm) und bei 4°C gelagert.

3.7 Quantifizierung von DNA

3.7.1 Mittels quantitativer Agarose-Gelelektrophorese

Zur Quantifizierung von kleinen DNA-Fragmenten wurde der Molekulargewichts-Standard *Low Mass DNA Ladder* auf einem Agarose-Gel (1% od. 1,5% w/v + EtBr) elektrophoretisch aufgetrennt. Dieser Marker besteht aus einer äquimolaren Mischung sechs definierter DNA-

Fragmente. Durch den Vergleich der Proben-DNA mit einer bekannten Menge der Marker-DNA (400 ng pro Gelspur) wurde die DNA-Menge einzelner Banden unter dem UV-Licht abgeschätzt oder mit Hilfe der Auswertungssoftware (Herolab) bestimmt.

3.7.2 Mittels photometrischer Bestimmung

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der Spektralcharakteristika der Basen ultraviolettes Licht in einem Wellenlängenbereich von 250 nm bis 270 nm und zeigen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Zur DNA-Quantifizierung wird eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) durchgeführt. Dabei entspricht ein Absorptionswert von 1 bei 1 cm Schichtdicke einer Konzentration von ca. 50 µg doppelsträngiger DNA. Misst man die Absorption der DNA-Probe zusätzlich bei 280 nm (A_{280}), so gibt der Quotient der gemessenen Absorptionskoeffizienten ($A_{260/280}$) Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäure-Präparation, da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt. Bei sehr reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient zwischen 1,8 und 1,95. Niedrigere Werte sind ein Indiz für die Anwesenheit von Proteinen oder Verunreinigungen mit Phenol. Werte, die über 2,0 liegen, können ein Hinweis auf denaturierte DNA sein.

3.8 Restriktionsanalyse von DNA

Als Restriktion bezeichnet man die *in vitro*-Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, eine Klasse bakterieller Enzyme, die Phosphodiester-Bindungen in doppelsträngigen DNA-Molekülen innerhalb spezifischer Basensequenzen spalten.

Die Restriktionsanalyse von PCR-Produkten und von Plasmid-DNA wurde nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas) durchgeführt. Zur Analyse der Restriktion wurden die geschnittenen DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (3.5).

Tab. 8: Restriktion gereinigter LTR PCR-Produkte.

Ansatz: 60 µl	1x
Puffer 10x (rot)	6 µl
<i>Mlu</i> I (10 U/µl)	2 µl
<i>Xho</i> I (10 U/µl)	2 µl
DNA (5-25 ng)	45 µl
H ₂ O bidest	5 µl
→ Inkubation für 2 h bei 37°C im Wasserbad	
→ Inaktivierung der Enzyme für 10 min bei 65 °C im Wasserbad	

3.9 Klonierung von PCR-Produkten

Bei der Klonierung handelt es sich um gentechnische Experimente, bei denen spezifische Gensequenzen mit einem Klonierungsvektor *in vitro* kovalent verknüpft werden (*Ligation*), um diese rekombinante DNA anschließend zur Vermehrung in geeignete Bakterienzellen zu transformieren (3.9.2). Sowohl der Vektor als auch das gewünschte DNA-Fragment werden dazu mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Der Klonierungsvektor wird dabei linearisiert und verliert zunächst seine biologische Aktivität. Durch die Insertion der Fremd-DNA entsteht jedoch wieder ein zirkuläres Molekül, das in geeigneten Wirtsorganismen, meist *E. coli*-Bakterien, die Fähigkeit zur eigenständigen DNA-Replikation hat, da der Klonierungsvektor einen funktionalen Replikationsursprung (*origin of replication*) besitzt.

Die zur Herstellung der Konstrukte LTR/ pGL3-Basic verwendeten Restriktionsschnittstellen *MluI* und *XhoI* waren in der *multiple cloning site* des Expressionsvektors pGL3-Basic vorhanden, in die LTR-PCR-Fragmente wurden sie über PCR-Primer eingefügt (3.4.1). Nachdem sowohl die PCR-Fragmente als auch der Vektor pGL3-Basic mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *XhoI* geschnitten waren, erfolgte die Aufreinigung der PCR-Fragmente (3.6.2). Der Vektor pGL3-Basic wurde zur Abtrennung des *MluI* / *XhoI*-Fragments aus einem Agarose-Gel präpariert (3.6.3). Anschließend wurden die 462 bp LTR-Fragmente entsprechend dem T4-Ligationsprotokoll nach Angaben des Herstellers in den 4806 bp Vektor pGL3-Basic ligiert. Für die Ligation sollte die Konzentration freier Enden möglichst hoch sein, wobei sich das molare Verhältnis von Vektor:PCR-Fragment mit 1:3 bis 1:5 bewährte.

Die Vermehrung der LTR/ pGL3-Konstrukte erfolgte mittels Transformation in *E. coli* nach dem Z-Kompetent-Standard-Protokoll (3.9.2).

Tab. 9: Standard-Protokoll für die Ligation der LTR-PCR-Produkte in den Vektor pGL3-Basic.

Ansatz 10 µl	1x
T4 Ligase (4 U/µl)	1 µl
T4 Ligationspuffer 10x	1 µl
linearisierter Vektor (<i>MluI</i> / <i>XhoI</i>)	10 ng
PCR-Fragment (<i>MluI</i> / <i>XhoI</i>)	2-3 ng
H ₂ O bidest	ad 10 µl
→ Inkubation für 4 h bei 37°C im Wasserbad	

3.9.1 Herstellung Z-kompetenter Bakterien

Für die Transformation der LTR/ pGL3-Konstrukte wurde der *E. coli*-Stamm XL1-blue benutzt. Kompetente Bakterien wurden nach dem Standard-Protokoll *Z-Competent E. coli Transformation Kit*TM hergestellt.

Dazu wurde eine Glycerin-Stock-Kultur ausgestrichen und für 8-12 h bei 37°C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde in 3 ml LB-Medium angeimpft und als Übernachtskultur bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 0,5 ml in 50 ml SOB-Medium überimpft (1:100) und bei 20 bis 25°C und 200 rpm so lange auf dem Schüttler inkubiert, bis der Messwert der Optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm 0.2 bis 0.3 OD betrug. Die Bakteriensuspension wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und bei 2500 g sedimentiert (GSA-Rotor, 4.000 rpm, 4°C, 5 min). Das Pellet wurde in 5 ml eisgekühltem Waschpuffer (1x) resuspendiert und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nachdem der Überstand vollständig entfernt worden war, wurde das Pellet in 5 ml eisgekühltem 1 x Competent Puffer resuspendiert, in Aliquots von je 100 µl portioniert, in flüssigem Stickstoff (-180°C) schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.9.2 Transformation von Plasmid-DNA in Z-kompetente Bakterien

Die Transformationen in *E. coli* XL1-blue wurden nach dem Standard-Protokoll *Z-Competent E. coli Transformation Kit*TM durchgeführt. Die verwendeten Plasmide wurden aus dem Vektor pGL3-Basic hergestellt und tragen somit das für die β-Lactamase kodierende Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion der transformierten Klone.

Die Z-kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Je 100 µl der Bakterien wurden mit 1 µl eines Ligationsansatzes versetzt, vorsichtig gemischt und für 40-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10 µl und 90 µl dieser Bakteriensuspension auf vorbereitete Agarplatten (LB-Medium mit Ampicillin, Endkonzentration 100 µg/ml) ausplattiert und für 12 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Positive Kolonien wurden mittels Ampicillin-Resistenz selektioniert.

Nach dieser Methode wurde auch der Test auf Transformationseffizienz kompetenter Bakterien durchgeführt. Dazu wurden 100 µl kompetente Bakterien mit 1 µl Test-Plasmid (pEMBL, 2 ng/µl) versetzt. Anhand der ausgezählten Kolonien und unter Berücksichtigung des ausplattierten Suspensionsvolumens ließ sich die Transformationseffizienz der kompetenten Bakterien, d.h die Anzahl transformierter Zellen für 1 µg Plasmid-DNA berechnen:

Transformationseffizienz bezogen auf 10 µl ausplattierte Bakteriensuspension:

$$\text{Transformanten / } \mu\text{g Plasmid-DNA} = \text{Anzahl d. Kolonien/ Platte} \times 5 \times 100 \times 10$$

3.10 Präparation von Plasmid-DNA

Sämtliche Präparations-Verfahren liefern hochreine Plasmid-DNA, die sich für Restriktionsanalysen, Sequenzierungen und Klonierungen eignet. Im Anschluss an die verschiedenen Präparationen wurde die Plasmid-DNA sowohl durch Gel-Elektrophorese als auch durch Restriktion mit geeigneten Restriktionsenzymen analysiert (3.5 und 3.8).

3.10.1 Minipräparation nach *QIAwell Plasmid Purification Protocol*

Das Prinzip der Methode beruht auf der alkalischen Lyse von Bakterien (Birnboim und Doly, 1979) und anschließender selektiver Renaturierung von Plasmid-DNA. Dieses Protokoll eignet sich für die schnelle Präparation einer größeren Probenanzahl.

Je 3 ml Kultur (LB-Medium + Ampicillin, Endkonzentration 100 µg/ml) wurden für 14-16 h auf dem Schüttler inkubiert (200 rpm, 37°C), anschließend wurden je 1,5 ml für 5 min bei 5500 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Qiagen).

Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug 50-100 µg/ml Eluat. Das Präparationsverfahren lieferte 2,5 bis 5 µg hochgereinigte Plasmid-DNA pro 1,5 ml ÜN-Kultur.

3.10.2 Präparation nach *Nucleospin Plasmid Standard Protocol*

Bei einer geringen Anzahl zu analysierender Bakterienklone wurde die Plasmidpräparation nach dem Protokoll *Isolation of Plasmid DNA from E. coli* nach den Angaben des Herstellers (Machery Nagel) durchgeführt.

Die Ausbeute aus je 1,5 ml Kultur (LB-Medium + Ampicillin, Endkonzentration 100 µg/ml) betrug 50 bis 100 µg Plasmid-DNA /ml Eluat, also 2,5 bis 5 µg insgesamt.

3.10.3 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Der *Maxi Plasmid-Purification-Kit* (Qiagen) beruht ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und ist für größere Mengen Plasmid-DNA etabliert.

Eine frische Kolonie einer Selektionsplatte wurde in 2 ml LB-Medium (Amp. 100 µg/ml) überführt und für 6-8 h auf dem Schüttler bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde 1:1000 in 200 ml LB-Medium (Amp. 100 µg/ml) in 1 Liter-Erlenmeyerkolben überführt und für 12 h inkubiert (200 rpm, 37°C). Die Bakterienkultur wurde pelletiert (Rotor GSA, 5000 x g, 15 min), die Plasmid-DNA wurde nach Angaben des Herstellers präpariert.

Anschließend wurde die DNA mit 10 ml Ethanol (70%) gewaschen, in 500 µl TE 1x aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug 0,5-1,0 mg/ml Eluat, d.h. 250-500 µg insgesamt.

3.10.4 Endofree Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Transfektion der LTR/ pGL3-Plasmide in eukaryote Zellen musste endotoxinfreie DNA verwendet werden, um die Transfektionseffizienz zu verbessern. Endotoxine, auch bekannt als Liposaccharide, sind Membrankomponenten Gram-negativer Bakterien (z.B. *E. coli*). Bei der Bakterienlyse, die der Plasmidpräparation vorausgeht, gelangen die Endotoxinmoleküle aus der äußeren Membran in das Lysat. Durch ihre hydrophoben, hydrophilen und geladenen Molekülanteile können sie Wechselwirkungen mit Membranmolekülen der für die Transfektionsassays verwendeten Zellen eingehen, was die Transfektionseffizienz erheblich reduzieren kann.

Die Präparation endotoxinfreier Plasmid-DNA erfolgte mit dem *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus einer frischen Bakterienkolonie.

Die Ausbeute betrug 250-500 µg Plasmid-DNA.

3.11 DNA-Sequenzierung (*BigDye Cycle Sequencing-Kit*)

Die DNA-Sequenzierung ist ein Verfahren zur Bestimmung der Basenabfolge in einem DNA-Molekül. Die Sequenzanalysen wurden nach dem Protokoll *ABI PRISM™ AmpliTaq® FS BigDye Terminator* nach Angaben des Herstellers (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Protokoll basiert auf der Methode des *Enzymatischen Dideoxy-Kettenabbruch-Verfahrens* nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977), bei der von einer DNA-Sequenz mit Hilfe einer DNA-Polymerase verschieden lange Kopien hergestellt werden. Dazu muss die DNA als Einzelstrang vorliegen, damit an das 3'-Ende des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes ein

sequenz-spezifisches Oligonukleotid als Primer/ Startmolekül hybridisieren kann. Ausgehend von diesem kurzen Doppelstrang-Bereich beginnt die Polymerase mit der DNA-Synthese. Als Substrat werden die vier verschiedenen 2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate (dNTP) eingesetzt. Zusätzlich werden pro Ansatz vier verschiedene Dideoxynukleotide (ddNTP) zugesetzt, an deren Base jeweils ein spezifischer Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Diese ddNTP werden ebenfalls von der DNA-Polymerase als Substrat erkannt und in den neu-synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Der Einbau führt jedoch zum Kettenabbruch, da den ddNTP die für die Kettenverlängerung benötigte 3'-Hydroxylgruppe fehlt. Auf diese Weise entsteht in jedem Ansatz eine Population von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten, die sich in ihrer Länge um ein Nukleotid unterscheiden und jeweils mit einem der vier basen-spezifischen, fluoreszenzmarkierten ddNTPs enden.

Für die Sequenzreaktion wurde doppelsträngige DNA (30-100 ng PCR-Produkt oder 300-500 ng Plasmid-DNA) mit 4 µl Sequenzierungsmix (enthält Taq-Polymerase, dNTP, ddNTP und Puffer) und einem Primer (3,2 pmol) zu einem Endvolumen von 20 µl versetzt. Die Sequenzreaktion erfolgt in Form einer zyklischen PCR und liefert Einzelstrang-abschriften, die durch die fluoreszenzmarkierten ddNTP terminiert sind (*cycle sequencing*).

Nach der Sequenzreaktion wurden nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte dNTP, ddNTP und Primer durch eine Ethanol-fällung abgetrennt (3.6.1). Dazu wurde der Sequenzansatz mit einem Mix aus 2,0 µl Natriumacetat (3 M, pH 4,6), und 50 µl Ethanol abs. versetzt, das Präzipitat wurde durch Zentrifugation pelletiert. Das getrocknete Pellet wurde bis zum Auftragen auf das Sequenzgel bei -20°C gelagert.

Tab. 10: Zusammensetzung eines Sequenzansatzes nach dem Protokoll *ABI PRISM™ AmpliTaq® FS BigDye Terminator Cycle Sequencing-Kit*.

Ansatz 20 µl	1x
Premix (Ready-Reaktion-Mix)	8 µl
Primer (<i>sense</i> <u>oder</u> <i>antisense</i> , 3,2 pmol)	1 µl
PCR-Produkt	30-100 ng
Plasmid-DNA	300-500 ng
H ₂ O bidest	ad 20 µl

Standard-Protokoll für die Sequenzreaktion im Thermozykler:

Denaturierung	: 96°C →	2'	x 25
Denaturierung	: 96°C →	10''	
Annealing	: 55°C →	5''	
Elongation	: 60°C →	4'	
Ende der Reaktion und Lagerung	: 4°C →	∞	

3.11.1 Vorbereitung und Auftragen der Proben

Die gereinigte DNA wurde in 4 µl einer Mischung aus Formamid und 50 mM EDTA, pH 8,0 (1:6) für 2 min bei 90°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt, um eine Renaturierung zu vermeiden. Durch diesen Schritt wurden die DNA-Doppelstränge voneinander getrennt und eventuelle Sekundärstrukturen aufgelöst. Die abgekühlten Proben wurden auf einem hochauflösenden, denaturierenden 5%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel mit Hilfe des Plattengerätes 377 (Applied Biosystems, ABI; Weiterstadt) in einer Laufzeit von 14 h bei einer Spannung von 30 Watt elektrophoretisch aufgetrennt (2000 V). Der im Gerät integrierte Fluoreszenzdetektor scannt die DNA-Banden mit einem Laser und registriert den Fluoreszenzfarbstoff des dadurch angeregten jeweils terminierenden ddNTP. Durch die unterschiedliche Emission der vier Fluoreszenzfarbstoffe entsteht ein Muster aus Fluoreszenzsignalen, die von einer Software (ABI) in elektrische Signale umgerechnet und ausgewertet werden. Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programms *Sequence Analysis* (ABI) überprüft.

3.11.2 Sequenzierung der LTR-PCR-Produkte und der LTR/ pGL3-Konstrukte

Zur Ermittlung der Direktsequenz der LTR von HIV-1 wurden die LTR-PCR-Produkte mit den PCR-Primern 172s und 627as (Tab. 6) nach dem Protokoll *BigDye Terminator Sequencing-Kit* nach Angaben des Herstellers auf einem automatischen Sequencer sequenziert (2.4). Zur Identifizierung der klonalen Sequenz der LTR/ LpGL3-Konstrukte wurden pro HIV-Isolat 4-10 Klone sequenziert. Jeder Klon wurde in *sense* Orientierung mit dem für pGL3-Basic spezifischen Primer RV3 und in *antisense* Orientierung mit dem Primer GL2 sequenziert (Tab. 11). Die LTR-Sequenz wurde mit Hilfe der Software *Sequence Analysis* analysiert, die Konsensus-Sequenz der LTR jedes Isolates wurde mit der Software *Autoassembler* (ABI) ermittelt.

Tab. 11: Sequenzierungs-Primer für die Selektion positiver Klone LTR/ pGL3-Basic.

Name	Locus ¹	Sequenz 5'- 3'
RV3_s	4760-4779	CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC
GL2_as	111-89	CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA

¹ Koordinaten bezüglich Expressionsvektor pGL3-Basic

3.12 Phylogenetische Analysen

Die Phylogenie (Stammesgeschichte) beruht auf der Annahme, dass alle Lebewesen einen gemeinsamen Ursprung haben. In phylogenetischen Analysen wird die Veränderung der Arten im Laufe der Generationen und die Verwandtschaft von Organismen untersucht.

Da jede Base einer Nukleotidsequenz als einzelnes unabhängiges Merkmal betrachtet werden kann, liefern molekulargenetische Sequenzdaten im Vergleich z.B. zu morphologischen Daten einen enormen Merkmalsumfang; phylogenetische Studien anhand von Nukleotidsequenzen ermöglichen daher eine sehr feine Auflösung von Verwandtschaftsverhältnissen. Die Verwendung molekularer Sequenzen für Stammbaumanalysen basiert dabei auf der Annahme, dass Veränderungen in der DNA-Sequenz zufällig und zeitabhängig auftreten und ein Teil davon in den Molekülen dauerhaft erhalten bleibt. Die Akkumulation von Mutationen ist in einzelnen Genomabschnitten jedoch sehr unterschiedlich. Genomabschnitte mit hoher Mutationsrate eignen sich zur Analyse relativ junger Mutationsereignisse, während sich Genomabschnitte mit langsamer Mutationsrate zur Analyse weit zurückliegender Ereignisse heranziehen lassen. Für Stammbaumanalysen eignen sich generell Genomabschnitte, die wichtige Funktionen für den Organismus ausüben, in der Regel proteinkodierende Regionen.

3.12.1 Neighbor-Joining-Analyse der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O

Zur genetischen Klassifikation von HIV-1 werden phylogenetische Analysen häufig anhand der Nukleotidsequenz der *gag*-Region, der *pol*-Region oder der hypervariablen *env*-Region durchgeführt. Für die Subtypisierung von Isolaten der Gruppe M von HIV-1 eignet sich neben diesen Strukturgenen auch die regulatorische LTR-Promotor-Region (Carr *et al.*, 1998; Naghavi *et al.*, 1999; de Baar *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde die genetische Klassifikation neuer HIV-1-Isolate anhand der LTR-Promotorregion mittels phylogenetischer Analysen der LTR im Vergleich mit der *env*-Region von Referenzviren durchgeführt (Tab. 14). Dazu wurden die Nukleotid-Sequenzen der LTR von 30 HIV-1-Isolaten der Gruppe M, N und O (Tab. 5) anhand eines multiplen Sequenzalignments, mit repräsentativen LTR-Sequenzen des Subtypenpanels der Los Alamos Datenbank, Release 2000 (Tab. 4) verglichen (Abb. 10; Abb. 11). Das mit dem Programm *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) erstellte Sequenzalignment, bei dem homologe Merkmale der in Zeilen aufgeführten Sequenzen in Spalten (Positionen) untereinander stehen, bildete die Grundlage der Stammbaumanalysen.

Das Alignment wurde mit Hilfe des Alignment Editors *SE-AL* manuell nacheditiert (A. Rambaut, <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/projects/BBSRC-Nautilus/SoftwarePages/SeAl.html>). Die Edition erfolgte unter Berücksichtigung der mit dem Programm *MatInspector* (www.genomatix.de) und anhand publizierter Daten identifizierten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Für die weiteren Schritte der phylogenetischen Analyse wurde das Softwarepaket *PHYLIP* (*Phylogeny Inference Package*) Version 3.573c verwendet (J. Felsenstein, 1992 und 1993). Als phylogenetische Methode wurde das distanzbasierte *Neighbor-Joining*-Verfahren gewählt. Dabei wird die Distanz aller Positionen im Alignment jeweils zwischen zwei Sequenzen, also paarweise, verglichen. Aus der daraus ermittelten Matrix werden die evolutionären Distanzen für die Konstruktion eines Stammbaumes errechnet. Die Distanzmatrix wurde nach dem *Kimura-2-Parameter-Algorithmus* mit einer gewichteten Transitions-/ Transversionshäufigkeit von 2.0 erstellt (Kimura, 1980). Die Topologie der Baumstruktur wurde anschließend mit dem Programm *Treeview* (*Treeview* Version 0.95, Roderic D. M. Page) dargestellt.

Bei der Berechnung und Darstellung werden binäre Bäume, d.h. azyklisch verbundene Graphen aus Knoten und Kanten erzeugt. Die Knoten stellen die Verzweigungspunkte der Artbildung mit einem gemeinsamen Vorfahren und zwei Nachfolgern dar, die Kanten sind die Äste im Baum, die zu den untersuchten Spezies (*Monophyla*), hier vertreten durch die untersuchten Sequenzen, führen. Die Berechnung der Verzweigungsstruktur im *Neighbor-Joining*-Verfahren erfolgte unter Verwendung einer Außengruppe. Als Außengruppe wird eine Sequenz gewählt, die homolog zu den untersuchten Sequenzen ist (*dot-plot*) und zudem einen gemeinsamen Vorfahren mit diesen Sequenzen hat. Durch die Verwendung der Außengruppe erhält der Baum eine Wurzel (*root*), die durch den ersten Knoten in der Baumstruktur repräsentiert wird. Von dieser Wurzel zweigen alle zu klassifizierenden Sequenzen ab. Jeder interne Knoten stellt einen weiteren Verzweigungspunkt zwischen einer Sequenz und zwei davon abstammenden Sequenzen im Baum dar. In gewurzelten Bäumen (mit Außengruppe) ist die Astlänge ein Maß für die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den Spezies. In Sequenzanalysen ist dieses Maß als Prozentsatz an Mutationen

pro Position im Alignment definiert. Je kürzer die Äste, die von einem Knoten ausgehen, desto näher verwandt sind die beiden von diesem Knoten ausgehenden Sequenzen. Ungewurzelte Bäume stellen nur die relativen Beziehungen der untersuchten *Monophyla* dar. Um die Signifikanz der Verzweigungspunkte und damit die Stabilität der Baumtopologie (Verzweigungsstruktur) zu überprüfen, wurde eine *bootstrap*-Analyse durchgeführt. Dabei werden die Spalten (Positionen) eines Alignments in unterschiedlicher Abfolge zusammengestellt, wobei manche Nukleotidpositionen nicht berücksichtigt werden, andere dafür mehrfach (*bootstrap*). Daraus entstehen, der Anzahl der Wiederholungen entsprechend, unterschiedliche Bäume, aus denen ein Konsensusbaum erzeugt wird. Die *bootstrap*-Werte wurden mit Hilfe der *Seqboot*-Software des *PHYLIP*-Paketes aus einem Datenset von 1000 Wiederholungen bestimmt. Sie zeigen die prozentuale Häufigkeit an, mit der zwei Spezies (Sequenzen) im Verlauf der wiederholten Berechnungen auf einen gemeinsamen Verzweigungspunkt (Vorfahren) zurückgehen, d.h. wie häufig im Verlauf der 1000 *bootstrap*-Analysen genau diese monophyletische Gruppe gebildet wird. Die über 70% liegenden *bootstrap*-Werte wurden als signifikant gewertet und vor den Knotenpunkten des originalen *Neighbour-Joining*-Baumes eingetragen.

3.12.2 Genetische Distanz der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O

Anhand der Distanzmatrix, die einer *Neighbor-Joining*-Analyse zugrunde liegt, kann durch eine paarweise Sequenz-Identitäts- oder -Distanzmatrix die genetische Distanz zwischen Sequenzen eines multiplen Alignments prozentual berechnet werden.

Aus darstellungstechnischen Gründen wurde die genetische Distanz der LTR von HIV-1 innerhalb eines Subtyps (*intrasubtyp*-Distanz), zwischen den Subtypen (*intersubtyp*-Distanz) und zwischen den Gruppen (*intergruppen*-Distanz) anhand der Sequenzidentität ermittelt. Mit dem Modul *Sequence Identity Matrix* (Tom Hall, Departement of Microbiology, North Carolina State University) wurde zunächst eine paarweise Sequenz-Identitätsmatrix erstellt. In der daraus erstellten Tabelle ist die prozentuale Identität zweier Sequenzen dargestellt. Ausgehend von einer theoretisch möglichen Identität zweier Sequenzen von 100% wurden die Sequenzdivergenzen von den errechneten Identitätswerten abgeleitet. Zum Vergleich der genetischen Distanz zwischen den Subtypen und Gruppen von HIV-1 wurden nur die Mittelwerte der Sequenzen eines Subtyps oder einer Gruppe dargestellt. Die diagonal aufgeführten Null-Werte ergeben sich aus dem Vergleich eines Subtyps oder einer Gruppe mit sich selbst.

3.13 *In vitro*-Modell zur Untersuchung der Promotoraktivität der LTR

Um die funktionalen Unterschiede zwischen der LTR von HIV-1 Subtypen zu analysieren, wurde ein *in vitro*-Modell verwendet, mit dem die Aktivität der LTR in transienten Transfektionsexperimenten unter standardisierten Bedingungen quantifiziert werden konnte.

Die amplifizierten LTR-Fragmente (3.4.2) wurden in einen experimentellen Luziferase-Vektor des *pGL3-Luciferase-Reporter-Systems* kloniert (3.9; Abb. 7) und zusammen mit einem β -Galaktosidase-Vektor in eukaryote Zellen kotransfiziert (3.13.5.1). Die enzymkatalytisch erzeugte Chemilumineszenz der Enzymaktivitäten beider Reporter wurde nach 24 bis 48 h mit Hilfe des *Dual-Light® Reporter Gene Assay Systems* aus dem Zellysat gemessen (3.13.6). Die in RLU (*relative light units*; relative Lichteinheiten) gemessene Enzymaktivität der Luziferase ist ein Maß für die Expression der Luziferase unter der Kontrolle der HIV-1 LTR und dient somit als indirekter Nachweis für die Aktivität der LTR verschiedener Gruppen und Subtypen in dem verwendeten *in vitro*-Modell. Die RLU-Ratio des Kontrollenzym β -Galaktosidase dient als interner Standard einzelner Transfektionsansätze, die RLU des Kontrollvektors pGL3-Promoter wurde als externer Standard eines gesamten Transfektionsexperimentes eingesetzt.

3.13.1 Klonierung der LTR/ Luziferase-Konstrukte

Der benutzte Expressionsvektor pGL3-Basic enthält ein modifiziertes *luziferase*-Gen (*luc+*) der Feuerfliege (*Photinus pyralis*), das für die Darstellung der Transkriptionsaktivität in transfizierten eukaryotischen Zellen optimiert wurde. Da dieser Vektor keinen eukaryotischen Promotor enthält, eignet er sich für die Messung der Transkriptionsaktivität des LTR-Promotors, der, stromaufwärts des *luziferase*-Gens kloniert, die Expression der Luziferase steuert.

Die gereinigten LTR-Fragmente wurden sequenziert (3.11.2), analysiert, mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *XhoI* geschnitten (3.8) und nochmals gereinigt (3.6.2). Der *MluI/ XhoI*-geschnittene Vektor pGL3-Basic wurde über Gelelektrophorese gereinigt (3.6.3; Abb. 14). Danach wurden die LTR-Fragmente an das 5'-Ende des *luziferase*-Gens in den Vektor pGL3-Basic ligiert (3.9) und zur Vermehrung in *E. coli* transformiert (3.9.2). Nach der Plasmidpräparation (3.10) wurden die durch Sequenzanalyse (3.11.2) ausgewählten LTR/ pGL3-Klone (Tab. 14) in 200 ml ÜN-Kulturen vermehrt, die Plasmid-DNA wurde endotoxinfrei präpariert (3.10.4) und zur Charakterisierung der LTR-Aktivität in eukaryote Zelllinien transient transfiziert (3.13.5).

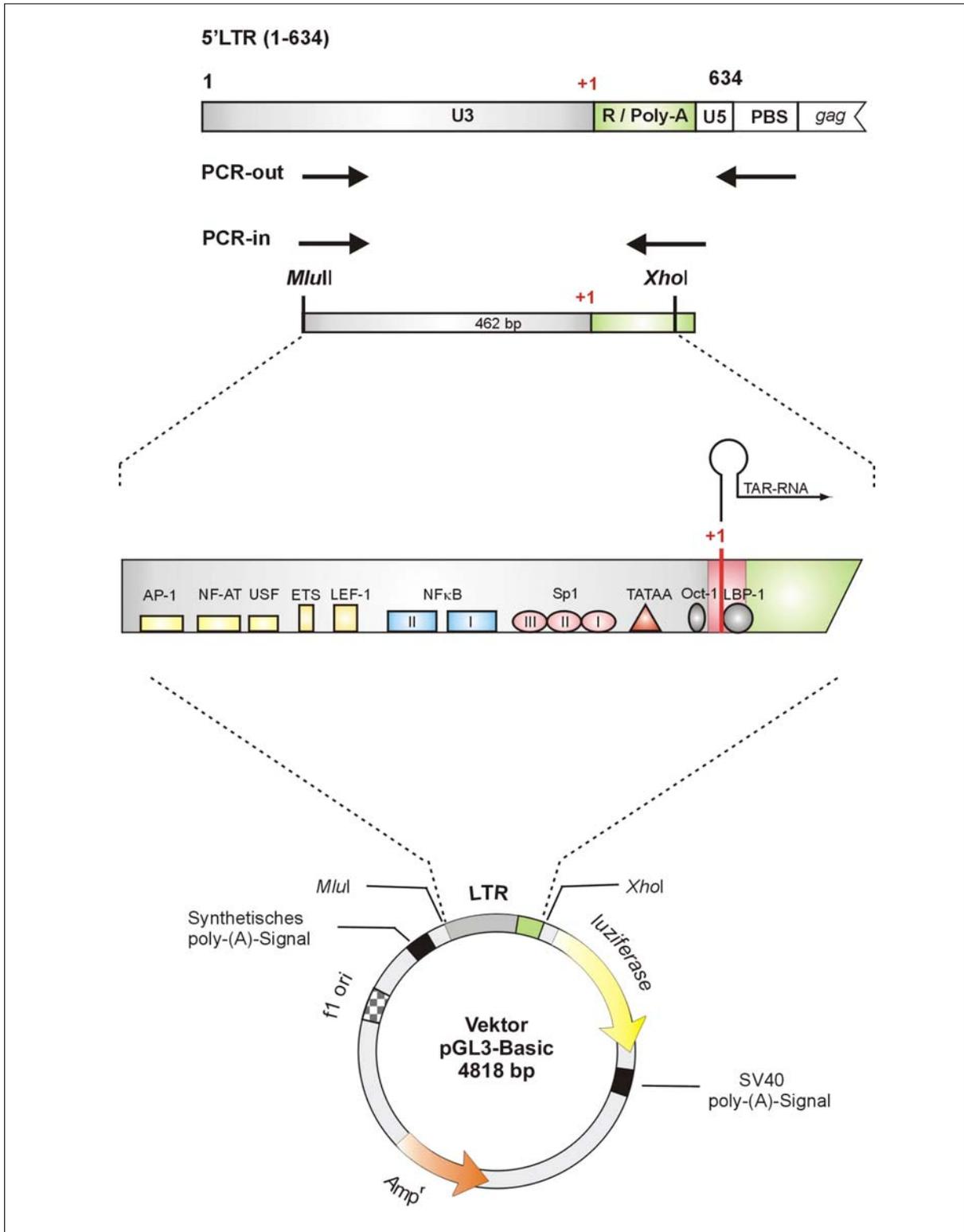


Abb. 7: Klonierungsschema zur Herstellung der LTR/ Luziferase-Konstrukte.

Die über eine semi-nested PCR amplifizierten LTR-Fragmente ausgewählter HIV-1-Isolate wurden nach der Restriktion mit *MluI*/ *XhoI* in den ebenfalls mit *MluI*/ *XhoI* geschnittenen Luziferase-Expressionsvektor pGL3-Basic (Promega) kloniert. Die 4463 bp großen Endkonstrukte LTR/ pGL3-Basic wurden sequenziert, ausgewählte Klone wurden für die phylogenetische Analyse (4.1.4.2) und/ oder für die funktionale Analyse der LTR-Aktivität in transienten Transfektions-Assays (4.2) verwendet.

3.13.2 Kultivierung der Zelllinie COS-Z-28 für transiente Transfektionen

Die Kultivierung der COS-Z-28-Zellen (2.7) erfolgte im CO₂-begasteten Feuchtbrutschrank (Heraeus) mit einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Temperatur von 37°C. Als Medium wurde DMEM, versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) und 1% Glutamin (Endkonzentration 2 mM) benutzt. Beim adhärenenten Wachstum in den Zellkulturflaschen (25 cm² bzw. 75 cm²; Nunc, Dänemark) organisieren sich die COS-Zellen in Form einer einzelligen Schicht (*monolayer*).

Um den Zellen optimale Proliferationsbedingungen zu schaffen, wurden sie in frische Kulturflaschen umgesetzt, sobald sie zu einem geschlossenen Zell-Monolayer gewachsen waren (*konfluentes* Wachstum). Dazu wurde zuerst das Medium über den Zellen abgenommen, die Zellen wurden entsprechend der Größe der Zellkulturflasche mit 2 bzw. 5 ml Puffer (PBS) gewaschen, mit 1 bzw. 2 ml Trypsin/ EDTA gespült und mit 0,5 bzw. 1 ml Trypsin/ EDTA im Brutschrank bei 37°C so lange inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden ablösten (3-5 min). Die abgelösten Zellen wurden mit DMEM-Medium (+ 10% FBS, + Glutamin 2 mM) auf ein definiertes Volumen eingestellt, je nach Bedarf 1:2 bis 1:20 in eine neue Kulturflasche überführt, auf 5 bzw. 15 ml mit frischem Medium aufgefüllt und weiter kultiviert.

3.13.2.1 Einfrieren von Zellen aus Zellkultur

Nach der Anreicherung der Zellen wurden sie entweder sofort verwendet oder bei -180 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Schädigung der Zellen möglichst gering zu halten, wurden sie mit frisch hergestelltem *Freeze-Mix* (FKS + 10% DMSO) versetzt. Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcon überführt und für 5 min bei 700 rpm sedimentiert. 10 µl Überstand wurden für die Mykoplasmen-PCR verwendet (3.13.4), der restliche Überstand wurde verworfen. Das Zellsediment wurde mit 1 ml *Freeze-Mix* vorsichtig resuspendiert und auf ein geeignetes Volumen (ca. 5 x 10⁶ Zellen/ml) aufgefüllt. Nach der Portionierung der Zellen in Kryoröhrchen wurden die Röhrchen in Zellstoff und Styropor verpackt, um beim anschließenden Gefrierprozess eine schonende Abkühlung von ca. 1°C pro Minute zu gewährleisten. Dazu wurden die Zellen zunächst für 2 h bei 4°C, nach 24 h bei -70°C gelagert und für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (-180°C) überführt.

3.13.2.2 Auftauen von Zellen für die Zellkultur

Um die Schädigung der Zellen möglichst gering zu halten, müssen sie rasch und bei mäßiger Wärme aufgetaut werden. Die Kryoröhrchen wurden dazu aus dem Stickstofftank in ein Glas mit warmem Wasser (nicht über 37°C) gestellt. Das auf die Zellen toxisch wirkende DMSO

wurde unmittelbar danach durch einen Waschschrift mit 10 ml gebrauchsfertigem Medium im 15 ml Falcon bei 1200 rpm (Heraeus) für 10 min entfernt. Die Zellen wurden mit 0,5 ml Medium resuspendiert, in einer kleinen Kulturflasche (25 cm²) mit 4,5 ml Medium aufgefüllt und bei 37°C im CO₂-begasteten Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde die Kultur unter dem Mikroskop kontrolliert, vitale Zellen wurden bei 700 rpm (Heraeus) für 5 min sedimentiert; die Zelltrümmer und abgestorbenen Zellen verblieben im Überstand und wurden abgegossen. Die vitalen Zellen wurden resuspendiert und weiter kultiviert. Anhand eines Aliquots von 10 µl 1:10 verdünntem Überstand wurde die Kultur vor dem Einsatz in Transfektionsexperimente auf die eventuelle Kontamination mit Mykoplasmen getestet (3.13.4).

3.13.3 Trypanblaufärbung (Vitalfärbung)

Die Trypanblaufärbung wird angewendet, um die Vitalität von Zellen zu untersuchen, und eignet sich daher für den Nachweis toxischer Einflüsse auf eine Zellkultur. Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass tote Zellen sich mit dem betreffenden Farbstoff anfärben lassen, bei lebenden Zellen der Farbstoff jedoch nicht in das Zellinnere gelangt. Nach der Trypsinierung wurden die Zellen in PBS (pH 7,4) aufgenommen, und die Zellkonzentration wurde auf ca. 10⁵ Zellen/ ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde 1:10 mit einer Trypanblaulösung (1% in PBS/ Essigsäure) versetzt und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Der Prozentsatz lebender Zellen errechnet sich aus dem Quotienten ungefärbter Zellen durch die Summe aller gezählten Zellen.

