

Einfluss der Raf-Bindungsdomäne im Nef-Protein auf die Pathogenität von SIVsmmPBj

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Ulrich Tschulena
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2004
(DF1)

Vom Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz

Gutachter: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz
Prof. Dr. Klaus Cichutek

Datum der Disputation: _____

1. Einleitung	7
1.1 Immundefizienzviren	8
1.1.1 Retroviren	8
1.1.2 Replikationszyklus der Retroviren	10
1.1.3 Lentiviren	12
1.2 Zelleintritt der Immundefizienzviren	14
1.3 Infektion und Pathogenese der Immundefizienzviren	16
1.4 Die simianen Immundefizienzviren (SIV)	18
1.4.1 Das simiane Immundefizienzvirus SIVsmmPBj1.9	19
1.5 Das akzessorische Nef-Protein	22
1.5.1 Veränderung des intrazellulären Proteintransports durch Nef	23
1.5.2 Erhöhung der Virion-Infektiosität durch Nef	24
1.5.3 Nef-vermittelte Zellaktivierung	24
1.6 Die mitogene Signalkaskade	25
1.6.1 Der Raf/MEK/ERK-Signalweg	27
1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit	27
2. Material und Methoden	29
2.1 Lösungen und Kulturmedien	29
2.1.1 Sonstige Materialien	31
2.1.2 Geräte	31
2.1.3 Oligonukleotide	31
2.1.4 Plasmide	32
2.1.5 Verwendete Antikörper	33
2.2 Zellbiologische Methoden	34
2.2.1 Kultivierung und Lagerung von eukaryotischen Zelllinien	34
2.2.2.1 Suspensionszellen	34
2.2.2.2 Adhärente Zellen	34

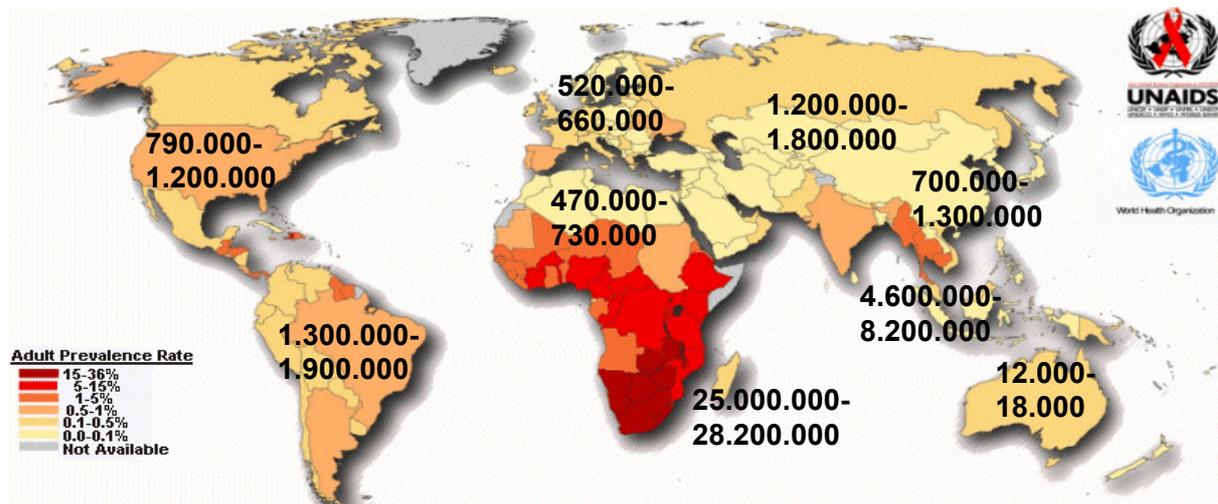
2.2.2	Kryokonservierung von Zellen _____	34
2.2.3	Präparation peripherer mononukleärer Blutzellen und Gewinnung von Plasma aus Blut _____	35
2.2.4	Kultivierung von PBMC _____	36
2.2.5	Stimulation von PBMC _____	36
2.2.6	Infektion von Zellen _____	36
2.2.7	Gewinnung von Serum _____	37
2.2.8	Transfektion eukaryotischer adhärenter Zellen (Lipofectamin-Methode) _____	37
2.2.9	Transfektion eukaryotischer Suspensionszellen (DMRIE-C-Methode) _____	38
2.2.10	Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität _____	38
2.2.11	Proliferationsassay mit [³ H]-Thymidin _____	38
2.2.12	Aufreinigung von Viruspartikeln mit Optiprep _____	39
2.3	Mikrobiologische Methoden _____	39
2.3.1	Kultivierung und Lagerung von Bakterien _____	39
2.3.1.1	Flüssigkultur _____	39
2.3.1.2	Nährböden _____	40
2.3.1.3	Lagerung _____	40
2.3.2	Herstellung kompetenter Bakterien _____	40
2.3.3	Transformation von Bakterien _____	41
2.4	Molekularbiologische Methoden _____	42
2.4.1	Isolierung von DNA aus Bakterien _____	42
2.4.2	Restriktion von DNA _____	42
2.4.3	Auftrennung und Analyse von DNA über Agarose-Gelelektrophorese _____	42
2.4.4	Aufreinigung von DNA _____	43
2.4.5	Ligation _____	43
2.4.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) _____	43
2.4.7	Gerichtete Punktmutagenese _____	44
2.4.8	Luciferase Reportergen Assay _____	45
2.4.9	Isolierung viraler RNA aus Plasma _____	45
2.4.10	Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen _____	46

