

ZOFIA KILIAŃSKA

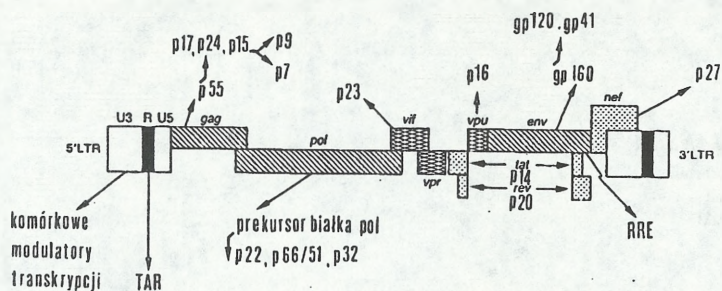
Katedra Cytobiochemii
Instytut Biochemii
Uniwersytet Łódzki
Łódź

GENY WIRUSA HIV CHARAKTERYSTYKA I ROLA PRODUKTÓW ICH EKSPRESJI

Wirus HIV (ang. Human Immunodeficiency Virus), etiologiczny czynnik nabytego zespołu niedoboru immunologicznego (ang. Acquired Immunodeficiency Syndrome; skrót AIDS) należy do rodziny retrowirusów. Wirusy te charakteryzuje obecność enzymu — odwrotnej transkryptazy, dzięki której ich materiał genetyczny w postaci RNA zostaje przepisany na komplementarną doń nić „minus” DNA. Ten ostatni tworzy przejściowy kompleks RNA–DNA trawiony przez RNazę H, a następnie po dobudowaniu nici „plus” jako forma dwuniciowego DNA (prowirus) zwykle zostaje włączony w genom komórki gospodarza. W przypadku HIV mogą to być m.in. limfocyty wspomagające T, monocyty, niektóre komórki mózgu. W większości komórek prowirusowy DNA ulega podwojeniu w czasie ich podziału, zachowując w swoim genomie geny intruza. Sekwencje prowirusowego DNA stanowią zatem liniową replikę materiału genetycznego wirusa. W formie prowirusa HIV może pozostać bez przejawów aktywności replikacyjnej przez długi okres (nawet kilka lat). Wstawienie „własnego” zestawu genów HIV w genom gospodarza wywołuje stan stałej infekcji (ang. permanent infection). Aktywacja zainfekowanych komórek (m.in. antygeny, mitogeny, współinfekcja wirusowa) wyzwala kaskadę zdarzeń doprowadzających do masowej replikacji potomnych cząstek wirusowych.

Ostatnio zwraca się uwagę na występowanie w zakażonych wirusem HIV komórkach T4 i monocytach niezintegrowanych, pozachromosomalnych form prowirusowego DNA, których rola w patogenezie infekcji HIV pozostaje wciąż niewyjaśniona. Być może ich występowanie warunkuje czasookres latencji HIV [1]. Prowirusowy DNA ulega transkrypcji z udziałem komórkowej DNA — zależnej polimerazy RNA II. Utworzony na tej matrycy RNA stanowi materiał genetyczny potomnych cząstek wirusowych oraz jest wykorzystywany jako mRNA w biosyntezie białek wirusowych.

Genom różnych szczepów wirusa HIV osiąga długość około 10 000 par zasad. Zsekwencjonowany jako jeden z pierwszych genom klonu BH10, wydzielony z komórek H9, liczy 9749 par zasad [2]. W porównaniu z komórką ludzką potencjał genetyczny HIV jest mniejszy około 100 000 razy. Rysunek 1



Rys. 1. Schemat genomu wirusa HIV oraz produkty ekspresji poszczególnych genów (wg Greene [3] zmodyfikowany)

przedstawia schemat ułożenia genów wirusa HIV oraz produkty ich ekspresji [3], zaś w tabeli 1 zestawiono aktualnie i poprzednio stosowane oznakowania genów tego wirusa (2–8) oraz funkcje białek — produktów ich ekspresji.

Przez gen obecnie rozumie się taką sekwencję nukleotydową DNA (lub RNA), która zostanie przepisana na sekwencję zasad w informacyjnym RNA (mRNA) wyznaczającą kolejność aminokwasów w kodowanym łańcuchu białkowym albo w RNA typu rRNA, tRNA itd. Gen, jednostka funkcji, reprezentuje transkrybowany odcinek DNA wraz z sekwencją bezpośrednio regulującą inicjację transkrypcji — promotorem oraz sekwencjami otaczającymi 5' i 3' koniec genu (regulującymi jego ekspresję).

Tabela 1

Geny wirusa HIV i funkcja kodowanych przez nie białek

Poprzednio stosowany symbol	Aktualny symbol	Funkcja kodowanych białek
<i>gag</i>	bez zmian	Struktura rdzenia
<i>pol</i>	—	Białka enzymatyczne
<i>env</i>	—	Struktura otoczki
<i>tat III, TA</i>	<i>tat</i>	Transaktywator genów HIV
<i>art, trs</i>	<i>rev</i>	Regulator ekspresji
<i>3' orf, B, E', F</i>	<i>nef</i>	Inhibitor ekspresji cząstek wirusowych
<i>sor, A, P', Q</i>	<i>vif</i>	Czynnik infekcyjności
	<i>vpu</i>	Warunkuje efektywność uwalniania cząstek HIV
<i>R</i>	<i>vpr</i>	Słaby aktywator transkrypcji

W wyniku licznych badań ujawniono szereg nieoczekiwanych właściwości genów, m.in. fakt istnienia genów zachodzących, ich przemieszczanie się, występowania w obrębie innych genów itd. Większość genów organizmów eukariotycznych, wielu wirusów, a także pewnych bakterii (np. *Sulfolobus sulfataricus*) wykazuje strukturę nieciągłą — mozaikową. Są zbudowane z sekwencji „informacyjnych” — kodujących (eksony), poprzedzielanych sekwencjami „nieinformacyjnymi” — niekodującymi (introny). Transkrypcja (przepisa-

nie) genu prowadzi do powstania pierwotnego transkryptu, który w następstwie skomplikowanego procesu usuwania intronów i łączenia odpowiednich eksonów (tzw. składanie, ang. *slicing*) dostarcza dojrzałych transkryptów.

Jak dotąd wiadomo, że w genomie wirusa HIV znajduje się 9 genów, których ekspresja prowadzi do biosyntezy trzech białek strukturalnych, typowych dla wszystkich retrowirusów, tj. białek rdzenia, enzymów i otoczki kodowanych odpowiednio przez geny *gag*, *pol* i *env* oraz 6 białek związanych z regulacją cyklu życiowego HIV. Są to geny: *tat* (ang. *transactivator of transcription*), *rev* (ang. *regulator of virion protein expression*), *nef* (ang. *negative regulatory factor*), *vif* (ang. *viral infection factor*) oraz *vpr* i *vpu* — geny o mało poznanej funkcji. Graniczne sekwencje 5' i 3' genomu HIV stanowią tzw. długie powtarzające się sekwencje końcowe LTR (ang. *Long Terminal Repeats*; por. rys. 1), zbudowane z trzech segmentów, tj. U3, R i U5 o długości odpowiednio 455, 97 i 85 par zasad [1].