3.13.4 Mykoplasmen-PCR

Mykoplasmen sind mit einer Größe von 0,22 µm bis 2 µm die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryoten. Da sie häufig in den Stoffwechsel der befallenen Zellen eingreifen, müssen Zellkulturen regelmäßig auf eine eventuelle Kontamination mit Mykoplasmen getestet werden. Falls mit Hilfe der PCR-Methode Mykoplasmen-DNA nachgewiesen wurde, muss die kontaminierte Zellkultur vernichtet oder mit einem Antibiotikum behandelt werden, da Mykoplasmen in ihrer Form variabel sind und übliche Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) passieren können.

Tab. 12: Standardansatz für den Nachweis von Mykoplasmen mit Hilfe der PCR.

Reagenz	Konz. (Stock)	Konz. (final)	µl / Ansatz
Primer-Mix K	25 µM	0,25 µM	2,0
Puffer	10 x	1 x	5
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM	1
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5
Taq.-Pol.	5 U/µl	2,5 U	0,2
H ₂ O			30,3
Mix			40
Kultur-Überstand 1:10			10
Volumen			50

Standard-Bedingungen für die Mykoplasmen-PCR im Thermozykler:

Vorlauf	: 94°C	5'	
	72°C	3'	
	94°C	45"	
	55°C	45"	
Amplifikation	: 72°C	3'	x 40
	94°C	45"	
	55°C	45"	
Ende	: 72°C	10'	
	27°C	10'	
Store	: 4°C	∞	

3.13.5 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA

Transfektion ist die Bezeichnung von Verfahren zum experimentellen Einschleusen von DNA in eukaryote Zellen. Bei einer transienten Transfektion werden die in die Wirtszellen eingebrachten Gene nur vorübergehend exprimiert. Die eingeschleuste DNA wird zwar in den Nukleus der Zelle transportiert, aber nicht in das Chromosom der Empfängerzelle integriert. Da die extrachromosomale Plasmid-DNA nicht repliziert, wird sie in der transfizierten Zelle nur für eine limitierte Zeit exprimiert werden und geht im Verlauf der Zellteilungen wieder verloren.

3.13.5.1 Transfektion adhärenter Zellen mit LTR/ pGL3-Konstrukten

Bei der Transfektionsmethode nach dem Protokoll *Effectene Transfection Kit* wird DNA mit Hilfe von *Effectene*, einem nicht-liposomalen Lipid, in eukaryote Zellen eingeschleust. Das *Effectene* Reagenz liegt in Form kationischer Micellen vor, die im Komplex mit der Plasmid-DNA von der Zelle aufgenommen werden.

Die adhärent wachsende Zelllinie COS-Z-28-Zellen wurde als Monolayer in DMEM, versetzt mit 10% (vol/vol) fötalem Kälberserum und 0,4 mM Glutamin, bei 37°C im CO₂-begasten Brutschrank (5% CO₂) kultiviert (3.13.2). Die Transfektion erfolgte in zwei bis drei unabhängigen Experimenten jeweils als Doppelansatz pro LTR-Konstrukt in 24-Loch-Platten mit je 1 x 10⁵ Zellen pro Loch. Die LTR/ Luziferase-Plasmide wurden nach experimentell optimierten Bedingungen mit einer DNA:*Effectene*-Ratio von 1:20 transfiziert (4.2.2).

Nach der Abnahme des Mediums wurden die Zellen vorsichtig mit 500 µl PBS „ohne“ gewaschen. Der PBS-Puffer wurde abgenommen und das Medium vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Die DNA wurde mit dem Puffer EC in einem Eppendorfgefäß gemischt, um optimale Salzbedingungen für die anschließende DNA-Kondensation zu schaffen. Nach der Zugabe des Enhancers kondensierte die DNA für 2 bis 5 min bei Raumtemperatur. Durch die Zugabe von *Effectene* folgte die Komplexbildung des Gemisches für 5-10 min bei RT. Danach wurden 700 µl Medium zugegeben, das Gemisch wurde sofort zu je 400 µl auf die Zellen der beiden *wells* eines Doppelansatzes verteilt. Nachdem die 24-Loch-Platten 2-3 Mal kreisend bewegt wurden, um das DNA-Gemisch gleichmäßig auf den Zellen zu verteilen, erfolgte eine Inkubation für 18 bis 24 h bei 37°C im CO₂-begasten Brutschrank.

3.13.5.2 Kotransfektion von Plasmid-DNA

Unter Kotransfektion versteht man die gleichzeitige Einschleusung mehrerer Gene, die sich auf unterschiedlichen Plasmiden befinden, in eine Wirtszelle. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurden zusätzlich zu der jeweiligen LTR/ pGL3-Plasmid-DNA weitere Plasmide (2.6) für unterschiedliche Funktionen kotransfiziert:

(1) Das Plasmid pRSV-β-Gal, das die β-Galaktosidase (*lac-Z*-Gen von *E. coli*) exprimiert, wurde zur internen Standardisierung der experimentellen Transfektionsbedingungen kotransfiziert (erhalten von H. Schäfer, Robert Koch-Institut, Berlin). (2) Das Plasmid pBSSK+ wurde kotransfiziert, um die Gesamtmenge an DNA pro Transfektionsansatz konstant zu halten. (3) Zur Messung der transaktivierten LTR-Aktivität wurden statt dem Plasmid pBSSK+ pro Doppelansatz 100 ng des Plasmids pcDNA3-tat kotransfiziert. Das Protokoll zur Zusammensetzung der Transfektionsansätze wurde experimentell optimiert (4.2.2.2).

3.13.6 Aufarbeitung der Zellen und Detektion der Reporterproteine (Luziferase Assay)

Das Prinzip des *Dual-Light® Reporter Gen System* beruht auf der Messung enzymkatalytisch erzeugter Lumineszenz, der sog. Biolumineszenz, in einem Photomultiplier (Microlumat LB 96V). Nach Zugabe des Substrates für beide Enzymreaktionen wird zunächst die verstärkte Luziferase-Reaktion gemessen, die durch Verbrauch von ATP ein Lichtsignal mit einer Halbwertszeit von etwa einer Minute produziert. Nach einer 40-minütigen Inkubationszeit wird durch Zugabe des Lumineszenz-Verstärkers *Sapphire-II™* das Lichtsignal des akkumulierten Produktes der β -Galaktosidase/*Galacton-Plus®* Substrat-Reaktion gemessen.

Die LTR/ pGL3-Konstrukte wurden in eukaryote Zellen transfiziert (3.13.5), die Messung der Luziferase- und der β -Galaktosidaseaktivität erfolgte 20–24 Stunden nach der Transfektion aus demselben Zelllysate. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen wurden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, danach durch Zugabe von 100 μ l Lysis-Puffer 1x (Promega) lysiert, mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zellfragmente wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf Zentrifuge sedimentiert, der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Messung der Chemilumineszenz wurde aus 10 μ l Lysat, vorgelegt in einer Mikrotiterplatte, in einem Luminometer durchgeführt. Dabei erfolgte innerhalb von 10 min nach Zugabe von Puffer A die automatisierte Zugabe von jeweils 100 μ l Puffer B, der das Substrat Galacton Plus enthält. Die Messung des Luziferase-Signals erfolgte unmittelbar nach der Zugabe von Puffer B mit einer Messgeschwindigkeit von 0,1 sec./ well.

Nach einer Inkubationszeit von 40-60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte die automatisierte Injektion von 100 μ l *Light Emission Accelerator-II* zur Verstärkung der Lichtintensität der β -Galaktosidase-Substrat-Reaktion. Das β -Galaktosidase-Signal wurde ebenfalls mit einer Messgeschwindigkeit von 0,1 sec./ well gemessen.

3.13.7 Standardisierung der Transfektionsergebnisse

Das in 2.2.20 beschriebene *in vitro*-Modell wurde zunächst mit zwei Zelllinien, COS-Z-28 und 293 EBNA, durchgeführt. Da beide Zelllinien im relativen Vergleich übereinstimmende Ergebnisse lieferten, die Zelllinie COS-Z-28 mit den verwendeten Protokollen jedoch effizienter transfizierbar war, wurden die transienten Transfektionsexperimente in COS-Z-28-Zellen durchgeführt. Eine interne Standardisierung der einzelnen Transfektionsansätze anhand des β -Galaktosidase-exprimierenden Plasmides pRSV- β -Gal konnte in diesem Falle nicht vorgenommen werden, da die Zelllinie COS-Z-28 ein *lac-Z*-Gen unter der Kontrolle einer HIV-LTR exprimiert. Die Expression der chromosomalen β -Galaktosidase würde durch

die Tat-Aktivierung beeinflusst werden. Zur Standardisierung der Luziferaseaktivität wurden deshalb die relativen Lichteinheiten des Luziferase-Signals mit den RLU des Kontrollplasmides pGL3-Promoter verrechnet. Dieses Plasmid, in dem die Luziferase unter der Kontrolle des SV40 Promotors exprimiert wird, wurde in jedem Transfektionsexperiment als externer Standard mitgeführt. Die standardisierte Luziferaseaktivität gilt als Maß für das unter der Kontrolle der LTR exprimierte Luziferase-Protein und damit für die LTR-Aktivität in dem durchgeführten *in vitro*-Modell-System.

Die aus den Ansätzen a und b eines Transfektionsexperimentes berechneten Mittelwerte der basalen und der transaktivierten LTR-Aktivität, $RLU_{Luziferase\ LTR/ pGL3} (\bar{X}_{a,b})$, wurden anhand der RLU des im jeweiligen Transfektionsexperiment mitgeführten Kontrollplasmides pGL3-Promoter ($RLU_{Luziferase\ pGL3\ Promoter}$) standardisiert. Der Standardisierung der LTR/ pGL3-Klone liegt folgende Berechnung zugrunde:

$$\text{standardisierte } RLU_{Luziferase\ LTR} = \frac{RLU_{Luziferase\ LTR/ pGL3} (\bar{X}_{a,b})}{RLU_{Luziferase\ pGL3\ Promoter}} \times 100$$

Aus den standardisierten RLU der LTR/ pGL3-Klone ($RLU_{Luziferase\ LTR}$) wurde der Mittelwert aller Transfektionsexperimente berechnet. Diese für jeden Klon ermittelten standardisierten RLU der basalen und der transaktivierten LTR-Aktivität wurden benutzt, um den Faktor der Transaktivierbarkeit (Tat-Antwort) der LTR zu berechnen: (Abb. 16 c).

$$\text{Transaktivierbarkeit der LTR} = RLU_{Luziferase\ LTR\ \text{tat-aktiviert}} / RLU_{Luziferase\ LTR\ \text{basal}}$$

4 Ergebnisse

Die Transkription von HIV-1 wird durch ein komplexes Zusammenspiel der viralen Enhancer-/ Promotor-Region LTR (*long terminal repeat*) mit zellulären Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle und viralen Regulationsfaktoren gesteuert. Die regulatorischen Elemente der LTR interagieren dabei sowohl mit konstitutiven als auch mit induzierbaren Transkriptionsfaktoren. Diese Interaktion führt zur Bildung eines stabilen Transkriptionskomplexes, der die Initiation und Elongation der zellulären RNA-Polymerase II (RNAPII) stimuliert. Die Mehrzahl der mRNA-Transkripte dieser basalen Transkription sind allerdings instabil, ihre Elongation bricht vorzeitig ab. Das früh im Infektionszyklus exprimierte virale Protein Tat stimuliert die Elongation der Transkription jedoch durch die spezifische Interaktion mit dem TAR-RNA-Element, einer Haarnadelstruktur (*stem-loop*), die sich am 5'-Ende der viralen mRNA-Transkripte faltet. Die durch die Tat-TAR-Interaktion aktivierte zelluläre Kinase CDK9 katalysiert die Hyperphosphorylierung der RNAPII im Initiations-Elongations-Komplex, was zur Veränderung der Elongationseigenschaften der RNAPII und somit zur Synthese langer mRNA-Transkripte führt. Diese werden im Zytoplasma translatiert und bilden die Grundlage für die Bildung neuer Virionen.

Wie in den Strukturgenen *gag*, *pol* und *env* sind auch in der regulatorischen Enhancer-/ Promotor-Region LTR Unterschiede zwischen den Subtypen und Gruppen von HIV-1 bekannt. In vergleichenden Strukturanalysen einiger LTR-Sequenzen wurden subtypspezifische Unterschiede in den Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren, die mit der LTR interagieren, identifiziert (Gao *et al.*, 1996; Montano *et al.*, 1997; Naghavi *et al.*, 1999; De Baar *et al.*, 2000). Die Ergebnisse der *in vitro*-Studien lassen auf einen Zusammenhang zwischen der strukturellen und der funktionalen Divergenz schließen (Montano *et al.*, 1998; Naghavi *et al.*, 1999; Jeeninga *et al.*, 2000). Daraus könnte man Unterschiede in der Transaktivierbarkeit und Steuerung der Genexpression in Abhängigkeit vom Subtyp *in vivo* ableiten, was wiederum subtypspezifische Unterschiede in der Virusvermehrung und im Infektionsverlauf zur Folge haben kann.

4.1 Strukturanalyse der Enhancer-/ Promotor-Region von HIV-1 Gruppe M, N und O

Zu Beginn der Dissertation existierten nur wenige vollständige LTR-Sequenzen; deren Analyse basierte auf einzelnen Vertretern von Subtypen der Gruppe M.

Um ein umfassendes Bild vom Zusammenhang zwischen der Struktur der HIV-1 LTR und deren Promotoraktivität zu erhalten, wurde ein Studienpanel aus 30 HIV-1-Isolaten mit Vertretern der Gruppe M (n=28), N (n=1) und O (n=1) untersucht (Tab. 5). Die Isolate dieses Sets waren unterschiedlicher geographischer Herkunft, um alle Gruppen von HIV-1 und

möglichst viele der zur Zeit weltweit zirkulierenden Subtypen der M-Gruppe im Hinblick auf die divergente Struktur und Aktivität des Promotors untersuchen zu können.

Nach Anzucht der HIV-Isolate auf primären monozytären Blutzellen (PBMC) HIV-negativer Blutspender wurde die provirale DNA extrahiert und in die LTR-PCR eingesetzt (3.3 und 3.4).

4.1.1 Primerdesign zur subtyp-generischen und gruppen-spezifischen

Amplifikation der LTR von HIV-1

Die Etablierung der LTR-PCR erfolgte unter Berücksichtigung mehrerer Aspekte: (1) In der amplifizierten Region sollten alle *cis*-regulatorischen Sequenzen der LTR enthalten sein; (2) obwohl bislang keine Sequenzunterschiede der 5'LTR und der 3'LTR beobachtet wurden (Al-Harhi *et al.*, 1998), sollte unter Berücksichtigung ihrer unterschiedlichen Funktionen im Replikationszyklus von HIV-1 die spezifische Amplifikation der 3'LTR und die 5'LTR möglich sein; (3) für die anschließende Klonierung der PCR-Fragmente in den Expressionsvektor pGL3-Basic sollten die Restriktionsschnittstellen *MluI* und *XhoI* über die PCR-Primer eingeführt werden; (4) die Primer sollten möglichst subtyp- und gruppen-generisch sein.

Zum Primerdesign wurde ein Alignment aus LTR-Sequenzen der HIV-Datenbank erstellt (www.hiv-web.lanl.gov; Release 1997). Innerhalb der Gruppe M war mindestens eine Sequenz der zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Subtypen vertreten. Das Alignment bestand aus Sequenzen der Region *nef*-3'LTR und Sequenzen der Region 5'LTR-PBS (*primer binding site*). Die Primerauswahl für die Gruppen M, N und O erfolgte in subtyp-generischen konservierten Sequenzbereichen so, dass eine selektive Amplifikation der 3'LTR und der 5'LTR möglich war (3.4.2).

Die Sequenz des Isolates O_MP5180 wurde aus den partiellen 5'- und 3'LTR- Sequenzen zusammengesetzt. Ebenso wurde mit der LTR-Sequenz des Isolates N-YBF30 verfahren. Dieses Isolat wurde jedoch erst später in das Studienpanel aufgenommen, da man Gruppe N-Viren erst 1998 entdeckte (Simon *et al.*, 1998).

Aufgrund der Sequenzhomologie der Primer-Loci konnte die LTR der N-Gruppe (N-YBF30) mit den subtyp-generischen Primern der M-Gruppe amplifiziert werden (Abb. 8). Die LTR-Amplifikation der Gruppe O (O-MVP5180) erfolgte dagegen mit spezifischen Primern für dieses Isolat (Tab. 6).

Die Primer wurden somit subtyp-generisch für die Gruppe M, gruppen-generisch für die Gruppe M und N und spezifisch für das Isolat O-MVP5180 ausgewählt (Abb. 8).

Abb. 8: Sequenzalignment für das Primerdesign der LTR-PCR von HIV-1 Gruppe M, N und O

Dargestellt ist ein Sequenzalignment aus HIV-1 Sequenzen der Los Alamos Datenbank (Release 1997). Das Alignment setzte sich zusammen aus drei 5'LTR-Sequenzen der Gruppe M (Subtyp B, D und CRF01_AE) und acht 3'LTR-Sequenzen der Gruppe M (Subtyp A, B, C, D, F, H, CRF01_AE und CRF02_AG). Die Sequenzen der Isolate O-MVP5180 und N-YBF30 wurden aus den partiellen 5'- und 3'LTR-Sequenzen so zusammengesetzt, dass die Sequenzinformation der 5'LTR am Transkriptionsstart +1 beginnt.

Die Bindungsstellen für die PCR-Primer sind rot umrandet, ihre Orientierung ist in Form von Pfeilen dargestellt. Die TATAA-Box, die *Primer Binding Site* (PBS) und das Poly-A-Signal sind hellblau unterlegt. Beginn und Ende der drei LTR-Abschnitte U3, R und U5 sind mit blauen Pfeilen markiert. Waagerechte Striche stehen für fehlende Nukleotide, Punkte stehen für Nukleotidübereinstimmung im Vergleich zu der unterstrichen dargestellten Referenzsequenz HXB2R (Acc. K03455).

4.1.2 Etablierung einer selektiven 5' und 3'LTR-PCR

Die selektive Amplifikation der 5' und der 3'LTR basiert auf der spezifischen Kombination der Primer bei der äußeren PCR (*PCRout*) und erfolgte als *semi-nested* PCR nach experimentell optimierten Standardprotokollen (3.4.2).

Der *sense* Primer (*MluI*_172s) der äußeren 5'LTR ist am 5'-Ende der U3-Region lokalisiert, der *antisense* Primer (*XhoI*_733as) ist komplementär zu dem konservierten Übergangsbereich zwischen der U5-Region und der Primerbindungsstelle (PBS). Mit diesem Primerpaar wurde ausschließlich die 5'LTR amplifiziert (Tab. 6 und Abb. 8; Abb. 9).

Der *sense* Primer der äußeren 3'-PCR liegt dagegen im *nef* Gen (*MluI*_13s), und der *antisense* Primer (*XhoI*_627as) ist komplementär zu dem Polyadenylierungssignal am 3'-Ende der R-Region, wodurch ein spezifisches 3'LTR-Produkt erzeugt wurde.

Die innere PCR (*PCRin*) wurde mit jeweils 2 µl der äußeren 5'LTR-PCR bzw. der äußeren 3'LTR-PCR mit dem Primerpaar *MluI*_172s und *XhoI*_627as durchgeführt (Tab. 6; Abb. 9). Damit waren die spezifischen 5'LTR- und 3'LTR-Produkte am 5'-Ende mit einer *MluI*-Schnittstelle und am 3'-Ende mit einer *XhoI*-Schnittstelle für die anschließende Klonierung in den Expressionsvektor pGL3-Basic ausgestattet (Abb. 7).

Mit Hilfe dieser *semi-nested* LTR-PCR wurde der Sequenzbereich der LTR amplifiziert, in dem alle *cis*-regulatorischen Elemente des HIV-1 Promotors lokalisiert sind.

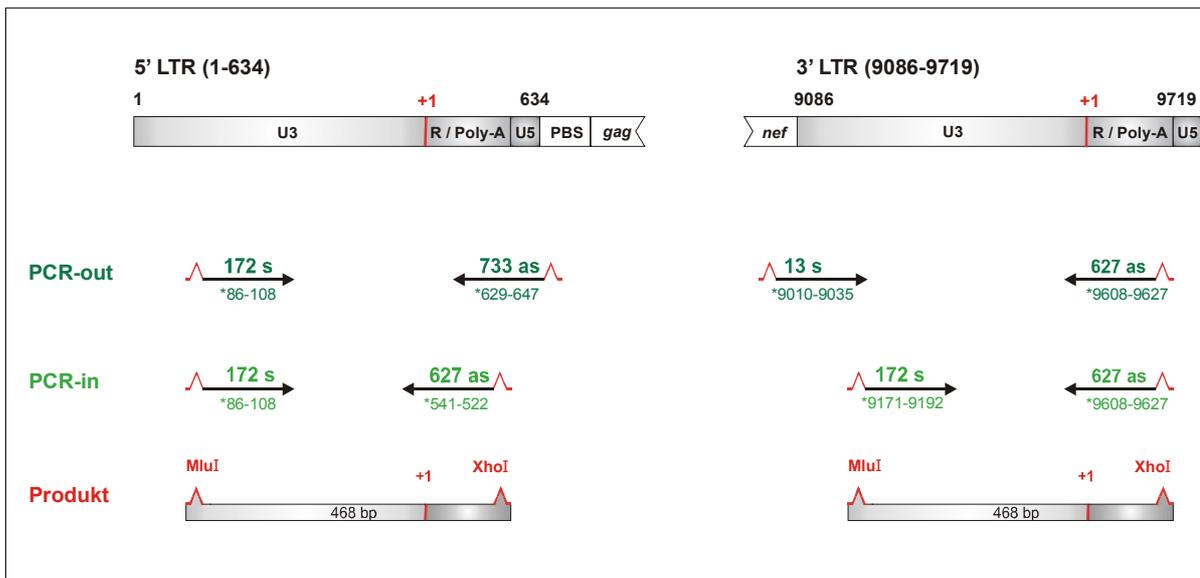


Abb. 9: Darstellung der semi-nested PCR zur Amplifikation der 5' und der 3'LTR von HIV-1.

Durch die spezifische Kombination von PCR-Primern (Tab. 6) wurde eine 5' und eine 3'LTR-PCR etabliert (4.1.2). Aus den amplifizierten 468 bp-Fragmenten wurde die direkte oder die klonale Sequenz bestimmt (4.1.3.1). Die Etablierung der 3'LTR-PCR erfolgte anhand des molekularen Klon pNL4.3. Die 5'LTR wurde mit DNA aus der Zelllinie ACH-2 optimiert (3.4.2). Ein Standardprotokoll für die *semi-nested* LTR-PCR wurde unter experimenteller Optimierung der Annealing-Temperatur und der finalen $MgCl_2$ -Konzentrationen etabliert (Tab. 7 und Tab. 13).

Tab. 13: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (PCRout)¹ zur Amplifikation der LTR von HIV-1.

Reagenz_	5'LTR			3'LTR				
	Konz. (Stock)	Konz. (Final)	μ l / Ansatz	Konz. (Stock)	Konz. (Final)	μ l / Ansatz		
Primer <i>sense</i>	172s	25 μ M	0,25 μ M	0,5	13s	25 μ M	0,25 μ M	0,5
Primer <i>antisense</i>	733as	25 μ M	0,25 μ M	0,5	627as	25 μ M	0,25 μ M	0,5
$MgCl_2$	50 mM	0,6 mM	0,6	0,6	50 mM	1,5 mM	2,5	2,5
Puffer III	10 x	1 x	5,0	5,0	10 x	1 x	5,0	5,0
dNTPs	2,5 mM	0,2 mM	4,0	4,0	2,5 mM	0,2 mM	4,0	4,0
Optimizer	5 x	1 x	10,0	10,0	5 x	1 x	10,0	10,0
Combi-Pol.	5 U/ μ l	2,5 U	0,5	0,5	5U/ μ l	2,5 U	0,5	0,5
H ₂ O			8,9	8,9			7,0	7,0
Mix			30 μl	30 μl			30 μl	30 μl
DNA + H₂O			20 μl	20 μl			20 μl	20 μl
Σ			50 μl	50 μl			50 μl	50 μl

¹ Die LTR-PCR (PCRin) wurde analog mit 2 μ l der PCRout, den Primern *MluI*_172s/ *XhoI*_627as (Tab. 6) und einer finalen $MgCl_2$ -Konzentration von 1mM durchgeführt.

Die optimale $MgCl_2$ -Konzentration der 5'LTR-PCR_{out} lag bei 0,6 mM, die der 3'LTR-PCR_{out} bei 1,5 mM. Für die innere PCR wurde jeweils eine optimale finale $MgCl_2$ -Konzentration von 1,0 mM ermittelt. Die Amplifikation im Thermozykler erfolgte unter Standardbedingungen, wobei die optimale Annealing-Temperatur der verwendeten Primer bei 55°C lag (3.4.2).

4.1.3 Sequenzanalyse der Promotorregion von HIV-1 Gruppe M, N und O

Von insgesamt 30 Isolaten verschiedener Subtypen bzw. Gruppen von HIV-1 wurde die Sequenz der 5' oder 3'LTR ermittelt (Tab. 5).

Acht Isolate und der molekulare Klon pNL4.3 stammen aus dem *NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*, 16 Primärisolate wurden von L. Gürtler zur Verfügung gestellt (Universität Greifswald). Weitere fünf Isolate stammen von Patienten der Serokonverterstudie des RKI (Tab. 5). Diese fünf Serokonverter waren zuvor in den Genomregionen *gag* (p17) und *env* (C2V5) typisiert worden und gehören zu nonB-Viren der M-Gruppe. Sie waren im Rahmen dieser Arbeit auf primären Blutzellen (PBMC) HIV-negativer Spender angezüchtet und vermehrt worden (3.2.2). Der Nachweis der Virusvermehrung erfolgte mittels p24 Antigen-Nachweis im Kulturüberstand (3.2.5). Der Vertreter der Gruppe O-Viren (O-MVP5180) war bereits auf die Zelllinie H9 adaptiert und wurde auf diesen vermehrt (3.2.3). Von allen anderen Isolate standen Virusstocks oder infizierte Zellen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung (erhalten von K. Rokos). Zur Amplifikation (3.4.2) und Sequenzierung der LTR (3.11) wurde die provirale DNA aus infizierten Zellen extrahiert (3.3).

4.1.3.1 Direkte und klonale Sequenzanalyse

Mit der etablierten *semi-nested* PCR wurde die LTR von 30 HIV-1-Isolaten amplifiziert (Abb. 9 und). Von den Isolaten 92UG029 (A-2) und N-YBF30 konnte nur die 3'LTR, nicht aber die 5'LTR amplifiziert werden. Bei 14 Isolaten wurde die LTR-Sequenz als *direkte Konsensussequenz* aus dem PCR-Produkt bestimmt. Die Sequenzanalyse des PCR-Produkts von Isolat O-MVP5180 und von dem nonB-Isolat 98-00164 war durch die Überlagerung von Basensignalen, verursacht durch das Vorliegen unterschiedlicher Virusvarianten der HIV-Quasispezies, nicht möglich. Die Isolate, von denen keine Auswertung der Direktsequenz möglich war, und weitere Isolate, die für die funktionale Analyse ausgewählt waren, wurden zur Sequenzierung kloniert. Da für die funktionale Analyse die Verwendung des Luziferase-Expressionsvektors pGL3-Basic geplant war, wurde dieser auch direkt für die Sequenzanalyse der LTR-Klone verwendet, um eine spätere Umklonierung der LTR-Fragmente zu vermeiden (3.13.1 und Abb. 7).

Pro Isolat wurden 4-10 Klone sequenziert, um daraus eine *klonale Konsensussequenz* zu erstellen. Bei dem Isolat O-MVP5180 wurden 2 unterschiedliche Sequenzformen identifiziert, die sich durch eine 26 bp lange Insertion unterschieden. Die der publizierte Originalsequenz O-MVP5180 (Acc. L20571) entsprechende Form wurde im Folgenden als O-MVP5180/ O2 von der längeren Form O-MVP5180/ O3 unterschieden und getrennt analysiert. Das Primärisolat 98-00164 (Serokonverter) bestand ebenfalls aus einem Gemisch und führte zu zwei Gruppen unterschiedlicher klonaler Sequenzmuster.

Insgesamt wurde die LTR von 18 HIV-1 Isolaten (Referenzpanel n=7; Primärisolate n=10, Serokonverter n=1) kloniert und sequenziert. Die phylogenetische und die strukturelle Analyse der LTR erfolgte anhand von Direktsequenzen und klonalen Sequenzen. Die anschließende funktionale Analyse wurde mit ausgewählten Klonen, die der klonalen Konsensussequenz des jeweiligen Isolates entsprachen, durchgeführt (Tab. 14).

4.1.3.2 Sequenzvergleich der 5' und der 3'LTR von HIV-1

Anhand von 7 Isolaten der Gruppe M, jeweils einem Isolat pro Subtyp A, B, C, D, G, F und CRF01_AE, wurde ein Sequenzvergleich zwischen der 5'LTR und der 3'LTR durchgeführt. Dazu wurden die klonalen Sequenzen der 5'LTR und der 3'LTR des jeweiligen Isolates in einem Sequenzalignment (MacVector 7.0) verglichen. Die 5' und die 3'LTR eines Isolates waren jeweils identisch (Daten nicht gezeigt).

Wegen Problemen bei der Amplifikation der 5'LTR wurde bei dem Isolat A-2 auf die in diesem Fall besser zu amplifizierende 3'LTR zurückgegriffen. Von Isolat N-YBF30 und von dem molekularen Klon pNL4.3 wurde ebenfalls die 3'LTR für weitere Untersuchungen benutzt, von den übrigen Isolaten wurde die 5'LTR amplifiziert.

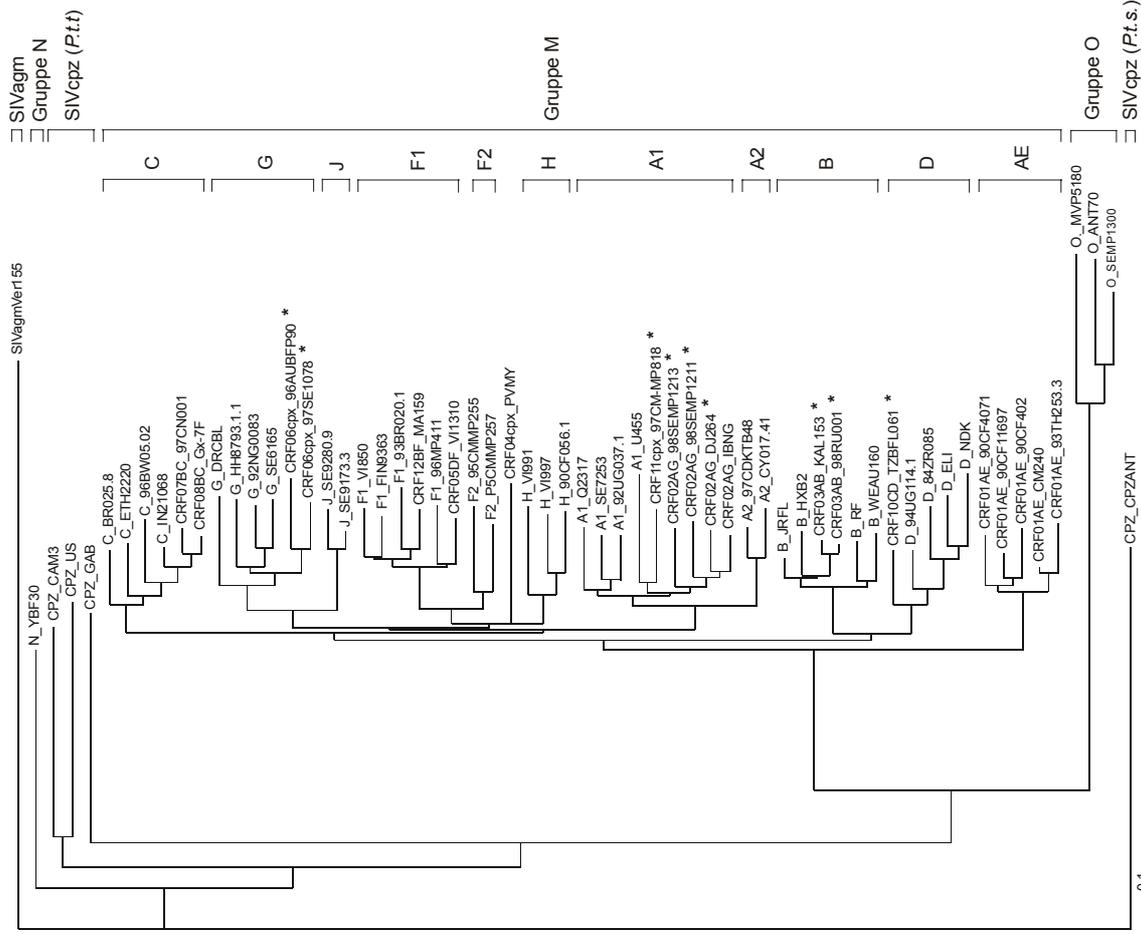
4.1.4 Genetische Klassifikation der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O

Die genetische Klassifizierung der LTR-Sequenzen erfolgte mittels phylogenetischer Analyse mit dem PHYLIP Package Version 3.573 (J. Felsenstein 1993; 2.2.16) anhand international etablierter Referenzviren für HIV-1 Gruppen und Subtypen (Tab. 4). Die LTR-Nukleotidsequenzen der Isolate des Studienpanels wurden mit den Referenzsequenzen, die für die Erstellung des LTR-Stammbaumes verwendet wurden, aligniert. Nach manueller Edition des Alignments wurde eine Distanzmatrix nach dem Kimura-2-Parameter-Modell erstellt, um daraus einen Stammbaum mit Hilfe des Neighbor-Joining-Verfahrens abzuleiten (3.12).

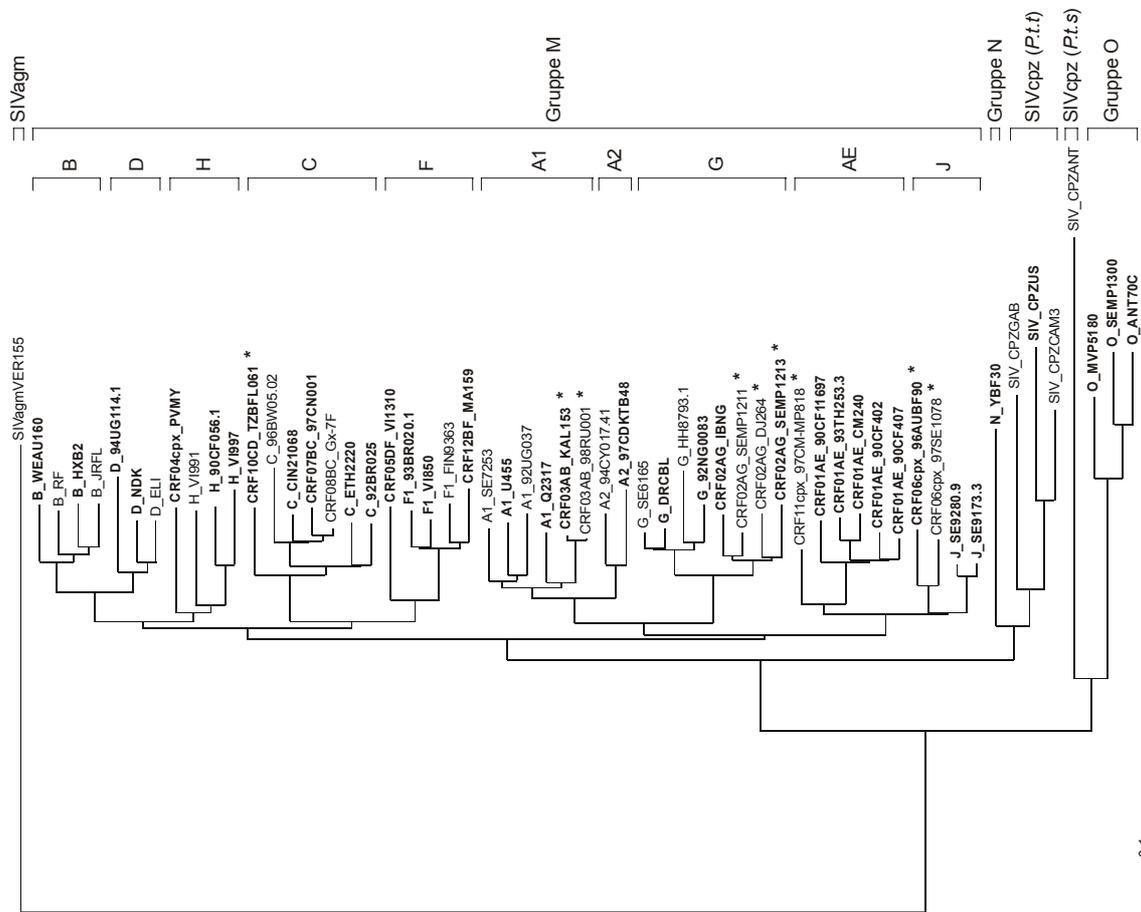
4.1.4.1 Vergleichende phylogenetische Analyse der *env*- und LTR-Region von HIV-1 Referenzviren

Die meisten Studien konzentrieren sich zwar auf die phylogenetische Analyse der Strukturgene, die genetische Variation der LTR-Region ist mittlerweile jedoch ebenfalls Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Man stellte fest, dass eine zur Subtypisierung von HIV-1 hinreichende Sequenzvariation, wie sie in der *env*- oder der *gag*-Region vorliegt, auch für die LTR zutrifft (Naghavi *et al.*, 1999; De Baar *et al.*, 2000). Anhand rekombinanter Viren stellte sich jedoch heraus, dass ein Virusisolat aufgrund intersubtypischer Rekombination in der LTR-Region einem anderen Subtyp angehören kann als in der *env*- oder *gag*-Region (Naghavi *et al.*, 1999). Da die genetische Klassifizierung der Referenzviren auf der Subtypisierung in der *env*- oder *gag*-Region basiert, musste zunächst überprüft werden, welchem Subtyp die LTR der Referenzviren entspricht, die für die genetische Klassifikation der LTR des Studienpanels benutzt werden sollten (Tab. 4).