2.5 Analytische Methoden	46
2.5.1 Immun-Peroxidase-Assay (IPA)	46
2.5.2 Proteinbestimmung	47
2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.5.4 Western Blot	49
2.5.5 Immun-Komplex-Kinase-Assay	51
2.5.6 Analytische Durchflußzytometrie (FACS)	53
2.5.6.1 Analyse zellulärer Oberflächenmarker aus Vollblut	54
2.5.7 Bestimmung der DNA-Konzentration	54
2.5.8 Reverser Transkriptase Test (RT-Test)	54
2.5.9 IL-2 und IL-6 ELISA	55
2.6 Bestimmung virologischer Parameter nach Infektion von Schweinsaffen	55
2.6.1 Infektion von Schweinsaffen	55
2.6.2 Messung der Zell-assoziierten Virusbelastung	56
2.6.3 Bestimmung des Differentialblutbildes	56
2.6.4 Sequenzierung von Virusklonen	56
2.6.5 Inno-LIA-Confirmation-Test	57
2.6.6 Histopathologie und Hämatoxylin- und Eosin-Färbung	57
3. Ergebnisse	59
3.1 Konstruktion der Virusmutante PBj-ΔRBD	59
3.2 Eigenschaften von PBj-ΔRBD <i>in vitro</i>	62
3.2.1 Replikation von PBj- Δ RBD in PBMC	62
3.2.2 Expression von Nef nach Infektion von PBMC mit PBj- Δ RBD	63
3.2.3 LTR-Transkriptionsaktivität von PBj- Δ RBD in A3.01 Zellen	63
3.2.4 Proliferation von PBMC nach Infektion mit PBj- Δ RBD	65
3.2.5 ERK-Aktivität nach Infektion von PBMC mit PBj- Δ RBD	66
3.2.6 Expression von Aktivierungsmarkern auf PBj- Δ RBD-infizierten PBMC	68
3.2.7 Zytokinsezernierung nach Infektion von PBMC mit PBj- Δ RBD	71
3.3 Analyse der Eigenschaften von PBj-ΔRBD <i>in vivo</i>	72
3.3.1 Infektion von Schweinsaffen	72
3.3.2 Klinische Symptome nach Infektion von Schweinsaffen	73