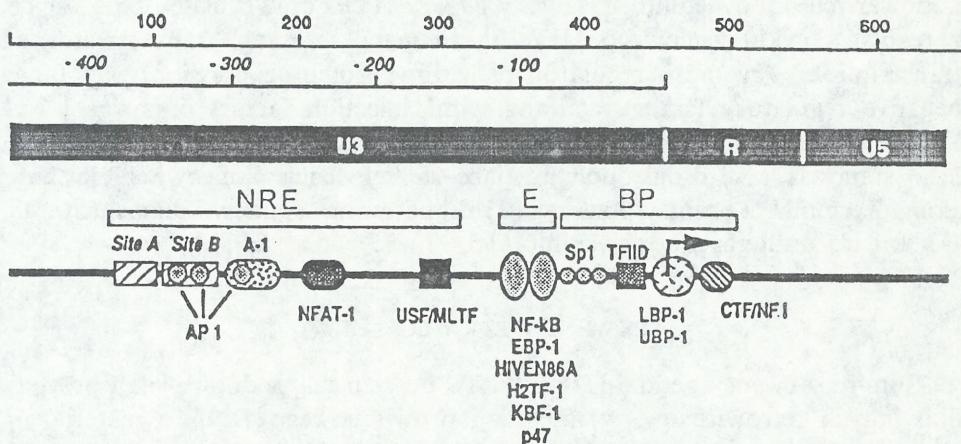
SEKWENCJE LTR WIRUSA HIV

Skrajne sekwencje genomu HIV — LTR uczestniczą, podobnie jak w przypadku innych retrowirusów, w integracji prowirusowego DNA z materiałem genetycznym komórek gospodarza. Odcinki LTR zawierają sygnały inicjacji i poliadenylacji transkryptów wirusowego RNA oraz sekwencje regulatorowe, które modulują aktywność transkrypcyjną prowirusa [3]. Rozpoczyna je sekwencja TG, zaś kończy układ sekwencji odwróconej CA [9]. Koniec segmentu U3 poprzedza miejsce inicjacji transkrypcji wirusowego mRNA, tj. pierwszy (+1) nukleotyd segmentu R. Segment U5 rozpoczyna się sekwencją CCA ulegającą poliadenylacji, którą wcześniej poprzedza sygnał poliadenylacji, w 3' końcowej części R (por. [6, 9]). Z segmentem U5 5'LTR sąsiaduje 18-nukleotydowy odcinek sekwencji komplementarnej do tRNA Lys, który odgrywa rolę startera w biosyntezie nici „minus” DNA. Z kolei w 3' LTR wirusa HIV, w którym nie występuje odcinek wiązania startera, z segmentem U3 graniczy 16-nukleotydowy fragment reprezentujący szlak polipurynowy istotny dla inicjacji biosyntezy nici „plus” DNA [10].

W obrębie sekwencji LTR wirusa HIV określono kilka funkcjonalnych domen dzięki doświadczeniom włączającym badania aktywności genu reporterowego — acetylotransferazy chloramfenikolowej (CAT), do której przyłączano określone odcinki LTR.

Rysunek 2 przedstawia schemat budowy sekwencji 5'LTR wirusa HIV opracowany ostatnio przez G i a c c a i wsp. [11]. Stanowi on próbę usystematyzowania aktualnych danych o funkcjonalnych domenach sekwencji LTR wirusa HIV oraz możliwości wiązania się z nimi czynników białkowych, modulujących ekspresję genów. W odcinku 5'LTR wirusa HIV znajdują się przynajmniej trzy *cis*-aktywne elementy regulujące, skupione głównie w obrębie odcinków U3 i R. Obejmują one trzy domeny, tj.:

- pierwszą — związaną z miejscem inicjacji transkrypcji wraz z odcinkiem bezpośrednio go poprzedzającym, opisywaną jako podstawowy promotor (BP, ang. Basal Promoter),
- drugą — reprezentującą sekwencje wzmacniające (E, ang. Enhancer) oraz
- trzecią — stanowiącą region sekwencji związanych z negatywną regulacją ekspresji (NRE, ang. Negative Regulatory Element).



Rys. 2. Organizacja sekwencji 5'LTR wirusa HIV oraz przykłady znanych białek komórek ludzkich wchodzących z nimi w interakcje. Symbole objaśniono w tekście. Liczby oznaczają kolejność nukleotydów w odcinku LTR, startując od „+1” (strzałka) — miejsca przyłączenia DNA polimerazy, Umownie przyjęto oznaczenie sekwencji nukleotydowych na lewo od startu jako „—”, a na prawo „+”. Górna skala przedstawia numerację licząc od pierwszego nukleotydu 5' LTR, zaś dolna — od miejsca startu transkrypcji (wg G i a c c a i w sp. [11])

Dotychczas poznano kilkanaście komórkowych oraz kilka wirusowych białek, które mogą wiązać się z LTR wirusa HIV. Białka komórkowe mające zdolność specyficznej interakcji z określonymi sekwencjami DNA, aktywujące bądź hamujące proces transkrypcji przyjęto nazywać czynnikami białkowymi transkrypcji. Czynniki te powszechnie występują w wielu typach komórek (niektóre tylko w komórkach limfoidalnych), a sekwencje przez nie rozpoznawane odnajduje się zarówno w genach komórkowych, jak i wirusowych [1, 11].

W rejonie promotorowym — BP (rys. 2) znajdują się trzy miejsca wiązania dla jednego z najwcześniej wykrytych białek aktywujących transkrypcję, tj. białka SP1 [12], oraz czynnika TFIID wiążącego się z układem sekwencji TATAA (ang. TATA box; 13). Z tym odcinkiem LTR wirusa HIV mogą wiązać się dwa inne czynniki białkowe — CTF/NF1, rozpoznający sekwencje GGCCAATCT (tzw. CAAT box; 14), oraz białko odpowiadające za latencję HIV — LBP-1 (ang. Latency Binding Protein) rozpoznające sekwencje TCTGG. Białko LBP1 wykazuje wysokie powinowactwo do sekwencji 5' LTR na pograniczu segmentów R/U5, zlokalizowanych między -16. i +27. nukleotydem (miejsce I),

oraz mniejsze — do odcinka między —16. i —38. nukleotydem (miejsce II). Według odkrywców tego białka [15], mającego naturę inhibitora transkrypcji, może ono zapobiegać wiązaniu się innego modulatora transkrypcji — TFIID z sekwencją „TATA box”.

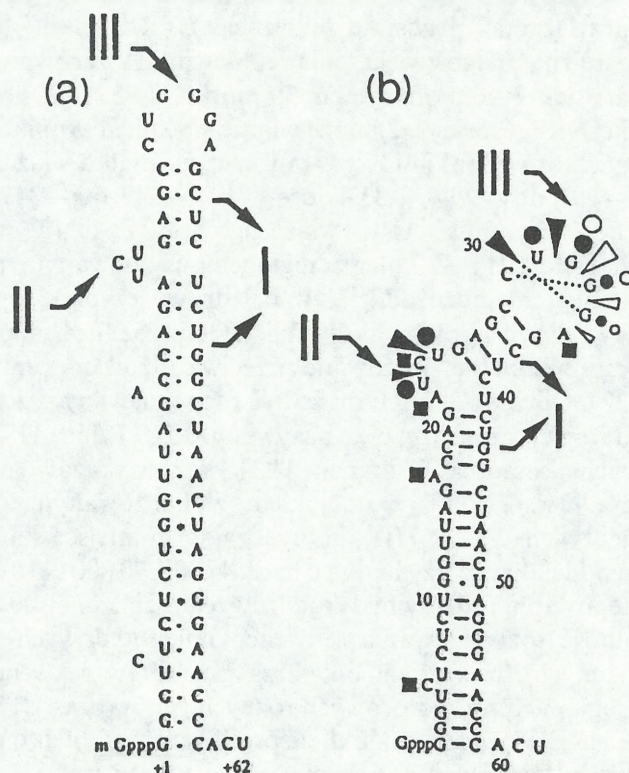
Domenę tzw. sekwencji wzmacniających — E (rys. 2) wirusa HIV stanowią dwa proste powtórzenia sekwencji GGGACTTTCC, usytuowane między —81. a —104. nukleotydem [16], które wpływają na podwyższenie poziomu transkrypcji. Z tym odcinkiem sekwencji może wchodzić w interakcję szereg czynników białkowych, które udało się oczyścić i scharakteryzować [11]. Najlepiej dotychczas poznany czynnik aktywujący transkrypcję — białko NF Kappa B, rozpoznający sekwencje wzmacniające, należy do fosfoprotein — rodziny białek NF Kappa B o m.cz. 50 000–65 000. Został opisany jako czynnik aktywujący transkrypcję w limfocytach B [17], a następnie w komórkach linii T pobudzonych czynnikami aktywującymi proliferację [18].