Dazu wurde der LTR-Bereich, der dem amplifizierten LTR-Fragment des Studienpanels entspricht (U3/ R), mit der *env*-Region (C2V5) der entsprechenden Referenzviren (Tab. 4) in phylogenetischen Analysen verglichen.



b. env



a. LTR

Abb. 10: Phylogenetischer Neighbor-Joining Stammbaum von HIV-1 Referenzviren.

a. *env*-Region. **b.** LTR-Region. Der Distanzbalken mit dem Wert 0,1 zeigt die Astlänge an, die einem Nukleotidaustausch von 10% pro Position im Alignment entspricht. *Bootstrap*-Werte über 70% werden als signifikant bezeichnet und sind im Stammbaum angegeben. Die Sequenz SIVagmVer155 (Acc. M29975), isoliert aus afrikanischen grünen Meerkatzen (*Chlorocebus pygerythrus*) wurde als „Außengruppe“ für die Erstellung der Baumtopologie benutzt. Sequenzen, die für die spätere genetische Klassifikation der LTR des Studienpanels benutzt werden (Abb. 11), sind fett gedruckt. Isolate, bei denen die LTR und die *env*-Region unterschiedlichen Genotypen zugeordnet wird, wurden mit einem Stern markiert.

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, konnten alle verwendeten Referenzsequenzen klassifiziert werden. Alle Vertreter von Subtypen sind in der LTR und in der *env*-Region dem gleichen Subtyp zuzuordnen. Dies gilt auch für die Isolate der rekombinanten Form CRF01_AE, die in der LTR und in *env* eine von Subtyp A deutlich abgegrenzte AE-*clade* bilden (Abb. 10a und b).

Die Isolate vom Typ CRF02_AG dagegen gehören in der *env*-Region zu Subtyp A, in der LTR bilden sie eine eigene, der G-*clade* eng verwandte monophyletische Gruppe (Abb. 10b Gruppe G/ AG *bootstrap*-Wert 99,8). Das Isolat 97CM-MP1298 (CRF11_cpx) kolokalisiert in der LTR mit AE-Sequenzen, der untersuchte *env*-Abschnitt liegt dagegen in der Gruppe A (vergl. Abb. 10a CRF_AE und Abb. 10b Subtyp A). Die beiden Isolate der rekombinanten Form CRF03_AB sind in *env* dem Subtyp B, in der LTR jedoch dem Subtyp A zuzuordnen (vergl. Abb. 10a Gruppe B mit Abb. 10b, Gruppe A). Die *env*-Sequenzen der beiden rekombinanten Isolate CRF06_cpx liegen in der Gruppe G, die LTR ist jedoch dem Subtyp J zuzuordnen (vergl. Abb. 10a Gruppe G und Abb. 10b Gruppe J).

Das rekombinante Isolat CRF04cpx_PVMY dagegen gehört in der LTR und in *env* zu Subtyp H; das rekombinante Isolat CRF05DF_VI1310 ist in der LTR und in *env* dem Subtyp F zuzuordnen.

Die hier gezeigte vergleichende genetische Klassifizierung der *env*-Region und der LTR-Region von Referenzviren zeigt, dass sich bei HIV-1 nicht nur kodierende Genomabschnitte, sondern auch das regulatorische Element LTR zur Klassifizierung der Subtypen eignet. Innerhalb der untersuchten Referenzsequenzen wurden 9 Isolate identifiziert, bei denen der Subtyp der LTR nicht dem Subtyp der *env*-Region entspricht (Isolate in Abb. 10 mit Stern markiert). Damit kann die Genotypisierung der LTR bei rekombinanten Viren zusätzliche Informationen zur Mosaikstruktur und damit zu den verwandtschaftlichen Verhältnissen von HIV-1-Isolaten liefern. Die genetische Klassifizierung der untersuchten Mosaikviren entspricht der aktuellen Einteilung der 14 unterschiedlichen CRFs in der HIV-Datenbank (www.hiv-web.lanl.gov/CRFs).

4.1.4.2 Genetische Klassifizierung der LTR des Studienpanels

Die genetische Klassifizierung der erstmalig ermittelten LTR-Sequenzen des Studienpanels erfolgte in einer phylogenetischen Analyse anhand der LTR-Sequenz etablierter Referenzviren des Subtypen-Panels der HIV-Datenbank (Tab. 4; 3.12; Abb. 11). Alle neuen LTR-Sequenzen waren anhand dieser Referenzsequenzen klassifizierbar, d.h. es wurden keine unbekanntes HIV-Varianten identifiziert. Die untersuchten Direktsequenzen und die klonalen Sequenzen wurden derjenigen monophyletischen Gruppe zugeordnet, in der sie in der Baumstruktur liegen (Stammbaum nicht gezeigt). Um eine übersichtliche Darstellung zu ermöglichen, wurde eine zweite Stammbaumanalyse anhand einer reduzierten Auswahl von 38 Referenzsequenzen durchgeführt (ausgewählte Referenzen sind in der Tab. 4 mit einem Index versehen, in Abb. 10 fett gedruckt). Die Klassifizierung der LTR-Sequenzen anhand der ausgewählten Referenzen stimmte mit der Klassifizierung anhand des kompletten Datensets der Referenzsequenzen überein. Die Ergebnisse der phylogenetischen LTR-Analyse des Studienpanels sind in Abbildung 11 dargestellt.

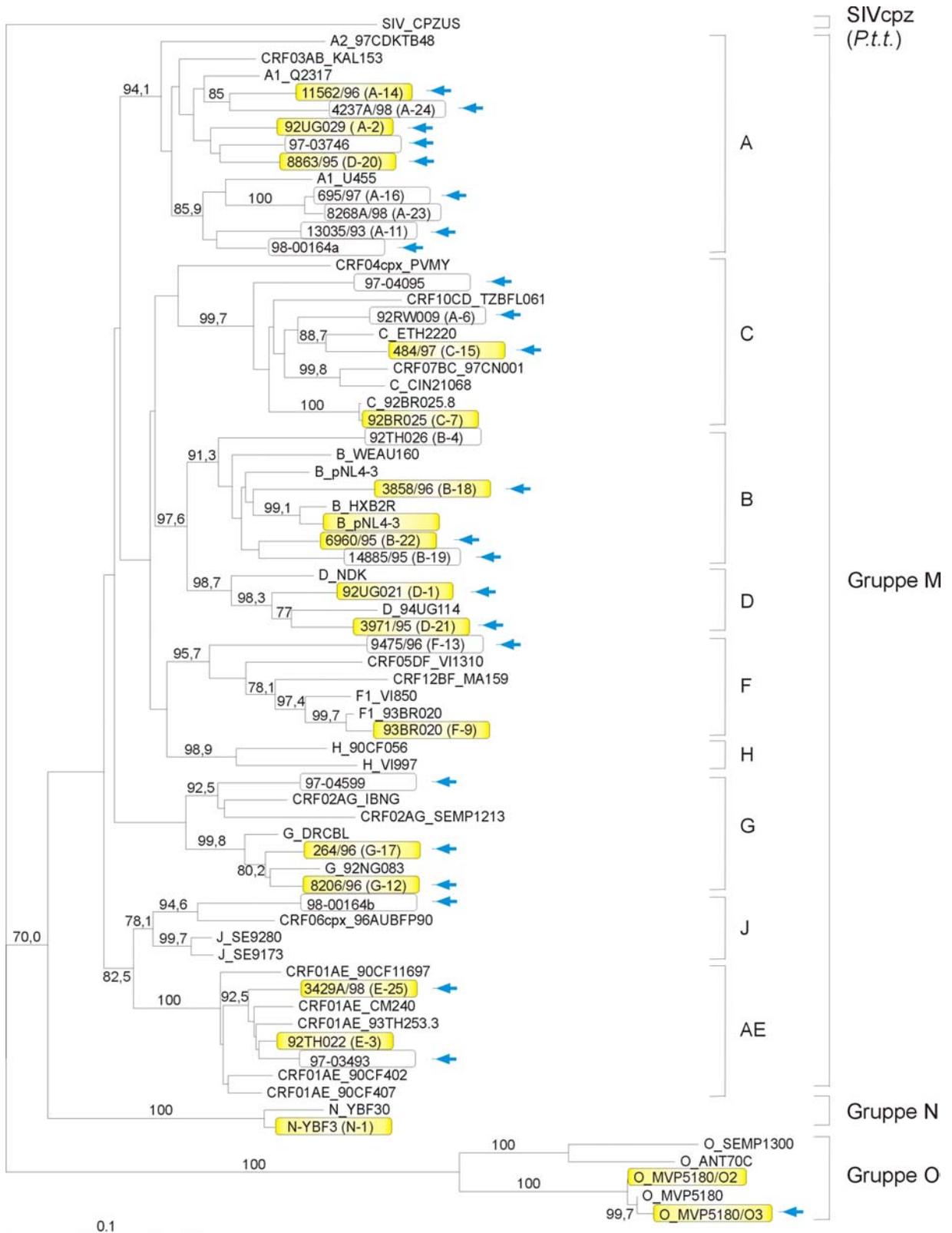


Abb. 11: Phylogenetischer Neighbor Joining Stammbaum der LTR von HIV-1.

Zur besseren Übersicht wurde die phylogenetische Analyse der LTR anhand einer reduzierten Anzahl etablierter Referenzsequenzen durchgeführt (vergl. Abb. 10 und Tab. 4). Der Distanzbalken mit dem Wert 0,1 zeigt die Astlänge an, die einem Nukleotidaustausch von 10% pro Position im Alignment entspricht. Die Signifikanz der Verzweigungsstruktur der Baumtopologie wurde in einer *bootstrap*-Analyse mit 1000 Wiederholungen verglichen (3.12). *Bootstrap*-Werte über 70% werden als signifikant bezeichnet und sind im Stammbaum angegeben. Die Sequenz SIVcpzUS (Acc. AF103818), isoliert von der Schimpansen-Spezies *P. t. troglodytes*, wurde als „Außengruppe“ für die Erstellung der Baumtopologie benutzt.

Die Isolate des Studienpanels sind umrahmt, die für die funktionale Analyse ausgewählten Isolate sind zusätzlich farbig unterlegt, neu klassifizierte LTR-Sequenzen sind mit einem Pfeil markiert.

Anhand der phylogenetischen Analyse mit etablierten Referenzsequenzen konnten 24 neue LTR-Sequenzen klassifiziert werden, darunter auch von 3 Viren des HIV-Referenzpanels (Tab. 4), von denen bisher noch keine LTR-Sequenz vorlag (92UG029, 92TH026, 92UG021). Für die neu klassifizierten HIV-1 LTR-Sequenzen, die alle zur Gruppe M gehören, ergab sich folgende Subtypen-Zuordnung: A: n=8; B: n=4; C: n=2; D: n=2; F: n=1; G: n=2; CRF01_AE: n=3; CRF02_AG: n=1.

Die LTR-Sequenz der Isolate N-YBF30 und O-MVP5180 waren bereits publiziert (Tab. 4), ebenso vier weitere Isolate des Studienpanels (Tab. 14). Allerdings wurde von dem Isolat O-MVP5180 eine klonale Sequenz identifiziert (O-MVP5180/O3), die sich durch eine Insertion von 26 bp von der Datenbanksequenz unterscheidet. Die zweite klonale Sequenz dieses Isolates (O-MVP5180/O2) entspricht der bereits publizierten Sequenz.

Die Subsubtypen A1 und A2 bilden auch in der LTR zwei Untergruppen, wobei alle neu identifizierten Subtyp-A LTRs der Untergruppe A1 zuzuordnen sind. Innerhalb des Subclusters A1 trennen sich das Datenbank-Isolat A1Q2317 und das Studienisolat A-14, die beide aus Kenia stammen, noch einmal von den übrigen A1-Isolaten ab, was ihre enge phylogenetische Verwandtschaft verdeutlicht. Auch das Studienisolat A-24 liegt in dieser Gruppe, seine Herkunft ist jedoch nicht bekannt. Das rekombinante Isolat AB-KAL153 gehört dem Subtyp A an, da die LTR, wie bei der rekombinanten Form CRF03_AB üblich, von einem Subtyp A-Virus abgeleitet ist.

Wie in der HIV-Datenbank beschrieben, liegt bei allen Referenzisolaten vom Typ CRF01_AE die LTR im Cluster des Subtyps E. Die AE-Isolate bilden in der LTR mit 100%iger Signifikanz eine eigene, vom Subtyp A unterschiedliche monophyletische Gruppe des parentalen Subtyps E. Innerhalb der AE-Gruppe formen die thailändischen Isolate, inklusive der aus Thailand stammenden Studienisolate E-3 und E-25, eine Untergruppe, die sich mit einer Signifikanz von 92,5% von den Isolaten aus der Zentral Afrikanischen Republik (CF) abgrenzt.

Innerhalb der *B-clade* grenzen sich das Referenzisolat HXB2R und der in dieser Arbeit untersuchte molekulare Klon pNL4.3 von den übrigen B-Isolaten signifikant ab (*bootstrap* Wert 99,1%). Die 3'LTR dieses Konstruktes stammt von der Sequenz LAV des französischen Isolates LAI (früher BRU), was die enge Verwandtschaft zu dem ebenfalls aus Frankreich stammenden Referenzisolat HXB2R erklären könnte. Zwei aus Paraguay stammende Isolate des Studienpanels (B-22 und B-19) bilden innerhalb der *B-clade* ebenfalls eine Untergruppe. Die B-Isolate insgesamt bilden eine signifikante monophyletische Gruppe, die in enger Verwandtschaft zur D-Gruppe steht.

Auch die *D-clade* ist nach signifikanten Kriterien in 2 Untergruppen geteilt, wobei die aus der Demokratischen Republik Kongo stammende Datenbanksequenz (D-NDK) dem Studienisolat 3971/95 (D-21) aus Tansania und den Isolaten aus Uganda (Studienisolat D-1; Referenz D-94UG11) gegenübersteht.

Innerhalb des Subtyps C bildet das Studienisolat 484/97 (C-15) aus Äthiopien eine Untergruppe mit dem Referenzisolat C-ETH2220, das ebenfalls aus Äthiopien stammt. Das Studienisolat AC-6 liegt ebenfalls in dieser Untergruppe von Subtyp C, was einerseits zeigt, dass die LTR dieses Mosaik-Isolats AC (*env* A, *gag* C) dem Subtyp der *gag*-Region entspricht. Zudem stammt dieses AC-Isolat aus Ruanda und gruppiert sich damit in die *C-clade* der afrikanischen Isolate. Die drei afrikanischen C-Isolate grenzen sich damit von dem C-Isolat aus Brasilien (C-7 = 92BR025) ab. In dem editierten Sequenzalignment fällt auf, dass die LTR der afrikanischen C- und AC-Isolate im Gegensatz zu dem C-Isolat aus Brasilien drei statt der bei HIV-1 üblichen zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF κ B besitzen (Abb. 12). Die asiatischen Isolate CRF_07BC (97CN001, China) und C-IN210689 (Indien) besitzen zwar ebenfalls drei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF κ B, bilden jedoch eine eigene Untergruppe innerhalb der *C-clade*. Das Isolat 97-04095 der Serokonverterstudie stammt zwar aus Äquatorial Guinea, gruppiert jedoch nicht mit den übrigen afrikanischen C-Isolaten.

In der *F-clade* ist das Studienisolat F-9 mit dem ebenfalls aus Brasilien stammenden Datenbank-Isolat 93BR020 enger verwandt als mit dem afrikanischen Isolat VI850.

Die LTR des Isolates 97-04599 (Serokonverter) kann, wie bei der LTR der rekombinanten Form CRF02_AG üblich, dem Subtyp G zugeordnet werden, bildet allerdings gemeinsam mit zwei Datenbanksequenzen der rekombinanten Form A/G eine vom Subtyp G signifikant unterscheidbare monophyletische Gruppe.

Der Vertreter der N-Gruppe N-YBF30 zeigt auch in der LTR-Sequenz eine engere Verwandtschaft zur M-Gruppe als der Vertreter der Gruppe O (O-MVP5180). Die Gruppen M und N sind damit auch in der LTR mit dem Schimpansen-Isolat SIVcpzUS enger verwandt als mit den Isolaten der Gruppe O. Innerhalb der *O-clade* trennen sich zwei Untergruppen mit 100%iger Signifikanz voneinander ab, was auf eine Unterteilung der Gruppe O in

unterschiedliche Subtypen auch hinsichtlich der LTR-Sequenz hinweisen könnte (Yamaguchi *et al.*, 2002).

Die LTR-Sequenzen eines Primärisolates der Serokonverterstudie (98-00164) bildeten zwei klonale Sequenzgruppen. Die Klone der einen Gruppe (98-00164a) waren in der phylogenetischen Analyse dem Subtyp A zuzuordnen, die übrigen Klone (98-00164b) bildeten eine mit dem Subtyp J eng verwandte monophyletische Gruppe mit dem Referenzisolat CRF06_cpx (96AUBF90), dessen LTR der J-Gruppe zugeordnet wird. In dem Patienten lag demnach ein Gemisch von 2 unterschiedlichen Virus-Stämmen, eventuell infolge einer Doppelinfektion, vor. Die Virusanzucht und Verlaufskontrolle dieses Isolates könnte Aufschluss über die Herkunft der beiden Virusvarianten geben.

4.1.4.3 Vergleichende genetische Klassifikation des Studienpanels: LTR, *env* und *gag*

Anhand von Referenzviren der HIV-Datenbank wurde gezeigt, dass sich die LTR generell zur genetischen Klassifikation der LTR eignet (4.1.4.1). Um zu überprüfen, dass dies auch für die neu klassifizierten Isolate zutrifft, wurden die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse der LTR-Sequenzen des Studienpanels (Abb. 11) mit der genetischen Klassifizierung der *gag*- und *env*-Sequenzen dieser Isolate (C. Kücherer, pers. Mitteilung) verglichen.

Tab. 14: Vergleichende phylogenetische Analyse der LTR mit den Genomregionen *env* und *gag*.

Virus	Labor-Code	Herkunft	Genotyp			
			LTR	<i>gag</i> ² p17	<i>env</i> ² C2V5	
a: Isolate, bezogen vom NIH AIDS Research and Reference Reagent Program						
92UG029 ¹	A-2	Uganda	A	◀ A	A	
92RW009 ^R	A-6	Ruanda	A	◀ C	A	
92TH026	B-4	Thailand	B	nd ³	B	
92BR025 ¹	C-7	Brasilien	C	C	C	
92UG021 ¹	D-1	Uganda	D	◀ D	D	
92TH022 ¹	E-3	Thailand	AE	nd ³	AE	
93BR020 ¹	F-9	Brasilien	F	F	F	
YBF30 ¹	N-1	Kamerun	N	nd ³	nd ³	

Virus	Labor-Code	Herkunft	LTR	Genotyp	
				<i>gag</i> ² p17	<i>env</i> ² C2V5

b: Primärisolate, erhalten von L. Gürtler (Universität Greifswald)

13035/93	A-11	Elfenbeinküste	A	◀	A	A
11562/96 ¹	A-14	Kenia	A	◀	A	A
695/97	A-16	Zaire	A	◀	nd ³	nd ³
8268A/98	A-23	nb ⁴	A	◀	nd ³	nd ³
4237A/98	A-24	nb ⁴	A	◀	nd ³	nd ³
3858/96 ¹	B-18	Griechenland	B	◀	B	B
6960/95 ¹	B-22	Paraguay	B	◀	B	B
14885/95	B-19	Paraguay	B	◀	B	B
484/97 ¹	C-15	Äthiopien	C	◀	C	C
8863/95 ^R	D-20	Tansania	A	◀	D	D
3971/95 ¹	D-21	Tansania	D	◀	D	D
3429A/98 ¹	E-25	Thailand	AE	◀	AE	AE
9475/96	F-13	Elfenbeinküste	F	◀	F	F
8206/96 ¹	G-12	Togo	G	◀	G	G
264/96 ¹	G-17	Äthiopien	G	◀	G	G
MVP5180 ¹	O2	Kamerun	O		O	O
MVP5180 ¹	O3	Kamerun	O	◀	O	O

c: Molekularer rekombinanter Klon (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)

pNL4.3 ¹	pNL4.3	USA/ Frankreich	B			
---------------------	--------	-----------------	---	--	--	--

d: Primärisolate aus der Serokonverterstudie des Robert Koch-Institutes

97-03493 ^R		Deutschland	AE	◀	A	AE
97-03746		Deutschland	A	◀	A	A
97-04599 ^R		Deutschland	AG	◀	AG	A
98-00164 ^R		Togo	A/AGJ	◀	A	A
97-04095		Äquatorial Guinea	C	◀	C	C

◀ neue, nicht in der Datenbank publizierte LTR-Sequenz

¹ Konsensussequenz wurde aus den LTR/ pGL3-Klonen ermittelt; diese Sequenzen wurden für die funktionale Analyse der LTR ausgewählt (zusätzlich gelb unterlegt; s. auch Abb. 11)

² Genotyp wurde am RKI bestimmt (C. Kücherer)

³ nd: nicht durchgeführt

⁴ nb: nicht bekannt

^R neu klassifizierte, im Vergleich *env*-LTR oder *gag*-LTR als rekombinant identifizierte Viren

Die phylogenetische Analyse der LTR der untersuchten Isolate von HIV-1 Gruppe M, N und O korreliert weitgehend mit der auf der *env*- und *gag*-Region basierenden Klassifikation der Gruppen und Subtypen (Tab. 14). Das Isolat A-6 ist in der LTR wie auch in der *gag*-Region dem Subtyp C zuzuordnen, in der *env*-Region jedoch dem Subtyp A. Es hat somit eine Mosaikstruktur A/C. Das Primärisolat 97-04599 der nonB-Serokonverter bildet eine monophyletische Gruppe mit CRF02_AG-Isolaten der Datenbank, deren LTR dem Subtyp G zuzuordnen ist. Da das Isolat in der *env*-Region in der A-Gruppe liegt, kann es der rekombinanten Form CRF02_AG zugeordnet werden. Die AE-Isolate bilden in der LTR eine eigene, von A unterschiedliche monophyletische Gruppe AE; in der *env*-Region gehören sie zur A-Gruppe und in der *gag*-Region zur Gruppe AE und werden damit ausschließlich als rekombinante Viren vom Typ CRF01_AE klassifiziert.

Insgesamt wurden unter den neu klassifizierten LTR-Sequenzen 5 Isolate identifiziert, bei denen sich der Subtyp der LTR von dem Subtyp in der *env*- und/ oder *gag*-Region unterschied (A-6, D-20, 97-03493, 97-04599, 98-00164; Tab. 14).

Aus den Ergebnissen folgt, dass sich die LTR-Region zur genetischen Klassifizierung der Subtypen und Gruppen von HIV-1 eignet. Intersubtypische Rekombinationen können anhand der vergleichenden Genotypisierung der LTR mit den Regionen *env* oder *gag* identifiziert werden.

4.1.4.4 Sequenzvarianz der LTR von HIV-1

Die Sequenzunterschiede in der LTR sind hinreichend für die genetische Klassifizierung der Gruppen und Subtypen von HIV-1 und ermöglichen die Genotypisierung der Viren des Studienpanels anhand der LTR-Region (Abb. 11). Anhand der Distanzmatrix wurde die genetische Distanz der LTR des Studienpanels ermittelt (3.12.2). Ausgehend von dem Sequenzalignment aus Studienisolaten und Referenzen (Tab 4 und 5), das auch der Neighbor-Joining-Analyse (Abb. 11) zugrunde liegt, wurde mit dem Modul *Sequence Identity Matrix* des Programms BioEdit zunächst eine paarweise Sequenz-Identitätsmatrix erstellt. Daraus wurde die mittlere prozentuale Sequenzvarianz innerhalb eines Subtyps (*intrasubtyp* Distanz) zwischen den Subtypen der Gruppe M (*intersubtyp*-Distanz) und zwischen den Gruppen M, N und O (*intergruppen*-Distanz) abgeleitet.

Tab. 15: Vergleich der intersubtyp- und intergruppen-Sequenzdivergenz ¹ des LTR-Promotors von HIV-1

Subtyp/ Gruppe	A	B	C	D	AE	F	G	H	J	N	O
A	0	20,7	23,4	21,5	19,9	24,5	19,9	21,0	15,7	28,2	46,7
B		0	20,2	15,8	21,4	22,7	21,1	18,4	17,2	29,7	46,7
C			0	21,3	21,2	22,8	23,0	19,6	16,6	31,2	45,2
D				0	22,6	22,1	20,0	18,8	18,3	30,5	46,1
AE					0	24,8	19,2	20,3	12,2	27,8	43,3
F						0	23,8	22,5	22,0	33,8	45,6
G							0	17,6	16,7	27,1	43,8
H								0	17,2	30,6	43,7
J									0	24,6	42,6
N										0	46,4
O											0
M	19,7										
M:N	29,3										
M:O	44,9										
N:O	46,4										

¹ Die prozentuale Sequenzdivergenz entspricht der Differenz der errechneten Sequenzidentität zu einer theoretischen Sequenzidentität von 100%.

In der HIV-1 LTR des Studienpanels liegt die durchschnittliche intersubtyp-Divergenz der Gruppe M bei 19,7%. Dies entspricht publizierten Daten von ca. 22% (Hunt *et al.*, 2001). In der LTR phylogenetisch nah verwandte Genotypen wie AE und J oder Subtyp B und D (Abb. 11) zeigen eine geringe Sequenzdivergenz (Subtyp J/ CRF01_AE: 12,2% oder Subtyp B/D: 15,8%). Phylogenetisch weit entfernte Subtypen wie Subtyp A und F (Abb. 11) zeigen eine entsprechend größere Sequenzdivergenz (Subtyp A/C: 23,4% oder Subtyp A/F: 24,5%).

Aus den hieraus abgeleiteten Werten der LTR-Sequenz zeigt sich, dass die Distanz zwischen der Gruppe M und der Gruppe N mit 29,3% wesentlich geringer ist als zwischen den Gruppen M und O (44,9%) oder N und O (46,4%), wobei berücksichtigt werden muss, dass für die Gruppe O nur drei, für die Gruppe N nur eine LTR-Sequenz einbezogen werden konnte.

Tab. 16: Vergleich der intrasubtyp- und der intragruppen-Sequenzdivergenz¹ des LTR-Promotors von HIV-1.

Subtyp	A	B	C	D	AE	F	G	O
Sequenz-Divergenz	17,0	10,7	10,4	13,6	6,3	12,7	9,3	25,0

¹Die prozentuale Sequenzdivergenz entspricht der Differenz der errechneten Sequenzidentität zu einer theoretischen Sequenzidentität von 100%.

Von den Subtypen H und J und von der Gruppe N wurde jeweils nur eine Sequenz analysiert; eine intrasubtyp -Distanz konnte somit nicht bestimmt werden.

Innerhalb eines Subtypen-Clusters der Gruppe M liegt die Sequenzdivergenz der LTR einzelner Isolate zwischen 17,0% (Subtyp A) und 6,3% (CRF01_AE). Innerhalb der Gruppe O unterscheiden sich die LTR-Sequenzen um 25%. Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit einer Studie zur phylogenetischen Analyse der *gag*-, *pol*- und *env*-Region von Gruppe O-Isolaten, für deren 5 bislang charakterisierte Cluster innerhalb der Gruppe O eine den Subtypen der Gruppe M ähnliche genetische Distanz ermittelt wurde (Yamaguchi *et al.* 2002).

4.1.5 Vergleichende Promotororganisation in der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O

Zur Identifikation struktureller Unterschiede in der Enhancer-/ Promotor-Region von HIV-1 wurden die Sequenzen der transkriptions-regulierenden Elemente der LTR von HIV-1 Gruppen und Subtypen in einem *ClustalW*-Alignment verglichen. Zur besseren Übersicht wurden die 30 LTR-Sequenzen des Studienpanels im Folgenden mit einer nochmals reduzierten Auswahl von Datenbanksequenzen dargestellt (Tab. 4; Abb. 12).

Anhand des Alignments (Abb. 12) wurden Sequenzunterschiede in den transkriptions-regulierenden Elementen der LTR analysiert. Dazu gehören *cis*-regulatorische DNA-Sequenzen mit Bindungsmotiven für Transkriptionsfaktoren sowie die HIV-1-spezifische TAR-RNA.

Es wurden neue isolat- und subtyp-spezifische Strukturunterschiede identifiziert und bereits publizierte Befunde bestätigt (Montano *et al.*, 1998; Naghavi *et al.*, 1999; Jeeninga *et al.*, 2000).

Im Folgenden werden die aktivierenden regulatorischen Elemente des *core*-Promotors, der Enhancer-Region, sowie der stromaufwärts gelegenen Elemente und der TAR-RNA untersucht, anschließend werden die reprimierenden Elemente hinsichtlich gruppen- oder subtyp-spezifischer Unterschiede analysiert.

4.1.5.1 Vergleich der basalen Promotorregion

Der minimale funktionale Promotor von HIV-1 liegt in der U3-Region der LTR und umfasst die Positionen –78 bis –1 (Pereira *et al.*, 2000). Er besteht aus dem TATAA-Element, der Initiator-Sequenz und den drei Bindungsstellen für Sp1 (Jones, 1986; Garcia *et al.*, 1987; Zenie-Gregory *et al.*, 1993). Die Elemente des *core*-Promotors sind sowohl für die basale als auch für die transaktivierte Transkription von HIV-1 essentiell (Roebuck und Saifuddin, 1999).

Das **TATAA-Element**, in der HIV-1 LTR im Bereich –23 bis –27 stromaufwärts des Transkriptionsstarts +1 (Pereira *et al.*, 2000) lokalisiert (TATAA⁻²⁸), fungiert als Erkennungs- und Bindungssequenz des TATAA-Bindungsproteins (TBP). TBP ist ein Bestandteil des Initiationsfaktors TFII-D, der durch die Bildung des Präinitiationskomplexes an der TATAA-Box die Einleitung der Transkription von HIV-1 bewirkt. Da TBP zudem mit dem Transaktivator Tat interagiert, spielt die TATAA⁻²⁸-Box eine Schlüsselrolle für die basale wie auch für die Tat-aktivierte Transkriptionsaktivität der LTR (Gaynor, 1992; Roebuck und Saifuddin, 1999; Karn, 1999; Kashanchi *et al.*, 1994; Majello *et al.*, 1998).

Das TATAA⁻²⁸-Motiv ist in den untersuchten Isolaten weitgehend konserviert. Ausnahmen bilden alle bereits bekannten oder hier neu identifizierten Viren vom Typ CRF02_AE. Das TATAA-Motiv in Position –28 entspricht hier nicht der regulären Sequenz TATAA, sondern ist durch einen Nukleotidaustausch zu TAAAA abgewandelt. Auch der Vertreter der N-Gruppe (YBF30) zeigte diese Modifikation. Bei den Referenzviren vom Typ CRF06_cpx (96AUBF90) und CRF02_AG (98SEMP1213) konnte das modifizierte TATAA-Motiv ebenfalls identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Dafür befindet sich bei einem Isolat des Studienpanels CRF01_AE (E-3) 136 nt stromaufwärts vom Transkriptionsstart ein reguläres TATAA-Motiv, das im weiteren als TATAA⁻¹³⁶-Box bezeichnet wird. Der Verlust der regulären TATAA⁻²⁸-Box von CRF01_AE-Promotoren scheint keinen Einfluss auf die Promotoraktivität zu haben, weshalb die CRF01_AE-LTR zur Klasse der Promotoren ohne TATAA-Box gezählt wird (Jeeninga *et al.*, 2000).

Alle bisher bekannten Isolate der Gruppe O besitzen wie die Subtypen der M-Gruppe ein reguläres TATAA-Element.

Die drei **Sp1-Bindungsstellen** für den Transkriptionsfaktor Sp1 (*stimulating protein 1*) sind bei HIV-1 stromaufwärts des TATAA-Elementes, im Bereich –46 bis –78 relativ zum Transkriptionsstart lokalisiert (Jones *et al.*, 1986). Die *core*-Sequenz dieser Bindungsstellen ist GGCG, wobei die dritte Position C einen geringeren Informationsgehalt für die Funktionalität dieser Bindungsstelle besitzt. Die Bindung von Sp1 hat einen aktivierenden Einfluss auf die Transkription von HIV-1. Zudem gibt es Interaktionen zwischen den Bindungsproteinen der Sp1-*sites*, dem TATAA-Element und dem Tat-Protein. Sp1 ist somit ebenfalls für die basale Transkription wie auch für die Tat-vermittelte Transaktivierung der HIV-1 LTR essentiell (Sune und Garcia-Blanco, 1995).

Die Sp1-Bindungsstellen sind bei allen Subtypen und auch innerhalb der Gruppe O unterschiedlich gut konserviert, wobei die mittlere Sp1-*site* II am stärksten konserviert ist. Die *core*-Sequenz dieser Sp1-*site* II ist in der Gruppe O und innerhalb der Gruppe M bei allen Subtypen konserviert. Allerdings variiert die dritte Nukleotidposition bei den G-Isolaten und bei den CRF02_AG-Isolaten. Auffällig ist der Verlust dieser Sp1-*site* II bei dem Isolat N-YBF30 und dem Studienisolat A-2, was jedoch nicht auf den Großteil der A-LTRs zutrifft. In den äußeren Bindungsstellen Sp1 I und Sp1 III variiert die *core*-Sequenz stärker. In der Sp1-*site* I entspricht sie nur bei B-Isolaten der Sequenz GGCG; sie ist spezifisch GGCC für alle C-Isolate und vorwiegend GGCT für die restlichen Subtypen der Gruppe M sowie für die Gruppe N und O. Auffällig ist jedoch die gleiche Deletion eines Nukleotides bei den beiden Thailändischen C-Isolaten C-15 und C-ETH2220 und bei beiden D-Isolaten des Studienpanels (D-1 und D-21). In der Sp1-*site* III ist die *core*-Sequenz konserviert für Subtyp D und F (außer Studienisolat F-13). Subtyp C und Gruppe O-Isolate haben die gleiche von anderen Isolaten unterschiedliche *core*-Sequenz. Ebenso zeigen die A-, AE- und AG-Isolate und das N-Isolat die gleiche Sp1 III *core*-Sequenz.

Das Initiator-Element (INR) reguliert in Promotoren, die ein TATAA-Element besitzen, vor allem die Stärke der Promotoraktivität (Gaynor, 1992). Die HIV-1 LTR enthält zwei potentielle Initiator-Elemente, eines in Position –2 bis +8 relativ zum Transkriptionsstart +1, ein zweites in Position +32 bis +41. Damit überlappen diese Elemente mit der stromabwärts gelegenen TAR-DNA. Mutationen in der Region –2 bis +8 führten zu einer Reduktion der viralen Genexpression, was auf eine wichtige Funktion bei der Transkriptionsregulation schließen lässt (Gaynor, 1992; Montano *et al.*, 1996). Die Sequenz von Position +1 bis +6 relativ zum Transkriptionsstart ($G^{+1}GGTCT$) ist essentiell für die Funktion des INR-Elementes bei HIV-1 (Rittner *et al.*, 1995).

Die funktionale Sequenz $G^{+1}GGTCT$ des Initiator-Elementes ist in allen Isolaten der Gruppe M, N und O identisch. Die erweiterte INT-Sequenz, also die Positionen -1 und -2 , sowie $+7$ und $+8$ relativ zum Transkriptionsstart, sind ebenfalls identisch für die Gruppe M und N. Die Gruppe O unterscheidet sich hier, wobei die Sequenz auch bei verschiedenen Isolaten innerhalb der O-Gruppe variiert.

AP-1 I

NF-AT II

NF-AT III

AP-1 II

COUP/AP-1 III

AP-1 I: -320 -330 -340 -350 -360 -370 -380 -390 -400 -410 -420 -430
NF-AT II: -320 -330 -340 -350 -360 -370 -380 -390 -400 -410 -420 -430
NF-AT III: -320 -330 -340 -350 -360 -370 -380 -390 -400 -410 -420 -430
COUP/AP-1 III: -320 -330 -340 -350 -360 -370 -380 -390 -400 -410 -420 -430

B-HXB2R
B-18/1
B-22/1
B-NL4_3/2
PCR_B-4
PCR_B-19
A1-U455
A-2/4
A-14/2
PCR_A-11
PCR_AC-6
PCR_A-16
PCR_A-23
PCR_A-24
A_97-03746
PCR_A-20
AE-93TH253
AE-90CF402
AE-3/1
AE-25/1
AE-97-0349
C-ETH2220
C-15/2
C-97-04095
C-92BR025
C-7/1
D-NDK
D-1/3
D-21/9
F1-93BR020
F-9/4
PCR_F-13
G-92NG083
G-12/1
G-17/3
AG-IBNG
A-97-04599
H-90CF056
J-SE280
L.A. N-YBF
N-YBF3/3
O-MVP5180
O-5180-02/3
O-5180-03/8

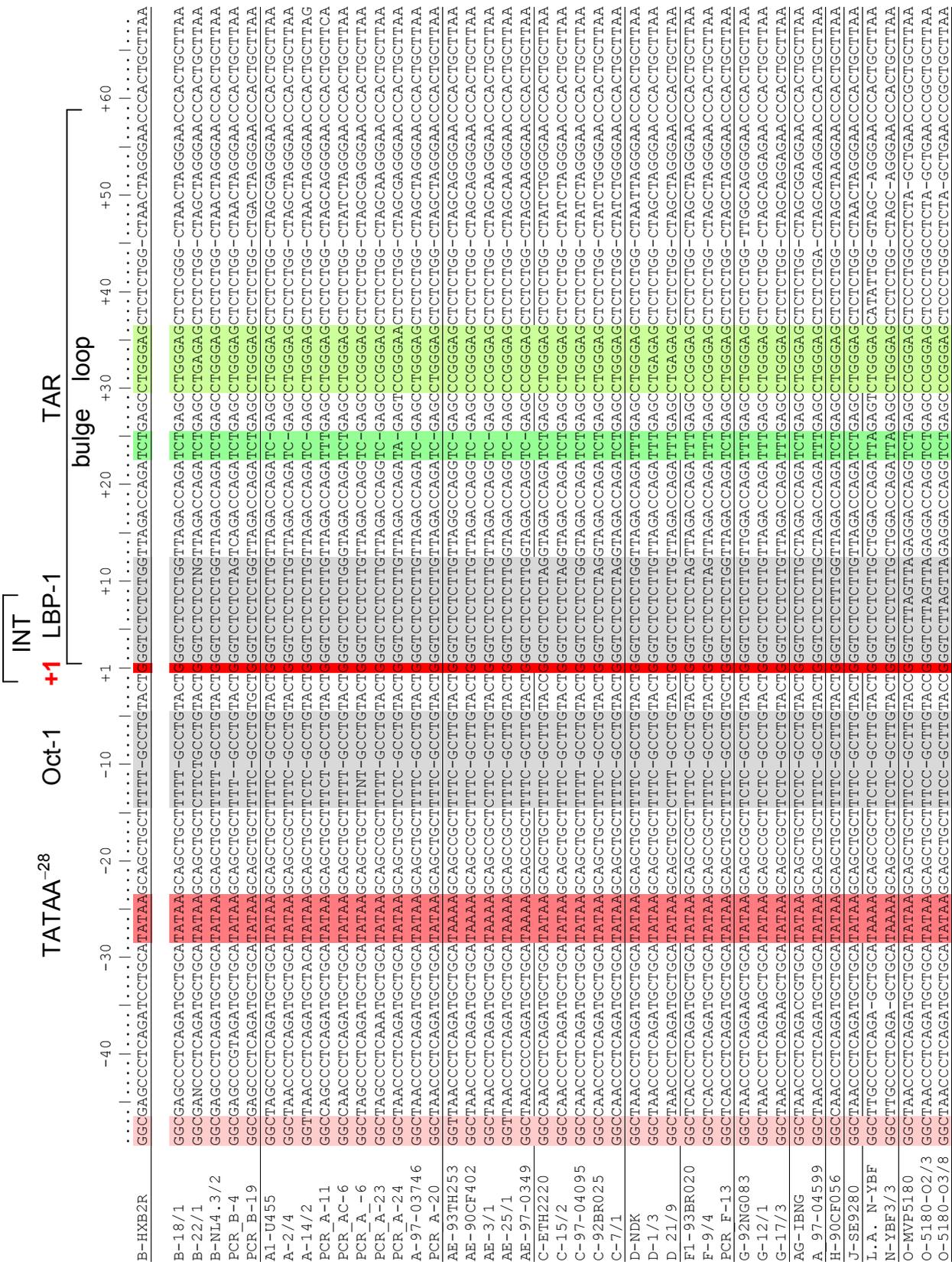


Abb. 12: Sequenzvergleich des LTR-Promotors von HIV-1 Gruppe M-, N- und O-Viren.