3.3.3	Virusbelastung nach Infektion von Schweinsaffen _____	75
3.3.4	Virale Nukleotidsequenz nach Infektion von Schweinsaffen _____	76
3.3.5	Lymphozytenzahl nach Infektion von Schweinsaffen _____	76
3.3.6	Serokonversion nach Infektion von Schweinsaffen _____	77
3.3.7	Expression von Aktivierungsmarkern auf Lymphozyten in verschiedenen Organen nach Infektion von Schweinsaffen _____	79
3.3.8	Zytokinkonzentration im Serum nach Infektion von Schweinsaffen _	81
3.3.9	Histopathologie nach Infektion von Schweinsaffen _____	83
4.	Diskussion _____	85
4.1	Konstruktion von PBj- Δ RBD _____	85
4.2	Eigenschaften von PBj- Δ RBD <i>in vitro</i> _____	86
4.2.1	PBj-induzierte Zellaktivierung <i>in vitro</i> _____	88
4.3	Charakteristika von PBj- Δ RBD <i>in vivo</i> _____	90
4.3.1	Replikationskinetik <i>in vivo</i> _____	90
4.3.2	Wirtsparameter <i>in vivo</i> _____	90
4.3.3	Zytokinausschüttung <i>in vivo</i> _____	91
4.3.4	Aktivierung von T-Zellen <i>in vivo</i> _____	92
4.4	Modell für die Induktion der SIVsmmPBj-induzierten Enteropathie	94
4.5	Ausblick _____	95
5.	Zusammenfassung _____	96
6.	Literaturverzeichnis _____	98
7.	Abkürzungsverzeichnis _____	107
8.	Danksagung _____	110
9.	Lebenslauf _____	111

1. Einleitung

Die weltweite Epidemie des humanen Immundefizienzvirus (HIV) ist eines der größten Gesundheitsprobleme der heutigen Zeit. Rund drei Millionen Menschen sind im Jahr 2003 an AIDS gestorben. Weit mehr Menschen haben sich 2003 mit HIV infiziert: fünf Millionen. Weltweit leben derzeit zwischen 34 und 46 Millionen Menschen mit dem HIV-Erreger (AIDS Epidemic update, UNAIDS, WHO).



Total: 34 – 46 Millionen

Abb. 1: Geschätzte Zahl der im Jahr 2003 lebenden HIV-Infizierten. Dargestellt ist die Anzahl der HIV-Infizierten und die Prävalenzrate in verschiedenen Regionen und Ländern (modifiziert nach AIDS Epidemic update, UNAIDS, WHO).

1.1 Immundefizienzviren

In den USA wurde 1981 bei jungen amerikanischen Homosexuellen ein bis dahin unbekanntes Immundefizienz-Syndrom dokumentiert, welches assoziiert war mit schweren opportunistischen Infektionen wie z. B. *Pneumocystis carinii*, neurologischen Ausfällen, dem Auftreten maligner Tumore sowie einer stetigen Abnahme der CD4⁺ T-Zellen (Falk, et al., 1986; Ho, et al., 1995; Shaw, et al., 1985). Die beschriebenen Krankheitssymptome wurden 1982 vom Center for Disease Control in Atlanta unter dem Namen Acquired Immunodeficiency Syndrom (AIDS) zusammengefasst. Der Verursacher dieser erworbenen Immunschwäche konnte 1983 erstmals aus Blutlymphozyten eines Patienten der kurz vorher beschriebenen Erkrankung des Immunsystems isoliert werden (Barre-Sinoussi, et al., 1983). Der Erreger wurde später als humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) bezeichnet (Coffin, et al., 1986). Kurz darauf wurde in Blutlymphozyten westafrikanischer AIDS-Patienten ein zweiter HIV-Typ (HIV-2) entdeckt (Clavel, et al., 1986). HIV wurde in die Familie der Retroviridae in die Unterfamilie der Lentiviren eingeordnet.

1.1.1 Retroviren

Die Familie der Retroviridae ist in sieben Genera eingeteilt: Alpharetroviren, Betaretroviren, Gammaretroviren, Deltaretroviren, Epsilonretroviren, Foamyviren und Lentiviren. Alle Retroviren besitzen einen gleichen Grundaufbau. Die umhüllten Virionen haben einen Durchmesser von 80 bis 120 nm. In die Lipid-Doppelmembran sind virale Glykoproteine eingelagert, welche eine geometrische Proteinstruktur, das Kapsid, bilden. Die Lokalisation und Form des Kapsids sind charakteristisch für die einzelnen Genera der Virus-Familie. Im Kapsid befinden sich verschiedene Proteine, darunter die Enzyme reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Außerdem enthalten die Retrovirus-Partikel zwei identische 7 – 12 kb große RNA-Moleküle, die wie typische eukaryotische Boten RNAs (mRNA) am 5'-Ende eine 7-Methylguanin-Kappe und am 3'-Ende einen poly(A)-Schwanz tragen. Die viralen RNAs liegen linear, einzelsträngig, ungespleißt und in positiver Polarität vor. Die Genome aller Retroviren sind ähnlich aufgebaut und enthalten

drei proteinkodierende Genbereiche, die für die Vermehrung des Virus erforderlich sind:

- Der *gag*-Bereich (engl. „group-specific-antigens“) kodiert für die inneren Strukturproteine des Kapsids. Synthetisiert werden die Gag-Proteine als gemeinsames Vorläuferprodukt (Polyprotein), das durch die virale Protease in einzelne Komponenten gespalten wird. Je nach Virus wird die virale Protease von *gag*, *pol* oder von einem eigenem Bereich (*pro*) kodiert. Gag-Proteine sind für die Bildung von Matrix (MA), Kapsid (CA) und Nukleokapsid (NC) verantwortlich.
- *Pol* (engl. polymerase) kodiert für eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, auch reverse Transkriptase (RT) genannt und andere virusassoziierte Enzyme, wie die Integrase und RNase H.
- Aus den *env*-Genen (engl. envelope) entstehen die Oberflächen- und Transmembrankomponenten der viralen Hüllproteine.

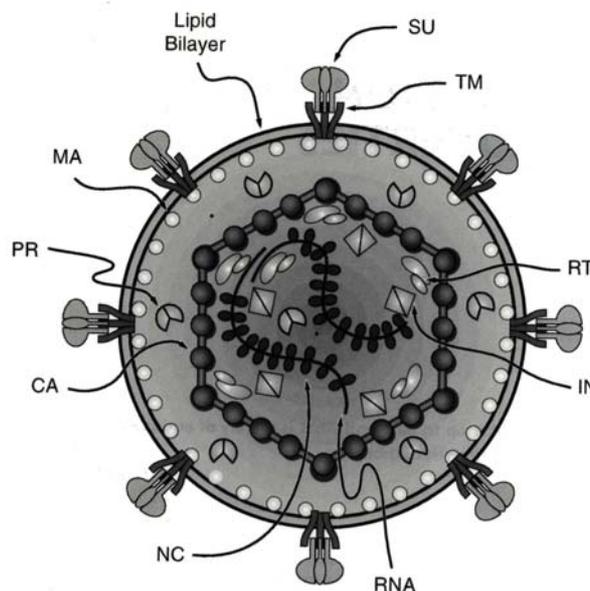


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Retrovirus. Die virale Hülle wird durch die zelluläre Lipid-Doppelhülle (Lipid Bilayer) gebildet. In diese sind die Proteine, welche durch *env* kodiert werden, integriert. Diese Hüllproteine bestehen aus einem Transmembranteil (TM) und einer Oberflächenkomponente (SU). Die internen Strukturproteine werden durch *gag* kodiert. Dies sind Matrix-Proteine (MA), Kapsid-Proteine (CA) und Nukleokapsid-Proteine (NC). Ebenfalls im Partikel enthalten sind einige der durch *pol* kodierten Proteine, wie reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR)(modifiziert nach Coffin J, Hughes S, Varmus E, Retroviruses).