Pionierskie doświadczenia grupy H a s e l t i n e [19, 20] wykazały, że delecja regionu obejmującego nukleotydy między pozycją —167. a —423. odcinka 5' LTR wirusa HIV powoduje wzrost ekspresji bakteryjnego genu *CAT*, do którego przyłączono pozostałe sekwencje LTR. Delecja tych sekwencji przyczynia się do znacznego zwiększenia replikacji HIV zarówno w komórkach linii T (Jurkat), jak i w monocytach (komórki U-937) [20]. Z tą domeną opisywaną jako NRE, (por. rys. 2) może wiązać się kilka czynników białkowych o naturze aktywatorów i inhibitorów transkrypcji. Białka wiążące się z odcinkami między —291. do —299., —337. do —371., i —343. do —349. nukleotydem są podobne do czynnika AP1, wiążącego się z DNA, występującego w komórkach Hela [21]. Z kolei z regionem usytuowanym między —216. a —254. nukleotydem może oddziaływać jądrowy czynnik, opisywany jako NFAT-1, który odgrywa rolę w aktywacji LTR przez fitohemaglutyninę oraz przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko białkom powierzchniowym komórek T [22]. Odcinek 3' NRE może być rozpoznawany przez inny czynnik jądrowy modulujący transkrypcję, nazywany MLTF/lub USF, a wykryty w wielu typach komórek i tkanek [23]. Jak wykazały ostatnie badania G i a c c a i wsp. [11], z odcinkiem zlokalizowanym między —152. a —174. nukleotydem 5' LTR HIV, poprzedzającym miejsce startu polimerazy RNA II, mogą oddziaływać trzy białka o m.cz. 44 000, 70 000 i 110 000. Autorzy ci sugerują występowanie rodziny białek jądrowych o zbliżonej strukturze, wykazujących zdolność rozpoznawania sekwencji nukleotydowych (w niewielkim stopniu odmiennych), w których powtarza się motyw sekwencji CACGTG, spotykany w regionach promotorowych różnych genów oraz LTR wirusa HIV.

Z domeną NRE wiąże się produkt ekspresji genu *nef*, białko o m. cz. 27 000 (p27), o którym będzie mowa w dalszej części artykułu.

W odcinku LTR wirusa HIV znajduje się stosunkowo wcześniej poznana domena regulatorowa — TAR (ang. trans-activation region), z którą oddziałuje białko p14 — produkt ekspresji genu *tat*, nieodzowne w procesie transaktywacji

[19, 24]. Właściwości i rola tego białka zostanie przedstawione później. Odcinek TAR jest usytuowany między -17. a +81. nukleotydem LTR [19]. Dla procesu aktywacji wymagane jest przynajmniej 25–30 nukleotydów tego fragmentu LTR [25]. Segment TAR w wyniku obróbki produktów transkrypcji HIV zostaje wcielony w sekwencje liderowe (niekodujące) wirusowych mRNA, tworząc stabilną strukturę przypominającą „spinkę do włosów” (ang. hairpin), zawierającą 60 nukleotydów, z miejscem „cap” u podstawy pętli [26–31]. Wyróżnia się w niej trzy elementy, tj. pień, wybrzuszenie i pętlę (ang. stem, bulge, loop). Dla wiązania i aktywności białka transaktywującego istotna jest integralność strukturalna TAR (rys. 3). Poznano sekwencję nukleotydową odcinka stanowiącego „wybrzuszenie” (UCU), istotną w wiązaniu białka p14, a także sześcionukleotydowej pętli (CUGGGA) — ważnej dla interakcji z białkami komórkowymi [27–29]. Oba te fragmenty TAR są nieodzowne w transaktywacji [30]. Mutacja bądź modyfikacje w obrębie „wybrzuszenia” TAR wskazały na kluczową rolę nukleotydu urydylowego w pozycji 23. w wiązaniu białka transaktywującego [28].

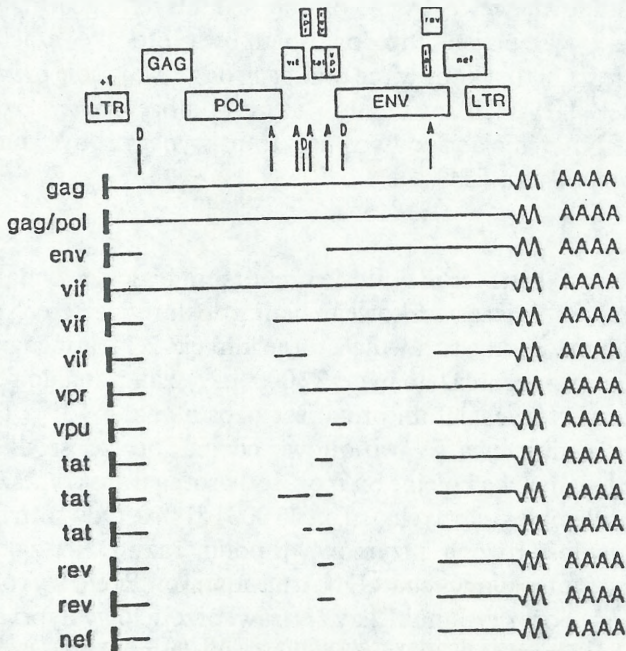


Rys. 3. Strukturalna organizacja domeny regulatorowej TAR, (a) — wg Wu i wsp. [29] i (b) — wg Colvin i Garcia-Blanco [31], I — pień (ang. stem), II — wybrzuszenie (ang. bulge), III — pętla (ang. loop)

Ostatnio, Colvin i Garcia-Blanco [31], na podstawie obszernych badań wykorzystujących modyfikacje chemiczne i trawienie nukleazami (RNaza T i RNaza A) domeny TAR i jej mutantów, przedstawili dane sugerujące, że „wybrzuszenia” ważne w wiązaniu białka transaktywującego zawiera 4 nukleotydy, tj. AUCU.

Na podkreślenie zasługuje wykrycie białka komórek Hela o m.cz. 185 000, opisywanego symbolem TRP-185, które wiąże się specyficznie z rodzimą strukturą TAR wirusa HIV. Ta interakcja jest regulowana zarówno przez wirusowe białko p14, jak i komórkowe czynniki białkowe modulujące ekspresję HIV [29].

Ekspresja genów HIV, pozostająca pod kontrolą czynników wiążących się z sekwencjami LTR, obejmuje złożone etapy dojrzewania pierwotnych transkryptów, a następnie wykorzystanie ich w biosyntezie białek wirusowych. Należy podkreślić, że tylko geny *gag* i *pol* wykorzystują jako matrycę mRNA nie podlegający składaniu i odpowiadający RNA potomnych cząstek wirusowych (rys. 4). Białka otoczki pochodzą z translacji mRNA, po jednoetapowym składaniu, które objęło „wycięcie” sekwencji kodujących *gag* i *pol*. Natomiast inne białka wirusa HIV wykorzystują matryce mRNA, które podlegają wielokrotnemu składaniu. W zakażonych wirusem HIV komórkach może pojawić się kilkanaście różnych wirusowych mRNA, wynikających z możliwości odmiennego składania pierwotnego transkryptu (por. rys. 4; [5, 32]).



Rys. 4. Typy mRNA wirusa HIV. Symbole A i D oznaczają akceptorowe i donorowe miejsca składania (wg Kieny [5])

Produkty ekspresji genów *gag* i *pol* tworzą rdzeń dojrzałego wirionu HIV. Z kolei białka kodowane przez *env* budują jego zewnętrzny płaszcz. Natomiast białka syntetyzowane na matrycach genów regulatorowych występują głównie w cytoplazmie zaatakowanych komórek i wpływają na aktywność genów strukturalnych i regulatorowych (z autoregulacją włącznie).

GENY STRUKTURALNE WIRUSA HIV

CHARACTERYSTYKA I ROLA PRODUKTÓW ICH EKSPRESJI

gag

Ekspresja genu *gag* dostarcza prekursora białek rdzenia, którym jest polipeptyd o masie cząsteczkowej (m.cz.) 55 000 (p55), bogato ufosforylowany i mirystylowany na reszcie N-końcowej glicyny. Ostatnio wykazano, że mirystylacja N-końcowego aminokwasu białka p55 jest nieodzowna dla ostatecznego formowania cząstek HIV [33]. Proteaza wirusowa nacina łańcuch polipeptydu p55, co prowadzi do powstania trzech dojrzałych białek rdzenia, tj. p17, p24, p15 [3]. Specyficzna proteoliza białka p55 w zaatakowanych przez HIV komórkach zachodzi w czasie tzw. „pączkowania” cząstek wirusowych z błon tych komórek. Silnie zasadowe białko p15 ulega dalszemu cięciu prowadzącemu do utworzenia peptydów p7 i p9, oddziałujących z RNA genomu wirusa. Silnie immunogenne białko p24 stanowi wewnętrzną osłonę cylindrycznego rdzenia, zaś p17 — zewnętrzną, wyścielającą lipidowo-białkową otoczkę cząstki wirusowej. Przypuszcza się, że białka kodowane przez *gag* odgrywają rolę przy powstawaniu nowych cząstek HIV, ich uwalnianiu się z komórek, przy „rozplaszczaniu” wirusowego RNA, inicjacji odwrotnej transkrypcji i być może interakcji z genomem gospodarza [34].