Die neu klassifizierten klonalen und PCR-Konsensus-LTR-Sequenzen des Studienpanels wurden mit ausgewählten Referenzen der HIV-Datenbank (Tab. 4; Abb. 10) aligniert (ClustalW). Das Alignment wurde manuell so editiert (Software SeAl, A. Rambaut), dass die mit dem Programm MatInspector (www.genomatix.de) und die anhand publizierter Daten identifizierte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren keine Lücken (*gaps*) enthielten. Die Anordnung der LTR-Elemente wurde relativ zur Subtyp B LTR-Sequenz HXB2R (Acc. K03455) vorgenommen und es wurden, soweit vorhanden, Informationen über funktionelle *core*-Sequenzen der einzelnen Bindungsstellen berücksichtigt. Die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sind in dem erzeugten Alignment blockweise farbig unterlegt.

4.1.5.2 Vergleich der NF κ B-Enhancer-Region

Direkt stromaufwärts der Sp1-Bindungsstellen befinden sich die Bindungsstellen für den induzierbaren T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor NF κ B (*nuclear factor B*; Nabel und Baltimore, 1987). Nach zellulären Aktivierungssignalen der infizierten Zelle gelangt er in aktivierter Form in den Kern, um dort die Transkriptionsaktivität der LTR zu steigern (Kretzschmar *et al.*, 1992). Zahlreiche Studien belegen, dass die Bindungssequenz *GGGACTTTCC* für die NF κ B-abhängige Aktivierung der HIV-1 Transkription in T-Zellen essentiell ist, wobei auf der LTR zwei NF κ B-Bindungsstellen üblich sind (Nabel und Baltimore, 1987; Montano *et al.*, 1996). Die bei Subtyp C-Isolaten charakteristische Sequenzvariation der NF κ B-*site* *GGGCGTTCC* bedeutet anscheinend keinen Bindungsverlust für NF κ B p50:p65, weshalb man annimmt, dass die C-LTR üblicherweise mit drei NF κ B-*sites* ausgestattet ist (Montano *et al.*, 1997). Die für AE-Isolate charakteristische Veränderung der NF κ B II-*site* zu *AGGACTT_CC* bedeutet dagegen einen Verlust der Funktionalität dieser Bindungsstelle für NF κ B (Montano *et al.*, 1997). Allerdings entspricht diese veränderte Sequenz der von Verhoef *et al.* charakterisierten Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor GABP, der an die in den thailändischen wie auch in den afrikanischen AE-Isolaten identifizierte Sequenz *ACTTCCG* bindet (Verhoef *et al.*, 1999).

Die Anzahl der NF κ B-Bindungsstellen ist bei den Isolaten des Studienpanels, abgesehen von wenigen Ausnahmen, spezifisch für die Subtypen der Gruppe M (Abb. 12).

Die für die LTR vom Subtyp C charakteristische Anordnung von drei aufeinanderfolgenden funktionellen NF κ B-Bindungsstellen wurde bei zwei Isolaten des Studienpanels (C-15 und AC-6) sowie bei dem Referenzisolat C-ETH2220 identifiziert. Wie in der phylogenetischen Analyse (Abb. 11) gezeigt werden konnte, bilden diese drei afrikanischen Isolate eine Untergruppe innerhalb des Subtyps C. Interessanterweise konnte diese C-typische Anordnung auch in einem Datenbank-Isolat der rekombinanten Form CRF08_BC (Gx-7F) identifiziert werden, dessen LTR allerdings dem Subtyp B zugeordnet wird (Piyasirisilp *et al.*, 2000).

In der bereits publizierten LTR-Sequenz des Isolates 92BRO25 (Acc. U52953), das als Isolat C-7 dem Studienpanel angehört, wurden dagegen nur zwei funktionale Bindungsstellen für NF κ B identifiziert. Eine Subtyp-C-Referenzsequenz besitzt dagegen sogar 4 vollständige NF κ B-*sites* (96BW0504). Die beiden neu identifizierten Subtyp C-LTRs (C-15 und AC-6) besitzen somit drei Bindungsstellen für NF κ B, generell kann die Anzahl jedoch zwischen zwei und vier variieren.

Bei den CRF01_AE-Isolaten des Studienpanels wurde, wie für die AE-LTR bisher beschrieben, nur eine vollständige Erkennungssequenz für NF κ B identifiziert (NF κ B I), die potentielle NF κ B II-*site* hatte eine unvollständige Sequenz (AGGACTT_CC) mit mindestens zwei Nukleotidaustauschen im Vergleich zur funktionalen Sequenz (s.o.). Das Isolat der Gruppe N ist mit mindestens zwei funktionalen NF κ B-Bindungsstellen ausgestattet. Hier liegt ein potentielles drittes NF κ B-Element vor, das sich durch den Austausch von zwei Nukleotiden von der funktionalen Variante unterscheidet (Abb. 12).

Vom Isolat MP5180 als Vertreter der Gruppe O lag in der Datenbank eine Sequenz mit zwei NF κ B-Bindungsstellen vor. Das von L. Gürtler stammende Isolat wurde in der Arbeitsgruppe auf H9-Zellen vermehrt (3.2.3). Bei der Sequenzierung der LTR stellte sich heraus, dass ein Gemisch von zwei Virusvarianten vorlag: eine Variante des Isolates O-MVP5180 hatte zwei (O-5180/ O2), die andere Variante hatte drei NF κ B-Bindungsstellen (O-5180/ O3, vgl. Abb. 12).

Der NF κ B-Enhancer von HIV-1 weist damit in der LTR von Subtyp C, CRF01_AE und eventuell in der LTR der Gruppe N spezifische Unterschiede auf. Drei Bindungsstellen für NF κ B sind nicht zwingend charakteristisch für die LTR vom Subtyp C. Die Anzahl der NF κ B-Bindungsstellen variiert innerhalb der Gruppe M und eventuell auch bei Viren der Gruppe N und O.

4.1.5.3 Vergleich der stromaufwärts gelegenen Bindungsstellen für Transaktivatoren

Stromaufwärts des NF κ B-Enhancers der LTR sind zahlreiche spezifische Bindungsstellen für modulierende Transkriptionsfaktoren lokalisiert, die je nach Zelltyp und Aktivierungsstadium der Zelle aktivierend oder reprimierend auf die LTR einwirken (Gaynor, 1992; Jeang *et al.*, 1996; Roebuck und Saifuddin, 1999). Im Folgenden soll lediglich auf diejenigen eingegangen werden, für die eine spezifische Bindung an die LTR und ein eindeutig positiver oder negativer Einfluss auf die Transkription von HIV-1 nachgewiesen werden konnte.

Die Bindungsstellen dieser Transkriptionsfaktoren werden, ausgehend vom NF κ B-Enhancer, in aufsteigender Reihenfolge besprochen (Abb. 12).

LEF-1 (*lymphoid enhancer-binding factor-1*) bindet in der Region -142 bis -122 der HIV-LTR an die *core*-Erkennungssequenz CAAGA und aktiviert die Transkription von HIV-1 in Lymphozyten (Jones und Peterlin, 1994).

Die Bindungsstelle für LEF-1 ist hoch konserviert für alle Subtypen der Gruppe M sowie für das N-Isolat. Eine Abänderung im ersten Nukleotid der *core-site* von LEF-1 findet man bei den Isolaten des Studienpanels AC-6, AE-3, AE-97-03493 und in den Datenbanksequenzen A1_U455, AE_93TH253, CRF12_BF (MA159) und CRF02_AG (HH8793.1). Auffallend daran ist, dass dieser Austausch bei den genannten Isolaten zur Bildung eines stromaufwärts gelegenen TATAA-Motivs führt. Dieses TATAA⁻¹³⁶-Motiv wurde als Ausnahmeerscheinung einiger CRF-AE-LTRs beschrieben, in dieser Arbeit wurde es jedoch nicht nur in zwei AE-LTRs (AE-3, AE-97-03493), sondern auch in einer neu charakterisierten Subtyp C-LTR (AC-6) identifiziert. In den beiden F-Isolaten F-9 und F1_93BR020 unterscheidet sich das zweite Nukleotid der LEF-1-*site* von allen anderen Isolaten. Die LEF-1-*site* der Gruppe O-Viren unterscheidet sich spezifisch von allen anderen Isolaten.

Die **ETS**-Bindungsstelle ist eine purinreiche Sequenz, die in der Region -140 bis -160 der HIV-1 LTR lokalisiert ist. Der vor allem in lymphoiden Zellen exprimierte Transkriptionsfaktor ETS-1, bindet in der LTR von HIV-1 an die *core*-Sequenz C/A GGA A/T (Holzmeister *et al*, 1993; Wasylyk *et al*, 1993).

Die *core*-Sequenz des Bindemotivs für den Transkriptionsaktivator ETS-1 ist hoch konserviert bei den Subtypen der Gruppe M und bei dem N-Isolat N-YBF30. Die beiden Isolate des Studienpanels A-16 und A-23 sowie alle Isolate mit einer AE-LTR unterscheiden sich jedoch durch einen Nukleotidaustausch (GGA \rightarrow AGA) von der *core*-Sequenz der übrigen Isolate. Interessanterweise stimmt sie darin mit der *core*-Sequenz der O-Isolate (MVP5180; SEMP1300 und ANT70; Daten jedoch nicht gezeigt) überein. Die Referenzisolate CRF12_BF (MA159) und CRF05_DF (VI1310) besitzen diese Sequenz ebenfalls.

Die flankierenden Bereiche der ETS-Bindungsstelle sind variabler und lassen keine subtypspezifischen Unterschiede erkennen. Das Isolat der Gruppe N entspricht jedoch auch hier und damit vollständig dem ETS-1-Motiv des Subtyps B.

Das O-Isolat MVP5180 und die zwei AE-Isolate (Studienisolat AE-25 und Datenbanksequenz 90CF402) unterscheiden sich dagegen auch in diesen Sequenzen von den übrigen Isolaten der Gruppe M. Die Isolate der Gruppe O zeigen insgesamt keine Übereinstimmung mit der funktionalen ETS-Bindungssequenz.

USF (*upstream stimulating factor*) kann je nach Zelltyp sowohl positive als auch negative Effekte auf die LTR-gesteuerte Transkription von HIV-1 haben, wobei dieser duale zelltypspezifische Effekt von USF unabhängig vom Subtyp der LTR ist (Naghavi *et al.*, 2001). In der HIV-1 LTR bindet USF innerhalb der Region –166 bis –161 an das Motiv CAC(A/G)TG (Gaynor, 1992; Naghavi *et al.*, 2001). Für Bindungsstellen, die von dieser Sequenz abweichen, konnte keine Bindung von USF nachgewiesen werden (Naghavi *et al.*, 2001).

Die *core*-Sequenz CACATG der Bindungsstelle für USF zeigt überwiegend spezifische Muster für die Subtypen und Gruppen (Abb. 12).

Die meisten Isolate von Subtyp C, einschließlich der untersuchten Studienisolate C-7 und C-15, stimmen mit der *core*-Sequenz überein. Das Primärisolat 97-04095 ist mit der Abänderung zu CACATC eine Ausnahme innerhalb der C-Gruppe. Die meisten B-Isolate, wie das Subtyp-B Referenzisolat HXB2R und die Isolate des Studienpanels B-18 und B-4 entsprechen der *core*-Sequenz. Die Isolate NL4-3 und B-22 unterscheiden sich in einem Nukleotid (CACGTG) von der *core*-Sequenz. Die übrigen Subtypen entsprechen der *core*-Sequenz von USF nicht, sind jedoch vorwiegend spezifisch für die Vertreter eines Subtyps. Die LTR vom Subtyp D entspricht nicht generell der *core*-Sequenz von USF; das Studienisolat D-1 entspricht hier dem B-spezifischen Motiv, das Isolat D-21 nicht.

Die USF-Sequenzen aller Isolate mit einer AE-, F- und J-LTR sind damit identisch, entsprechen jedoch nicht der *core*-Sequenz. Die USF-Sequenz der Subtyp-A-Isolate ist dagegen sehr variabel.

Die Isolate der Gruppen N und O enthalten die *core*-Sequenz von USF ebenfalls nicht.

Der 5'-Bereich der USF-Bindungsstelle läßt zwar teilweise subtypspezifische Muster erkennen, jedoch weniger deutlich als in der *core*-Sequenz. Hier ähneln sich andere Subtypen, und die Varianz zwischen den Vertretern eines Subtyps ist stärker ausgeprägt.

Das N-Isolat und die Isolate von Gruppe O unterscheiden sich von der M-Gruppe und sind auch im Vergleich zueinander heterogen (Daten für O-ANT70 und O-SEMP1300 nicht gezeigt).

Die Lokalisation der purinreichen Bindungssequenzen für den T-Zell-spezifischen aktivierenden Transkriptionsfaktor **NF-AT** (*nuclear factor of activated T-cells*) mit der *core*-Sequenz GAAA (MatInspector) ist in verschiedenen Arbeiten unterschiedlich beschrieben. Nach Pereira *et al.* ist in der LTR von HIV-1 eine Bindungsstelle für NF-AT im Bereich –254 bis –216 relativ zum Transkriptionsstart lokalisiert (Pereira *et al.*, 2000). Andere Publikationen gehen von zwei Bindungsstellen für NF-AT aus, die in einem Abstand von ca. 40 Nukleotiden in der gleichen Region lokalisiert sind (Gaynor, 1992; Montano *et al.*, 1997), während in einer weiteren Studie drei NF-AT-*sites* in der modulatorischen Region der LTR identifiziert wurden (De Baar *et al.*, 2000).

In den Isolaten des Studienpanels konnten drei Sequenzbereiche mit potentiellen Bindungsstellen für NF-AT (NF-AT III, NF-AT II, NF-AT I) identifiziert werden (Abb. 12). Die Anzahl der *core*-Sequenz GAAA variiert für die Gruppen und Subtypen.

Die NF-AT I-*site* ist in den A- und B-Isolaten weitgehend identisch. Die *core*-Sequenz wurde jedoch nur in den AE-Isolaten, mit Ausnahme des Isolates 97-03493, und in einem Datenbank-Isolat mit Subtyp-J LTR (SE9280) identifiziert. In den übrigen Isolaten lässt sich keine Spezifität des Subtyps erkennen. In der NF-AT II-*site* besitzen alle AE-Isolate die *core*-Sequenz, ebenso wie das J-Isolat SE9280 und ein B-Isolat des Studienpanels (B-4). In allen anderen Isolaten unterscheidet sich die *core*-Sequenz meist um ein Nukleotid, jedoch nicht subtyp-spezifisch. In der NF-AT III-*site* wurde die *core*-Sequenz in allen F-Isolaten und in zwei B-Isolaten des Studienpanels gefunden (B-18 und B-22).

In dem Isolat N-YBF30 und O-MVP5180 wurde keine *core*-Sequenz für NF-AT identifiziert, das Referenzisolat O-ANT70 C besitzt die *core*-Sequenz in der NF-AT III-*site*.

Der Faktor **AP-1** (*activator protein-1*) bindet am 5'-Ende der LTR an zwei bis drei potentielle Bindungsstellen mit der *core*-Sequenz TGA, wobei die am weitesten stromaufwärts gelegene AP-1-*site* mit einer Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor COUP überlappt (Gaynor, 1992). Eine kompetitive Hemmung der beiden Transkriptionsfaktoren an ein und derselben Bindungsstelle der LTR wird diskutiert (Jeang *et al.*, 1996). AP-1 spielt eine zelltyp-spezifische, aktivierende Rolle bei der Transkription von HIV-1 (Pereira *et al.*, 2000).

Die Anzahl der *core*-Sequenzen variiert in den untersuchten Isolaten zwischen eins und drei (AP-1 III, AP-1 II, AP-1) in Abhängigkeit vom Subtyp der LTR.

Bei den meisten Subtyp-B-Viren wurde die *core*-Bindungsstelle in dreifacher Ausführung identifiziert. Das Isolat B-18 dagegen besitzt nur die mittlere AP1-II-*site*. Bei fast allen

Subtyp-A-Isolaten ist nur die mittlere AP-1 II-*site* vorhanden. Ausnahmen sind das Isolat A-6 mit drei AP1-*sites* und das Isolat A-11, in dem keine AP-1-*site* identifiziert wurde.

Die Subtyp-C- und Subtyp-F-Isolate sind generell mit drei AP-1-*sites* ausgestattet, die einzige Ausnahme innerhalb des Subtyps C ist das Isolat ETH2220, dem die AP-1-*site* I fehlt. Allen Subtyp-D-Isolaten fehlt die AP-1 I-*site*, dagegen fehlt der rekombinanten Form CRF01_AE die AP-1 III-*site*; einzige Ausnahme ist das Isolat AE-25, bei dem nur die AP-1-*site* I identifiziert werden konnte. Die Isolate vom Subtyp G sowie die CRF02_AG-Rekombinanten besitzen nur die AP-1 III-*site*, ebenso die H-Isolate aus der Datenbank. Die Referenzisolate vom Subtyp J enthalten die Bindungsstellen AP-1 III und AP-1 II.

Im Vergleich der Gruppen sind die Unterschiede dagegen deutlicher. Im Gegensatz zu den M-Viren wurde bei dem N-Isolat N-YBF30 keine *core*-Sequenz für AP-1 identifiziert, die O-Isolate dagegen besitzen die AP-1 III-Bindungsstelle. Vermutlich kann man aber auch hier eine größere Varianz erwarten, wenn eine größere Anzahl sequenzierter Isolate zur Verfügung stehen.

4.1.5.4 Vergleich des TAR-RNA-Elements

Das TAR-Element (*trans-activation response*) ist maßgeblich an der Regulation der Transkription von HIV-1 beteiligt. Die Sequenz des TAR-Motivs umfasst die Region +1 bis +59. Während der basalen Transkription werden mRNA-Moleküle transkribiert, die am 5'-Ende das funktionale TAR-Motiv, eine RNA-Sekundärstruktur ausbilden. Diese besteht aus einem Stamm (*stem*), einer Blase am Stamm aus 3 Nukleotiden (*bulge*) und einer 6 Nukleotide langen Schleife (*loop*). Die *bulge*-Sequenz ist essentiell für die Bindung von Tat, dem Transaktivator der HIV-1 LTR, wobei diese Bindung von der *stem-loop*-Struktur beeinflusst wird.

Das TAR-RNA-Element ist bei allen HIV-Isolaten stark konserviert. Die *bulge*-Sequenz zeigt teilweise subtyp-spezifische Unterschiede. Sie besteht üblicherweise aus drei Nukleotiden, meist TCT (Abb. 12). Diese Sequenz ist bei Subtyp-D und bei Subtyp-G-Isolaten und bei einem analysierten Subtyp-F-Isolat (F-9) zu TTT verändert. Auch die Mehrzahl der rekombinanten Form CRF02_AG, zu der auch ein Isolat der Serokonverterstudie gehört (97-04599), tragen die *bulge*-Sequenz TTT.

Alle AE-Isolate unseres Studienpanels haben eine spezifische Deletion eines Nukleotides in der *bulge*-Sequenz, wodurch TCT zu TC_ verändert ist. Diese Deletion gilt zwar als

Besonderheit der AE-LTR, konnte jedoch auch in beiden Studienisolaten vom Subtyp A (A-2 und A-14) und in einem Referenzisolat (A-U455) identifiziert werden (Montano *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 1996; Jeeninga *et al.*, 2000).

Auffällig ist die abgewandelte *bulge*-Sequenz des N-Isolates zu TTA, während das O-Isolat MVP5180 sowie die Gruppe O-Referenzisolate der Datenbank (O-ANT70C und O-SEMP1300) eine mit der Gruppe M identische *bulge*-Sequenz besitzen.

Die *loop*-Sequenz der TAR-RNA, vor allem der 3'-Bereich, ist innerhalb der Gruppe M hoch konserviert. Die *loop*-Sequenz ist identisch für alle Isolate des Studienpanels vom Subtyp B, C, D, G sowie für fünf der acht untersuchten A-Isolate, für das AC-Isolat und für das AG-Isolat 97-04599. Die beiden 5'-Nukleotide der *loop*-Sequenz unterscheiden sich jedoch spezifisch in den Isolaten der rekombinanten Form CRF01_AE. Die drei übrigen A-Isolate und ein Studienisolat mit Subtyp-F-LTR besitzen diese abgeänderte *loop*-Sequenz ebenfalls.

Die Gruppe N stimmt in der *loop*-Struktur mit der Konsensus-Sequenz der M-Gruppe überein, die O-Isolate dagegen sind nur identisch mit den AE-Isolaten.

4.1.5.5 Vergleich der reprimierenden Strukturelemente

Die LTR enthält auch Bindungsstellen für DNA-Bindungsproteine, die als Repressoren der HIV-1-Transkription fungieren. Dazu gehören die Bindungsstellen für Oct-1 und LBP-1. Sie sind direkt benachbart (Oct-1) oder überlappend (LBP-1) zur Initiator-Sequenz lokalisiert.

Oct-1. Die Bindungssequenz für Oct-1 *TTTTGCCT* befindet sich in Position –7 bis –14 relativ zum Transkriptionsstart (Roebuck und Saifuddin, 1999; Pereira *et al.*, 2000). Oct-1 (*octamer binding protein-1*) unterdrückt sowohl die basale als auch die Tat-aktivierte Transkription von HIV-1 (Liu *et al.*, 1997).

Die komplette DNA-Erkennungssequenz für Oct-1 wurde nur bei wenigen Isolaten mit einer LTR von Subtyp A, B und C identifiziert. Dazu gehören die B-Isolate B-18, NL4-3 und das Referenzisolat HXB2R, sowie die Isolate A-23, AC-6 und das Primärisolat 97-04095 (Serokonverter).

Die übrigen Isolate besitzen eine davon variante Sequenz mit ein bis zwei veränderten Nukleotiden im stromaufwärts gelegenen Sequenzbereich der potentiellen Oct-1-Bindungsstelle. Der jeweilige Nukleotidaustausch ist identisch für alle AE-Isolate und für die meisten

Isolate von Subtyp C, D und F. Bei Subtyp G, H und J und bei CRF02_AG ist der stromaufwärts gelegene Sequenzbereich von Oct-1 stärker verändert.

Das N-Isolat N-YBF30 ist identisch mit der Sequenz der G und AG-Isolate. Die Isolate der Gruppe O haben eine von N und M divergente potentielle Oct-1-Sequenz.

LBP-1

Das LBP-1 Protein (*leader binding protein*) bindet die LTR im Bereich –16 bis +27 relativ zum Transkriptionsstart an die Erkennungssequenz $G^{+1}GGTCTCTCTGG$ (Kato *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2000). In Kooperation mit dem multifunktionalen humanen Transkriptionsfaktor YY1 (*Yin Yang 1*) wirkt LBP-1 reprimierend auf die Transkription von HIV-1 (Margolis *et al.*, 1994; Romerio *et al.*, 1997).

Die Bindungssequenz für LBP-1 ist in den Subtypen der Gruppe M hoch konserviert. Die einzigen Ausnahmen der untersuchten Sequenzen bilden ein C-Isolat, ein F-Isolat und ein H-Isolat aus der HIV-Datenbank. Alle hier untersuchten neuen LTR-Sequenzen stimmen mit der Erkennungssequenz von LBP-1 überein.

Das Gruppe N-Isolat N-YBF30 besitzt die gleiche Sequenz wie die Vertreter der Gruppe M, die O-Isolate sind jedoch unterschiedlich, wobei das Isolat O-MVP5180 die größte Divergenz zeigt.

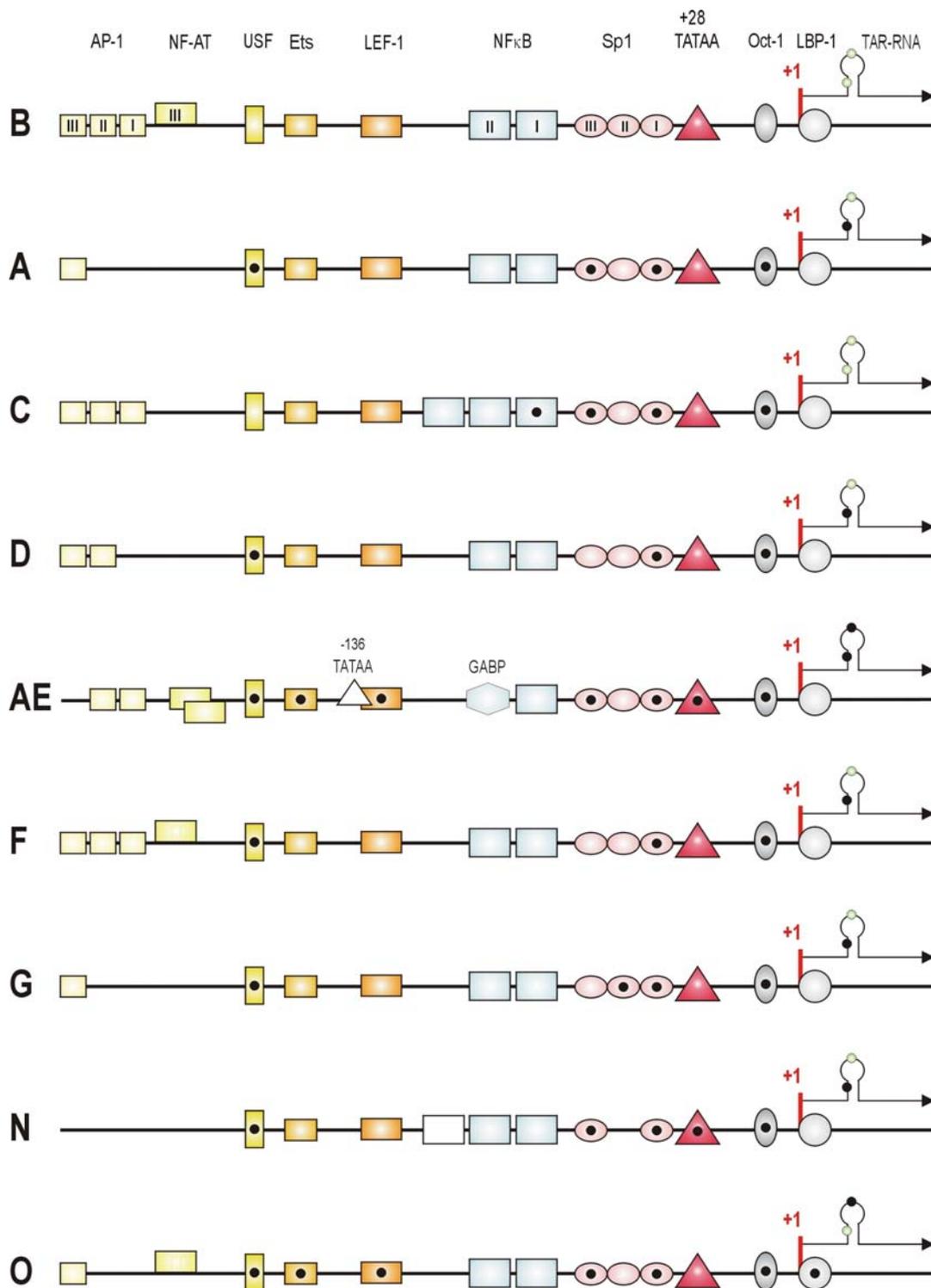


Abb. 13: Schematische Darstellung der Promotororganisation von HIV-1.

Die Bindungsstellen für regulatorische Faktoren der HIV-1 LTR des Studienpanels (Tab. 5) sind schematisch dargestellt. Die Anordnung der Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren und virale Faktoren wurde anhand von Informationen über funktionelle *core*-Sequenzen der einzelnen Bindungsstellen und relativ zur Subtyp B-LTR-Sequenz HXB2R (Acc. K03455) vorgenommen. Die Unterschiede zur LTR des Subtyps B sind mit schwarzen Punkten markiert. Die Markierung wurde nur vorgenommen, wenn die Mehrzahl der untersuchten Isolate eines Subtyps oder einer Gruppe dem jeweiligen Merkmal entsprach. Konnte die *core*-Sequenz einer Bindungsstelle nicht identifiziert werden, so wurde die entsprechende Box entfernt und als fehlend definiert.

Insgesamt wurden überwiegend spezifische strukturelle Unterschiede im Vergleich der Gruppen M, N und O festgestellt (Abb. 13). Innerhalb der M-Gruppe sind zwar subtyp-spezifische Charakteristika, wie z.B. die Struktur des TAR-Elementes bei den CRF01_AE Viren vorhanden (Abb. 12). Es gibt jedoch meist einzelne oder auch mehrere Vertreter eines Subtyps, die Ausnahmen von dieser Regel darstellen. Die *cis*-reprimierenden Elemente scheinen im Vergleich zu den *cis*-aktivierenden Elementen innerhalb der Gruppe M stärker konserviert zu sein.

Innerhalb der M-Gruppe zeigt die LTR-Struktur der CRF01_AE-Isolate die meisten Unterschiede zur B-LTR und zu allen anderen Subtypen. Die LTR von CRF01_AE enthält spezifische Nukleotid-Mutationen in einer NF κ B-*site* und in mehreren Enhancer-Elementen (NF-AT, USF, ETS). Wie bereits beschrieben, konnte auch in den hier untersuchten AE-LTRs eine Mutation in der regulären TATAA-Box (-28nt) und ein zusätzliches TATA-Motiv in dem stromaufwärts gelegenen modulatorischen Element identifiziert werden. Die Promotorstruktur der LTR vom Subtyp D zeigt die geringste Diskrepanz zur LTR vom Subtyp B. Diese Ergebnisse entsprechen der phylogenetischen Analyse (Abb. 11) und dem Vergleich der Sequenzunterschiede in der Distanzmatrix (Tab. 15), wobei sich zeigt, dass zwischen Subtyp B und D eine nahe Verwandtschaft besteht.

In den untersuchten Bindungsstellen der LTR wurde zwischen der M-Gruppe und der O-Gruppe eine höhere Sequenzdivergenz festgestellt als zwischen der M- und der N-Gruppe. Auch diese Ergebnisse spiegeln die Sequenzdivergenz- und Stammbaumanalysen wider (Tab. 15; Abb. 11), die eine große Übereinstimmung zwischen der Gruppe M und N und erhebliche Abweichungen zwischen der Gruppe M und O aufzeigten.

4.2 Funktionale Analyse des LTR-Promotors von HIV-1 Gruppe M, N und O

Die Feststellung struktureller Divergenzen der LTR verschiedener HIV-1 Virusvarianten (Abb. 12 und 12) legt unterschiedliche Bindungskapazitäten für Transkriptionsregulatoren nahe, was in unterschiedlichen Promotoraktivitäten resultieren kann. Für die funktionale Analyse der Enhancer-/ Promotor-Region von HIV-1 wurde ein *in vitro*-Modell ausgewählt, das auf dem Luziferase-Reporter-System (Promega) basiert. Nach der Klonierung der LTR in den Expressionsvektor pGL3-Basic konnte die Promotoraktivität der LTR/ pGL3-Konstrukte anhand der Expression des Reportergens *luziferase* in Transfektionsexperimenten gemessen werden.

4.2.1 Die Konstruktion der LTR/ Luziferase-Vektoren

Das Set für die funktionale Analyse wurde aus HIV-1-Isolaten zusammengestellt, die in der phylogenetischen Analyse eindeutig klassifizierbar waren und bei denen der Subtyp der LTR mit dem Subtyp in den Genomregionen *env* und *gag* übereinstimmte (Tab. 14). Zudem repräsentierten die ausgewählten Klone, soweit aus der vergleichenden Strukturanalyse erkenntlich, die typische Sequenz des jeweiligen Subtyps bzw. der Virusgruppe. Das ausgewählte Set enthielt aus der M-Gruppe je zwei Isolate der Subtypen A, C, D und G, drei Vertreter des Subtyps B, ein Isolat vom Subtyp F und zwei Isolate der rekombinanten Form CRF01_AE. Die Gruppe N war durch das Isolat N-YBF30 vertreten, die Gruppe O durch das Isolat O-MVP5180.

Die LTR-Amplifikate wurden nach der Restriktion mit *MluI* und *XhoI* (3.8) in gerichteter Orientierung in den ebenfalls mit *MluI* und *XhoI* geschnittenen Luziferase-Expressionsvektor pGL3-Basic kloniert (3.13.1; Abb. 7; Abb. 14). Die Klonierung erfolgte nach Standardprotokollen (3.9). Die Klonierungsstellen (*MluI*/ *XhoI*) sind im Vektor pGL3-Basic stromaufwärts des Luziferase Gens (*luc+*) lokalisiert, sodass die LTR-gesteuerte Expression der Luziferase nach transienter Transfektion der LTR/ pGL3-Plasmide in eukaryote Zellen (COS-Z-28) anhand der Aktivität der Luziferase im Zelllysat in einem Lumineszenz-Assay quantifiziert werden kann (3.13.5). Die durch die Luziferaseaktivität erzeugten relativen Lichteinheiten (RLU) sind ein Maß für die Promotoraktivität der LTR, die in diesem *in vitro*-System ohne den Einfluss anderer viraler Determinanten untersucht werden kann. Durch Kotransfektion des Plasmides pcDNA3-tat kann die basale mit der Tat-transaktivierten LTR-Aktivität verglichen werden (3.13.5.1).

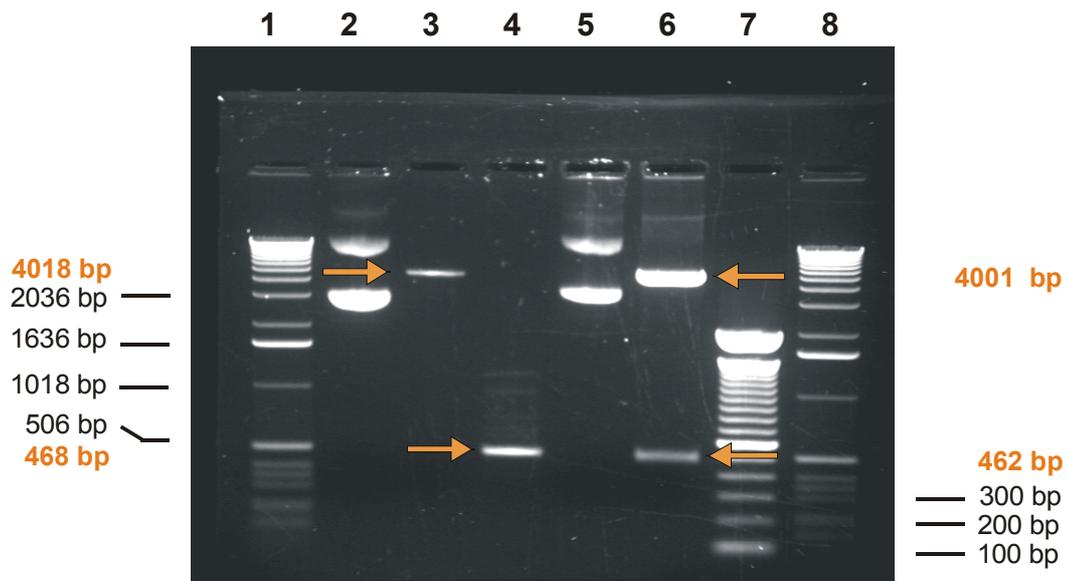


Abb. 14: Darstellung der PCR-Produkte und Vektoren zur Herstellung der LTR/ pGL3-Klone

EtBr-gefärbtes Agarose-Gel (1%), auf dem die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Fragmente der LTR, der Expressionsvektor pGL3-Basic und die Produkte der Restriktionsanalysen (*MluI/ XhoI*) dargestellt sind.

Spurbelegung: Spur 1: 1kb-Leiter; Spur 2: pGL3-Basic ungeschnitten (4018 bp); Spur 3: pGL3-Basic (*MluI/ XhoI*, 4001 bp); Spur 4: 5'LTR PCR-Produkt G-12 (468 bp); Spur 5: Klon G-12-1/ pGL3 (5269 bp); Spur 6: Klon G-12-1/ pGL3 (*MluI/ XhoI*) mit dem 4801 bp-Fragment und dem 462 bp-Fragment des 5'LTR-PCR-Produktes G-12; Spur 7: 100 bp -Leiter; Spur 8: 1 kb-Leiter.