1.1.2 Replikationszyklus der Retroviren

Der Replikationszyklus der Retroviren wird durch eine spezifische Bindung der viralen Hüllproteine an zelluläre Oberflächenrezeptoren eingeleitet. Von der Expression spezifischer Oberflächenrezeptoren auf der Zelle wird der Wirtstropismus des Virus definiert. Durch Fusion der Virus- mit der Wirtsmembran gelangt das Kapsid in die Zelle. Nach dem Zelleintritt wird die virale RNA im Zytoplasma der Wirtszelle von der mitgebrachten RT in doppelsträngige DNA (dsDNA) umgeschrieben. Diese dsDNA wird dann in den Zellkern transportiert und mit Hilfe der viruseigenen Integrase unspezifisch in das Wirtsgenom integriert. Die stabil integrierte virale DNA wird als Provirus bezeichnet und virale Gene werden von wirtszelleigenen Polymerasen exprimiert. Dabei wird die Genexpression durch direkte Sequenzwiederholungen (LTR, engl. long terminal repeat), welche das Provirus auf beiden Seiten begrenzen, reguliert. Ein Abschnitt in der 5'-LTR dient als Promoter und der 3'-LTR Bereich enthält Sequenzen für die Polyadenylierung der RNA. Es entstehen dabei zum einen Transkripte, die mit der genomischen viralen RNA identisch sind, sowie durch Spleißen subgenomische mRNAs. Diese mRNA dient der Translation der Virusproteine, während die Vollängen-RNA als neues Genom für neu entstehende Virionen in das Kapsid verpackt wird. Die Viruspartikel verlassen die Zellen durch „Knospung“ und werden dabei von der Zytoplasma-Membran umschlossen. In diese Membran sind virale Hüllproteine, kodiert vom *env*-Gen des Virus, eingebaut. In diesen noch unreifen Partikeln werden nach der Knospung zelluläre und virale Proteine durch die virale Protease prozessiert, was bei einigen Viren an morphologischen Veränderungen der viralen Kapsid-Struktur beobachtet werden kann. Schließlich liegen reife Virionen vor, welche neue Zielzellen infizieren können.

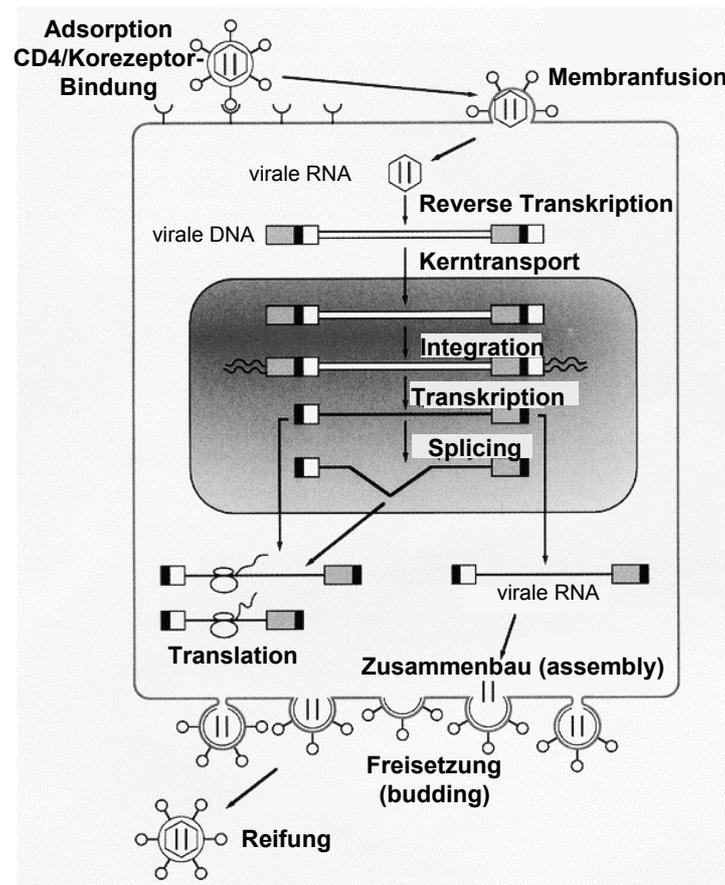


Abb. 3: Replikationszyklus der Retroviren. Die wichtigsten Ereignisse während einer Infektion von Viruseintritt über Integration in das Wirtsgenom, Zusammenbau viraler Partikel bis zur Freisetzung neuer Virionen sind schematisch dargestellt (modifiziert nach Coffin J, Hughes S, Varmus E, Retroviruses).