pol

Gen *pol* stanowi matrycę w syntezie prekursora białek enzymatycznych HIV. Proteoliza tego wysokocząsteczkowego białka dostarcza czterech polipeptydów, które w dojrzałym wirionie sprawują istotne funkcje. Z N-końcowego fragmentu prekursora pochodzi proteaza o m.cz. 22 000 (p22), zaliczana do rodziny proteaz asparaginowych, których inhibitorem jest pepstatyna A [35]. Ten enzym jest nieodzowny dla dojrzewania wirionów; odcina on ze środkowej domeny prekursorowego łańcucha kolejne białko — odwrotną transkryptazę, występującą w dwóch formach molekularnych o m.cz. 66 000 i 51 000. Odwrotna transkryptaza wykazuje aktywność dwóch enzymów, tj. polimerazy DNA zależnej od RNA (przeprowadza syntezę łańcucha cDNA na matrycy RNA wykorzystując jako „starter” tRNA^{Lys}) oraz rybonukleazy H (trawi przejściowy hybryd RNA-DNA). Z C-końcowego fragmentu prekursora białkowego pochodzi enzym o cechach integrazy/endonukleazy o m.cz. 32.000 (p32). Ten ważny enzym odpowiada za integrację prowirusowego DNA z genomem komórek gospodarza [5, 36].

env

Z analiz genetycznych wynika, że *env*, należący do najbardziej zmiennych sekwencji genomu HIV, ma zdolność kodowania prekursorowego białka o długości 873 aminokwasów [37]. Białko to zawiera silnie hydrofobową sekwencję przy końcu łańcucha, która jest odcinana w sposób typowy dla białek sekrecyjnych z jednoczesną glikozylacją jego cząsteczki. Glikoproteina o m.c. 160 000 (gp 160) wyposażona jest w C-końcowym fragmencie cząsteczki w hydrofobowy odcinek, stanowiący miejsce jej zaczepienia w błonie atakowanej komórki. Rozszczepienie białka gp160 otoczki wirusa za pomocą komórkowej proteazy prowadzi do powstania dwóch białek: zewnątrzotoczkowego polipeptydu gp120 i białka transmembranowego opisywanego jako gp41. Charakterystykę białek otoczki HIV przedstawiono uprzednio (por. [6, 8]). Białka te cechuje wysoka zawartość cysteiny (18 reszt w gp120 i 1–5 reszt w gp41), aminokwasu istotnego dla utrzymania ich właściwej struktury. Ostatnio określono położenie 9 mostków S–S w białku gp120, które tworzą się między resztami cysteiny: 61–81, 126–212, 133–203, 138–164, 225–254, 235–246, 303–338, 385–452 i 392–425 [38]. Zewnątrzotoczkowa glikoproteina gp120 wiąże się łatwiej z antygenem powierzchniowym CD4 komórek docelowych niż prekursor białka otoczkowego — gp160. Antygen CD4 (glikoproteina o m.c. 55 000) jest głównym, aczkolwiek prawdopodobnie nie jedynym receptorem wirusa HIV [3, 39]. Białko gp120 odpowiedzialne za tropizm HIV do komórek nosiciela zawiera odcinek konserwatywnych sekwencji aminokwasowych (między 420. a 463. aminokwasem), istotny dla interakcji z cząsteczkami CD4 [40]. Ten fragment białka gp120, tkwiący w zagłębieniu cząsteczki, jest ukryty w osłonie cząsteczek cukrowych. Natomiast część białka gp120, nieistotna w wiązaniu wirusa z komórką, występuje w postaci pętli i jest mniej glikozylowana [41]. Obecnie wiadomo, że ten „wypętlony” odcinek łańcucha gp120 jest syntetyzowany przez fragment genu *env* o bardzo dużej zmienności. W glikoproteinie gp120 można wyróżnić dwie funkcjonalne domeny: jedną w części C końca łańcucha białkowego, a służącą do interakcji z antygenem CD4 i drugą — w N-końcowym segmencie, gdzie występuje region wiązania (niekowalencyjnego) z transmembranowym białkiem gp41 [3,5]. Istnieje wiele dowodów na to, że pierwsze etapy infekcji HIV, tj. wiązanie, zakotwiczenie wirusa w błonie komórkowej, a także późniejsza fuzja (zlewanie) komórek przebiega z udziałem białek otoczki. W początkowym stadium białko gp120 wiąże się z receptorem CD4 niezainfekowanych komórek. Następnie jeden koniec białka gp41 (w którym znajduje się region odpowiedzialny za fuzję usytuowany między 518. a 527. aminokwasem i zawierający głównie aminokwasy hydrofobowe) przebija błonę komórkową i inicjuje fuzję [5, 41]. Ten proces zwykle obejmuje zarówno zakażone, jak i zdrowe sąsiadujące komórki, prowadząc do powstania wielojądrowych, krótko żyjących syncytiów. W ten sposób dochodzi do masowego zaniku limfocytów T4. *In vitro* wykazano, że pojedynczy zaatakowany wirusem limfocyt T4 może uśmiercić w wyniku fuzji około 500 zdrowych komórek T4.

Gen *env* reprezentuje sekwencje genomu HIV, które podlegają zmianom w najrozleglejszym (do 25%) stopniu (m.in. mutacje punktowe, delecje, insercje, duplikacje krótkich fragmentów). Z badań grupy M o n t a g n i e r a pochodzą dane świadczące o tym, że zamiana nawet jednego aminokwasu, np. izoleucyny (w pozycji 425.) na leucynę lub tryptofanu (w pozycji 432.) na fenyloalaninę lub tyrozynę prowadzi do istotnych zmian właściwości laboratoryjnego szczepu HIV w postaci utraty jego zdolności wiązania się z antygenem CD4 [42].

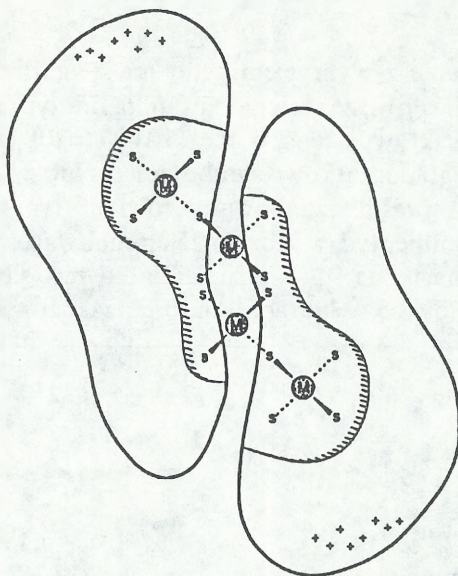
GENY REGULATOROWE WIRUSA HIV:
CHARAKTERYSTYKA I ROLA PRODUKTÓW ICH EKSPRESJI

Z dotychczasowych badań wynika, że prawdopodobnie wszystkie tzw. niestrukturalne geny wirusa HIV (por. rys. 1; tab. 1) są zaangażowane w regulację jego replikacji. W określeniu aktywności i funkcji genów HIV wykorzystuje się m.in. transfekcje komórek różnych linii (np. komórki Jurkat tat III, Raji, komórki cos-1 nerki małpy) plazmidami, które zawierają sekwencje prowirusowego HIV, bądź jego mutanty delecyjne [43, 44].