Die LTR von insgesamt 21 unterschiedlichen HIV-1-Isolaten (Referenzpanel n=7; Primärisolate n=9; Serokonverter n=5) wurde kloniert und analysiert. Zur klonalen Sequenzanalyse war ein Teil der LTR-PCR-Produkte unterschiedlicher Isolate bereits in den Vektor pGL3-basic kloniert worden, die übrigen LTR-Sequenzen wurden erst nach der Auswahl geeigneter Isolate zur funktionalen Analyse der LTR kloniert.

Bei dem Isolat O-MVP5180 wurden nach der klonalen Sequenzanalyse 2 unterschiedliche Sequenzformen identifiziert, die sich durch eine 26 bp lange Insertion unterschieden. Die der publizierten Originalsequenz entsprechende Form wurde als O-MVP5180/ O2 von der längeren Form O-MVP5180/ O3 unterschieden und getrennt analysiert.

Für die funktionale Analyse wurden 17 LTR-Klone von Isolaten ausgewählt, die die Gruppen und Subtypen von HIV-1 repräsentieren (Tab. 14; Abb. 11): Gruppe M (Subtyp A: n= 2; B n= 3; C: n= 2; D: n= 2; E: n= 2; F: n= 1; G: n= 2), Gruppe N: n = 1; Gruppe O: n= 2 (O2, O3).

4.2.2 Etablierung des Transfektionsassays (*Effectene Transfection Kit*)

Die Transfektion der eukaryoten adhären wachsenden Zelllinie COS-Z-28 mit ausgewählten LTR/ Luziferase-Konstrukten (Tab. 14) erfolgte nach dem Protokoll *Effectene Transfection Kit* und wurde experimentell optimiert (3.13.5).

Zur internen Standardisierung der Transfektionseffizienz wurde ein β -Galaktosidaseplasmid kotransfiziert, die Enzymaktivitäten wurden mit Hilfe des Dual-Light® Systems (ABI, Massachusetts) in einem Chemilumineszenz Reporter Gen Assay zur kombinierten Detektion von Luziferase und β -Galaktosidase gemessen (3.13.6).

4.2.2.1 Toxizitätstest des Transfektionsreagenz *Effectene*

Um die toxische Wirkung des Transfektionsreagenz *Effectene* zu untersuchen, wurde der Effekt der Einwirkzeit dieser Substanz auf die Vitalität der COS-Z-28-Zellen geprüft. Nach 24, 48 und nach 72 Stunden wurde aus jeweils einem Ansatz die Anzahl abgestorbener Zellen mittels Vitalfärbung (3.13.3) mikroskopisch ermittelt. Der prozentuale Anteil abgestorbener Zellen wurde als Maß der Toxizität von *Effectene* bewertet.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit waren ca. 5% der Zellen abgestorben, nach 48 Stunden ca. 12% und nach 72 Stunden ca. 28% der Zellen. Dementsprechend wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion geerntet und aufgearbeitet.

4.2.2.2 Optimierung des Transfektionsprotokolls

Da eukaryote Zelllinien unterschiedlich effizient transfizierbar und transaktivierbar sind, wurden zunächst die beiden Zelllinien 293 EBNA und COS-Z-28 verglichen. Die Transfektionseffizienz und die Transaktivierung der LTR war in der Zelllinie 293 EBNA jedoch geringer als in der Zelllinie COS-Z-28 (Daten nicht gezeigt). Da zur Beurteilung der unterschiedlichen LTR-Aktivitäten eine möglichst hohe Transfektionseffizienz notwendig ist, wurde die Zelllinie 293 EBNA nicht weiter benutzt. Die Bedingungen und die Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes wurden anhand der Zelllinie COS-Z-28 experimentell optimiert. Jedes LTR/ pGL3-Konstrukt wurde in 2-3 Transfektionsexperimenten jeweils in Form eines Doppelansatzes in 24-Loch-Platten durchgeführt.

Folgende Faktoren wurden zur Etablierung eines Standardprotokolls optimiert:

(1) Volumen des Ansatzes, (2) Zellzahl pro Ansatz, (3) DNA-Gesamtmenge, (4) Ratio DNA:*Effectene*, (5) Volumen DNA-Gemisch:Enhancer, (6) Gesamtvolumen des Transfektionsansatzes.

Tab. 17: Optimierter Standardansatz für ein Transfektionsexperiment mit *Effectene*

Faktor	pro Doppelansatz
Zellzahl	2 Ansätze à 10^5 Zellen pro Loch
<u>Transfektionsgemisch:</u>	
Ratio DNA: <i>Effectene</i>	1:20
DNA-Menge	500 ng
DNA-Volumen	10 μ l
Puffer EC	110 μ l
Enhancer	4 μ l
<i>Effectene</i>	10 μ l
Medium	700 μ l
	400 μ l Transfektionsgemisch pro Loch

4.2.2.3 Standardisierung der Transfektionseffizienz mit β -Galaktosidase

Zur internen Standardisierung der einzelnen Transfektionsansätze wurde das Plasmid RSV- β -Gal, das bakterielle β -Galaktosidase unter Kontrolle eines eukaryoten Promotors exprimiert, kotransfiziert (erhalten von H. Schäfer, Robert Koch-Institut). Um zu gewährleisten, dass die mit dem kotransfizierten Plasmid gemessenen RLU-Werte im linearen Meßbereich der β -Galaktosidase liegen, wurde eine Dosisabhängigkeitsmessung mit gereinigtem β -Galaktosidase Protein aus *E. coli* durchgeführt. Dazu wurde das Protein in dem im Protokoll verwendeten Lysispuffer mit Endkonzentrationen von 10 pg bis 2 μ g Protein pro 10 μ l verdünnt. Nach 40 min und nach 60 min Inkubation mit der Galakton-Plus-Lösung nach Protokoll erfolgte die Messung der RLU β -Galaktosidase aus 10 μ l dieses DNA-Puffer-Gemisches im Luminometer.

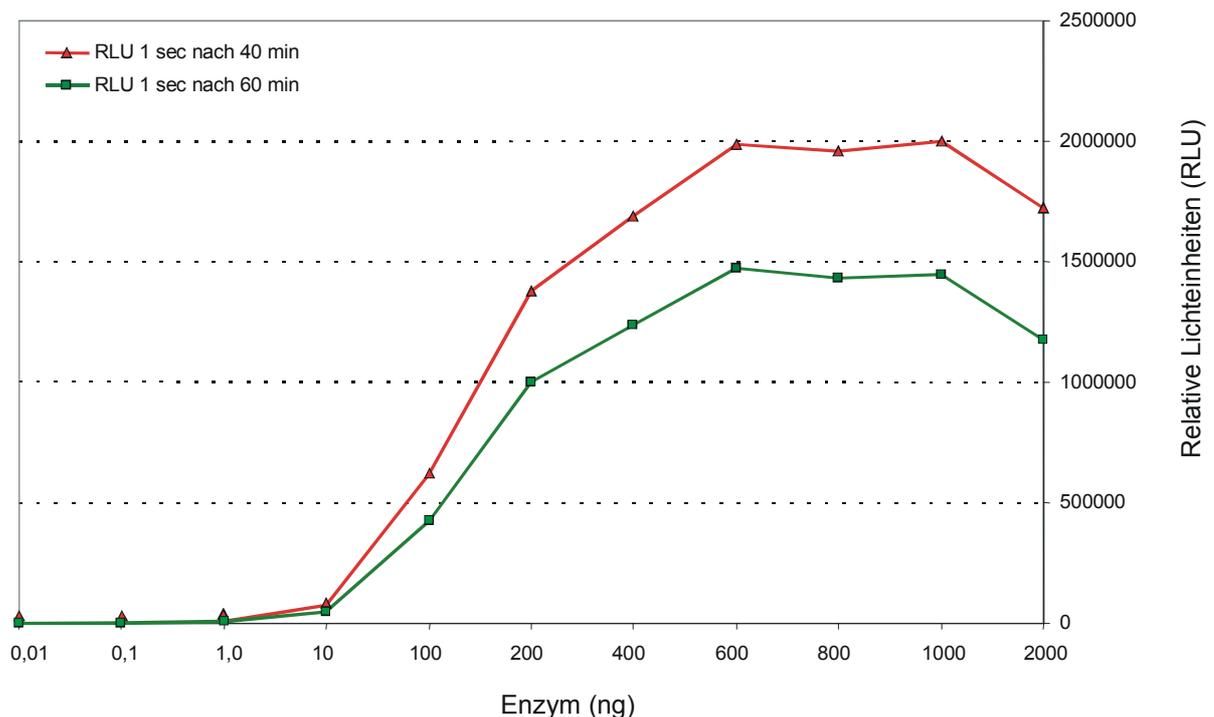


Abb. 15: Standardkurve von β -Galaktosidase aus *E. coli*.

Dosisabhängigkeitsmessung mit gereinigtem β -Galaktosidase Protein aus *E. coli* zur Ermittlung des linearen Messbereiches des Proteins β -Galaktosidase. Nach einer Inkubation der Proteinverdünnungen (10 pg bis 2 μ g) von 40 min und 60 min mit der Galakton-Plus-Lösung des verwendeten Dual-Light-Kits wurden die RLU (relative Lichteinheiten) der β -Galaktosidaseaktivität im Luminometer gemessen. Die beiden Messreihen sind in Form logarithmischer Standardkurven dargestellt.

Der lineare Messbereich der RLU aus dem β -Galaktosidase-Protein liegt für Proteinmengen von 50 ng bis 600 ng bei 2×10^5 bis 2×10^7 RLU. Die Inkubationszeit von 40 Minuten erwies sich für das verwendete Protokoll als geeignet.

Da in Testtransfektionen durch die Kotransfektion von 25 ng pRSV- β -Gal-Plasmid β -Galaktosidaseaktivitäten von 1×10^5 bis 5×10^5 RLU gemessen wurden, konnte man davon ausgehen, dass bei einer Kotransfektion von 40 ng pRSV- β -Gal pro Ansatz die Aktivität der exprimierten β -Galaktosidase im linearen Messbereich liegt. Um die benötigte DNA-Gesamtmenge beizubehalten, wurden 40 ng Plasmid-DNA pRSV- β -Gal mit 10 ng Plasmid-DNA pBSSK+ (*bluescript*) auf eine Konzentration von 50 ng/ μ l eingestellt.

Da die Zelllinie COS-Z-28 jedoch ein chromosomales *lac-Z*-Gen unter der Kontrolle der HIV-LTR exprimiert und dies bei der Transaktivierung zu erhöhten RLU-Werten für die β -Galaktosidase führte, wurde das in jedem Experiment mitgeführte Kontrollplasmid pGL3-Promotor für die Standardisierung der RLU *Luziferase* der LTR/ pGL3-Klone benutzt (2.6).

Der Aufbau dieses Kontrollplasmides entspricht dem für die Klonierung der LTR benutzten Plasmid pGL3-Basic, jedoch wird die Luziferase unter der Kontrolle des SV40-Promotors exprimiert. Im Vergleich resultierte die interne Standardisierung auf die β -Galaktosidaseaktivität zwar in niedrigeren absoluten Tat-transaktivierten Luziferaseaktivitäten als die externe Standardisierung auf den Vektor pGL3-Promotor, im relativen Vergleich der Promotoren der LTR/ pGL3-Plasmide ergaben sich jedoch keine Unterschiede.

4.2.2.4 Optimierung der DNA-Konzentrationen in der Transfektion

Da die Gesamtmenge DNA, die pro Transfektion eingesetzt werden kann, limitiert ist (500 ng), musste auch das Mengenverhältnis zwischen LTR/ Luziferase-Konstrukt und dem Tat-Expressionsvektor pcDNA3-tat, der das Tat-Exon-1-Protein des Subtyp-B-Isolates LAI exprimiert, optimiert werden (Verhoef *et al.*, 1997). Zur Ergänzung der DNA-Menge wird das Plasmid pBSSK+ (*bluescript*) verwendet.

Tab. 18: Optimierter Transfektionsansatz für die Ermittlung der basalen und der Tat-transaktivierten LTR-Aktivität

Ansatz	PRSV-β-Gal/ pBSSK+ [50 ng/ μ l]	LTR/<i>Luc</i>- Konstrukt [50 ng/ μ l]	pBSSK+ [50 ng/ μ l]	pCDNA3-tat [50 ng/ μ l]
basal	2 μ l	6 μ l	2 μ l	
transaktiviert	2 μ l	6 μ l		2 μ l

4.2.3 Basale und transaktivierte Promotoraktivitäten von HIV-1 Gruppe M, N und O

Die LTR-Luziferaseaktivität ausgewählter LTR/ pGL3-Konstrukte des Studienpanels (Tab. 14) wurden jeweils in zwei bis drei unabhängigen Experimenten in Form von Doppelansätzen bestimmt. Dabei wurde jeweils die basale sowie die Tat-transaktivierte LTR-Aktivität, die von der LTR-gesteuerten Luziferaseexpression der LTR/ pGL3-Klone erzeugt wurde, in Form relativer Lichteinheiten (RLU $_{LuziferaseLTR/ pGL3}$) gemessen (3.13.6) und standardisiert (3.13.7).

Alle untersuchten LTR-Fragmente erwiesen sich als funktionale Promotoren mit einer geringen basalen Aktivität, die in Gegenwart des viralen Transkriptionsaktivators Tat effizient transaktivierbar sind (Abb. 16). Im Vergleich zur basalen Transkriptionsaktivität der LTR von

HIV-1 (Abb. 16a) exprimiert der Kontrollvektor pGL3-Promoter die Luziferase unter der Kontrolle des SV40 Promotors ca. 4 mal stärker als die LTR mit der höchsten basalen Transkriptionsaktivität (vergl. Abb. 16b pGL3-Promoter mit Abb. 16a Klon O-5180/ O3). Im transaktivierten Zustand jedoch (Abb. 16b) ist die LTR von HIV-1 in dem hier verwendeten *in vitro*-Modell weitaus aktiver als der SV40 Promotor. Die einzige Ausnahme bildet die LTR von Klon B-18-1, deren transaktivierte Aktivität geringfügig unter der des Kontrollvektors pGL3-Promoter liegt.

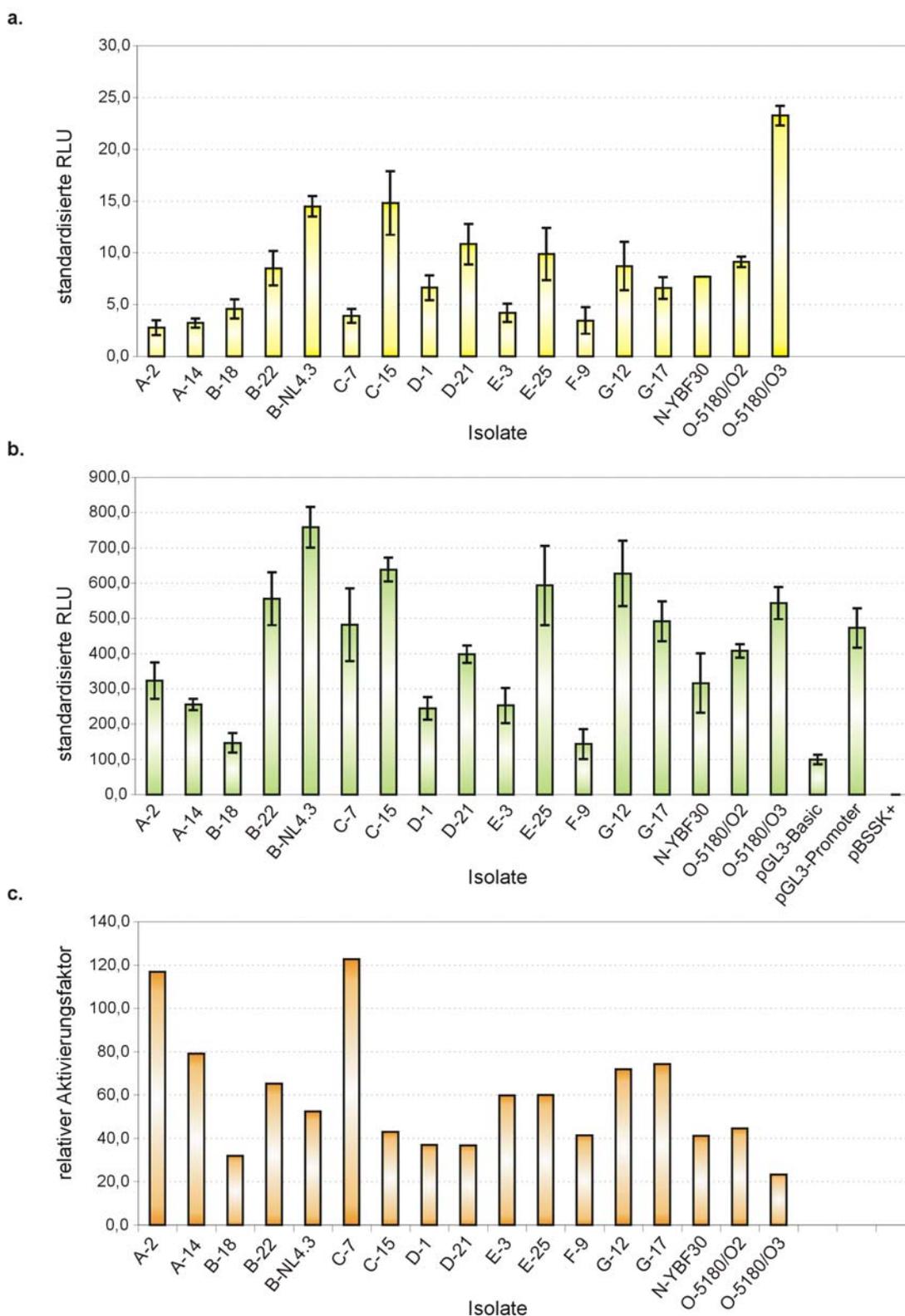


Abb. 16: Promotoraktivität der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O.

a. Basale Promotoraktivität; **b.** Transaktivierte Promotoraktivität, **c.** Aktivierungsfaktor

In Abb. 16a und 16b sind auf der y-Achse die standardisierten RLU (*relative light units*) als Maß der basalen LTR-Aktivität aufgetragen, in Abb. 16c der Tat-Aktivierungsfaktor als Quotient aus transaktiverter und basaler LTR-Aktivität. Auf der x-Achse sind die HIV-1-Isolate der Gruppen M, N und O aufgeführt. Die Skalierung der y-Achsen variiert aus Darstellungsgründen. Die RLU der Kontrollplasmide (pGL3-Promoter, pGL3-Basic und pBSSK+) sind in Abb. 16b aufgeführt.

4.2.3.1 Die basale Promotoraktivität

Innerhalb der M-Gruppe ist jeder Subtyp (außer F) mit zwei bzw. drei Isolaten vertreten, die sich in ihrer basalen Aktivität teilweise um ein vielfaches unterscheiden (Abb. 16a, vergl. C-7-1 und C-15-2).

Wie unterschiedlich die LTR-Aktivität von Isolaten eines Subtyps sein kann, wird an den drei Subtyp B-Isolaten deutlich (Abb. 16a B-18, B-22 und pNL4.3). Das Subtyp B-Isolat (B-18) ist gering aktiv, das zweite B-Isolat (B-22) ist dagegen im mittleren Aktivitätsspektrum angesiedelt. Die LTR des molekularen Klons pNL4.3, ebenfalls dem Subtyp B zuzuordnen, ist sogar einer der aktivsten Promotoren.

Die beiden Isolate des Subtyps A zeigen im nicht-aktivierten basalen Zustand (Abb. 16a) im Vergleich zu allen anderen Subtypen die geringste basale LTR-Aktivität.

Das Isolat D-21 besitzt eine erhöhte Aktivität gegenüber anderen Isolaten, die G-Isolate zeigen eine mittlere basale Aktivität im Vergleich zu anderen Subtypen, die LTR des Subtyp F-Isolates ist ein vergleichsweise schwacher Promotor. Die LTR des N-Isolates N-YBF30 ist ebenfalls vergleichbar mit der durchschnittlichen Aktivität der Gruppe M-Promotoren.

Subtyp C-Isolate, die aufgrund einer dritten NF κ B-*site* generell mit einer C-spezifischen hohen basalen LTR-Aktivität korreliert werden, können sowohl in der Anzahl der NF κ B-Bindungsstellen als auch in ihrer LTR-Aktivität sehr unterschiedlich sein. Bei den beiden untersuchten Isolaten vom Subtyp C ist die basale LTR-Aktivität nur dann höher, wenn drei NF κ B-Bindungsstellen vorliegen. Der C-Promotor mit drei NF κ B-Bindungsstellen (C-15) ist innerhalb der Gruppe M am aktivsten, C-7 besitzt dagegen nur zwei Bindungsstellen für NF κ B und zeigt eine schwache LTR-Aktivität (Abb. 16a C-7 mit C-15). Zudem konnte auch in einer Variante des Isolates O-MVP5180 eine dritte NF κ B-*site* identifiziert werden (O-MVP5180/ O3), was diese LTR zu einem 3-fach stärkeren basalen Promotor gegenüber einer Sequenzvariante dieses Isolates macht, die nur zwei NF κ B-*sites* besitzt (O-MVP5180/ O2). Die LTR O-MVP5180/ O3 ist damit der stärkste Promotor des untersuchten Kollektivs.

Dass die LTR-Aktivität jedoch nicht direkt mit der Anzahl der NF κ B-Bindungsstellen korrelierbar ist, wird an den AE-Promotoren deutlich, die beide nur eine Bindungsstelle für NF κ B besitzen. Sie zeigen keine spezifisch geringere Aktivität als andere Subtypen und ähnliche Aktivitätsunterschiede wie andere Isolate eines Subtyps; die LTR des Isolates AE-25 ist zweifach aktiver als die AE-3-LTR.

Die basale LTR-Aktivität von HIV-1 ist bei den hier untersuchten Isolaten nicht subtyp-spezifisch und kann somit nicht von subtyp-spezifischen Strukturdivergenzen der LTR abgeleitet werden. Vielmehr ist die basale LTR-Aktivität von isolat-spezifischen Strukturmerkmalen abhängig.

4.2.3.2 Die Tat-transaktivierte Promotoraktivität

Die Transaktivierung mit dem Tat-Protein von Subtyp B steigerte die basale Transkriptionsaktivität aller LTR-Promotoren der Gruppe M, N und O. Gegenüber der basalen LTR-Aktivität, die zwischen Werten von 3 bis 27 standardisierten RLU schwankt, konnte die LTR-Aktivität auf Werte zwischen 150 und 760 standardisierten Lichteinheiten gesteigert werden (Abb. 16b). Dabei fällt auf, dass die Unterschiede der LTR-Aktivität zwischen den Isolaten eines Subtyps im transaktivierten Zustand weniger ausgeprägt sind als im basalen Zustand (vergl. Abb. 16a B-18 und B-22 mit Abb. 16b B-18 und B-22). Der Vergleich von basaler und transaktivierter LTR-Aktivität einzelner Isolate lässt nur bezüglich der absoluten Aktivitäten einen Trend erkennen, d.h. basal schwache Promotoren zeigen im Vergleich zu anderen auch eine schwache transaktivierte LTR-Aktivität. Die Promotoren der Isolate B-18, D-1 und F-9 beispielsweise sind sowohl schwache basale als auch schwache transaktivierte Promotoren (Abb. 16a/ b). Die beiden Vertreter der Subtyp A Viren dagegen sind basal schwächere Promotoren als Isolat B-18, im transaktivierten Zustand zeigen sie jedoch eine höhere Aktivität als das Subtyp B-Isolat B-18 (Abb. 16a, A-2, A-14, B-18 und Abb. 16b, A-2, A-14, B-18).

Das Isolat B-NL4.3, dessen LTR zu den starken basalen Promotoren zählt, zeigt die höchste transaktivierte Promotoraktivität.

Die LTR des Isolates N-YBF30 ist Tat-aktiviert mit dem Durchschnitt der Gruppe M zu vergleichen. Die O-LTR mit drei NF κ B-*sites* ist auch im transaktivierten Zustand aktiver als die O-LTR mit zwei NF κ B-*sites*, der Unterschied zwischen den beiden Promotoren ist jedoch geringer als in der basalen Aktivität (Abb. 16a und 15b, O-MVP5180/ O2 und O-MVP5180/ O3).

Damit ist auch die Höhe der Tat-transaktivierten Promotoraktivität isolat-spezifisch, es waren jedoch keine Unterschiede erkennbar, die mit subtyp-spezifischen Strukturdivergenzen in Zusammenhang gebracht werden könnten.

Setzt man die transaktivierte Promotoraktivität einer LTR in Bezug zu ihrer basalen Promotoraktivität, so erhält man den **Aktivierungsfaktor**, d.h. die relative Transaktivierbarkeit einer LTR. Die untersuchten Promotoren aller Gruppen und Subtypen wurden mit dem Tat-Protein um den Faktor 25 bis 120 transaktiviert. Auffallend ist, dass sehr starke basale Promotoren nur schwach transaktivierbar sind und umgekehrt. Die relativ schwachen Promotoren der beiden A-Isolate werden 80-120-fach durch Tat gesteigert (vergl. Abb. 16a, A-2 mit Abb. 16c, A-2). Beide A-LTR-Promotoren weisen zwar eine Mutation im TAR-*bulge* im Vergleich zu der Konsensussequenz des *bulge*-Motivs auf, besitzen jedoch eine reguläre

TATAA-Box, sodass es unwahrscheinlich scheint, dass eine optimierte TATAA-TAR-Interaktion (wie bei CRF01_AE) die Ursache für die hohe Transaktivierbarkeit ist. Auch die LTR des Isolates C-7, basal ein schwacher Promotor, ist durch Tat um mehr als 120-fach aktivierbar, und auch die Isolate E-3 und F-9 sind schwache Promotoren, deren Aktivität durch Tat ebenfalls stark gesteigert wird.

Dem stehen starke basale Promotoren gegenüber, die nur geringfügig transaktivierbar sind, wie beispielsweise die Promotoren von Isolat B-NL4.3 und C-15, die lediglich 40-50-fach transaktiviert werden. Die LTR von O-5180/ O3 ist sogar nur ca. 20-fach transaktivierbar. O-5180/ O3 zeigt zwar eine ca. dreimal höhere basale, aber nur eine 1,2-fach höhere transaktivierte Aktivität als der Klon O-MVP5180/ O2. Damit ist die O3-LTR, die in dem Studienpanel die höchste basale Aktivität zeigt, die am schwächsten transaktivierbare LTR, ihr Aktivierungsfaktor ist 50% geringer als bei der LTR von O-MVP5180/ O2 (Abb. 16c, vergl. O-MVP5180/ O2 und O-MVP5180/ O3).

Die LTR-Aktivität des C-Isolates mit zwei NF κ B-Bindungsstellen (C-7) ist ebenfalls stärker transaktivierbar als das C-Isolat mit drei Bindungsstellen (Abb. 16c).

Die hier untersuchten AE-Isolate zeigen keinen signifikant geringeren Aktivierungsfaktor als andere Subtypen. Beide AE-Isolate besitzen die veränderte TATAA⁻²⁸-Box und den nur 2 Nukleotide umfassenden *bulge* und sind stärker transaktivierbar als der Klon N-YBF30, der zwar eine drei Nukleotide umfassende *bulge*-Sequenz enthält, dafür jedoch keine veränderte TATAA-Box. Die kombinierte Mutation in der TATAA-TAR-Region scheint damit auch in den hier untersuchten AE-Isolaten eine spezifische Anpassung der CRF01-AE-LTR für eine optimale Tat-Transaktivierung zu sein.

Die Aktivierungsfaktoren der N-LTR und der O2-LTR sind vergleichbar mit den durchschnittlichen Werten der M-Gruppe.

4.2.3.3 Analyse der Strukturmerkmale in Abhängigkeit von der Promotorstärke

Um eine Korrelation der Promotorstärke der LTR mit spezifischen Bindungsmotiven für Transkriptionsfaktoren oder deren Kombination zu untersuchen, wurden die LTR-Promotoren anhand ihrer Transkriptionsaktivität gruppiert und analysiert.

Da für die Transaktivierung der LTR ein Tat-Protein von Subtyp B verwendet wurde, wäre eine subtyp-abhängige Tat-TAR-Interaktion bei der Transaktivierung der LTR möglich. Aus diesem Grund wurde die Gruppierung der LTR-Promotoren anhand ihrer standardisierten basalen Promotoraktivität vorgenommen.

Folgende Kriterien wurden der Einteilung zugrunde gelegt: **Starke LTR-Promotoren** haben eine hohe basale Aktivität mit standardisierten RLU-Werten zwischen >10 und 25. **Mittelstarke Promotoren** liefern im Transfektionsassay standardisierte RLU-Werte zwischen > 5 und 10. **Schwache Promotoren** haben standardisierte RLU-Werte zwischen 0 und 5.

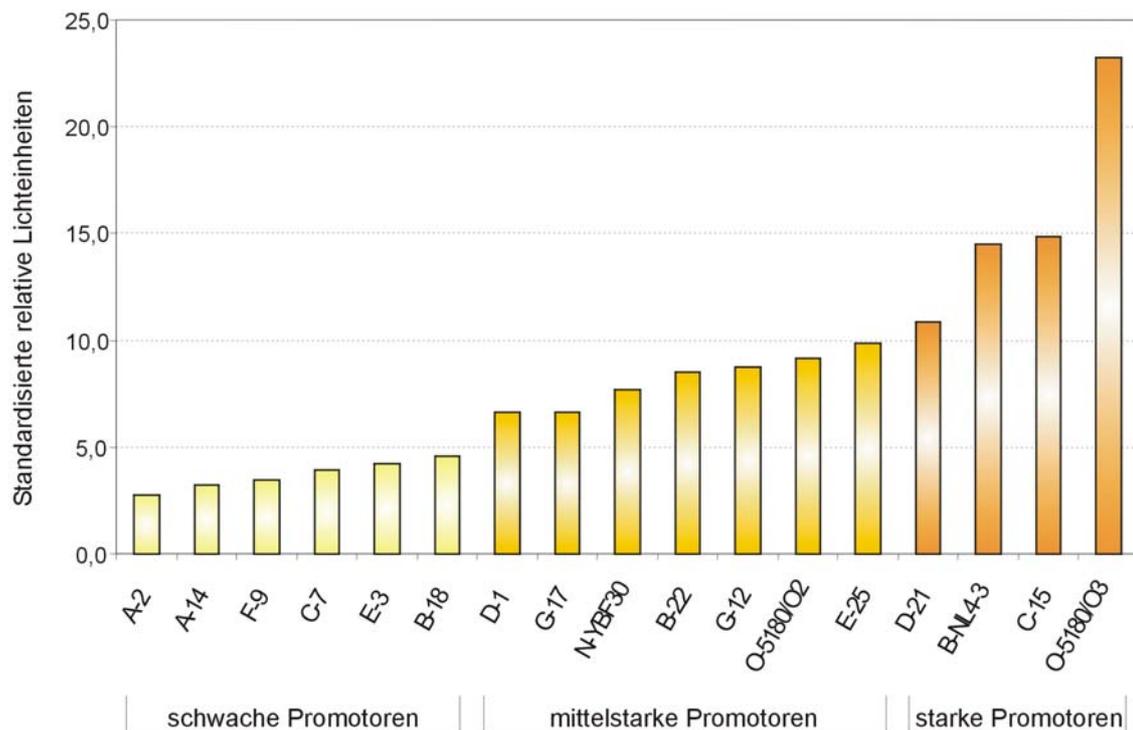


Abb. 17: Gruppierung der LTR-Promotoren nach aufsteigender basaler Promotoraktivität.

Die standardisierten basalen Promotoraktivitäten der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O (Abb. 16a), sind in aufsteigender Reihenfolge, nach der Stärke ihrer Promotoraktivität gruppiert, dargestellt.

Starke Promotoren

Hierzu gehören die Isolate D-21, B-NL4.3, C-15, sowie O-MVP5180/ O3. Das C-Isolat C-15 zeigte die höchste LTR-Aktivität unter den M-Viren. Wie alle LTRs vom Subtyp C besitzt es eine charakteristische Sequenzvariation der NF κ B-site I. Sie ist abgewandelt zu dem Motiv GGGCGTTCC. Obwohl sie sich damit in zwei Nukleotiden von einer regulären NF κ B-site GGGACITTCC unterscheidet (Jeeninga *et al.*, 2000), ist sie funktional für die Bindung von NF κ B p50:p65 (Montano *et al.*, 1997). Zusätzlich enthält C-15 zwei weitere reguläre NF κ B-sites. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Subtyp C-LTR aktiver ist als die LTR anderer Subtypen, was auf diese dritte NF κ B-site und eine veränderte USF-site zurückgeführt wurde (Naghavi *et al.*, 1999; Montano *et al.*, 1997). Im Hinblick auf die hohe LTR-Aktivität des Isolates C-15 trifft die Korrelation zwischen der Anzahl der NF κ B-Motive

und der LTR-Aktivität zu. Allerdings könnte der aktivierende Effekt der dritten NF κ B-*site* in dem Isolat C-15 zusätzlich durch die Bindungsstelle für USF verstärkt werden, da sich diese Sequenz der C-LTR von anderen Subtypen unterscheidet. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass USF die LTR anderer Subtypen ebenfalls beeinflusst, eine Bindung von USF an das stromaufwärts gelegene USF-Motiv ist jedoch nur für die LTR von Subtyp B und C gesichert (Naghavi *et al.*, 2001).

Das Isolat B-NL4.3 weist eine starke basale LTR-Aktivität auf und ist im transaktivierten Zustand sogar der stärkste aller untersuchten Promotoren, obwohl nur zwei NF κ B-*sites* vorhanden sind und weder signifikante Sequenzunterschiede zu den übrigen B-Promotoren noch Sequenzübereinstimmungen zu anderen starken Promotoren bestehen.

Zu den aktiven Promotoren kann auch die LTR des Isolates D-21 gezählt werden. Eine dritte NF κ B-*site* fehlt hier ebenfalls, auffällig ist allerdings die gleiche Deletion in der Sp1 I-*site*, die auch in dem Isolat C-15 vorliegt. Allerdings besitzt auch das D-Isolat D-1, das einen mittelstarken Promotor besitzt, diese Deletion. Dies spricht gegen ihren Einfluss auf die erhöhte Aktivität von D-21. Im Gegensatz zu dem Isolat D-1 entspricht die Bindungsstelle für USF bei D-21 nicht der *core*-Sequenz. Da für USF je nach Zelltyp ein negativ oder positiv regulierender Effekt nachgewiesen wurde, könnte sich diese Variation der USF-*site* positiv auf die LTR von D-21 auswirken (Naghavi *et al.*, 2001).

Zu den starken Promotoren ist auch die Sequenzvariante LTR-O3 des Gruppe O-Isolates zu zählen. Der Einfluss einer zusätzlichen NF κ B-*site* auf die Transkriptionsaktivität eines LTR-Promotors wird an diesem Beispiel deutlich. Die USF-Bindungsstelle dürfte dagegen nicht zur Aktivierung des O-Isolates beitragen, da sie sich nicht von derjenigen der M-Gruppe unterscheidet. Da die LTR des O-Isolates jedoch auch ohne dritte NF κ B-*site* ein mittelstarker Promotor ist, könnte eventuell auch ein Funktionsverlust der Bindungsstellen negativ regulierender Faktoren eine Rolle spielen. Die Oct-1-*site* unterscheidet sich ebenso von der Gruppe M wie die LBP-1-*site*. Die Aktivität des molekularen Klons pNL4.3 ist ebenfalls hoch und auch ohne dritte NF κ B-*site* vergleichbar mit C-15, weist in den essentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren jedoch keine Gemeinsamkeiten mit C-15 auf.

Mittelstarke Promotoren liefern im Transfektionsassay standardisierte RLU-Werte zwischen 5 und 10. Zu dieser Kategorie gehören die Isolate D-1, die beiden G-Isolate, B-22, AE-25, das Isolat N-YBF30 und O-MVP5180/ O2.

Die LTR-Promotoren von AE-25 sowie das N-Isolat sind charakterisiert durch den Verlust einer regulären TATAA⁻²⁸-Box, die CRF01_AE-LTR besitzt zudem nur eine funktionale NF κ B-*site*, und eine wahrscheinlich nicht funktionale ETS-*site*. Man würde eine stark verminderte basale LTR-Aktivität erwarten (wie z.B bei AE-3). Der Verlust der TATAA⁻²⁸-Box

der Isolate mit AE-LTR und des N-Isolates N-YBF30 spiegelt sich jedoch nicht in der Promotoraktivität wider. Die LTR von CRF01_AE (AE-25) zeigt mit 10 RLU eine sehr hohe basale Aktivität und ist fast zu den starken Promotoren zu zählen. Die CRF01_AE-spezifische TATAA⁻¹³⁶-Box, überlappend mit der Bindungsstelle für LEF-1 lokalisiert, könnte also die Funktion der regulären TATAA⁻²⁸-Box übernommen haben. Das Isolat AE-25 besitzt jedoch auch dieses TATAA⁻¹³⁶-Motiv nicht, die LTR von AE-25 ist trotzdem aktiver als die des Isolates AE-3, das die TATAA⁻¹³⁶-Box enthält. Auch in der N-LTR der mittelstarken Gruppe ist kein TATAA⁻¹³⁶-Motiv vorhanden. Die Möglichkeit, dass das TATAA⁻¹³⁶-Motiv die Funktion des TATAA⁻²⁸-Motives übernimmt, um einen Aktivitätsverlust zu kompensieren, erscheint daher unwahrscheinlich. Der Gebrauch dieser stromaufwärts gelegenen TATAA-Box würde zudem die Verschiebung des Transkriptionsstarts in diese Richtung bedeuten, was sicherlich erhebliche Konsequenzen für die Transkriptionsregulation hätte.

Die LTR von Isolat N-YBF30 besitzt zwar eine potentielle dritte NFκB-*site*, ist jedoch ein nur durchschnittlich aktiver Promotor. Ob diese NFκB-*site* funktional ist, ist nicht bekannt. Falls sie funktional wäre, könnte der aktivierende Effekt jedoch durch die fehlende Sp1-*site*-II in dem N-Isolat wieder beeinträchtigt werden. Da die Sp1-I-*site* und/ oder die Sp1-II-*site* *in vitro* für die LTR-Aktivität verantwortlich ist, wäre eine Reduktion der Aktivität durch den Verlust der Sp1-II-*site* denkbar (Jones *et al.*, 1986).