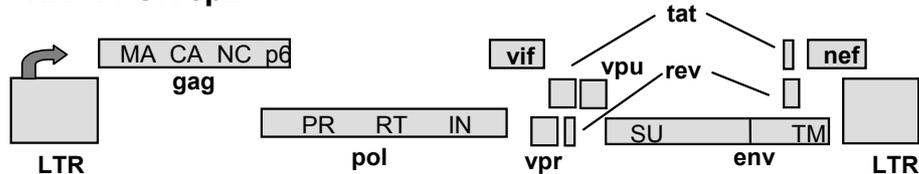
1.1.3 Lentiviren

Die Lentiviren bilden innerhalb der Familie der Retroviren ein eigenes Genus. Ihr Name ist auf ihren charakteristischen langsamen Infektionsverlauf (lat: lentus = langsam) zurückzuführen. Lentiviren zählen zu den komplexen Retroviren und können außer den Genen *gag*, *pol* und *env* weitere akzessorische Gene enthalten (*tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *vpx*).

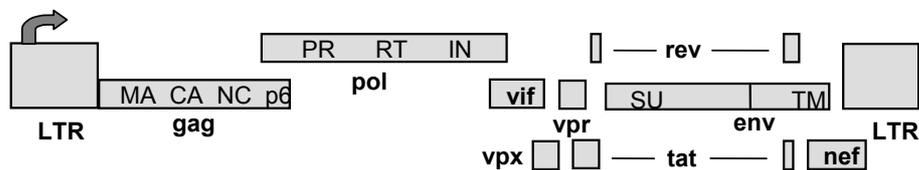
- Die Synthese vollständiger Transkripte wird durch die Bindung von Tat an eine gefaltete virale mRNA Struktur ermöglicht (TAR, Trans-Activator-Region). Tat wirkt somit als „Transaktivator“ der viralen Genexpression.
- Rev-Multimere binden an eine andere RNA-Sequenz (RRE, REV-Responsive-Element) in allen einfach gespleißten und ungespleißten viralen mRNAs und ermöglichen so einen effizienten Kern-Export dieser RNAs und somit deren Translation.
- Vif spielt eine wichtige Rolle bei der Produktion infektiöser Viruspartikel, da es den Abbau des zellulären Restriktionsfaktors APOBEC3G bewirkt, so dass dieses nicht in virale Partikel eingebaut wird. APOBEC3G ist eine DNA-Deaminase, die virale DNA hypermutiert und so nicht-funktionale provirale DNA erzeugt (Gu und Sundquist, 2003).
- Für die Eigenschaft der Lentiviren in nicht-mitotischen Zellen replizieren zu können spielt Vpr eine wichtige Rolle. Die Integration des Provirus ist bei Lentiviren unabhängig vom Zerfall der Kernhülle. Vpr ist am aktiven Kerntransport des viralen Präintegrationskomplex (PIC) beteiligt. Außerdem ist Vpr in der Lage, eine Arretierung in der G2-Phase des Zellzyklus zu induzieren.
- Das Vpu-Protein, welches nur in einigen Lentiviren vorkommt, stimuliert die Freisetzung von Virionen und ist für den Abbau von neu-synthetisiertem CD4-Rezeptor im Endoplasmatischen Retikulum (ER) verantwortlich. Dadurch wird eine Komplexbildung gleichzeitig synthetisierter Env und CD4-Proteine verhindert und die Freisetzung von Env aus dem ER erleichtert.

- Nef (engl. Negative factor) spielt eine wichtige Rolle für die Pathogenese der Lentiviren. Auf das akzessorische Nef-Protein wird in einem gesonderten Kapitel eingegangen (Kapitel 1.5).

HIV-1 / SIVcpz



HIV-2 / SIVsmm / SIVmac



SIVagm

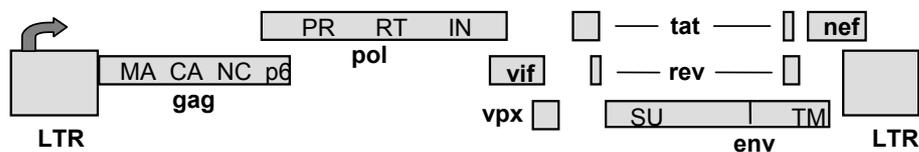


Abb. 4: Genomaufbau der Immundefizienzviren. Schematisch dargestellt ist die provirale Struktur der drei großen Gruppen der Primaten-Immundefizienzviren. Die offenen Leseraster in den drei Leserastern sind von langen Sequenzwiederholungen (LTR) flankiert (modifiziert nach Flint, Enquist et al., Principles of Virology).