W połowie lat osiemdziesiątych wykryto w genomie HIV dwa geny, opisywane w tym okresie jako *tat* III [45] i *art* [46, 47] (obecnie — *tat* i *rev*), związane z procesem transaktywacji transkrypcji. Produkty ich ekspresji mogą regulować aktywność transkrypcyjną genów wirusa, odmiennych od tych, które je kodują.

tat

Tat jest przykładem genu podzielonego, który tworzą trzy eksony. Pierwszy — niekodujący (250 par zasad) jest usytuowany w 5'LTR i pełni rolę sekwencji liderowej w mRNA. Drugi — istotny dla transaktywacji (242 pary zasad), umieszczony między genami *vpr* i *vpu* koduje 72-aminokwasowy, bogaty w cysteinę polipeptyd. Natomiast trzeci (1243 pary zasad) — zlokalizowany w 3' odcinku genu *env*, ale w innej ramce odczytu, produkuje krótki 14-aminokwasowy łańcuch [2, 45]. Produkt ekspresji genu *tat* — 86-aminokwasowe białko, bogate w aminokwasy zasadowe i prolinę wędruje w żelu poliakryloamidowym w postaci pasma odpowiadającego m.cz. 14 000 (p14). W białku tym można wyróżnić trzy domeny: 1) w N końcu — bogatą w prolinę, 2) centralną — z wysoką zawartością cysteiny (wśród 16 reszt aminokwasowych 7 stanowi cysteina) oraz 3) w C końcu — zasadową, w której na 9 aminokwasów przypada aż 6 reszt argininowych i 2 lizynowe [3, 45, 48, 49]. Ta ostatnia domena jest miejscem oddziaływania białka p14 z RNA i odpowiada za jego lokalizację w jądrze komórkowym [50]. Na podstawie analizy widmowej w UV stwierdzono, że białko, kodowane przez gen *tat* w formie monomeru, wiąże dwa jony Zn^{+2} lub Cd^{+2} . Badania elektroforetyczne kompleksów białko p14 — jony metali wskazują, że polipeptyd ten tworzy dimery połączone przez jony Zn^{+2} lub Cd^{+2} [49]. Rysunek 5 przedstawia prawdopodobny sposób ich oddziaływania.

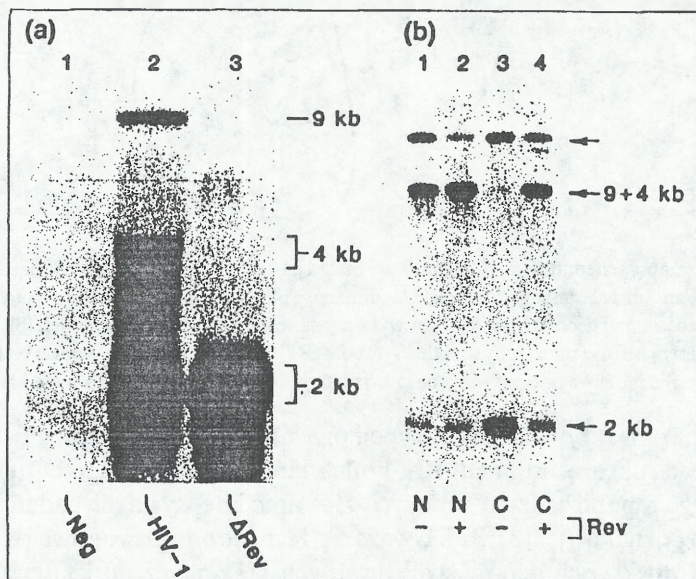


Rys. 5. Przypuszczalny schemat tworzenia dimerów białka p14 połączonych przez jony metali. Każdy monomer p14 zawiera 7 cząsteczek cysteinowych. W dimerze p14 połączonym przez jony metalu (M) tworzy się układ o czterościennej geometrii, w którym wykorzystane jest 14 reszt cysteinowych (S). Dwie z czterech reszt cystein tworzą mostki przez jony metalu. Symbole „+” określają zasadowy region białka, reprezentujący równocześnie możliwe miejsca wiązania z kwasami nukleinowymi (wg F r a n k e l a i wsp., [49])

Zdolność transaktywacji transkrypcji przez białko p14 niektórzy badacze [51, 52] wiążą ze strukturą fragmentu N końca łańcucha oraz fragmentu cząsteczki umieszczonego w pobliżu lizyny w pozycji 41. Mimo intensywnych badań rola białka p14 jest słabo poznana [1, 3, 31, 32]. Uważa się, że może ono powodować wzrost ilości produktów transkrypcji genów strukturalnych HIV przez oddziaływanie z sekwencją TAR (por. poprzedni rozdział). Sekwencja ta, obecna w niekodującym fragmencie mRNA, rozpoznawanym przez inicjujący rybosom, hamuje translację przyległych sekwencji, czemu z kolei zapobiega interakcja z białkiem p14. Jedną z możliwości zakłada, że udział białka p14 w podnoszeniu poziomu transkrypcji może polegać na uwalnianiu niedojrzałych miejsc terminacji z odcinka położonego w pobliżu końca struktury pnia sekwencji TAR (por. rys. 3) i podnosić wydajność procesu elongacji transkrypcji [53, 54]. Pojawiły się doniesienia wskazujące, że omawiane białka wpływają zarówno na inicjację, jak i elongację transkrypcji [3, 53]. Należy podkreślić wyniki doświadczeń podkreślających zależność działania białka kodowanego przez gen *tat* od komórkowych czynników aktywujących transkrypcję (np. białka SP1, NF-Kappa B), rozpoznających określone sekwencje w obszarze 5'LTR [16, 55, 56]. Mutacja w pobliżu dwóch kodujących eksonów [46] bądź delecja genu *tat* [57] dramatycznie zmniejsza zdolność (ok. 1000-krotnie) wirusa do ekspresji białek strukturalnych i jego replikacji. Stymulacja genów strukturalnych i regulatorowych przez aktywne białka p14 przyczynia się do intensywnego namnażania nowych cząstek wirusowych [53].

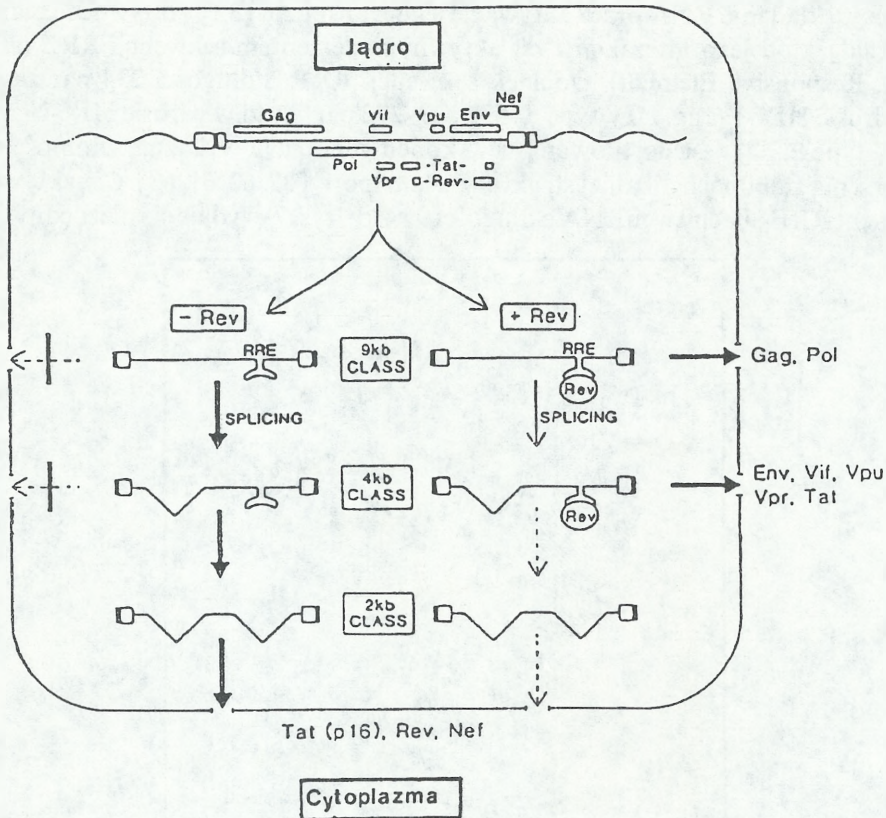
rev

Niemal równocześnie z wykryciem genu *tat* stwierdzono [46, 47, 58], że mRNA, kodujący białko p14, ze zmienioną ramką odczytu stanowi matrycę dla kolejnego białka transaktywującego, o m.c. 20 000 (p20). Dla genu kodującego białko p20, opisywanego początkowo symbolami *art* lub *trs*, przyjęto symbol *rev* [4]. Jego produkt ekspresji, oznakowany również tym symbolem, stanowi 116-aminokwasowy polipeptyd, w którym 25 aminokwasów od N końca koduje pierwszy ekson, zaś następne 91 — drugi. Białko *rev*, silnie zasadowa fosfo-proteina, występuje głównie w jądrach komórek zakażonych HIV [46, 59].