Zu den Isolaten mit einer **schwachen LTR-Promotoraktivität** gehören solche, bei denen standardisierte RLU-Werte zwischen 0 und 5 gemessen wurden (Subtyp A, die Isolate B-18, C-7, AE-3 und F-9).

Das Sp1-I-Motiv und/ oder das Sp1-II-Motiv spielt *in vitro* eine essentielle Rolle für die LTR-Aktivität, das Sp1-III-Motiv hat dagegen einen geringen Effekt auf die virale Transkription (Jones *et al.*, 1986). Da das Sp1-III-Motiv in den hier untersuchten Isolaten generell variabler ist, scheint es plausibel, dass dieser Transkriptionsfaktor eine untergeordnete Rolle bei der Transkription von HIV-1 spielt. Dies könnte erklären, weshalb der Klon A-2 trotz fehlender Sp1-III-*site* nicht wesentlich weniger aktiv ist als das zweite A-Isolat A-14. Die geringe Aktivität der LTR von B-18 ist im Vergleich zu den beiden anderen B-Isolaten nicht auf das reprimierende Oct-1-Motiv zurückzuführen, da das B-Isolat NL4-3 mit demselben intakten Oct-1-Motiv zu den stärksten Promotoren des Studienpanels gehört. Auffallend bei der LTR von B-18 ist allerdings eine Insertion von 22 bp zwischen den beiden NFκB-*sites*, was die Protein-Protein-Interaktion aktivierender Faktoren wie Sp1, Ets-1 oder NFκB beeinflussen könnte.

Eine eindeutige Korrelation zwischen Promotorstärke und Abhängigkeit von einem *cis*-regulatorischen Element konnte damit nicht festgestellt werden. Promotoren mit einer ähnlich starken Transkriptionsaktivität zeigen nicht notwendigerweise ähnliche strukturelle Gemeinsamkeiten.

4.2.3.4 Einfluss der NF κ B-Bindungsstellen auf die Promotoraktivität der LTR

Die beiden von dem Isolat O-MVP5180 isolierten Klone unterscheiden sich nur durch eine Bindungsstelle für NF κ B. Das Isolat O-MVP5180 stellt damit ein geeignetes Modell dar, um den Einfluss von zwei gegenüber drei NF κ B-*sites* auf die Transkriptionsaktivität des HIV-Promotors im Kontext der gleichen LTR-Sequenz zu untersuchen. Die LTR des Klons O-MVP5180/ O3 zeigt eine dreifach höhere basale Promotoraktivität als die LTR der Varianten O-MVP5180/ O2, die mit zwei NF κ B-*sites* ausgestattet ist und damit der bereits publizierten Sequenz entspricht (Acc. L 20571). Dieser direkte Vergleich zeigt eindeutig, dass die Existenz einer zusätzlichen Bindungsstelle für NF κ B die Aktivität der LTR im gleichen Kontext mehr als zweifach steigert (Abb. 16a).

Das Aktivitätspotential von LTR-Promotoren lässt sich jedoch nicht generell mit der Anzahl von NF κ B-*sites* korrelieren. Die Veränderung der NF κ B-II-*site* der CRF01_AE-Isolate zu TAGGACTTCC bedeutet zwar einen Verlust der Funktionalität dieser Bindungsstelle (Montano *et al.*, 1997). Die funktionale Analyse dieser Arbeit zeigt jedoch, dass nur der Promotor des Isolates AE-3 zu den schwachen Promotoren zählt, die LTR von AE-25 dagegen ein durchschnittlicher Promotor ist. Obwohl die veränderte NF κ B-*site* in Bindungsassays eine stark reduzierte Bindungskapazität für das NF κ B-Protein besitzt, könnte das Virus durch seine genetische Flexibilität defekte LTR-Enhancer-Motive durch die Anpassung anderer viraler Determinanten kompensieren (Koevolution). Das veränderte NF κ B-*site*-II-Motiv der CRF01_AE-LTR könnte eine Bindungsstelle für einen weiteren Transkriptionsfaktor sein, um einen eventuellen Funktionsverlust des Promotors auszugleichen. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein GABP, ein Vertreter der ETS-Familie, an dieses NF κ B-*site*-II-Motiv bindet, was zu einer Steigerung der transaktivierten LTR-Aktivität führte (Verhoef *et al.*, 1999). Die Konversion einer NF κ B II-*site* in eine GABP-Bindungsstelle, die charakteristisch für natürlich vorkommende AE-Isolate ist, konnte auch in den von uns untersuchten, ebenfalls aus Thailand stammenden AE-Isolaten identifiziert werden. Nur eine NF κ B-*site* zu besitzen, kann demnach kein hinreichendes Kriterium für die LTR-Aktivität sein.

Eine zusätzliche dritte NF κ B-Bindungsstelle scheint eine erhöhte Promotoraktivität zu bewirken und kann die Promotoraktivität im gleichen LTR-Kontext verdoppeln. In Isolaten mit einer AE-LTR scheint die Reduktion von zwei auf eine NF κ B-site die LTR-Aktivität nicht zu beeinträchtigen. Im Vergleich von LTR-Promotoren unterschiedlicher Isolate lässt die Anzahl der NF κ B-Bindungsstellen demnach keine generelle Korrelation mit der Aktivität des Promotors zu.

4.2.3.5 Vergleich der Promotoraktivitäten von HIV-1 Gruppe M, N und O

In dieser Arbeit wurden erstmals die Promotoraktivitäten von HIV-1-Isolaten der Gruppen O und N untersucht und mit der LTR-Aktivität der Gruppe M-Viren verglichen.

Die O-LTR ist in der basalen Transkription aktiver als die N-LTR. Die O-LTR mit drei NF κ B-Bindungsstellen ist der stärkste Promotor aller untersuchten Klone und im Vergleich mit der Gruppe M höchstens mit dem Subtyp C-Promotor C-15-2 und mit dem Subtyp-B-Promotor pNL4.3 in einer Aktivitätskategorie zusammenzufassen. Im transaktivierten Zustand ist O ebenfalls stärker als N und nur vergleichbar mit den stark transaktivierbaren LTR-Klonen der Gruppe M.

Der Transaktivierungsfaktor ist geringer für Isolate mit hoher basaler LTR-Aktivität, für die verlängerte O3-LTR (O-MVP5180/ O3) ist er dementsprechend am geringsten (Abb. 16c).

Die LTR des Isolates N-YBF30 zeigt zwar sowohl im basalen als auch im transaktivierten Zustand eine geringere Promotoraktivität als die Klone von Isolat O-MVP5180, jedoch eine vergleichbare Aktivität mit dem Durchschnitt der M-Gruppe.

In dem hier verwendeten transienten *in vitro*-Transfektionsmodell korreliert die divergente Promotororganisation der drei Gruppen M, N und O nicht mit der LTR-Aktivität.

5 Diskussion

Angesichts der globalen HIV-Epidemie, die von einer ungleichen Verbreitung unterschiedlicher HIV-1 Subtypen geprägt ist, stellte sich die Frage nach viralen Eigenschaften, die zu einem solchen Ausbreitungsmuster beitragen könnten. Die Regulation der Expression des proviralen Genoms beeinflusst die Virusproduktion maßgeblich und kann auf lange Sicht eine Ausbreitungseffizienz von Virusvarianten bedingen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Frage untersucht, inwieweit sich die virale Promotorstruktur von HIV-1 in den Gruppen M, N und O unterscheidet, und ob gruppen- oder subtyp-spezifische Divergenzen zu unterschiedlichen Promotoraktivitäten führen. Dazu wurden die LTR-Sequenzen von HIV-1-Isolaten der Subtypen A, B, C, D, F und G, der rekombinanten Form CRF01_AE sowie je eines Isolates der Gruppe N und O ermittelt und ihre Subtyp- bzw. Gruppenzugehörigkeit im Vergleich zu Referenzviren klassifiziert. Nachdem die LTR-Sequenzen, insbesondere die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, hinsichtlich subtyp-spezifischer Muster untersucht waren, folgte die funktionale Analyse der Promotoraktivität ausgewählter LTR-Promotoren auf der Grundlage eines Luziferase-Reportersystems in transienten Transfektionsassays.

Erstmals wurden die Promotoraktivitäten der LTR unterschiedlicher Subtypen der Gruppe M mit der LTR-Aktivität von Viren der Gruppen N und O verglichen.

5.1 Genetische Klassifikation der LTR von HIV-1 der Gruppe M, N und O

Im LTR-Promotor von HIV-1 wurde eine signifikante Sequenzdiversität festgestellt, die wie andere Genomregionen eine phylogenetische Klassifikation in Gruppen und Subtypen ermöglicht. Dies war bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden, und wurde in dieser Untersuchung an einer größeren Zahl von Virusisolaten verifiziert (Gao *et al.*, 1996; Montano *et al.*, 1997; Naghavi *et al.*, 1999). Die Ergebnisse zeigen zudem, dass die Genotypisierung der LTR-Region neben der genetischen Klassifikation der *env* und *gag*-Region eine Ergänzung zur Identifizierung mosaiker rekombinanter Genomstrukturen darstellt. Einige Isolate gehörten in der LTR anderen monophyletischen Gruppen an als in der jeweiligen *env*- und *gag*-Region des gleichen Isolates. Die Genotypisierung auf Basis der LTR-Sequenz kann somit eine wichtige zusätzliche Information in der Genom-analyse eines HIV-1-Isolates darstellen.

In Stammbaumanalysen kann die evolutionäre Verwandtschaft von HIV-Stämmen untersucht werden. Auf der Grundlage der Analyse der *pol*-Region zeigte sich beispielsweise eine enge Verwandtschaft von B- und D-Isolaten, daraus folgerte man, dass sich die Subtypen B und D im Verlauf der Evolution der M-Gruppe erst relativ spät auftrennten (Korber *et al.*, 2000). Diese Aussage spiegelt sich auch in der ebenfalls engen Verwandtschaft der Gruppe B und D in der LTR-Region wider.

Auch ein gemeinsamer epidemischer Ursprung von Infektionen wird in Stammbaumanalysen erkennbar. Innerhalb der untersuchten Isolate des Subtyps C bildeten sich drei signifikante Untergruppen: Drei afrikanische Isolate stehen einer Untergruppe aus zwei asiatischen Isolaten und einem signifikant unterschiedlichen brasilianischen Isolat gegenüber. Die Isolate afrikanischer Herkunft besitzen im Gegensatz zu dem C-Isolat aus Brasilien drei statt der bei HIV-1 üblichen zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF κ B. Damit gehören auch Subtyp C-Viren mit zwei NF κ B-Modulen, wie sie in dieser Arbeit identifiziert wurden, der *C-clade* an. Allein die Anzahl der vorliegenden NF κ B-Module reicht somit nicht aus, um die Zugehörigkeit zu einer monophyletischen Gruppe, deren Mitglieder denselben gemeinsamen Vorläufer haben, zu bedingen. Die asiatischen Isolate sind ebenfalls mit drei NF κ B-*sites* ausgestattet, bilden jedoch eine eigene Untergruppe.

5.2 Divergente Promotorstruktur von HIV-1 der Gruppen M, N und O

Anhand einer detaillierten Sequenzanalyse wurden spezifische Strukturunterschiede in den funktionalen Elementen der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O identifiziert. Entsprechend der Distanzmatrix der neu analysierten und mit Referenzviren alignierten Sequenzen beträgt die Sequenzdivergenz zwischen der LTR von Gruppe M und N ca. 30%. Die LTR von Viren der Gruppe M und der Gruppe O divergiert um 44,9% und entspricht damit in etwa der Sequenzdivergenz von 46,4% zwischen der LTR von N- und O-Isolaten. Während die LTR der Subtypen innerhalb der M-Gruppe eine ca. 20%ige Sequenzdivergenz aufweisen, unterscheiden sich die LTR-Sequenzen der Isolate eines Subtyps um 6,3% bis 17%. Die Gruppen N und O konnten jeweils nur anhand eines Vertreters untersucht werden. Dieser Aspekt ist bei der Feststellung, dass die N-LTR strukturell weitgehend mit der M-Gruppe übereinstimmt, die O-Gruppe dagegen stärker divergiert, zu berücksichtigen.

Die beobachtete Sequenzvariabilität der LTR erscheint zunächst hoch für eine Genomregion, die für die Transkriptionskontrolle und damit für die Virusreplikation essentiell ist. Es ist jedoch bekannt, dass HIV eine hohe Plastizität in wichtigen Funktionen aufweist, die sich in der Variabilität auch anderer essentieller Gene niederschlägt. Die *env*-Region von HIV, die für das hypervariable Hüllprotein von HIV kodiert, divergiert sogar intrasubtypisch um 13-23%, die enzymkodierende *pol*-Region dagegen ist bei HIV mit ca. 2-5% intra-

subtypischer Divergenz ähnlich konserviert wie die gruppen-spezifischen Antigene (*gag*) mit ca. 4-8% (Myers and Hong, 1996 ; Van de Peer *et al.* 1996; C. Kücherer, pers. Mitteilung).

Zu der über die gesamte Länge der LTR-Sequenz beobachteten Divergenz tragen auch Mutationen in Bindungsstellen von Transkriptionsregulatoren bei. Die Promotororganisation zeigt in vielen Bindungsmotiven subtyp-spezifische Sequenzunterschiede innerhalb der Gruppe M und zwischen den Gruppen M, N und O. Dabei muss berücksichtigt werden, dass zwar einzelne Bindungsmotive subtyp-spezifische Muster tragen, dass diese Spezifität jedoch nicht in allen *cis*-regulatorischen Elementen eines Promotors zu beobachten ist. Motive, die einen Subtyp charakterisieren, können mit Motiven eines anderen Subtyps und/oder mit nicht spezifischen Motiven kombiniert vorliegen. Die subtyp-spezifische Promotororganisation muss somit als stark vereinfachtes Modell verstanden werden, bei dem Ausnahmen innerhalb eines Subtyps durchaus möglich sind.

Besonders deutlich wird dies in den stromaufwärts gelegenen regulatorischen Elementen der LTR. Hier unterscheiden sich nicht nur die Sequenzmotive einzelner Module, sondern auch die Anzahl kompletter Motive variiert. Subtyp-spezifische Unterschiede in diesen regulatorischen Elementen könnten zu Unterschieden in zell-spezifischer Expression der verschiedenen HIV-Gruppen und Subtypen führen.

Die Sequenzen des basalen Promotors, des NF κ B-Enhancers und der TAR-Region sind dagegen stärker konserviert. Die hoch konservierte TAR-Region verdeutlicht, dass der Mechanismus der Transaktivierung bei allen Gruppen und Subtypen ähnlich verläuft.

Insgesamt unterscheidet sich die LTR der Subtypen C und E am stärksten von den übrigen Subtypen. Bei Subtyp A divergieren die Bindungsmotive für regulatorische Transkriptionsfaktoren zwischen den einzelnen Isolaten (*intrasubtypisch*) am stärksten.

Im Folgenden werden die wesentlichen subtyp-spezifischen Strukturunterschiede hinsichtlich ihres möglichen Einflusses auf die LTR-Funktion diskutiert.

Der **basale Promotor** ist aufgrund seiner essentiellen Bedeutung für die Transkription von HIV-1 bei den untersuchten Isolaten hoch konserviert. Ein Verlust der regulären TATAA⁻²⁸-Box durch die Transition des zweiten T nach A wurde bislang als spezifisches Merkmal des basalen Promotors der rekombinanten Form CRF01_AE beschrieben (Soto-Ramirez *et al.*, 1996; Montano *et al.*, 1997; Jeeninga *et al.* 2000; Roof *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte

das zu TAAAA modifizierte Motiv jedoch nicht nur bei allen AE-Isolaten, sondern auch bei dem Isolat der N-Gruppe (N-YBF30) identifiziert werden.

Es wird vermutet, dass eine weiter stromaufwärts liegende TATAA-Box (TATAA⁻¹³⁶) die fehlende TATAA⁻²⁸-Box kompensiert. Bei dem Isolat AE-3 wurde tatsächlich eine TATAA-Box stromaufwärts des NFκB-Enhancers identifiziert (TATAA⁻¹³⁶-Box). Diese ist jedoch weder in dem Isolat AE-25 noch in dem Gruppe N-Isolat vorhanden, dafür aber in der LTR eines Laborisolates mit einer Subtyp C-LTR (AC-6), die keinen Defekt in der TATAA⁻²⁸-Box aufweist (Abb. 12).

Damit wurde dieses bislang als spezifisch für CRF01_AE-LTR geltende Merkmal erstmals auch in einer LTR eines anderen Subtyps nachgewiesen.

Die übrigen Isolate der Gruppe M und das O-Isolat MVP5180 besitzen dagegen nur eine reguläre TATAA⁻²⁸-Box.

Bei LTR-Promotoren, die einen Verlust der regulären TATAA⁻²⁸-Box aufweisen, würde man eine verminderte basale LTR-Aktivität erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Der Verlust der TATAA⁻²⁸-Box der Isolate mit einer AE-LTR und des N-Isolates N-YBF30 spiegelt sich nicht in der Promotoraktivität wider. Vielmehr zeigte die AE-LTR (AE-25) eine überdurchschnittlich hohe basale Aktivität. Die AE-spezifische TATAA⁻¹³⁶-Box, überlappend mit der Bindungsstelle für LEF-1 lokalisiert, könnte also die Funktion der regulären TATAA⁻²⁸-Box übernommen haben. Das Isolat AE-25 besitzt jedoch auch dieses TATAA⁻¹³⁶-Motiv nicht, die LTR von AE-25 ist dennoch aktiver als die des Isolates AE-3, welche das TATAA⁻¹³⁶-Motiv enthält. Auch die basale Aktivität der N-LTR ist durchschnittlich, obwohl kein TATAA⁻¹³⁶-Motiv vorhanden ist. Die Möglichkeit, dass das TATAA⁻¹³⁶-Motiv die Funktion des TATAA⁻²⁸-Motives übernimmt, um einen Aktivitätsverlust zu kompensieren, scheint somit widerlegt. Der Gebrauch dieser stromaufwärts gelegenen TATAA-Box würde zudem die Verschiebung des Transkriptionsstarts in diese Richtung bedeuten, was sicherlich erhebliche Konsequenzen für die Transkriptionsregulation hätte. Bleibt die Frage, wie der Promotor ohne TATAA-Box, wie derjenige von AE-Isolaten und von Isolat N-YBF30, die Transkriptionsinitiation anderweitig reguliert. Eine Möglichkeit wäre, dass das veränderte Element TAAAA in Position -28 als alternative, aber funktionale TATAA-Box fungiert. Gestützt wird diese Theorie durch den Nachweis einer Bindung von TBP-TFIID an das veränderte TATAA-Motiv TAAAA⁻²⁸ (Montano *et al.*, 1997). Eine weitere Möglichkeit wäre die Kompensation eines eventuellen Funktionsverlustes der TAAAA⁻²⁸-Box durch das Initiator-Element. Promotoren besitzen gewöhnlich entweder ein TATAA-Element 25-30 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstarts +1 oder ein Initiator-Element, das den Transkriptionsstart überlappt. Beide Elemente haben ähnliche Funktionen, und zwar die akkurate Steuerung des Prä-initiationskomplexes zum Transkriptionsstart +1. Da das Initiatorelement dabei unabhängig oder im synergistischen Effekt mit der TATAA-Box agieren kann, ist vorstellbar, dass ein

eventueller Funktionsverlust der TATAA⁻²⁸-Box der AE-Isolate und des Isolates N-YBF30 auf diesem Wege ausgeglichen werden könnte. Das Initiatorelement dieser drei LTRs besitzt die für seine Funktion essentielle konservierte Sequenz im Bereich -2 bis +8, wodurch eine geregelte Transkriptionsinitiation auf diesem Wege gewährleistet wäre. In Bindungsstudien konnte zudem gezeigt werden, dass AE-Isolate das reguläre Transkriptions-Initiator-Element benutzen (Jeeninga *et al.*, 2000).

Das heißt, der basale Promotor von Isolaten mit veränderter TATAA⁻²⁸-Box ist funktional. Nach Jeeninga *et al.* (2000) ist die CRF01_AE-LTR sogar replikationseffizienter als die LTR von Subtyp B. Dies konnte mit den hier vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden.

In den *core*-Sequenzen der Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 gibt es zwar subtyp-spezifische Unterschiede, die aber, von wenigen Ausnahmen abgesehen, nicht die funktionalen *core-sites* betreffen. Die auffallende Deletion der mittleren Sp1 II-*site* in dem N-Isolat wurde auch in einem Isolat des Subtyps A nachgewiesen (A-2) und kann daher nicht als spezifisches Merkmal für das N-Isolat angesehen werden. Der Abstand zwischen der Sp1-*site* und der NFκB-*site* ist ebenfalls von Bedeutung; eine Protein-Protein-Interaktion von Sp1 und NFκB ist nur möglich, wenn die entsprechenden Bindungsstellen direkt benachbart sind (Fry und Farnham, 1999). Da der Abstand zwischen Sp1 III und NFκB I jedoch von Isolat zu Isolat, aber nicht subtyp- oder gruppen-spezifisch variiert, wäre es möglich, dass die durch Sp1 bedingten Effekte die Transkriptionsregulation unabhängig vom Subtyp beeinflussen.

Eine weitere auffällige subtyp-spezifische Variation war bisher im **NFκB-Enhancer** des Subtyps C und E in der Literatur beschrieben (Soto-Ramirez *et al.*, 1996; Montano *et al.*, 1997; Root *et al.*, 2002). Die LTR des Subtyps C ist meist mit drei statt mit den für HIV-1 üblichen zwei Bindungsstellen für NFκB ausgestattet. Es sind jedoch auch einzelne Isolate mit zwei oder mit vier NFκB-Motiven bekannt (Gao *et al.*, 1996; Naghavi *et al.*, 1999). Die Isolate mit einer CRF01-AE-LTR besitzen dagegen generell nur eine funktionale und eine veränderte NFκB-*site*. Diese veränderte Sequenz entspricht der von Verhoef *et al.* charakterisierten Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor GABP (Verhoef *et al.*, 1999). Die Konversion der NFκB-*site* in eine GABP-*site* wird mit einer erhöhten Tat-Transaktivierung assoziiert.

In dieser Arbeit wurde nun auch bei dem Isolat der N-Gruppe und bei einem Isolat der O-Gruppe ein drittes NFκB-Motiv identifiziert. Die LTR von N-YBF30 ist mit zwei funktionalen und einem potentiellen NFκB III-Motiv ausgestattet. Die Funktionalität dieses dritten NFκB-Motivs müsste zunächst in *in vitro* Bindungsstudien überprüft werden. Bei dem Isolat O-MVP5180 wurde aus einer aktuellen Laborpassage ebenfalls ein drittes funktionales NFκB-

Motiv identifiziert. Im Vergleich zur originär publizierten Sequenz (Gürtler *et al.*, 1994) geht das dritte NFκB III-Motiv auf eine Duplikation von 26 Nukleotiden zurück. In einer zurückliegenden Passage des Virusstocks wurde in retrospektiver Analyse bereits ein Gemisch von Viren mit zwei und drei NFκB-Motiven identifiziert. Man könnte von einer durch die Zellkultur bedingten Selektion dieser dritten NFκB-Bindungsstelle ausgehen. Es sind jedoch LTR-Sequenzen von Subtyp-C-Isolaten mit bis zu vier NFκB-*sites* beschrieben, die direkt aus Patientenblut amplifiziert wurden (Novitzky *et al.*, 1999; Naghavi *et al.*, 1999). Auffallend bei dem Isolat O-MVP5180 ist zudem eine 13 bp lange Insertion zwischen den beiden NFκB-Motiven. In einer Studie, in der diese Insertion auch für Isolate vom Subtyp C beschrieben wurde, war ein eventueller gemeinsamer Vorfahre des C-Subtyps und der O-Isolate angedacht worden (Zacharova *et al.*, 1997). In den hier untersuchten C-LTRs war diese Insertion jedoch nicht vorhanden.

Man kann davon ausgehen, dass das natürliche Vorkommen von drei NFκB-Motiven nicht auf Subtyp C beschränkt ist. Die Zahl der NFκB-Motive beeinflusst die Promotorstärke im basalen wie auch im Tat-transaktivierten Zustand. Die LTR des Isolates O-MVP5180/ O3 ist ein stärkerer Promotor als die LTR O-MVP5180/ O2, was auch für den Vergleich der LTR C-15 (3 NFκB-*sites*) und LTR C-7 (2 NFκB-*sites*) zutrifft.

Die funktionalen Sequenzen der **TAR-RNA** mit ihrer charakteristischen Haarnadel-Struktur (*stem-loop*) sind innerhalb der Gruppen und Subtypen unterschiedlich gut konserviert. Die *loop*- und die *stem*-Sequenzen zeigen innerhalb der Gruppen M und N wenig Sequenzvarianz, die LTR des Gruppe O-Isolates zeichnet sich in diesen Bereichen durch eine höhere Nukleotiddivergenz aus. Da diese Sequenzen Bindungsstellen für zahlreiche zelluläre Faktoren sind, wäre eine unterschiedliche zell-spezifische Regulation für Viren der Gruppen M und N und für Gruppe O-Viren möglich.

Die Blase (*bulge*) im Stamm der TAR-RNA, Bindungsstelle für den Transaktivator Tat, weist innerhalb der M-Gruppe subtyp-spezifische Unterschiede, vor allem für die Subtyp-E-LTR auf. Bei allen bisher untersuchten AE-LTR umfasst diese Blase zwei Nukleotide statt drei. Da sich alle untersuchten CRF01_AE-Isolate auch in der TATAA-Box von anderen Subtypen unterscheiden, könnte man daraus auf eine spezifische TATAA/ Tat/ TAR-Interaktion für AE-Isolate schließen. Die Mutagenese einer CRF01_AE-TATAA-Box zu einer B-TATAA-Box innerhalb eines CRF01_AE Virus resultierte in einer Reduktion der LTR-Aktivität, unabhängig davon, ob Tat von Subtyp B oder CRF01_AE stammte (Montano *et al.*, 1998). Das könnte bedeuten, dass die TATAA-Box von CRF01_AE eine Adaption zur optimalen Tat-Transaktivierung darstellt. Es wurde jedoch gezeigt, dass der CRF01-AE-Promotor mit TAR von Subtyp B als effektiver Promotor fungiert, egal, ob Tat von Subtyp B oder E stammte,

was die Hypothese einer CRF01_AE-spezifischen Interaktion der mutierten TATAA⁻²⁸-Box und Tat entkräftet (Jeeninga *et al.*, 2000). Damit kann die TATAA-Box als kritischer Faktor der Transaktivierung betrachtet werden, die Tat-Funktion dagegen scheint nicht signifikant vom Subtyp der LTR abhängig zu sein. Da, wie in dieser Arbeit gezeigt, auch andere Gruppen und Subtypen die TATAA-Modifikation tragen, ohne von der entsprechenden Modifikation der *bulge*-Sequenz begleitet zu sein, relativiert sich die mögliche Korrelation zwischen TAR und TATAA bei CRF01_AE- Isolaten.

In der LTR der Gruppe O überwiegt hier, wie bei den übrigen Isolaten der M-Gruppe, die Sequenz *TCT*. Die N-Sequenz unterscheidet sich dagegen von allen anderen Sequenzen.

Auch in den stromaufwärts der NFκB-*sites* gelegenen **positiv-regulatorischen Elementen LEF-1, ETS, USF, NF-AT, und AP-1** wurden subtyp- und gruppen-spezifische Unterschiede in der Sequenz und/ oder der Anzahl der Motive identifiziert. Die Ergebnisse aus den funktionalen Studien erlauben jedoch keine eindeutige Aussage hinsichtlich ihres Einflusses auf die Promotoraktivität. Eindeutige Korrelationen liegen nicht vor. Insbesondere für das ETS-Motiv und NF-AT, die *cis*-regulatorischen Elemente für die T-Zell-spezifische Transkriptionskontrolle, wären Bindungsstudien und eine zielgerichtete Mutagenese erforderlich, um die Rolle der modifizierten Bindungsstelle eindeutig bewerten zu können.

Eine ähnliche Schlussfolgerung muss auch für die **negativ-regulatorischen cis-Elemente USF, Oct-1 und LBP-1** gezogen werden. USF beispielsweise kann zudem je nach Zellkontext einen negativ oder positiv regulierenden Einfluss auf die Transkription von HIV-1 nehmen.

Die Gruppe O-LTR zeigte die meisten Sequenzdivergenzen in diesen zusätzlichen modulierenden *cis*-Elementen von HIV-1. Obwohl ein Einfluss auf die Promotoraktivität aus den hier vorgelegten Ergebnissen nicht abgeleitet werden kann, ist für die LTR der Gruppe O ein spezifischer Einfluss der negativ regulierenden Elemente denkbar.

Insgesamt könnten sich also durch die aktivierenden oder reprimierenden Elemente eine unterschiedliche Regulation der Subtypen und Gruppen ergeben. Da die Proteine der ETS- und der NFκB/ NF-AT-Familie die HIV-1 Transkription in T-Zellen durch physikalische Interaktionen regulieren und zahlreiche weitere synergistische (NFκB/ Sp1; LBP-1/ YY1) wie auch kompetitive Protein-Protein-Interaktionen (AP-1/ COUP) diskutiert oder nachgewiesen wurden, sind Unterschiede in den stromaufwärts gelegenen Bindungsstellen nicht nur getrennt, sondern immer auch in Verbindung miteinander zu betrachten. Die Beurteilung möglicher Einflüsse ist demnach besonders schwierig (Cooney *et al.*, 1991; Perkins *et al.*, 1993; Bassuk *et al.*, 1997; Margolis *et al.*, 1997; Naghavi *et al.*, 2001).

5.3 Isolat-spezifische, aber keine subtyp-spezifische Promotoraktivität von HIV-1

Gruppe M, N und O

Nachdem für die Subtypen und Gruppen von HIV-1 divergente Promotorstrukturen identifiziert waren, wurde deren eventuell spezifischer Einfluss auf die Promotoraktivität untersucht. Zunächst ist festzuhalten, dass alle untersuchten HIV-1-Isolate der Gruppe M, N und O funktionale LTR-Promotoren sind, die von einer niedrigen basalen Aktivität durch das Tat-Protein um ein Vielfaches transaktivierbar waren. Einerseits ist daraus ersichtlich, dass die geringe basale, Tat-unabhängige Transkription nicht nur für Isolate der Gruppe M, sondern auch für Isolate der Gruppe N und O zutrifft. Aus den Ergebnissen folgt auch, dass die LTR aller Gruppen und Subtypen mit dem Tat-Protein von Subtyp B transaktivierbar ist. Das könnte bedeuten, dass der Mechanismus der Tat-vermittelten Transaktivierung in allen Subtypen und Gruppen sehr ähnlich verläuft. Ob autologe Tat-Proteine eine stärkere Transaktivierung bewirken, das heißt, ob für die Transaktivierung eine Koevolution des Transaktivators und der TAR-Region stattgefunden hat, ist hier nicht untersucht worden. Für die LTR von CRF01_AE und B wurde gezeigt, dass Tat von Subtyp B die LTR von B und E gleich gut, also unabhängig von der TAR-Struktur transaktiviert (Montano *et al.*, 1998).

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass verschiedene LTR-Promotoren desselben Subtyps sehr unterschiedliche absolute Promotorstärken aufweisen können. Auch Promotoren, die defekte Bindungsstellen besitzen, erwiesen sich als starke Promotoren. Offensichtlich existieren Mechanismen, die ihre Aktivität kompensatorisch modulieren.

Daraus folgt, dass trotz zahlreicher subtyp-spezifischer Unterschiede in den *cis*-regulierenden Elementen keine subtyp- oder gruppen-spezifische Aktivität der LTR abgeleitet werden kann. Vielmehr scheint die Aktivität jedes LTR-Promotors auf eine individuelle Promotorstruktur zurückzuführen zu sein. Die Aktivität der LTR ist somit nicht gruppen- oder subtyp-spezifisch, sondern isolat-spezifisch.

5.4 Abhängigkeit der Promotorstärke von Strukturmerkmalen der LTR

Da die Aktivität einer LTR in dem hier benutzten *in vitro*-Modell offensichtlich nicht von einer subtyp-spezifischen Promotorstruktur abhängt, stellt sich die Frage, ob es gemeinsame Strukturmerkmale gibt, die eine LTR unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit oder Subtypklassifikation zu einem starken oder schwachen Promotor machen. Dazu wurden die LTR-Promotoren anhand ihrer basalen Transkriptionsaktivität in **starke, mittelstarke und schwache** Promotoren gruppiert und hinsichtlich struktureller Ähnlichkeiten analysiert.

Nur bei den starken Promotoren konnte ein Strukturelement identifiziert werden, das eindeutig die Stärke der absoluten Promotoraktivität beeinflusst. Zu den vier in dieser Studie als starke Promotoren klassifizierten LTR-Fragmenten gehören auffallenderweise die LTR-Promotoren O-MVP5180/ O3 und die LTR des Isolates C-15, die beide ein drittes funktionales NFκB-Motiv besitzen. Auch in anderen Studien erwies sich die Subtyp C-LTR als ein starker Promotor, dessen hohe Transkriptionsaktivität auf die dritte NFκB *site* in Verbindung mit einer modifizierten USF-Bindungsstelle zurückgeführt wurde (Naghavi *et al.*, 1999; Montano *et al.*, 1997). Im Falle der hier untersuchten O-LTR mit zwei bzw. drei NFκB-Motiven ist die höhere Aktivität der O3-LTR im Vergleich zur O2-LTR direkt und eindeutig auf die dritte NFκB-*site* zurückzuführen, da sich die beiden Promotoren nur darin unterscheiden. Da auch eine B-LTR (NL4.3) und eine D-LTR (D-21) zu den starken basalen Promotoren zählen, kann die Höhe der Aktivität allerdings nicht ausschließlich über NFκB reguliert sein, auch wenn die Bedeutung der NFκB-Kontrolle eindeutig erwiesen ist. Auch bei der Transaktivierung des basalen Promotors durch Tat gehören O-MVP5180/ O3 und C-15 zu den Promotoren mit der höchsten absoluten Aktivität.

Insgesamt sind zwar keine weiteren eindeutigen Korrelationen zwischen regulatorischen Elementen und der Höhe der Promotoraktivität ersichtlich, es ergeben sich jedoch einige interessante Aspekte, die zu Hypothesen über mögliche synergistische oder antagonistische Interaktionen von Transkriptionsfaktoren führen und damit Anlass zu gezielten Untersuchungen geben. So kann man beispielsweise aus dem Vergleich des starken LTR-Promotors D-21 zu dem mittelstarken D-1-Promotor, die sich nur in modulierenden *cis*-Elementen unterscheiden, eine aktivierende Rolle für die USF-Bindungsstelle in dem Isolat D-21 postulieren. Diese könnte man auch nach *in vitro* Mutagenese der LTR experimentell überprüfen. Der Vergleich der beiden CRF01_AE-Isolate, die einmal mit AE-3 als schwachem Promotor und mit AE-25 als mittelstarkem bis starkem Promotor vertreten waren, führte zu der Vermutung, dass die ETS- und/ oder AP-1 Regulation auch über die Höhe der Promotorstärke mitentscheidet. Auch der Einfluss der beiden wichtigen zusätzlichen Aktivatoren der HIV-Transkription ließe sich anhand dieser beiden sehr ähnlichen Isolate desselben Typs überprüfen.

Auch aus der Vermehrungseffizienz der HIV-1 Subtypen auf PBMC ergab sich kein Hinweis auf subtyp-spezifische oder gruppen-spezifische Unterschiede. Die Vermehrungseffizienz in Zellkulturen wird aus dem p24 Antigen-Titer wie auch aus den infektiösen Titern der produzierten Viren im Zellkulturüberstand abgeleitet. Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten *in vivo* Untersuchungen derselben Isolate zeigen, dass die Replikationseffizienz in

primären Zielzellen von HIV-1 nicht dem Subtyp der LTR korreliert (Rokos *et al.*, in Vorbereitung).

5.5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen teilweise im Gegensatz zu anderen Arbeiten, insbesondere aus der Gruppe um Max Essex (Montano *et al.*, 1997; Roof *et al.*, 2002). In jenen Arbeiten waren oft nur einzelne Vertreter von Subtypen oder Isolate mit gleicher Herkunft untersucht worden. Aus den Ergebnissen folgerte man, dass deren Eigenschaften charakteristisch für den jeweiligen Subtyp seien. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, reduzieren sich die subtyp-spezifischen Strukturmerkmale, sobald mehrere Isolate eines Subtyps mit unterschiedlicher Herkunft in die Untersuchung einbezogen werden. Zu allen bisher als subtyp-charakteristisch bezeichneten Strukturelementen wurden in dieser Arbeit Ausnahmen identifiziert, die auch in der funktionalen Analyse keine subtyp-spezifischen Eigenschaften hinsichtlich der Transkriptionskontrolle zuließen. Auch zwischen den Gruppen M, N und O von HIV-1 gibt es trotz ihrer hohen Nukleotiddivergenz und der Tatsache, dass sie vermutlich auf unterschiedliche Transmissionsereignisse zurückgehen, keine auffälligen stringenten gruppenbezogenen Spezifitäten bezüglich der Transkriptionskontrolle.

Da der Subtyp C und die rekombinante Form CRF01_AE die höchste Prävalenz weltweit besitzen, wurde ihre schnelle Expansion mit einer erhöhten Transkriptionsaktivität korreliert (Montano *et al.*, 1997 und 1998). Eine Hypothese war, dass die divergente Transkriptionskontrolle von HIV-1 zur ungleichen Ausbreitungsdynamik von HIV beiträgt. Die Ergebnisse aus dieser Untersuchung sprechen jedoch gegen subtyp-spezifische Effekte, die durch unterschiedliche Transkriptionsraten bedingt wären. Dies steht in Übereinstimmung auch mit anderen Untersuchungsergebnissen, in denen auch keine subtyp-spezifische Vermehrungseffizienz in diversen primären Zielzellen von HIV-1 beobachtet wurde (Dittmar *et al.*, 1997; Rokos *et al.*, in Vorbereitung). Der Gebrauch von Korezeptoren bei der Infektion der Zielzelle scheint nicht subtyp-spezifisch zu sein (Dittmar *et al.*, 1997; Kücherer *et al.*, in Vorbereitung). Zur Erklärung des divergenten Ausbreitungsmusters wird man weitere Parameter berücksichtigen und analysieren müssen. Einen wesentlichen Faktor, der in der globalen Epidemie zum Tragen kommen könnte, stellen populationsgenetische Marker dar, die zu unterschiedlichen Suszeptibilitäten für HIV-Infektionen führen, wie es z.B. für die HLA-Polymorphismen beschrieben ist (Rohowsky-Kochan *et al.*, 1998). Auch populations-spezifische Unterschiede in der Frequenz bestimmter Korezeptorallele könnten für unterschiedliche Ausbreitungsraten von HIV von Bedeutung sein (Yang *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 2001). Soziodemografische Faktoren und kulturell bedingte Unterschiede können

ebenfalls zu unterschiedlichen Ausbreitungsdynamiken beitragen, bei denen der sich ausbreitende Virustyp nur eine untergeordnete Rolle spielt, da er nur auf einen Gründerviruseffekt zurückgehen könnte.