1.2 Zelleintritt der Immundefizienzviren

Der Zelleintritt von HIV wird durch die Interaktion des trimerisierten viralen Glykoproteins gp120 mit bestimmten Wirtszellrezeptoren vermittelt. Kurz nach der Entdeckung von HIV wurde das CD4-Molekül als der primäre Rezeptor für das Virus nachgewiesen (Maddon, et al., 1986). CD4 ist ein Mitglied der Immunoglobulin-Superfamilie und besteht aus einer zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und vier extrazellulären Immunoglobulin-ähnlichen Domänen, an deren erste HIV bindet (Clayton, et al., 1988; Jameson, et al., 1988; Landau, et al., 1988). Die Interaktion von Env mit dem CD4-Molekül reicht allerdings für eine Infektion nicht aus. So waren Nagerzellen, welche stabil mit humanem CD4 transfiziert wurden, durch HIV nicht infizierbar (Page, et al., 1990). Daher mussten noch weitere Faktoren zum Eintritt des Virus in die Zielzelle beitragen. Im Jahr 1996 gelang schließlich die Identifizierung zweier sogenannter Korezeptoren, CXCR4 (Feng, et al., 1996) und CCR5 (Alkhatib, et al., 1996; Choe, et al., 1996; Deng, et al., 1996; Dragic, et al., 1996). Die Bindung des Virus an CD4 induziert Veränderungen in der Konformation im gp120, so dass eine Peptid-Schleife im gp120, der sogenannte V3-Loop, frei wird und an den Korezeptor bindet. Der V3-Loop ist damit die kritische Determinante für den Virus-Tropismus. Die Korezeptorbindung löst zusätzliche Konformationsänderungen im viralen Hüllprotein aus, die zur Exposition der gp41-Ektodomäne inklusive des N-terminalen Fusionspeptids führen. Es kommt zur Formierung einer 3-Strang-„coiled-coil“-Struktur des gp41, die dem hydrophoben Fusionspeptid ermöglicht, in die Zielzelle zu inserieren. Diese Struktur biegt sich zurück und formiert sich selbst zu einem Bündel aus sechs Helices, so dass sich das Fusionspeptid und die Transmembrandomäne am selben Ende befinden (Chan, et al., 1997; Weissenhorn, et al., 1997). Der Übergang von der „coiled-coil“-Struktur zum „6-Helix-Bündel“ führt zum engen Kontakt der viralen und zellulären Membran und induziert die Membranfusion (Melikyan, et al., 2000).

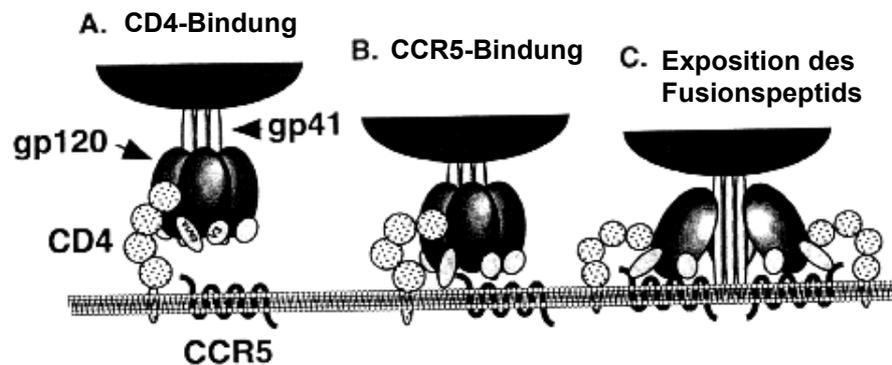


Abb. 5: Zelleintritt von HIV über CD4 und Korezeptor-abhängige Membranfusion. Das Schema zeigt Einen Ausschnitt der Virushülle mit dem trimerisierten Glykoprotein (gp41/gp120). Nach Bindung an den CD4-Rezeptor der Zielzelle (A) kommt es zur ersten Konformationsänderung. Nach Bindung des Korezeptors, hier CCR5 (B), erfolgt die zweite Konformationsänderung und damit die Exposition des Fusionspeptids (C) (modifiziert nach Coffin J, Hughes S, Varmus E, Retroviruses).