Rys. 6. Analiza Northern wirusowych mRNA w cytoplazmie cos-1 transfekowanych plazmidami zawierającymi prowirusy HIV, pozbawione genu *rev* (Rev; ścieżka 3) bądź prowirusy szczepu dzikiego (HIV-1, ścieżka 2) (a). Analiza transkryptów (z nukleazą S1) wirusa HIV w jądrze komórkowym (N) i cytoplazmie (C) komórek cos-1 transfekowanych w obecności (+) lub braku (—) *rev* (wg Feinberga i wsp. [47]) (b)

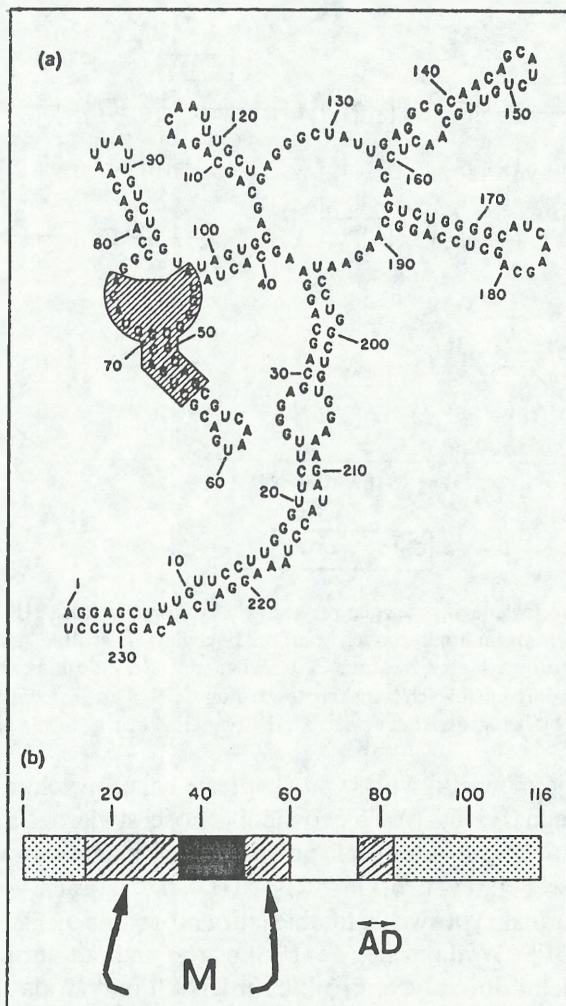
Od pionierskich eksperymentów opublikowanych w 1986 roku przez grupę Galla [47] wiadomo, że przy braku aktywnego białka *rev* praktycznie nie obserwuje się ekspresji białek strukturalnych HIV, natomiast dochodzi do wzmoczonej ekspresji krótkich mRNA o długości ok. 2kb, na których syntetyzują się białka regulatorowe wirusa (rys. 6). Białko *rev* indukuje cytoplazmatyczną ekspresję tzw. długich transkryptów (ok. 9kb) odpowiadających długością genomowemu RNA i mRNA dla białek kodowanych przez *gag* i *pol* oraz mRNA po jednokrotnym cięciu i składaniu (ok. 4kb), którego ekspresja może dostarczyć białek otoczki. Proces składania 4kb mRNA, zaliczanego również do tzw. długich transkryptów, usuwa sekwencje kodujące *env*, *vif*, *vpr*, *vpu*, generując mRNA o długości 2kb, który koduje białka: p14, *rev* i *nef* (rys. 7). Natomiast



Rys. 7. Rola białka kodowanego przez gen *rev* w cyklu życiowym wirusa HIV. Początkowo, przy braku białka *rev*, w cytoplazmie zakażonych komórek pojawiają się krótkie łańcuchy mRNA (2 kb), które kodują regulatorowe białka, włącznie z białkiem *rev*. Przy dostatecznej ilości białka *rev* dochodzi do ekspresji długoniciowych transkryptów o długości 9 i 4 kb (po jednorazowym składaniu) kodujących białka strukturalne wirusa HIV (wg Cullen i Malima [32])

białko *rev* okazuje niewielki wpływ na ekspresję wirusowych mRNA w obrębie jądra komórkowego (rys. 6a, b). W jego nieobecności stwierdza się w cytoplazmie zakażonych komórek (lub komórek po transfekcji plazmidami pozbawionymi w prowirusie sekwencji *rev*) krótkie mRNA HIV, a w jądrach — nagromadzenie długoniciowych transkryptów. Na terenie jądra mogą one ulegać degradacji bądź składaniu [60, 61]. Wydaje się, że białko *rev* ma zdolność specyficznego rozróżniania w pełni dojrzałych, krótkich mRNA i przyzwala na ich „eksport” poza jądro komórkowe. Indukcja ekspresji genów strukturalnych HIV przez białko p20 prawdopodobnie jest związana z ułatwianiem transportu jądro-cytoplazmatycznego długoniciowych transkryptów [60, 61], których retencja w jądrze może wynikać z ich interakcji z czynnikami komórkowymi [32]. Z przeprowadzonych dotąd badań nie wynika czy białko *rev* aktywuje transport wirusowych mRNA przez hamowanie procesu składania ich prekursorów, czy

hamuje składanie RNA przez aktywację jego transportu [32]. Aktywność białka p20 zależy od jego interakcji z *cis*-aktywnym elementem sekwencji RRE (ang. Rev. Responsive Element). Odcinek sekwencji RRE o długości 234 par zasad w wirusie HIV-1 (ang. HIV type-1, 63), a — 272 par zasad w wirusie HIV-2 (ang. HIV type-2, 62), jest usytuowany w 3' końcu genu *env* i wykazuje zdolność do tworzenia stabilnej helikalnej struktury „stem loop” [32, 60, 61, 63]. *Cis*-aktywny element RRE obecny w mRNA o długości 9 i 4 kb (rys. 7) wydaje się niezbędny dla



Rys. 8. Strukturalna organizacja *cis*-aktywnego elementu RRE i białka rev, (a) Sekwencja nukleotydowa RRE wraz z pierwotnym miejscem wiązania białka rev (region zakreskowany), (b) W łańcuchu białka rev zaznaczono czarnym prostokątem domenę argininobogą, odpowiedzialną za wiązanie z RRE oraz jego lokalizację w jądrze komórkowym. Klamrą wraz ze strzałkami zaznaczono fragment łańcucha odpowiedzialny za multimeryzację (M), AD — domena aktywacyjna białka rev (wg Cullena i Malima [32])

biologicznej aktywności białka p20. Interakcja białka rev z sekwencją RRE, o poznanej strukturze pierwszo- i drugorzędowej [32, 64, 65], odbywa się przez specyficzny układ jej nukleotydów (rys. 8). W początkowym etapie do tego układu przyłącza się monomer białka regulatorowego. Następne cząsteczki białka rev wiążą się z RRE, tworząc multimeryczny kompleks. Jak dotąd nie wiadomo czy powstaje on przed związaniem się białka rev z układem RRE, czy po utworzeniu połączenia monomer-RRE (64). Rysunek 8 przedstawia strukturalną organizację *cis*-aktywnego elementu RRE (rys. 8a) oraz białka rev (rys. 8b). Białko to charakteryzuje obecność silnie zasadowego odcinka aminokwasowego między 35. a 50. resztą, w której występuje aż 10 cząsteczek argininy. Mutanty delecyjne HIV pozbawione sekwencji kodujących ten zasadowy odcinek białka [66] bądź sekwencji RRE [64, 65], tracą zdolność nagromadzania białka rev w jądrze zakażonych komórek. Wnikliwe badania grupy Cullena [65] wskazują, że zespół aminokwasów otaczających silnie zasadowy fragment białka rev, wraz z nim, jest odpowiedzialny za wiązanie multimerycznego kompleksu z RRE. Ponadto w C-końcowym fragmencie łańcucha białkowego znajduje się 10-aminokwasowa domena, zwana „aktywacyjną” — bogata w leucynę. Wspomniany odcinek białka rev może wchodzić w interakcję z czynnikami komórkowymi, zaangażowanymi w proces składania i (albo) uczestniczyć w transporcie wirusowych mRNA [64, 65].