Es gibt jedoch auch einige experimentelle Einschränkungen, die eine endgültige Beantwortung der Frage nach einer subtyp-spezifischen Transkriptionskontrolle und ihren Konsequenzen verfrüht erscheinen lassen.

Einige erforderliche ergänzende Experimente zur Rolle auffälliger *cis*-regulatorischer Elemente sind unter 4.2.3.3 bereits beschrieben. Es ist zu beachten, dass die Tat-Transaktivierung nur mit Subtyp B Tat durchgeführt wurde, was ebenfalls eine Einschränkung der Aussagekraft der Ergebnisse darstellt.

Die LTR-Aktivität wurde hier außerhalb eines viralen Kontextes in einem Reporter-System in eukaryoten Zelllinien untersucht, die nicht Zielzellen von HIV-1 sind. Dies schließt zwar Überlagerungen mit anderen viralen Kontrollmechanismen aus, hat aber den Nachteil, dass zell-spezifische Effekte durch Unterschiede im Expressionsprofil an Transkriptionsfaktoren nicht erfasst werden. Primärzellen von HIV-1 sind jedoch sehr schlecht transfizierbar. Um die virale LTR-Aktivität verschiedener HIV-Subtypen in Primärzellen der HIV-Infektion zu untersuchen, kann die LTR über adenovirale Vektoren in Primärzellen wie z.B. Monozyten/ Makrophagen und Dendritische Zellen eingebracht werden. Diese Strategie wurde erfolgreich zur Untersuchung der Funktion des Nef-Proteins in Primärzellen eingesetzt (Swingler *et al.*, 1999), wurde im Rahmen dieser Promotion im Hinblick auf die Untersuchung der LTR-Aktivität bereits begonnen und soll in der Arbeitsgruppe fortgesetzt werden (s. Anhang).

6 Zusammenfassung

HIV-1 wird in drei genetisch distinkte Gruppen, M (*major*) N (*non-M, non-O*) und O (*outlier*) klassifiziert. Innerhalb der M-Gruppe wurden bislang 9 Subtypen und eine zunehmende Anzahl rekombinanter Viren (CRF, *circulating recombinant form*) identifiziert. Die Subtypen und CRF sind weltweit in Bezug auf die geographische Region und die Transmissionsgruppe sehr unterschiedlich verbreitet. Neben soziodemographischen Faktoren können die biologischen Eigenschaften des Wirtes und des Virus diese unterschiedliche Prävalenz beeinflussen.

Die subtyp-spezifische Sequenzvariation des LTR-Promotors von HIV-1 (*long terminal repeat*) könnte zu einer divergenten Transkriptionskontrolle der Genexpression führen, die zu subtyp-spezifischen Unterschieden in der Replikationseffizienz und letztendlich in der Ausbreitungsdynamik der Subtypen führen könnte. Auch eine subtyp-spezifische Replikationseffizienz in den unterschiedlichen Zielzellen von HIV-1 wird diskutiert.

Zu Beginn dieser Arbeit waren subtyp-spezifische strukturelle Unterschiede der LTR anhand eines limitierten Sets publizierter LTR-Sequenzen abzuleiten. Ausgehend von einem Isolat von Subtyp B, C und von CRF01_AE waren auch funktionale Unterschiede der LTR mit Unterschieden in der LTR-Architektur korreliert worden. Diese Ergebnisse stützten die Hypothese einer divergenten Transkriptionsregulation in Abhängigkeit vom Subtyp der LTR .

In dieser Arbeit wurde erstmals die strukturelle Promotororganisation und die funktionale Aktivität des LTR-Promotors nicht nur bei verschiedenen Subtypen und CRF der Gruppe M, sondern auch im Vergleich zur Gruppe N und Gruppe O analysiert.

Dazu wurde die provirale LTR von jeweils zwei Vertretern der Subtypen A bis G, von der rekombinanten Form CRF01_AE und von jeweils einem Vertreter der Gruppe N und der Gruppe O in einen Luziferase-Reporter-Vektor kloniert. Pro Isolat wurden 4-10 Klone sequenziert und analysiert. In phylogenetischen Analysen wurde die ermittelte LTR-Sequenz im Vergleich zu den aktuellen Referenzsequenzen der LTR aus der HIV-Datenbank klassifiziert und eine detaillierte Strukturanalyse der vorliegenden Transkriptionsfaktorbindungsstellen (*cis*-regulatorische Elemente) durchgeführt. Die LTR-Promotoraktivität repräsentativer Klone wurde in standardisierten transienten Transfektionsassays in der Zelllinie COS-Z-28 untersucht.

Aus dem Vergleich der LTR-Promotororganisation folgt, dass es keine Strukturmerkmale gibt, in denen sich die Isolate eines Subtyps spezifisch unterscheiden. Meist wurde bei einem einzelnen Vertreter eines anderen Subtyps oder einer Gruppe ein ähnliches Bindungsmotiv identifiziert. Zum Beispiel wurde das für CRF01_AE bisher als charakteristisch beschriebene veränderte Motiv der TATAA⁻²⁸-Box, ein wesentliches Element zur Bildung des basalen Transkriptionsinitiationskomplexes, auch bei dem Isolat der N-Gruppe identifiziert. Auch der NF κ B-Enhancer gilt als subtyp-spezifisches Merkmal. Bislang galten drei NF κ B-Bindungs-motive als charakteristisch für die LTR von Subtyp C-Viren. Es wurde jedoch ein Subtyp C Isolat identifiziert, das nur zwei NF κ B-Bindungsstellen aufweist, während bei einem Gruppe O-Isolat ein drittes NF κ B-Motiv nach Kultivierung der Viren beobachtet wurde.

Insgesamt ist der LTR-Promotor des N-Isolates der Gruppe M sehr ähnlich, der Aufbau der O-LTR unterscheidet sich dagegen deutlich von der LTR der M- und der N-Gruppe.

Die Promotoren aller Gruppen wiesen eine geringe basale Transkriptionsaktivität auf und waren durch das Tat-Protein von Subtyp B transaktivierbar. Die LTR-Aktivität war bei den einzelnen Virusisolaten unterschiedlich, die Aktivitätsunterschiede waren jedoch nicht auf die Zugehörigkeit zu einer Gruppe oder zu einem Subtyp zurückzuführen. Vielmehr scheinen individuelle Strukturmerkmale der LTR für die unterschiedliche Promotoraktivität verantwortlich zu sein.

LTR-Sequenzen mit drei NF κ B-Enhancer-Motiven zeigen eine erhöhte basale Promotoraktivität gegenüber LTR-Sequenzen mit den für HIV-1 üblichen zwei NF κ B-Enhancer-Motiven, unabhängig von der Subtyp- oder Gruppenzugehörigkeit der LTR. Isolate mit nur einer Bindungsstelle für NF κ B zeigen dagegen keinen signifikanten Aktivitätsverlust. Die LTR-Aktivität ist somit nur eingeschränkt korrelierbar mit der Anzahl der NF κ B-Enhancer-Motive.

Die Transkriptionsaktivität der LTR von HIV-1-Isolaten der Gruppen M, N und O ist somit nicht subtyp- oder gruppen-spezifisch, sondern isolat-spezifisch reguliert. Die Ergebnisse können jedoch eine divergente Transkriptionsregulation in primären Zielzellen von HIV-1 nicht ausschließen.

7 Summary

HIV-1 is classified into three distinct genetic groups: M (major), N (non-M; non-O) and O (outlier). Within the group M actually nine subtypes and an increasing number of circulating recombinant forms have been identified. The global spread of subtypes and CRF (*circulating recombinant form*) differs with respect to geographic regions and the routes of transmission. Besides sociodemographic factors, biological properties of the host and the virus may influence the different prevalences of the subtypes.

Subtype-specific sequence variation of the HIV-1 LTR promoter (*long terminal repeat*) could result in divergent transcriptional control of the gene expression, which in turn may lead to divergent replicative properties and may contribute to the dynamic spread of subtypes. Subtype-specific efficiency of replication depending on the HIV target cells is also discussed.

When the project was initiated subtype-specific structural differences of the LTR have been derived by means of a limited set of published LTR sequences. Starting from single isolates of subtype B, C and CRFO1_AE, functional differences of the LTR were correlated with differences of the LTR architecture. These results raise the possibility that the genetic diversity of the LTR may result in HIV-1 strains with different transcriptional regulation .

In this study the LTR enhancer/promoter regions of different subtypes of HIV-1 group M were characterized with regard to nucleotide sequence and promoter activity and for the first time they were analysed in comparison to group N and group O LTR promoters.

The proviral LTR of the subtypes A to G, of the recombinant form CRFO1_AE and of one group N and one group O strain was cloned into a *luciferase* reporter vector. Four to ten clones of each isolate were sequenced and analysed. The LTR-sequences were classified in phylogenetic analysis together with actual reference LTR sequences of the HIV database. A detailed structural analysis of *cis*-regulating enhancer/promoter elements was performed and the activity of representative LTR promoters was analysed in standardized transient transfection assays in COS-Z-28 cells.

There are only few subtype-specific structural features which are common to all isolates of a given subtype. In most cases within a subtype or group individual LTR sequences were identified being similar to other genotypes in single binding motifs. The TATAA⁻²⁸-box motif, for example, an essential element of the basic transcription initiation complex, has a characteristic mutation in the LTR of CRFO1_AE isolates, but this modification was also found in the N group. Also the structure of the NFκB enhancer is described to be subtype-specific. So far, the LTR of subtype C strains considered to carry three binding sites for

NF κ B. However, a subtype C isolate was identified, counting only two functional NF κ B sites, whereas in the LTR of an group O isolate a third NF κ B motif appeared upon cultivation of the virus.

Summarized, the organisation of the LTR enhancer/promoter of the N isolate is very similar to group M isolates, in contrast to the structure of the O-LTR which is distinct from the LTR of the M and the N group.

The promoters of all virus strains had low basal transcription activity and were activated by the viral transactivator protein Tat of subtype B. The LTR activities in individual isolates were different, but there was no correlation of these differences with the phylogenetic clade to which they belonged to. Individual structural features of the LTR are not likely to be responsible for the different promoter activities. LTR sequences with three NF κ B motifs showed a higher basal promoter activity in comparison to LTR sequences with two NF κ B motifs, no matter which subtype or group they belong to, whereas isolates with only one binding site for NF κ B had no significant loss of LTR activity. Therefore the correlation of the LTR activity and the number of NF κ B motifs is restrictive.

In conclusion the LTR-directed transcriptional regulation of HIV-1 isolates from group M, N and O is not specific of the subtype or group, but specific of the individual isolate. Finally, divergent transcriptional regulation in primary target cells of HIV-1 cannot be excluded.

8 Literatur

- Al-Harhi, L. and Roebuck, K.A.(1998). Human immunodeficiency virus type-1 transcription: role of the 5'-untranslated leader region (review). *Int J Mol Med JID - 9810955* **1**, 875-881.
- Alaeus, A., Lidman, K., Bjorkman, A., Giesecke, J., and Albert, J.(1999). Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *AIDS* **13**, 901-907.
- Alizon, M. and Montagnier, L.(1986). Lymphadenopathy/AIDS virus: genetic organization and relationship to animal lentiviruses. *Anticancer Res.* **6**, 403-411.
- Allan, J.S., Coligan, J.E., Lee, T.H., Barin, F., Kanki, P.J., M'Boup, S., McLane, M.F., Groopman, J.E., and Essex, M.(1987). Immunogenic nature of a Pol gene product of HTLV-III/LAV. *Blood* **69**, 331-333.
- Alkhatib, G., Broder, C.C., and Berger, E.A.(1996). Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. *J Virol JID - 0113724* **70**, 5487-5494.
- Antoni, B.A., Rabson, A.B., Kinter, A., Bodkin, M., and Poli, G.(1994). NF-kappa B-dependent and -independent pathways of HIV activation in a chronically infected T cell line. *Virology JID - 0110674* **202**, 684-694.
- Baeuerle, P.A. and Baltimore, D.(1988). I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science JID - 0404511* **242**, 540-546.
- Baldwin, A.S.J.(1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* **14**, 649-683.
- Baltimore, D.(1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature JID - 0410462* **226**, 1209-1211.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L.(1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science JID - 0404511* **220**, 868-871.
- Bassuk, A.G., Anandappa, R.T., and Leiden, J.M.(1997). Physical interactions between Ets and NF-kappaB/NFAT proteins play an important role in their cooperative activation of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells. *J.Virol.* **71**, 3563-3573.
- Beer, B.E., Bailes, E., Dapolito, G., Campbell, B.J., Goeken, R.M., Axthelm, M.K., Markham, P.D., Bernard, J., Zagury, D., Franchini, G., Sharp, P.M., and Hirsch, V.M.(2000). Patterns of genomic sequence diversity among their simian immunodeficiency viruses suggest that L'Hoest monkeys (*Cercopithecus lhoesti*) are a natural lentivirus reservoir. *J Virol JID - 0113724* **74**, 3892-3898.
- Benveniste, R.E., Arthur, L.O., Tsai, C.C., Sowder, R., Copeland, T.D., Henderson, L.E., and Oroszlan, S.(1986). Isolation of a lentivirus from a macaque with lymphoma: comparison with HTLV-III/LAV and other lentiviruses. *J.Virol.* **60**, 483-490.
- Berkhout, B. and Jeang, K.T.(1989). trans activation of human immunodeficiency virus type 1 is sequence specific for both the single-stranded bulge and loop of the trans-acting-responsive hairpin: a quantitative analysis. *J.Virol.* **63**, 5501-5504.

- Berkhout, B., Silverman, R.H., and Jeang, K.T.(1989). Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* **59**, 273-282.
- Bernstein, H.B. and Compans, R.W.(1992). Sulfation of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J Virol JID - 0113724* **66**, 6953-6959.
- Beug, H., Kahn, P., Vennstrom, B., Hayman, M.J., and Graf, T.(1985). How do retroviral oncogenes induce transformation in avian erythroid cells? *Proc.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* **226**, 121-126.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.(1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic.Acids.Res.* **7**, 1513-1523.
- Bishop, J.M.(1980). The molecular biology of RNA tumor viruses: a physician's guide. *N Engl J Med JID - 0255562* **303**, 675-682.
- Biswas, D.K., Salas, T.R., Wang, F., Ahlers, C.M., Dezube, B.J., and Pardee, A.B.(1995). A Tat-induced auto-up-regulatory loop for superactivation of the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J.Virol.* **69**, 7437-7444.
- Bittner, J.J. "Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice". *Science* **84** (1936):162.
- Bjorndal, A., Sonnerborg, A., Tscherning, C., Albert, J., and Fenyo, E.M.(1999). Phenotypic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates of Ethiopian AIDS patients. *AIDS Res Hum Retroviruses JID - 8709376* **15**, 647-653.
- Bohan, C.A., Kashanchi, F., Ensoli, B., Buonaguro, L., Boris-Lawrie, K.A., and Brady, J.N.(1992). Analysis of Tat transactivation of human immunodeficiency virus transcription in vitro. *Gene Expr.* **2**, 391-407.
- Brody, B.A., Kimball, M.G., and Hunter, E.(1994). Mutations within the transmembrane glycoprotein of Mason-Pfizer monkey virus: loss of SU-TM association and effects on infectivity. *Virology JID - 0110674* **202**, 673-683.
- Bryant, M., Getman, D., Smidt, M., Marr, J., Clare, M., Dillard, R., Lansky, D., DeCrescenzo, G., Heintz, R., and Houseman, K.(1995). SC-52151, a novel inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother JID - 0315061* **39**, 2229-2234.
- Carr, J.K., Salminen, M.O., Albert, J., Sanders-Buell, E., Gotte, D., Birx, D.L., and McCutchan, F.E.(1998). Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. *Virology* **247**, 22-31.
- 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.
- Cheng-Mayer, C. and Levy, J.A.(1988). Distinct biological and serological properties of human immunodeficiency viruses from the brain. *Ann Neurol JID - 7707449* **23 Suppl**, S58-S61
- Chermann, J.C., Barre-Sinoussi, F., Dauguet, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L.(1983). Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother JID - 1305576* **32**, 48-53.

- Cichutek, K., Merget, H., Norley, S., Linde, R., Kreuz, W., Gahr, M., and Kurth, R.(1992). Development of a quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**, 7365-7369.
- Clavel, F., Guyader, M., Guetard, D., Salle, M., Montagnier, L., and Alizon, M.(1986). Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**, 691-695.
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., and Vogt, P.(1986). What to call the AIDS virus? *Nature JID - 0410462* **321**, 10-Coffin, J.
- Coffin, J.M.(1979). Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. *J Gen Virol JID - 0077340* **42**, 1-26.
- Coffin, J.M.(1992). Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol JID - 0110513* **176**, 143-164.
- Coffin, J.M.(1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science JID - 0404511* **267**, 483-489.
- Cohen, E.A., Subbramanian, R.A., and Gottlinger, H.G.(1996). Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol JID - 0110513* **214**, 219-235.
- Cooney, A.J., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W., and Tsai, M.J.(1991). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor binds to a negative regulatory region in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J.Virol.* **65**, 2853-2860.
- Cornelissen, M., van den Burg, R., Zorgdrager, F., Lukashov, V., and Goudsmit, J.(1997). pol gene diversity of five human immunodeficiency virus type 1 subtypes: evidence for naturally occurring mutations that contribute to drug resistance, limited recombination patterns, and common ancestry for subtypes B and D. *J.Virol.* **71**, 6348-6358.
- Courgnaud, V., Pourrut, X., Bibollet-Ruche, F., Mpoudi-Ngole, E., Bourgeois, A., Delaporte, E., and Peeters, M.(2001). Characterization of a novel simian immunodeficiency virus from guereza colobus monkeys (*Colobus guereza*) in Cameroon: a new lineage in the nonhuman primate lentivirus family. *J Virol JID - 0113724* **75**, 857-866.
- Craven, R.C., Bennett, R.P., and Wills, J.W.(1991). Role of the avian retroviral protease in the activation of reverse transcriptase during virion assembly. *J Virol JID - 0113724* **65**, 6205-6217.
- Cullen, B.R.(1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell JID - 0413066* **93**, 685-692.
- Daniel, M.D., Letvin, N.L., King, N.W., Kannagi, M., Sehgal, P.K., Hunt, R.D., Kanki, P.J., Essex, M., and Desrosiers, R.C.(1985). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science JID - 0404511* **228**, 1201-1204.
- Daniel, M.D., Li, Y., Naidu, Y.M., Durda, P.J., Schmidt, D.K., Troup, C.D., Silva, D.P., MacKey, J.J., Kestler, H.W., and Sehgal, P.K.(1988). Simian immunodeficiency virus from African green monkeys. *J.Virol.* **62**, 4123-4128.
- Dawson, D.(1999). Origin of AIDS discovered. *STEP Perspect* **99**, 8

- De Baar, M.P., De Ronde, A., Berkhout, B., Cornelissen, M., Van Der Horn, K.H., Van Der Schoot, A.M., De Wolf, F., Lukashov, V.V., and Goudsmit, J.(2000). Subtype-specific sequence variation of the HIV type 1 long terminal repeat and primer-binding site. *AIDS Res Hum Retroviruses JID - 8709376* **16**, 499-504.
- De Cock, K.M., Adjorlolo, G., Ekpini, E., Sibailly, T., Kouadio, J., Maran, M., Brattegaard, K., Vetter, K.M., Doorly, R., and Gayle, H.D.(1993). Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic. *JAMA JID - 7501160* **270**, 2083-2086.
- Demarchi, F., d'Adda, d.F., Falaschi, A., and Giacca, M.(1996). Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* **70**, 4427-4437.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, 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. *Nature JID - 0410462* **381**, 661-666.
- Diaz, R.S., Sabino, E.C., Mayer, A., Mosley, J.W., and Busch, M.P.(1995). Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a dually exposed transfusion recipient. The Transfusion Safety Study Group. *J Virol JID - 0113724* **69**, 3273-3281.
- Dickinson, L.A., Trauger, J.W., Baird, E.E., Dervan, P.B., Graves, B.J., and Gottesfeld, J.M.(1999). Inhibition of Ets-1 DNA binding and ternary complex formation between Ets-1, NF-kappaB, and DNA by a designed DNA-binding ligand. *J.Biol.Chem.* **274**, 12765-12773.
- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M., Skinner, M.A., and Valerio, R.(1989). Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**, 6925-6929.
- Dittmar, M.T., McKnight, A., Simmons, G., Clapham, P.R., Weiss, R.A., and Simmonds, P.(1997). HIV-1 tropism and co-receptor use. *Nature* **385**, 495-496.
- Dittmar, M.T., Simmons, G., Hibbitts, S., O'Hare, M., Louisirochanakul, S., Beddows, S., Weber, J., Clapham, P.R., and Weiss, R.A.(1997). Langerhans cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 subtype A through F isolates derived from different transmission groups. *J.Virol.* **71**, 8008-8013.
- Dittmar, M.T., Zekeng, L., Kaptue, L., Eberle, J., Krausslich, H.G., and Gurtler, L.(1999). Coreceptor requirements of primary HIV type 1 group O isolates from Cameroon. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **15**, 707-712.
- Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G., and Doms, R.W.(1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell JID - 0413066* **85**, 1149-1158.
- Dragic, T., Charneau, P., Clavel, F., and Alizon, M.(1992). Complementation of murine cells for human immunodeficiency virus envelope/CD4-mediated fusion in human/murine heterokaryons. *J.Virol.* **66**, 4794-4802.

- Felsenstein, J.(1992). Estimating effective population size from samples of sequences: inefficiency of pairwise and segregating sites as compared to phylogenetic estimates. *Genet.Res.* **59**, 139-147.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP: Phylogeny interference package, version 3.5c. Distributed by the author.
- 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. *Science* **272**, 872-877.
- Fenyo, E.M., Fiore, J., Karlsson, A., Albert, J., and Scarlatti, G.(1994). Biological phenotypes of HIV-1 in pathogenesis and transmission. *Antibiot.Chemother.* **46**, 18-24.
- Fischinger, P.J., Dunlop, N.M., and Robey, W.G.(1985). Pathogenesis and virus content of lymphomas induced by pure ecotropic Graffi murine leukemia virus. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* **11**, 241-251.
- Folkman, J., Haudenschild, C.C., and Zetter, B.R.(1979). Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76**, 5217-5221.
- Freed, E.O., Orenstein, J.M., Buckler-White, A.J., and Martin, M.A.(1994). Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J Virol JID - 0113724* **68**, 5311-5320.
- Fukasawa, M., Miura, T., Hasegawa, A., Morikawa, S., Tsujimoto, H., Miki, K., Kitamura, T., and Hayami, M.(1988). Sequence of simian immunodeficiency virus from African green monkey, a new member of the HIV/SIV group. *Nature* **333**, 457-461.
- Gaines, H., von Sydow, M.A., von Stedingk, L.V., Biberfeld, G., Bottiger, B., Hansson, L.O., Lundbergh, P., Sonnerborg, A.B., Wasserman, J., and Strannegaard, O.O.(1990). Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS JID - 8710219* **4**, 995-999.
- Galai, N., Kalinkovich, A., Burstein, R., Vlahov, D., and Bentwich, Z.(1997). African HIV-1 subtype C and rate of progression among Ethiopian immigrants in Israel. *Lancet* **349**, 180-181.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., and Safai, B.(1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science JID - 0404511* **224**, 500-503.
- Galpin, J.E., Casciato, D.A., and Richards, S.B.(1994). A phase I clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (TAF) (HIV-1IIIIBenv-transduced, autologous fibroblasts) in asymptomatic HIV-1 infected subjects. *Hum Gene Ther JID - 9008950* **5**, 997-1017.
- Gao, F., Robertson, D.L., Carruthers, C.D., Li, Y., Bailes, E., Kostrikis, L.G., Salminen, M.O., Bibollet-Ruche, F., Peeters, M., Ho, D.D., Shaw, G.M., Sharp, P.M., and Hahn, B.H.(1998). An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I). *J Virol* **72**, 10234-10241.

- Gao, F., Robertson, D.L., Carruthers, C.D., Morrison, S.G., Jian, B., Chen, Y., Barre-Sinoussi, F., Girard, M., Srinivasan, A., Abimiku, A.G., Shaw, G.M., Sharp, P.M., and Hahn, B.H.(1998). A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 5680-5698.
- 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*. *Nature* **397**, 436-441.
- Gaynor, R.(1992). Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS JID - 8710219* **6**, 347-363.
- Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H., Ozel, M., Pauli, G., and Koch, M.A.(1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology JID - 0110674* **156**, 171-176.
- Gelderblom, H.R.(1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5**, 617-637.
- Goldstein, S., Ourmanov, I., Brown, C.R., Beer, B.E., Elkins, W.R., Plishka, R., Buckler-White, A., and Hirsch, V.M.(2000). Wide range of viral load in healthy african green monkeys naturally infected with simian immunodeficiency virus. *J.Virol.2000.Dec.;74.(24.):11744.-53.* **74**, 11744-11753.
- Gonda, M.A., Braun, M.J., Carter, S.G., Kost, T.A., Bess, J.W.J., Arthur, L.O., and Van der Maaten, M.J.(1987). Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. *Nature JID - 0410462* **330**, 388-391.
- Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A.(1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med JID - 0255562* **305**, 1425-1431.
- Goudsmit, J. and Lukashov, V.V.(1999). Dating the origin of HIV-1 subtypes. *Nature* **400**, 325-326.
- Griffin, G.E., Leung, K., Folks, T.M., Kunkel, S., and Nabel, G.J.(1989). Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B. *Nature* **339**, 70-73.
- Gurtler, L.G., Hauser, P.H., Eberle, J., von Brunn, 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.
- Guy, B., Kieny, M.P., Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M., Montagnier, L., and Lecocq, J.P.(1987). HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature JID - 0410462* **330**, 266-269.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., Taylor, M.E., Redfield, R.R., Markham, P.D., Salahuddin, S.Z., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., Parks, E.S., and Parks, W.P.(1986). Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* **232**, 1548-1553.
- Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M., and Sharp, P.M.(2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**, 607-614.

- Hallenberger, S., Tucker, S.P., Owens, R.J., Bernstein, H.B., and Compans, R.W.(1993). Secretion of a truncated form of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Virology* **193**, 510-514.
- Hennighausen, L. and Furth, P.A.(1990). NF-kB and HIV. *Nature* **343**, 218-219.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R.(1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**, 389-392.
- Hirsch, V.M. and Lifson, J.D.(2000). Simian immunodeficiency virus infection of monkeys as a model system for the study of AIDS pathogenesis, treatment, and prevention. *Adv.Pharmacol.2000.;49.:437.-77.* **49**, 437-477.
- Hiscott, J., Alper, D., Cohen, L., Leblanc, J.F., Sportza, L., Wong, A., and Xanthoudakis, S.(1989). Induction of human interferon gene expression is associated with a nuclear factor that interacts with the NF-kappa B site of the human immunodeficiency virus enhancer. *J.Virol.* **63**, 2557-2566.
- Ho, D.D.(1995). HIV-1 dynamics in vivo. *J Biol Regul Homeost Agents JID-8809253* **9**,76-77.
- Holzmeister, J., Ludewig, B., Pauli, G., and Simon, D.(1993). Sequence specific binding of the transcription factor c-Ets1 to the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat. *Biochem Biophys Res Commun JID - 0372516* **197**, 1229-1233.
- Hunt, J.C., Brennan, C.A., Golden, A.M., Yamaguchi, J., Lund, J.K., Vallari, A.S., Hickman, R.K., Zekeng, L., Gurtler, L.G., Hampl, H., Kaptue, L., and Devare, S.G.(1997). Molecular analyses of HIV-1 group O and HIV-2 variants from Africa. *Leukemia* **11 Suppl 3**, 138-141.
- Hymes, K.B., Cheung, T., Greene, J.B., Prose, N.S., Marcus, A., Ballard, H., William, D.C., and Laubenstein, L.J.(1981). Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases. *Lancet* **2**, 598-600.
- Isel, C. and Karn, J.(1999). Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J.Mol.Biol.* **290**, 929-941.
- Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J., and Varmus, H.E.(1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**, 280-283.
- Jeang, K.T., Chang, Y., Berkhout, B., Hammarskjold, M.L., and Rekosh, D.(1991). Regulation of HIV expression: mechanisms of action of Tat and Rev. *AIDS* **5 Suppl 2**, S3-14.
- Jeeninga, R.E., Hoogenkamp, M., Armand-Ugon, M., de Baar, M., Verhoef, K., and Berkhout, B.(2000). Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J Virol JID - 0113724* **74**, 3740-3751.
- Johnson, P.R., Gravell, M., Allan, J., Goldstein, S., Olmsted, R.A., Dapolito, G., McGann, C., London, W.T., Purcell, R.H., and Hirsch, V.M.(1989). Genetic diversity among simian immunodeficiency virus isolates from African green monkeys. *J.Med.Primatol.* **18**, 271-277.
- Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Luciw, P.A., and Tjian, R.(1986). Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* **232**, 755-759.

- Jones, K.A. and Peterlin, B.M.(1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem JID - 2985150R* **63**, 717-743.
- Kaleebu, P., French, N., Mahe, C., Yirell, D., Watera, C., Lyagoba, F., Nakiyingi, J., Rutebemberwa, A., Morgan, D., Weber, J., Gilks, C., and Whitworth, J.(2002). Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J.Infect.Dis.2002.May.1.;185.(9.):1244.-50.* **185**, 1244-1250.
- Kane, C.T., Montavon, C., Toure, M.A., Faye, M.A., Ndiaye, A.G., Diallo, A.G., NDoye, I., Liegeois, F., Delaporte, E., Mboup, S., and Peeters, M.(2001). Full-length genome sequencing of HIV type 1 group O viruses isolated from a heterosexual transmission cluster in Senegal. *AIDS Res.Hum.Retroviruses 2001.Aug.10.;17.(12.):1211.-6.* **17**, 1211-1216.
- Kanki, P.J., Allan, J., Barin, F., Redfield, R., Clumeck, N., Quinn, T., Mowovondi, F., Thiry, L., Burny, A., and Zagury, D.(1987). Absence of antibodies to HIV-2/HTLV-4 in six central African nations. *AIDS Res Hum Retroviruses JID - 8709376* **3**, 317-322.
- Kanki, P.J., Travers, K.U., Mboup, S., Hsieh, C.C., Marlink, R.G., Gueye-Ndiaye, A., Siby, T., Thior, I., Hernandez-Avila, M., and Sankale, J.L.(1994). Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet JID - 2985213R* **343**, 943-946.
- Kanki, P.J., Hamel, D.J., Sankale, J.L., Hsieh, C., Thior, I., Barin, F., Woodcock, S.A., Gueye-Ndiaye, A., Zhang, E., Montano, M., Siby, T., Marlink, R., NDoye, I., Essex, M.E., and Mboup, S.(1999). Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis* **179**, 68-73.
- Kaplan, A.H., Manchester, M., and Swanstrom, R.(1994). The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J.Virol.* **68**, 6782-6786.
- Karn, J.(1999). Tackling Tat. *J.Mol.Biol.* **293**, 235-254.
- Kashanchi, F., Shibata, R., Ross, E.K., Brady, J.N., and Martin, M.A.(1994a). Second-site long terminal repeat (LTR) revertants of replication-defective human immunodeficiency virus: effects of revertant TATA box motifs on virus infectivity, LTR-directed expression, in vitro RNA synthesis, and binding of basal transcription factors TFIID and TFIIA. *J.Virol.* **68**, 3298-3307.
- Kashanchi, F., Piras, G., Radonovich, M.F., Duvall, J.F., Fattaey, A., Chiang, C.M., Roeder, R.G., and Brady, J.N.(1994b). Direct interaction of human TFIID with the HIV-1 transactivator tat. *Nature* **367**, 295-299.
- Katz, R.A. and Skalka, A.M.(1994). The retroviral enzymes.*Annu.Rev.Biochem.* **63**, 133-173.
- Kawakami, K., Scheidereit, C., and Roeder, R.G.(1988). Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **85**, 4700-4704.
- Keet, I.P., Krijnen, P., Koot, M., Lange, J.M., Miedema, F., Goudsmit, J., and Coutinho, R.A.(1993). Predictors of rapid progression to AIDS in HIV-1 seroconverters. *AIDS* **7**, 51-57.

- Khan, A.S., Galvin, T.A., Lowenstine, L.J., Jennings, M.B., Gardner, M.B., and Buckler, C.E.(1991). A highly divergent simian immunodeficiency virus (SIVstm) recovered from stored stump-tailed macaque tissues. *J.Virol.* **65**, 7061-7065.
- Kim, Y.K., Bourgeois, C.F., Isel, C., Churcher, M.J., and Karn, J.(2002). Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated transcriptional elongation. *Mol.Cell Biol.*2002.Jul.;22.(13.):4622.-37. **22**, 4622-4637.
- Kimura, M.(1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J.Mol.Evol.* **16**, 111-120.
- Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J.(1996). The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression. *Eur J Biochem* **240**, 491-507.
- Klaver, B. and Berkhout, B.(1994). Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J.Virol.* **68**, 3830-3840.
- Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B.H., Wolinsky, S., and Bhattacharya, T.(2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000.Jun.9.;288.(5472.):1789.-96. **288**, 1789-1796.
- Korber, B.T., Allen, E.E., Farmer, A.D., and Myers, G.L.(1995). Heterogeneity of HIV-1 and HIV-2. *AIDS* **9 Suppl A**, S5-18.
- Kretzschmar, M., Meisterernst, M., Scheidereit, C., Li, G., and Roeder, R.G.(1992). Transcriptional regulation of the HIV-1 promoter by NF-kappa B in vitro. *Genes Dev.* **6**, 761-774.
- Kunanusont, C., Foy, H.M., Kreiss, J.K., Rerks-Ngarm, S., Phanuphak, P., Raktham, S., Pau, C.P., and Young, N.L.(1995). HIV-1 subtypes and male-to-female transmission in Thailand. *Lancet* **345**, 1078-1083.
- Kurth, R. and Norley, S.(1994). Simian immunodeficiency viruses of African green monkeys. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **188**, 21-33.
- Lapatto, R., Blundell, T., Hemmings, A., Overington, J., Wilderspin, A., Wood, S., Merson, J.R., Whittle, P.J., Danley, D.E., and Geoghegan, K.F.(1989). X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes. *Nature JID - 0410462* **342**, 299-302.
- Laspia, M.F., Rice, A.P., and Mathews, M.B.(1989). HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell JID - 0413066* **59**, 283-292.
- Le Grice, S.F., Naas, T., Wohlgensinger, B., and Schatz, O.(1991). Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J.* **10**, 3905-3911.
- Leitner, T., Alaeus, A., Marquina, S., Lilja, E., Lidman, K., and Albert, J.(1995). Yet another subtype of HIV type 1? *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **11**, 995-997.
- Leonard, J., Parrott, C., Buckler-White, A.J., Turner, W., Ross, E.K., Martin, M.A., and Rabson, A.B.(1989). The NF-kappa B binding sites in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat are not required for virus infectivity. *J.Virol.* **63**, 4919-4924.

- Letvin, N.L., Daniel, M.D., Sehgal, P.K., Desrosiers, R.C., Hunt, R.D., Waldron, L.M., MacKey, J.J., Schmidt, D.K., Chalifoux, L.V., and King, N.W.(1985). Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science JID - 0404511* **230**, 71-73.
- Li, W.H., Tanimura, M., and Sharp, P.M.(1988). Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences. *Mol.Biol.Evol.* **5**, 313-330.
- Liitsola, K., Tashkinova, I., Laukkanen, T., Korovina, G., Smolskaja, T., Momot, O., Mashkilleyson, N., Chaplinskias, S., Brummer-Korvenkontio, H., Vanhatalo, J., Leinikki, P., and Salminen, M.O.(1998). HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS* **12**, 1907-1919.
- Liu, Y.Z. and Latchman, D.S.(1997). The octamer-binding proteins Oct-1 and Oct-2 repress the HIV long terminal repeat promoter and its transactivation by Tat. *Biochem.J.* **322** (Pt 1), 155-158.
- Louwagie, J., McCutchan, F., van der Groen, G., Peeters, M., Fransen, K., Piot, P., Gershy-Damet, G.M., Roelants, G., Van Heuverswyn, H., and Eddy, G.(1992). Genetic comparison of HIV-1 isolates from Africa, Europe, and North America. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **8** , 1467-1469.
- Lu, Y., Stenzel, M., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A.(1989). Effects of long terminal repeat mutations on human immunodeficiency virus type 1 replication. *J.Virol.* **63**, 4115-4119.
- Lu, Y.C., Touzjian, N., Stenzel, M., Dorfman, T., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A.(1990). Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **64**, 5226-5229.
- MacGregor, G.R., Mogg, A.E., Burke, J.F., and Caskey, C.T.(1987). Histochemical staining of clonal mammalian cell lines expressing E. coli beta galactosidase indicates heterogeneous expression of the bacterial gene. *Somat.Cell Mol.Genet.* **13**, 253-265.
- Madore, S.J. and Cullen, B.R.(1993). Genetic analysis of the cofactor requirement for human immunodeficiency virus type 1 Tat function. *J Virol JID - 0113724* **67**, 3703-3711.
- Majello, B., Napolitano, G., and Lania, L.(1998). Recruitment of the TATA-binding protein to the HIV-1 promoter is a limiting step for Tat transactivation. *AIDS* **12**, 1957-1964.
- Mallardo, M., Dragonetti, E., Baldassarre, F., Ambrosino, C., Scala, G., and Quinto, I.(1996). An NF-kappaB site in the 5'-untranslated leader region of the human immunodeficiency virus type 1 enhances the viral expression in response to NF-kappaB-activating stimuli. *J.Biol.Chem.* **271**, 20820-20827.
- Mansky, L.M. and Temin, H.M.(1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J.Virol.* **69**, 5087-5094.
- Margolis, D.M., Somasundaran, M., and Green, M.R.(1994). Human transcription factor YY1 represses human immunodeficiency virus type 1 transcription and virion production. *J.Virol.* **68** , 905-910.
- Markovitz, D.M.(1993). Infection with the human immunodeficiency virus type 2. *Ann Intern Med JID - 0372351* **118**, 211-218.