Sposób działania białka rev jest sprawą szeroko dyskutowaną i wciąż nie wyjaśnioną [3, 5, 32, 66]. Cullen i Malim [32] wskazują na możliwe czynniki zatrzymujące długoniciowe transkrypty HIV w jądrze komórek zakażonych tym wirusem. Ich zdaniem mogą to być m.in. białka niejednorodnego jądrowego rybonukleoproteidu C (hnRNP; ang. heterogenous nuclear ribonucleoprotein), odpowiedzialne za jądrową retencję niedojrzałych transkryptów. Inna możliwość — to komórkowe czynniki, bezpośrednio zaangażowane w proces składania prekursorów mRNA, które w organizmach eukariotycznych tworzą kompleks z premRNA (ang. commitment complex). Prekursorowy mRNA w takim kompleksie pozostaje aż do zakończenia procesu składania. W tym miejscu należy podkreślić opublikowane ostatnio wyniki doświadczeń Liu i wsp. [66] wskazujące, że U1 niskocząsteczkowy jądrowy RNA (U1snRNA, ang. U1 small nuclear RNA), składnik kompleksu przeprowadzającego proces składania premRNA u drożdży, wchodzi *in vivo* w interakcję z mRNA kodującym białko otoczkowe HIV, których ekspresja jest sterowana przez białko rev. Autorzy nie wykluczają, że U1snRNA odgrywa przejściową rolę w kompleksie z mRNA białek otoczki. Wydaje się jednakże, że właśnie w tym kompleksie transkrypt kodujący białko otoczki jest rozpoznawany przez białko p20.

Kolejna hipoteza wyjaśniająca mechanizm działania białka rev zakłada, że jego interakcja z sekwencją RRE może hamować tworzenie kompleksu z czynnikami komórkowymi przeprowadzającymi składanie prekursorów mRNA albo doprowadzać do jego rozpadu przed zakończeniem procesu składania [32]. Uwolnione z tego kompleksu wirusowe mRNA, które nie uległy składaniu, są

transportowane do cytoplazmy. Oczywiście nie można wykluczyć, że po związaniu białka rev z elementem RRE dochodzi do kierowania transkryptów wirusowych poza jądro komórkowe, co prowadzi do odłączenia czynników komórkowych zaangażowanych w proces składania.

nef

Ten gen zlokalizowany jest w 3' krańcu genomu HIV tak, że około połowa jego sekwencji zachodzi na odcinek 3'LTR [67]. Inicjatorowy kodon metioniny znajduje się za kodonem terminacyjnym genu dla białek otoczkowych. Z badań sekwencyjnych genomu HIV wynika, że mRNA (ok. 2 kb) tworzy się w wyniku składania genowego i zawiera trzy eksony [68]. Ekspresja *nef* prowadzi do biosyntezy białka o m.c. 27 000 (p27), które występuje przede wszystkim w cytoplazmie zakażonych komórek w połączeniu z kwasami tłuszczowymi. Cechą charakterystyczną p27 jest mirystylacja N-końcowego aminokwasu, zapewne istotna dla jego interakcji z błoną komórkową [5, 69]. Ponadto N-końcowa część łańcucha p27 jest silnie ufosforylowana przez komórkową kinazę C [69]. Wciąż pozostaje sprawą otwartą funkcja białka kodowanego przez gen *nef* [3]. Jedną z możliwości zakłada, że odpowiada ono za hamowanie wzrostu wirusa i pozostawienie go w formie „uśpionej” [5]. Początkowo podkreślano zdolności hamowania replikacji wirusa HIV przez białko p27 (stąd jego symbol *nef*; ang. negative factor), wskazując na jego interakcję z sekwencją regulatorową NRE w obrębie odcinka 5' LTR genomu wirusa HIV [70, 71].

Niektórzy badacze zwracają uwagę na niewielki efekt negatywnej kontroli przez gen *nef*, a część z nich neguje inhibitorową rolę białka kodowanego przez ten gen w procesie replikacji HIV [72, 73]. Analiza sekwencji genu *nef* różnych izolatów wirusa HIV dostarcza danych o ich pewnej różnorodności. Okazuje się, że część wirusów posiada kodon „stop” wewnątrz sekwencji kodujących białko p27, konsekwencją czego jest różna długość tego polipeptydu, być może warunkująca odmienną patogenność szczepów wirusowych [5].

vif

W centralnej części genomu HIV znajduje się najbardziej konserwatywny gen — *vif* o długości 609 nukleotydów. Fragment 5' tego genu zachodzi na 3' koniec genu *pol*, natomiast jego 3' koniec zachodzi na gen *vpr* (por. rys. 1). Gen *vif* koduje silnie zasadowe białko o m.c. 23 000, z dużą zawartością tryptofanu [74, 75], występujące przede wszystkim w cytoplazmie zakażonych komórek. Funkcja tego białka jest mało poznana. Uważa się, że reguluje stopień infekcyjności wirusa i bierze udział we wczesnych etapach replikacji HIV [3, 76].

vpu i vpr

Jak dotąd, w najmniejszym stopniu poznano rolę tych sąsiadujących ze sobą genów, usytuowanych między genami struktury — *pol* i *env*. Uważa się, że kodowane przez nie białka są istotne dla infekcji komórek docelowych [70, 77, 78].

Gen *vpu* występuje wyłącznie w materiale genetycznym wirusów HIV-1. Spokrewnione z nimi wirusy HIV-2 oraz retrowirusy niektórych małp SIV (ang. Simian Immunodeficiency Virus) zawierają odpowiednik tego genu, ale o innej sekwencji — *vpx* [77]. Sugeruje się, że ta odrębność genów *vpu* i *vpx* stanowi jedną z podstawowych różnic między tymi wirusami, a ich obecność odpowiada za ostry (HIV-1) bądź powolny (HIV-2) przebieg zespołu AIDS.

Ostatnio udało się wstępnie określić właściwości białka kodowanego przez gen *vpu*. Jest nim silnie hydrofobowe białko o m.cz. 16 000 (p16), występujące głównie w cytoplazmie zaatakowanych komórek. Przypuszcza się, że jest ono nieodzowne w procesie dojrzewania, efektywnego „pączkowania” i uwalniania cząstek wirusowych [76, 78, 79]. Infekcja komórek T4 w hodowli mutantem wirusa HIV, pozbawionym sekwencji *vpu*, prowadzi do ograniczenia replikacji wirusów: takie komórki produkują 5–10 razy mniej dojrzałych wirusów.

Rola genu *vpr* nie została dotychczas bliżej określona. Z sygnałnych doniesień wynika, że białko kodowane przez ten gen jest słabym aktywatorem transkrypcji [80]. Stymuluje ono sekwencje LTR wirusa HIV podobnie jak niektóre sekwencje promotorowe wirusów i komórek.

Wirus HIV, którego budowa molekularna i wiele właściwości zostało w znacznym stopniu poznanych w stosunkowo krótkim czasie, wykazuje największe podobieństwo do retrowirusów rodziny Lentivirinae (tzw. wirusy powolne). Różnica pomiędzy HIV a innymi (spoza rodziny Lentivirinae) retrowirusami tkwi w złożoności jego genomu i obecności wielu genów regulatorowych. Precyzyjne określenie mechanizmów działania tych genów stanowi zapewne klucz do pełnego zrozumienia molekularnych podstaw infekcji HIV i jego cytopatycznych efektów.

LITERATURA*

1. Bednarik D. P., Folks T. M. — AIDS, 6: 3—16, 1992.
2. Ratner L., Haseltine W., Patarca R. i wsp. — Nature, 313: 277—284, 1985.
3. Greene W. C. — New Engl. J. Med. 324: 308—317, 1991.
4. Haseltine W. A., Wong - Staal F. — Scientific Am. 256: 52—62, 1988.
5. Kieny M. P. — J. Acq. Immun. Def. Synd. 3: 395—402, 1990.
6. Jung M., Zagórski W. — Post. Biochem. 33: 399—424, 1987.
7. Kiliańska Z. — Wszechświat, 89: 281—283, 1988.
8. Kiliańska Z. — Post. Biol. Kom. 15: 299—326, 1988.
9. Starcich B., Ratner L., Josephs S., Okamoto T., Gallo R. C., Wong - Staal F. — Science 227: 538—540, 1985.
10. Sanchez - Pescador, Power M. Barr P., Steiner K., Stempien M., Levy J., Dina D., Luciw P. — Science 227: 484—492, 1985.
11. Giacca M., Gutierrez M.J., Menzo S., D'adda Di Fagagna F., Falaschi A. — Virology 186: 133—147, 1992.
12. Briggs M. R., Kadonaga J. T., Bell S. P., Tijan R. — Science 234: 47—52, 1986.

* W niektórych nielicznych pozycjach, z uwagi na kilkunastu współautorów, cytowano trzy pierwsze nazwiska.