- Marx, P.A., Li, Y., Lerche, N.W., Sutjipto, S., Gettie, A., Yee, J.A., Brotman, B.H., Prince, A.M., Hanson, A., and Webster, R.G.(1991). Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a west African pet sooty mangabey. *J.Virol.* **65**, 4480-4485.
- Mastro, T.D., Satten, G.A., Nopkesorn, T., Sangkharomya, S., and Longini, I.M.J.(1994). Probability of female-to-male transmission of HIV-1 in Thailand. *Lancet* **343**, 204-207.
- Masuda, E.S., Naito, Y., Tokumitsu, H., Campbell, D., Saito, F., Hannum, C., Arai, K., and Arai, N.(1995). NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol* **15**, 2697-2706.
- Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onorato, I., Stouwe, R.A., Holzman, R.S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H.W., and Cunningham-Rundles, S.(1981). An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med JID - 0255562* **305**, 1431-1438.
- McCutchan, F.E., Hegerich, P.A., Brennan, T.P., Phanuphak, P., Singharaj, P., Jugsudee, A., Berman, P.W., Gray, A.M., Fowler, A.K., and Burke, D.S.(1992). Genetic variants of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **8**, 1887-1895.
- McCutchan, F.E., Salminen, M.O., Carr, J.K., and Burke, D.S.(1996). HIV-1 genetic diversity. *AIDS* **10 Suppl 3**, S13-S20
- McCutchan, F.E.(2000). Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* **14 Suppl 3**, S31-S44
- McGrath, K.M., Hoffman, N.G., Resch, W., Nelson, J.A., and Swanstrom, R.(2001). Using HIV-1 sequence variability to explore virus biology. *Virus Res JID - 8410979* **76**, 137-160.
- Meyerhans, A., Cheynier, R., Albert, J., Seth, M., Kwok, S., Sninsky, J., Morfeldt-Manson, L., Asjo, B., and Wain-Hobson, S.(1989). Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* **58**, 901-910.
- Miyamoto, N.G., Moncollin, V., Egly, J.M., and Chambon, P.(1985). Specific interaction between a transcription factor and the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter. *EMBO J.* **4**, 3563-3570.
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Sumida, M., Hiraki, S., Tsubota, T., Kimura, I., Miyamoto, K., and Sato, J.(1980). A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Gann JID - 8214471* **71**, 155-156.
- Montano, M.A., Kripke, K., Norina, C.D., Achacoso, P., Herzenberg, L.A., Roy, A.L., and Nolan, G.P.(1996). NF-kappa B homodimer binding within the HIV-1 initiator region and interactions with TFII-I. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 12376-12381.
- Montano, M.A., Novitsky, V.A., Blackard, J.T., Cho, N.L., Katzenstein, D.A., and Essex, M.(1997). Divergent transcriptional regulation among expanding human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Virol* **71**, 8657-8665.
- Montano, M.A., Nixon, C.P., and Essex, M.(1998). Dysregulation through the NF-kappaB enhancer and TATA box of the human immunodeficiency virus type 1 subtype E promoter. *J Virol JID - 0113724* **72**, 8446-8452.

- Montano, M.A., Nixon, C.P., Ndung'u, T., Bussmann, H., Novitsky, V.A., Dickman, D., and Essex, M.(2000). Elevated tumor necrosis factor-alpha activation of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Southern Africa is associated with an NF-kappaB enhancer gain-of-function. *J Infect Dis* **181**, 76-81.
- Moses, A.V., Ibanez, C., Gaynor, R., Ghazal, P., and Nelson, J.A.(1994). Differential role of long terminal repeat control elements for the regulation of basal and Tat-mediated transcription of the human immunodeficiency virus in stimulated and unstimulated primary human macrophages. *J Virol* **68**, 298-307.
- Myers Gerald and Lu Hong, HIV Kompendium 1996: HIV and Molecular Mimicry.
- Nabel, G. and Baltimore, D.(1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**, 711-713.
- Nabel, G.J., Rice, S.A., Knipe, D.M., and Baltimore, D.(1988). Alternative mechanisms for activation of human immunodeficiency virus enhancer in T cells. *Science JID - 0404511* **239**, 1299-1302.
- Naghavi, M.H., Schwartz, S., Sonnerborg, A., and Vahlne, A.(1999). Long terminal repeat promoter/enhancer activity of different subtypes of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses JID - 8709376* **15**, 1293-1303.
- Naghavi, M.H., Estable, M.C., Schwartz, S., Roeder, R.G., and Vahlne, A.(2001). Upstream stimulating factor affects human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat-directed transcription in a cell-specific manner, independently of the HIV-1 subtype and the core-negative regulatory element. *J Gen Virol JID - 0077340* **82**, 547-559.
- Novembre, F.J., Hirsch, V.M., McClure, H.M., Fultz, P.N., and Johnson, P.R.(1992). SIV from stump-tailed macaques: molecular characterization of a highly transmissible primate lentivirus. *Virology* **186**, 783-787.
- Olmsted, R.A., Hirsch, V.M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R.(1989). Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A JID - 7505876* **86**, 8088-8092.
- Osborn, L., Kunkel, S., and Nabel, G.J.(1989). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**, 2336-2340.
- Osmanov, S., Heyward, W.L., and Esparza, J.(1996). HIV-1 genetic variability: implications for the development of HIV vaccines. *Antibiot Chemother* **48**, 30-38.
- Osmanov, S., Pattou, C., Walker, N., Schwardlander, B., and Esparza, J.(2002). Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.2002.Feb.1.;29.(2.):184.-90.* **29**, 184-190.
- Panganiban, A.T. and Temin, H.M.(1984). Circles with two tandem LTRs are precursors to integrated retrovirus DNA. *Cell JID - 0413066* **36**, 673-679.
- Parada, C.A., Yoon, J.B., and Roeder, R.G.(1995). A novel LBP-1-mediated restriction of HIV-1 transcription at the level of elongation in vitro. *J.Biol.Chem.* **270**, 2274-2283.
- Parkin, N.T., Chamorro, M., and Varmus, H.E.(1992). Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol JID - 0113724* **66**, 5147-5151.

- Peeters, M., Liegeois, F., Bibollet-Ruche, F., Patrel, D., Vidal, N., Esu-Williams, E., Mboup, S., Mpoudi, N.E., Koumare, B., Nzila, N., Perret, J.L., and Delaporte, E.(1998). Subtype-specific polymerase chain reaction for the identification of HIV-1 genetic subtypes circulating in Africa. *AIDS* **12**, 671-673.
- Peeters, M. and Sharp, P.M.(2000). Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* **2000.;14.Suppl.3.:S129-40.** **14 Suppl 3**, S129-S140
- Pereira, L.A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M.J., and Deacon, N.J.(2000). A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* **28**, 663-668.
- Pfutzner, A., Dietrich, U., von Eichel, U., von Briesen, H., Brede, H.D., Maniar, J.K., and Rubsamen-Waigmann, H.(1992). HIV-1 and HIV-2 infections in a high-risk population in Bombay, India: evidence for the spread of HIV-2 and presence of a divergent HIV-1 subtype. *J Acquir Immune Defic Syndr JID - 8812597* **5**, 972-977.
- Pinter, A., Honnen, W.J., Tilley, S.A., Bona, C., Zaghoulani, H., Gorny, M.K., and Zolla-Pazner, S.(1989). Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol JID - 0113724* **63**, 2674-2679.
- Piyasirisilp, S., McCutchan, F.E., Carr, J.K., Sanders-Buell, E., Liu, W., Chen, J., Wagner, R., Wolf, H., Shao, Y., Lai, S., Beyrer, C., and Yu, X.F.(2000). A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J.Virol.2000.Dec.;74.(23.):11286-95.* **74**, 11286-11295.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C.(1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A JID - 7505876* **77**, 7415-7419.
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., and Gallo, R.C.(1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500.
- Quinn, T.C.(1996). Global burden of the HIV pandemic. *Lancet* **348**, 99-106.
- Rambaut, A., Robertson, D.L., Pybus, O.G., Peeters, M., and Holmes, E.C.(2001). Human immunodeficiency virus. Phylogeny and the origin of HIV-1. *Nature* **410**, 1047-1048.
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starcich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., and Baumeister, K.(1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature JID - 0410462* **313**, 277-284.
- Reil, H., Kollmus, H., Weidle, U.H., and Hauser, H.(1993). A heptanucleotide sequence mediates ribosomal frameshifting in mammalian cells. *J Virol JID - 0113724* **67**, 5579-5584.
- Renjifo, B., Fawzi, W., Mwakagile, D., Hunter, D., Msamanga, G., Spiegelman, D., Garland, M., Kagoma, C., Kim, A., Chaplin, B., Hertzmark, E., and Essex, M.(2001). Differences in perinatal transmission among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *J Hum Virol* **4**, 16-25.

- Rey-Cuille, M.A., Berthier, J.L., Bomsel-Demontoy, M.C., Chaduc, Y., Montagnier, L., Hovanessian, A.G., and Chakrabarti, L.A.(1998). Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease. *J Virol JID - 0113724* **72**, 3872-3886.
- Richter, S., Cao, H., and Rana, T.M.(2002). Specific HIV-1 TAR RNA loop sequence and functional groups are required for human cyclin T1-Tat-TAR ternary complex formation. *Biochemistry* 2002.May.21.;41.(20.):6391.-7. **41**, 6391-6397.
- Robertson, D.L., Sharp, P.M., McCutchan, F.E., and Hahn, B.H.(1995a). Recombination in HIV-1. *Nature* **374**, 124-126.
- Robertson, D.L., Anderson, J.P., Bradac, J.A., Carr, J.K., Foley, B., Funkhouser, R.K., Gao, F., Hahn, B.H., Kalish, M.L., Kuiken, C., Learn, G.H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P.M., Wolinsky, S., and Korber, B.(2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**, 55-56.
- Roebuck, K.A., Gu, D.S., and Kagnoff, M.F.(1996). Activating protein-1 cooperates with phorbol ester activation signals to increase HIV-1 expression. *AIDS* **10**, 819-826.
- Roebuck, K.A. and Saifuddin, M.(1999).Regulation of HIV-1 transcription.*Gene Expr* **8**,67-84.
- Romerio, F., Gabriel, M.N., and Margolis, D.M.(1997). Repression of human immunodeficiency virus type 1 through the novel cooperation of human factors YY1 and LSF. *J.Virol.* **71**, 9375-9382.
- Roof, P., Ricci, M., Genin, P., Montano, M.A., Essex, M., Wainberg, M.A., Gatignol, A., and Hiscott, J.(2002). Differential regulation of HIV-1 clade-specific B, C, and E long terminal repeats by NF-kappaB and the Tat transactivator. *Virology* 2002.Apr.25.;296.(1.):77.-83. **296**, 77-83.
- 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.
- Rosen, C.A.(1991). Regulation of HIV gene expression by RNA-protein interactions. *Trends.Genet.* **7**, 9-14.
- Rous P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent seperable from tumor cells J. Exp. Med. 13: 397-411.
- Rubsamen-Waigmann, H., Briesen, H.V., Maniar, J.K., Rao, P.K., Scholz, C., and Pftzner, A.(1991). Spread of HIV-2 in India. *Lancet JID - 2985213R* **337**, 550-551.
- Saifuddin, M., Roebuck, K.A., Chang, C., Ting, J.P., and Spear, G.T.(2000). Cutting edge: activation of HIV-1 transcription by the MHC class II transactivator. *J Immunol* **164**, 3941-3945.
- Salemi, M., Strimmer, K., Hall, W.W., Duffy, M., Delaporte, E., Mboup, S., Peeters, M., and Vandamme, A.M.(2001). Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J* **15**, 276-278.
- Salminen, M.O., Johansson, B., Sonnerborg, A., Ayehunie, S., Gotte, D., Leinikki, P., Burke, D.S., and McCutchan, F.E.(1996). Full-length sequence of an ethiopian human

- immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate of genetic subtype C. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **12**, 1329-1339.
- Sanchez-Pescador, R., Power, M.D., Barr, P.J., Steimer, K.S., Stempien, M.M., Brown-Shimer, S.L., Gee, W.W., Renard, A., Randolph, A., and Levy, J.A.(1985). Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science JID - 0404511* **227**, 484-492.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.(1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Satake, H., Suzuki, K., Aoki, T., Otsuka, M., Sugiura, Y., Yamamoto, T., and Inoue, J.(1995). Cupric ion blocks NF kappa B activation through inhibiting the signal-induced phosphorylation of I kappa B alpha. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **216**, 568-573.
- Sawadogo, M., Van Dyke, M.W., Gregor, P.D., and Roeder, R.G.(1988). Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei. *J.Biol.Chem.* **263**, 11985-11993.
- Schweiger, B., Pauli, G., Zeichhardt, H., and Kucherer, C.(1997). A multicentre quality assessment study to monitor the performance of HIV-1 PCR. *J.Virol.Methods* **67**, 45-55.
- Scriba, T.J., de Villiers, T., Treurnicht, F.K., zur, M.J., Barnett, S.W., Engelbrecht, S., and van Rensburg, E.J.(2002). Characterization of the South African HIV type 1 subtype C complete 5' long terminal repeat, nef, and regulatory genes. *AIDS Res Hum Retroviruses JID - 8709376* **18**, 149-159.
- Selby, M.J., Bain, E.S., Luciw, P.A., and Peterlin, B.M.(1989). Structure, sequence, and position of the stem-loop in tar determine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes Dev.* **3**, 547-558.
- Sharp, P.M., Robertson, D.L., and Hahn, B.H.(1995). Cross-species transmission and recombination of 'AIDS' viruses. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* **349**, 41-47.
- Sharp, P.M., Bailes, E., Gao, F., Beer, B.E., Hirsch, V.M., and Hahn, B.H.(2000). Origins and evolution of AIDS viruses: estimating the time-scale. *Biochem. Soc. Trans. 2000.Feb.;* **28**(2.):275-82. **28**, 275-282.
- Shaw, J.P., Utz, P.J., Durand, D.B., Toole, J.J., Emmel, E.A., and Crabtree, G.R.(1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**, 202-205.
- Sheridan, P.L., Mayall, T.P., Verdin, E., and Jones, K.A.(1997). Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro. *Genes Dev.* **11**, 3327-3340.
- Sherman, M.P. and Greene, W.C.(2002). Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect JID - 100883508* **4**, 67-73.
- Siegal, F.P., Lopez, C., Hammer, G.S., Brown, A.E., Kornfeld, S.J., Gold, J., Hassett, J., Hirschman, S.Z., Cunningham-Rundles, C., and Adelsberg, B.R.(1981). Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N Engl J Med JID - 0255562* **305**, 1439-1444.
- Sigurdsson B. 1954. Observation on the slow infections of sheep. Maedi, paratuberculosis, rida, slow encephalitis of sheep with general remarks on infections witch develop slowly and some of their special characteristics. *Br. Vet. J.* **110**: 255-270.

- Simon, F., Matheron, S., Tamalet, C., Loussert-Ajaka, I., Bartczak, S., Pepin, J.M., Dhiver, C., Gamba, E., Elbim, C., and Gastaut, J.A.(1993). Cellular and plasma viral load in patients infected with HIV-2. *AIDS JID - 8710219* **7**, 1411-1417.
- Simon, F., Mauciere, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barre-Sinoussi, F., and Brun-Vezinet, F.(1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat.Med.* **4**, 1032-1037.
- Sodroski, J., Rosen, C., Wong-Staal, F., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Arya, S., Gallo, R.C., and Haseltine, W.A.(1985). Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science* **227**, 171-173.
- Soto-Ramirez, L.E., Renjifo, B., McLane, M.F., Marlink, R., O'Hara, C., Sutthent, R., Wasi, C., Vithayasai, P., Vithayasai, V., Apichartpiyakul, C., Auewarakul, P., Pena, C., V, Chui, D.S., Osathanondh, R., Mayer, K., Lee, T.H., and Essex, M.(1996). HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* **271** , 1291-1293.
- Sourvinos, G., Tsatsanis, C., and Spandidos, D.A.(2000). Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. *Folia Biol (Praha)* **46**, 226-232.
- Sova, P. and Volsky, D.J.(1993). Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *J Virol JID - 0113724* **67**, 6322-6326.
- Stephens, R.M., Casey, J.W., and Rice, N.R.(1986). Equine infectious anemia virus gag and pol genes: relatedness to visna and AIDS virus. *Science JID - 0404511* **231**, 589-594.
- Su, L., Graf, M., Zhang, Y., von Briesen, H., Xing, H., Kostler, J., Melzl, H., Wolf, H., Shao, Y., and Wagner, R.(2000). Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *J Virol* **74**, 11367-11376.
- Subramanian, R.A. and Cohen, E.A.(1994). Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J Virol JID - 0113724* **68**, 6831-6835.
- Sullivan, A.D., Wigginton, J., and Kirschner, D.(2001). The coreceptor mutation CCR5Delta32 influences the dynamics of HIV epidemics and is selected for by HIV. *Proc Natl Acad Sci U S A JID - 7505876* **98**, 10214-10219.
- Sune, C. and Garcia-Blanco, M.A.(1995a). Sp1 transcription factor is required for in vitro basal and Tat-activated transcription from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J.Virol.* **69**, 6572-6576.
- Sune, C. and Garcia-Blanco, M.A.(1995b). Transcriptional trans activation by human immunodeficiency virus type 1 Tat requires specific coactivators that are not basal factors. *J.Virol.* **69**, 3098-3107.
- Tanese, N., Prasad, V.R., and Goff, S.P.(1988). Structural requirements for bacterial expression of stable, enzymatically active fusion proteins containing the human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *DNA JID - 8302432* **7**, 407-416.
- Tatt, I.D., Barlow, K.L., Nicoll, A., and Clewley, J.P.(1992). The public health significance of HIV-1 subtypes. *AIDS 2001.;15.Suppl.5.:S59.-71.* **15 Suppl 5**, S59-S71

- Temin, H.M. and Mizutani, S.(1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature JID - 0410462* **226**, 1211-1213.
- Terwilliger, E.F., Cohen, E.A., Lu, Y.C., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A.(1989). Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**, 5163-5167.
- Tindall, B. and Cooper, D.A.(1991). Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS JID - 8710219* **5**, 1-14.
- Triques, K., Bourgeois, A., Saragosti, S., Vidal, N., Mpoudi-Ngole, E., Nzilambi, N., Apetrei, C., Ekwilanga, M., Delaporte, E., and Peeters, M.(1999). High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. *Virology* **259**, 99-109.
- Triques, K., Bourgeois, A., Vidal, N., Mpoudi-Ngole, E., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Torimiro, N., Saman, E., Delaporte, E., and Peeters, M.(2000). Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 139-151.
- Tscherning-Casper, C., Vodros, D., Menu, E., Aperia, K., Fredriksson, R., Dolcini, G., Chaouat, G., Barre-Sinoussi, F., Albert, J., and Fenyo, E.M.(2000). Coreceptor usage of HIV-1 isolates representing different genetic subtypes obtained from pregnant Cameroonian women. European Network for In Utero Transmission of HIV-1. *J.Acquir.Immune.Defic.Sydr.2000.May.1.;24.(1.):1.-9.* **24**, 1-9.
- 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.
- Valentin, A., Albert, J., Fenyo, E.M., and Asjo, B.(1990). HIV-1 infection of normal human macrophage cultures: implication for silent infection. *Virology JID - 0110674* **177**, 790-794.
- Verdin, E. and Van Lint, C.(1995). Internal transcriptional regulatory elements in HIV-1 and other retroviruses. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) JID - 9216789* **41**, 365-369.
- Verhoef, K., Koken, S.E., and Berkhout, B.(1993). Electroporation of the HIV Tat trans-activator protein into cells. *Anal Biochem* **210**, 210-214.
- Verhoef, K., Tijms, M., and Berkhout, B.(1997b). Optimal Tat-mediated activation of the HIV-1 LTR promoter requires a full-length TAR RNA hairpin. *Nucleic Acids Res* **25**, 496-502.
- Verhoef, K., Koper, M., and Berkhout, B.(1997a). Determination of the minimal amount of Tat activity required for human immunodeficiency virus type 1 replication. *Virology* **237**, 228-236.
- Verrijzer, C.P. and Tjian, R.(1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends.Biochem.Sci.* **21**, 338-342.
- von Schwedler, U., Kornbluth, R.S., and Trono, D.(1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A JID - 7505876* **91**, 6992-6996.

- Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., and Alizon, M.(1985). Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell JID - 0413066* **40**, 9-17.
- Wang, F., Jin, L., Lei, Z., Shi, H., Hong, W., Xu, D., Jiang, J., Wang, Y., Zhang, B., Liu, M., and Li, Y.(2001). Genotypes and polymorphisms of mutant CCR5-delta 32, CCR2-64I and SDF1-3' a HIV-1 resistance alleles in indigenous Han Chinese. *Chin Med J (Engl) JID - 7513795* **114**, 1162-1166.
- Wasylyk, B., Hahn, S.L., and Giovane, A.(1993). The Ets family of transcription factors. *Eur.J.Biochem.* **211**, 7-18.
- Wolfs, T.F., Zwart, G., Bakker, M., and Goudsmit, J.(1992). HIV-1 genomic RNA diversification following sexual and parenteral virus transmission. *Virology* **189**, 103-110.
- Yamaguchi, J., Vallari, A.S., Swanson, P., Bodelle, P., Kaptue, L., Ngansop, C., Zekeng, L., Gurtler, L.G., Devare, S.G., and Brennan, C.A.(2002). Evaluation of HIV type 1 group O isolates: identification of five phylogenetic clusters. *AIDS Res Hum Retroviruses JID - 8709376* **18**, 269-282.
- Zacharova, V., Becker, M.L., Zachar, V., Ebbesen, P., and Goustin, A.S.(1997). DNA sequence analysis of the long terminal repeat of the C subtype of human immunodeficiency virus type 1 from Southern Africa reveals a dichotomy between B subtype and African subtypes on the basis of upstream NF-IL6 motif. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **13**, 719-724.
- Zenzie-Gregory, B., Khachi, A., Garraway, I.P., and Smale, S.T.(1993). Mechanism of initiator-mediated transcription: evidence for a functional interaction between the TATA-binding protein and DNA in the absence of a specific recognition sequence. *Mol.Cell Biol.* **13**, 3841-3849.
- Zhang, L., He, T., Huang, Y., Chen, Z., Guo, Y., Wu, S., Kunstman, K.J., Brown, R.C., Phair, J.P., Neumann, A.U., Ho, D.D., and Wolinsky, S.M.(1998). Chemokine coreceptor usage by diverse primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* **72**, 9307-9312.
- Zhou, M., Kashanchi, F., Jiang, H., Ge, H., and Brady, J.N.(2000). Phosphorylation of the RAP74 subunit of TFIIF correlates with Tat-activated transcription of the HIV-1 long terminal repeat. *Virology 2000.Mar.15.;268.(2.):452.-60.* **268**, 452-460.
- Zhou, Q. and Sharp, P.A.(1995). Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat. *EMBO J.* **14**, 321-328.
- Zhu, T., Korber, B.T., Nahmias, A.J., Hooper, E., Sharp, P.M., and Ho, D.D.(1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594-597.

Kongressbeiträge

Teile dieser Arbeit wurden in Form von Kongressbeiträgen publiziert :

- Somogyi S., Gürtler L., Rokos K., Pauli G., Kücherer C. (2000).
Structural and Functional Analysis of the LTR Promoter Activity of HIV-1 Subtypes.
Jahrestagung der Deutschen Virologischen Gesellschaft, 12/ - 15/ 03/ 2000
- Somogyi S., Gürtler L., Rokos K., Pauli G., Kücherer C. (2001).
Strukturelle und funktionale Analyse der LTR Promotor Aktivität von HIV-1 Subtypen.
8. Deutscher AIDS-Kongress, 04/ - 07/ 07/ 2001

Eine Publikation dieser Arbeit befindet sich in Vorbereitung:

- Divergent transcriptional regulation of HIV-1: Structural and Functional Analysis of the LTR Promoter Activity of Group M, N and O.
Somogyi S., Gürtler L., Rokos K., Pauli G., Kücherer C.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome (erworbenes Immundefektsyndrom)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CMV	Cytomegalovirus
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> (Humanes Immundefizienzvirus)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Molar
mg	Milligramm (10^{-3} g)
μ g	Mikrogramm (10^{-6} g)
μ l	Mikroliter (10^{-6} l)
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} l)
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MW	Molekulargewicht
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaktion (Polymerasekettenreaktion)
pers.	persönlich
RLU	<i>relative light units</i> (relative Lichteinheiten)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
s.	siehe
SIV	Simianes Immundefizienz Virus
sec.	Sekunde
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethyldiamin
TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
TE	Tris/ EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	unit
µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
µl	Mikroliter (10^{-6} l)
ÜN	über Nacht
V	Volt
vergl.	vergleiche
Vol	Volumen
Vpu	Virusprotein U
v/v	Volumen/ Volumen
wt	Wildtyp
w/v	weight/ volume (Gewicht/ Volumen)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside
z.B.	zum Beispiel

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Morphologie des Viruspartikels und provirales Genom von HIV-1	S. 6
Abb. 2:	Replikationszyklus von HIV-1	S. 12
Abb. 3:	Phylogenetischer Stammbaum der <i>pol</i> -Region der Primaten Lentiviren	S. 14
Abb. 4:	Globale HIV/ AIDS Epidemie (UNAIDS 2002)	S. 19
Abb. 5:	Die Promotorstruktur von HIV-1	S. 24
Abb. 6:	Modell für die Aktivierung der Transkription von HIV-1	S. 31
Abb. 7:	Klonierungsschema zur Herstellung der LTR/ Luziferase-Konstrukte	S. 67
Abb. 8:	Sequenzalignment für das Primerdesign der LTR-PCR von HIV-1 Gruppe M, N und O	S. 76-77
Abb. 9:	Darstellung der <i>semi-nested</i> PCR zur Amplifikation der 5' und der 3'LTR von HIV-1	S. 79
Abb. 10:	Phylogenetischer Neighbor-Joining Stammbaum von HIV-1 Referenzviren	S. 83
Abb. 11:	Phylogenetischer Neighbor-Joining Stammbaum der LTR von HIV-1	S. 86
Abb. 12:	Sequenzvergleich des LTR-Promotors von HIV-1 Gruppe M-, N- und O-Viren	S. 97-100
Abb. 13:	Schematische Darstellung der Promotororganisation von HIV-1	S. 109
Abb. 14:	Darstellung der PCR-Produkte und Vektoren zur Herstellung der LTR/ pGL3-Klone	S. 112
Abb. 15:	Standardkurve von β -Galaktosidase aus <i>E. coli</i>	S. 115
Abb. 16:	Promotoraktivität der LTR von HIV-1 Gruppe M, N und O	S. 118
Abb. 17:	Gruppierung der LTR-Promotoren nach aufsteigender basaler Promotoraktivität	S. 122
Abb. 18:	Herstellung rekombinanter Adenoviren mit Hilfe des <i>AdEasy Vector</i> <i>Systems</i>	S. 166

11 Anhang – Das AdEasy-System (Quantum Appligene)

Da mit dem Luziferase Reporter-System keine subtyp-spezifischen Unterschiede in der LTR-Promotoraktivität gesehen wurden, sollte eine alternative Methode gefunden werden, die verschiedenen LTR-Promotoren in Primärzellen zu untersuchen.

Die Transfektion von Primärzellen erwies sich jedoch als schwierig. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Elektroporation von PBMC nach einem neuen Protokoll erwies sich als wenig effizient. Eine weitere Möglichkeit wäre die Infektion von Primärzellen mit molekularen HIV-Klonen, wobei jedoch der jeweilige Zielzelltropismus berücksichtigt werden muss.

Swingler *et al.* zeigten, dass primäre Zielzellen von HIV, wie Monozyten und Makrophagen mit rekombinanten Adenoviren infizierbar sind (Swingler *et al.*, 1999). Zur Problemlösung wurde daher ein System zum Gentransfer mittels rekombinanter Adenoviren ausgewählt (Quantum Appligene, Frankreich). In diesem System wird die Fremd-DNA in das als Vektor benutzte Adenovirus kloniert und in eine eukaryote Zelllinie transfiziert. Mit den so hergestellten rekombinanten Adenoviren können anschließend Zelllinien oder Primärzellen (Makrophagen, T-Lymphozyten, Dendritische Zellen) infiziert werden. Da hierbei verschiedene adenovirale Transfer-Vektoren mit unterschiedlichen Indikatorgenen zur Verfügung stehen, kann sowohl die basale LTR-Aktivität als auch die Tat-Transaktivierung durch die Doppelinfektion mit zwei verschiedenen rekombinanten Adenoviren untersucht werden (pAdTrack und pAdenoVator-CMV5-IRES-BFP).

Zur Herstellung dieser rekombinanten Adeno/ LTR-Viren und Adeno/ Tat-Viren wurde die LTR und das *tat*-Gen in zwei getrennte Transfervektoren kloniert. Die vorliegenden LTR-Fragmente wurden bereits in Form der LTR/ Luziferase-Kassette in den für das Marker-Protein GFP (*green fluorescence protein*) kodierenden Transfer-Vektor pADTrack kloniert und sequenziert.

Das für die Transaktivierung benötigte Tat-Protein soll in den das Marker-Protein BFP (*blue fluorescence protein*) exprimierenden Transfer-Vektor pAdenoVator-CMV5-IRES-BFP kloniert werden. Dazu wurde bereits eine PCR zur Amplifikation von Exon-1 des Tat-Proteins etabliert. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung spezifischer Primer bei einer Annealing Temperatur von 54 °C.

Das 297 bp lange PCR-Produkt *tat*-Exon-1 enthält die für die Transaktivierung der HIV-1 LTR benötigte Minimalsequenz (Verhoef *et al.*, 1997).

Tab. 19: PCR-Primer zur Amplifikation von *tat* Exon 1 aus pNL4.3

Name	Locus ¹	Sequenz 5'- 3' ²
Tat_972s	5793-5811	GAA <u>GAT CTA</u> GCA GAA TAG GCG TTA CT
Tat_1254as	6055-6074	GAA <u>GAT CTG</u> TAT AGG TTG CAT TAC ATG T

¹ Koordinaten bezüglich Isolat HXB2R (Accession K03455) aus der HIV-Datenbank Los Alamos (www.lanl.gov)

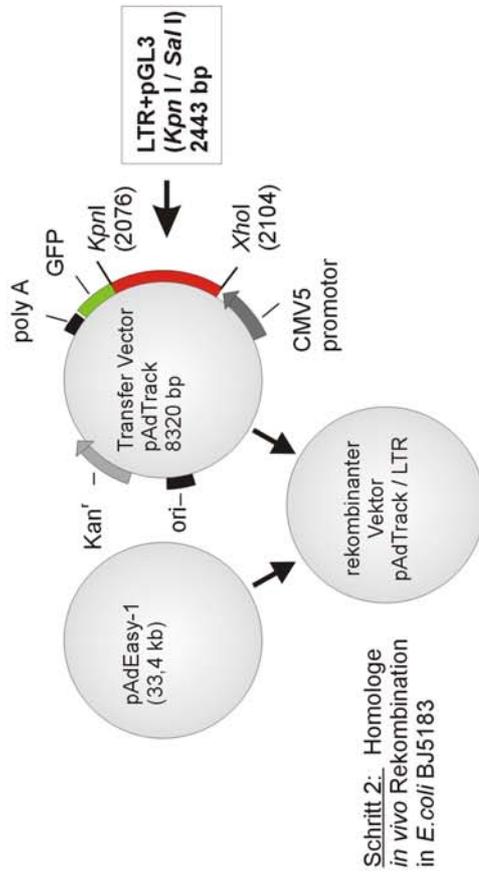
² eingefügte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

Das AdEasy-System der Firma Q-BIOgene umfaßt drei Schritte, die in Abb. 18 dargestellt sind: (1) Die Klonierung der LTR/ Luziferasekassette in den Transfervektor pAdTrack; analog dazu die Klonierung der cDNA *tat* Exon 1 in den Transfervektor pAdenoVator-CMV5-IRES-BFP. (2) Die Homologe *in vivo* Rekombination zwischen dem Adenogenom und der jeweiligen Fremd-DNA durch die Kotransfektion der in Schritt 1 klonierten Vektoren mit einem intakten superhelikalen Backbone-Vektor (pAdEasy-1) in den Bakterienstamm *E. coli* BJ5183. Der Vektor pAdEasy-1 enthält einen Großteil des Adenogenoms, die Gene E1 und E3 für die Virusreplikation wurden jedoch entfernt. Die Selektion der Rekombinanten erfolgt über ein im Transfervektor kodiertes Kanamycin-Gen (3) Die Produktion rekombinanter Adenoviren durch die Transfektion der linearisierten rekombinanten Vektoren in 293-Zellen. Diese Zelllinie ist mit Adenovirus transformiert und enthält das E1 Gen. Durch den Einbau der rekombinanten Adeno-Vektoren entstehen replikationsfähige Adenoviren, welche die HIV-1 LTR (LTR/ Adeno-Viren), beziehungsweise das *tat*-Gen (Tat/ Adeno-Viren) enthalten. Anhand der GFP- bzw. der BFP-Expression kann die Anzahl der transfizierten 293-Zellen mittels FACS-Analyse quantifiziert werden.

Nach der Infektion der Primärzellen mit rekombinanten Adeno/ LTR-Viren, bzw. nach der Doppelinfektion mit LTR/ Adeno-Viren und Tat/ Adeno-Viren soll der quantitative Nachweis der basalen und der transaktivierten LTR-Aktivität anhand der LTR-gesteuerten Luziferase-Expression erfolgen.

A. Herstellung rekombinanter LTR/Adenoviren

Schritt 1: Klonierung der cDNA LTR in den Transfer Vektor pAdTrack



Schritt 2: Homologe *in vivo* Rekombination in *E.coli* BJ5183

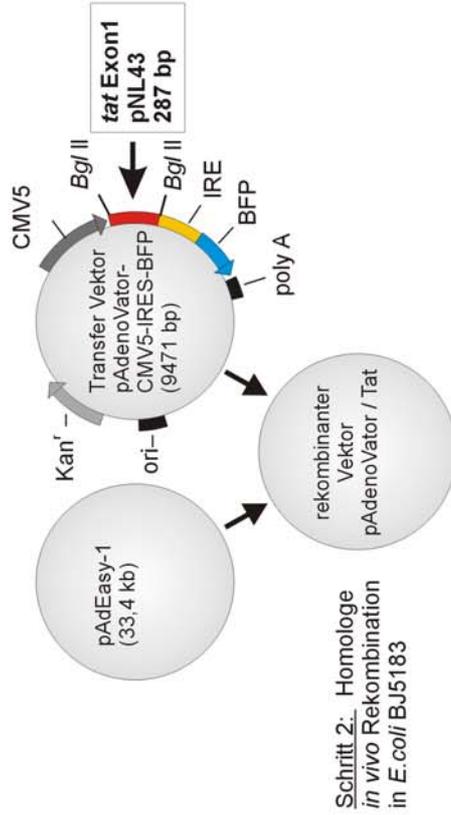
Schritt 3: Virus Produktion in 293 Zellen

Rekombinantes Adenovirus LTR/Adeno

Doppelinfektion von Primärzellen mit LTR/ Adeno und Tat/ Adeno

B. Herstellung rekombinanter Tat/Adenoviren

Schritt 1: Klonierung der cDNA *tat* Exon 1 in den Transfer Vektor pAdenoVator-CMV5-IRES-BFP



Schritt 2: Homologe *in vivo* Rekombination in *E.coli* BJ5183

Schritt 3: Virus Produktion in 293 Zellen

Rekombinantes Adenovirus Tat/ Adeno

Doppelinfektion von Primärzellen mit LTR/ Adeno und Tat/ Adeno

Abb. 18: Herstellung rekombinanter Adenoviren mit Hilfe des AdEasy Vector Systems (Quantum Appligene). Mit der cDNA der LTR-Region (Abb. 18A) und des transaktivierenden Proteins Tat (Abb. 18B) werden zwei unterschiedliche rekombinante Adenoviren hergestellt. Diese LTR/ Adenoviren und Tat/ Adenoviren, werden zur Doppelinfektion von primären Zielzellen von HIV-1 verwendet.

12 Danksagung

Eine Dissertation wird bekanntlich nicht im Alleingang durchgeführt, und so möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich unterstützt haben:

Herrn Professor Pauli danke ich für die Bereitstellung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Claudia Kücherer bedanke ich mich für die Betreuung bei der Durchführung der Experimente und der Anfertigung der Dissertation. Ihre Offenheit und Bereitschaft zur fachlichen (und ab und zu auch darüber hinaus) Diskussion und Unterstützung haben mich stets motiviert.

Ich bedanke mich bei Frau Rokos, die mir die Viruspellets, das Ausgangsmaterial meiner Arbeit, zur Verfügung stellte und mich mit vielen Tips und Hilfestellungen in die Virusanzucht einwies.

Bei Frau Schickhoff und Frau Blesken bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Virusanzucht und der Zellkultur.

Herrn Pociuli und Herrn Emmel danke ich für den unermüdlichen Einsatz am Sequencer.

Ich danke den "Laborfeen" Ruth, Moni, Tina und Walli, die mit ihrer Hilfsbereitschaft und mit viel Engagement einen "runden Ablauf" im Laboralltag ermöglichen.

Bei Stefan Mertens bedanke ich mich für die "computertechnische" Unterstützung, Ursula, Djin-Ye und Egi danke ich für die Korrekturarbeiten.

Ich möchte mich bei allen KollegInnen und FreundInnen von P22 und anderen Projektgruppen, v.a. bei Stefan, Andrea, Dani, Kim und Djin-Ye für den nötigen Spaß am Arbeitsplatz und für die enorme Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Fritz und Hannelore, meiner Oma Poldi und meiner Schwester Nicole, die mich in vielerlei Hinsicht unterstützen und den „Werdegang“ dieser Arbeit stets mit grossem Interesse verfolgten.

Vor allem aber danke ich dem korrigierenden, kooperierenden und aktivierenden *feelgoodfactor* Kai.