13. Wu F, Garcia J, Mitsuyasu R, Gaynor R. — *J. Virol.* 62: 218—225, 1988.
14. Jones K. A., Luciw P. A., Duchange N. — *Genes Dev.* 2: 1101—1114, 1988.
15. Kato H, Horikoshi M, Roeder R. — *Science* 251: 1476—1479, 1991.
16. Nabel G, Baltimore D. — *Nature* 326: 711—713, 1987.
17. Sen R, Baltimore D. — *Cell* 46: 705—716, 1986.
18. Lenardo M. J., Baltimore D. — *Cell* 58: 227—229, 1989.
19. Rosen C. A., Sodroski J. G., Haseltine W. A. — *Cell* 41: 813—823, 1985.
20. Lu Y, Stenzel M, Sodroski J. G., Haseltine W. A. — *J. Virol.* 63: 4115—4119, 1989.
21. Fianza B. R. J., Rauscher F. J. I., Josephs S. F., Curran T. — *Science* 239: 1150—1153, 1988.
22. Shaw J. P., Utz P. J., Durano D. B., Toole S. S., Emmer E. A., Crabtree D. R. — *Science* 241: 202—205, 1988.
23. Sawadogo M., van Dike M. W., Gregor P. D., Roeder R. G. — *J. Biol. Chem.* 263: 985—993, 1988.
24. Sodroski J., Rosen C. A., Haseltine W. A. — *Science* 225: 381—385, 1984.
25. Hauber J., Cullen B. R. — *J. Virol.* 62: 673—679, 1988.
26. Muesing M. A., Smith D. H., Capon D. J. — *Cell* 48: 691—701, 1987.
27. Marciniak R. A., Garcia-Blanco M. A., Sharp P. A. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3624—3628, 1990.
28. Weeks K. M., Ampe C., Schulz S. C., Steitz T. A., Crothers D. M. — *Science* 249: 1281—1285, 1990.
29. Wu F, Garcia J, Sigman D, Gaynor R. — *Genes Dev.* 5: 2128—2140, 1991.
30. Dingwall C., Ernberg I., Gait M. J. i wsp. — *EMBO J.* 9: 4145—4153, 1990.
31. Colvin R. A., Garcia-Blanco M. A., — *J. Virol.* 66: 930—935, 1992.
32. Cullen B. R., Malim M. H. — *TIBS* 16: 346—350, 1991.
33. Gheysen D., Jacobs E., de Foresta F., Thiriart C., Francotte M., Thines D., De Wilde M. — *Cell* 59: 103—112, 1989.
34. Trono D., Feinberg M. B., Baltimore D. — *Cell* 59: 113—120, 1989.
35. Weber I. T., — *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 7: 172—184, 1990.
36. Lighfoote M. M., Coligan J. E., Folks T. M., Fauci A. S., Martin M. A., Venkatsan S. — *J. Virol* 60: 771—775, 1986.
37. Starcich B. R., Hahn B. H., Shaw G. M. i wsp. — *Cell* 45: 637—648, 1986.
38. Leonard C. K., Spellman M. W., Riddle L., Harris R. J., Thomas J. N., Gregory T. J. — *J. Biol. Chem.* 265: 10373—10382, 1990.
39. Dalgleish A. G., Beverley P. C., Clapham P. R., Crawford D. H., Greaves M. F., Weiss R. A. — *Nature* 312: 763—767, 1984.
40. Bolognesi D. P. — *Acq. Immun. Def. Synd.* 3: 390—394, 1990.
41. Matthews T. J., Bolognesi D. P. — *Scientific Am.* 256: 120—127, 1988.
42. Cordonnier A., Montagnier L., Eberman M. — *Nature* 320: 571—574, 1989.
43. Rosen C. A., Sodroski J. G., Campbell K., Haseltine W. A. — *J. Virol.* 57: 379—384, 1986.
44. Fischer A. G., Wong-Staal F., Gallo R. C., — *Nature* 320: 367—370, 1986.
45. Sodroski J., Patarca R., Rosen C., Dayton A. Terwilliger E., Haseltine W. — *Science* 229: 74—77, 1985.
46. Sodroski J., Goh W. C., Rosen C., Dayton A. Terwilliger E., Haseltine W. — *Nature* 321: 412—417, 1986.
47. Feinberg M. B., Jarret R. E., Aldovini A., Gallo R. C., Wong-Staal F. — *Cell* 46: 807—817, 1986.
48. Sadaie M. R., Benter T., Wong-Staal F. — *Science* 239: 910—913, 1988.
49. Frankel A. D., Bredt D. S., Pabo C. O. — *Science* 240: 70—73, 1988.

50. Hauber J, Perkins A, Heimer E. P., Cullen B. R. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6364—6368, 1987.
51. Rappaport J, Lee S-J, Khalili K, Wong - Staal F. — *New Biologist* 1: 101—110, 1989.
52. Tiley L. S., Brown P. H., Cullen B. R., — *Virology* 178: 560—567, 1990.
53. Laspia M. F., Rice A. P., Mathews M. B. — *Cell* 59: 283—292, 1989.
54. Kao S-Y., Calman A. F., Luciw P. A., Peterlin B. M. — *Nature* 330: 489—493, 1987.
55. Jones K. A., Kadonaga J. T., Luciw P. A., Tijan R. — *Science* 232: 755—759, 1986.
56. Berkhout B., Gatignol A., Rabson A. B., Jeang K. T. — *Cell* 62: 757—767, 1990.
57. Fischer A. G., Feinberg M. B., Joseph S. F. wsp. — *Nature* 320: 367—371, 1986.
58. Arya S. K., Guo C., Josephs S. F., Wong - Staal F. — *Science* 229: 69—73, 1985.
59. Cullen B. R., Hauber J., Campbell K., Sodroski J. G., Haseltine W. A., Rosen C. A. — *J. Virol.* 62: 2498—2501, 1988.
60. Malim M. H., Hauber J., Lee S-Y., Maizel J. V., Cullen B. R. — *Nature* 338: 254—257, 1989.
61. Emerman M., Vazeux R., Peden K. — *Cell* 57: 1155—1165, 1989.
62. Lewis N., Williams J., Rekosh D., Hammar skjöld M. L. — *J. Virol.* 64: 1690—1697, 1990.
63. Zapp M. L., Green M. R. — *Nature* 342: 714—716, 1989.
64. Malim M. H., Cullen B. R. — *Cell* 65: 241—248, 1991.
65. Malim M. H., Tiley L. S., Mc Carn D. F., Rusche J. R., Hauber J., Cullen B. R. — *Cell* 60: 675—683, 1990.
66. Lu X., Heimer J., Rekosh D., Hammar skjöld M. L. — *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 87: 7598—7602, 1990.
67. Allan J. S., Coligan J. E., Lee T. H., Mc Lane M. F., Kanki P. J., Groopman J. E., Essex M. — *Science* 230: 810—813, 1985.
68. Franchini G., Robert - Guroff M., Wong - Staal F., Ghayel J., Kato I., Chang N. T. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5282—5285, 1986.
69. Guy B., Kieny M. P., Riviere Y. i wsp. — *Nature* 330: 266—269, 1987.
70. Ahmad N., Venkatesan S. — *Science* 241: 1481—1485, 1988.
71. Terwilliger E., Sodroski J. G., Rosen C. A., Haseltine W. A. — *J. Virol* 60: 754—760, 1986.
72. Kim S. Y., Ikeuchi K., Byrn R., Groopman J., Baltimore D. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9544—9548, 1989.
73. Kestler H. W., Ringler D. J., Mori K., Panicali D. L., Sehgal P. K., Daniel M. D., Desrosiers R. C. — *Cell* 65: 651—662, 1991.
74. Kan N. C., Franchini G., Wong - Staal F., Dubois G. C., Robey W. G., Lautenberg J. A., Papas T. S. — *Science* 231: 1553—1555, 1986.
75. Strebel K., Daugherty D., Clouse K., Cohen D., Folks T., Martin M. — *Nature* 328: 728—730, 1987.
76. Gallo R. — *J. Acq. Immun. Def. Synd.* 3: 380—389, 1990.
77. Essex M., Kanki P. J. — *Scientific Am.* 256: 64—71, 1988.
78. Strebel K., Klimkait I., Martin M. A. — *Science* 241: 1221—1223, 1988.
79. Terwilliger E. F., Cohen E. A., Lu X., Sodroski J. G., Haseltine W. A. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5163—5167, 1989.
80. Cohen E. A., Dehni G., Sodroski J. G., Haseltine W. A. — *J. Virol* 64: 3097—3099, 1990.