1.3 Infektion und Pathogenese der Immundefizienzviren

Eine HIV-Infektion ist durch drei Phasen gekennzeichnet:

- akute Phase der primären Infektion
- asymptomatische Phase
- symptomatische Phase (Ausbruch von AIDS)

Die akute Phase ist durch eine starke Virusvermehrung (bis zu 10^7 virale RNA-Kopien/ml Plasma) und eine Serokonversion in den ersten 10 Wochen gekennzeichnet (Clark, et al., 1991; Daar, et al., 1991). Vorübergehend kommt es zu einem Absinken der $CD4^+$ -Lymphozytenzahl, welche nach der primären Virämie wieder leicht ansteigt (Cooper, et al., 1985; Gaines, et al., 1990; Tindall und Cooper, 1991). Mit dem Auftreten der antiviralen Immunantwort sinkt die Virusbelastung im Plasma auf ein konstant niedriges Niveau von etwa $10^3 - 10^6$ Kopien/ml Plasma ab (Finzi und Siliciano, 1998). Dieses individuell unterschiedliche Niveau wird 6 – 12 Monate nach Infektion erreicht und kann als Marker für die Prognose der Dauer der asymptomatischen Phase und des Krankheitsverlaufs gelten (Mellors, et al., 1996). Die ungefähr 6 – 8 jährige Latenzzeit endet mit einem Abfall der $CD4^+$ -Zellzahl unter 200 Zellen/ μ l Blut und einem dramatischen Anstieg der Viruslast parallel zu einem Versagen der Immunantwort. Das AIDS-Vollstadium geht einher mit einer HIV-assoziierten Enteropathie, Lymphadenopathie, neurologischen Symptomen und opportunistischen Infektionen, die letztendlich zum Tode führen (1989; Cummins, et al., 1990; Kapembwa, et al., 1989; Miedema, et al., 1990; Pantaleo, et al., 1993; Zeitz, et al., 1998).

Während des AIDS-Vollstadiums werden täglich etwa 10^{10} infektiöse Viruspartikel freigesetzt und vom Immunsystem eliminiert. Mehr als 99 % der Viren werden von neu infizierten $CD4^+$ -T-Zellen produziert, deren Halbwertszeit ca. 1,6 Tage beträgt. Daraus resultiert eine Erhöhung des gesamten Zellumsatzes der $CD4^+$ -T-Zellen um den Faktor 25 (Ho, et al., 1995; Wei, et al., 1995). Das Gleichgewicht aus massiver Virusproduktion und Immunabwehr bricht beim Übergang in die symptomatische Phase zusammen. Das Auftreten von

hochvirulenten Virusvarianten, die sich in den lymphatischen Organen explosionsartig vermehren, führt im AIDS-Stadium zur Zerstörung der Lymphknotenarchitektur und damit zur Ausschwemmung der produzierten Viren in das periphere Blut (Finzi und Siliciano, 1998). Der Abfall der CD4⁺-T-Zellen kann nicht alleine durch die beschleunigte Zerstörung der reifen CD4⁺-T-Zellen und damit durch eine Ausschöpfung des Immunsystems erklärt werden (Ho, et al., 1995; Wei, et al., 1995), sondern eine beeinträchtigte Produktion der T-Zellen muss auch berücksichtigt werden. Zur Zerstörung reifer CD4⁺ T-Zellen führt neben der direkten zytolytischen Wirkung durch das Virus auch Apoptose oder Elimination infizierter und uninfizierter Zellen. Außerdem kommt es während der Infektion zu einer Verschiebung des Th1 zum Th2 Zytokinprofil (Shearer und Clerici, 1998). Trotz zahlreicher Erkenntnisse seit der Entdeckung des Erregers ist die HIV-Pathogenese noch nicht vollständig verstanden.

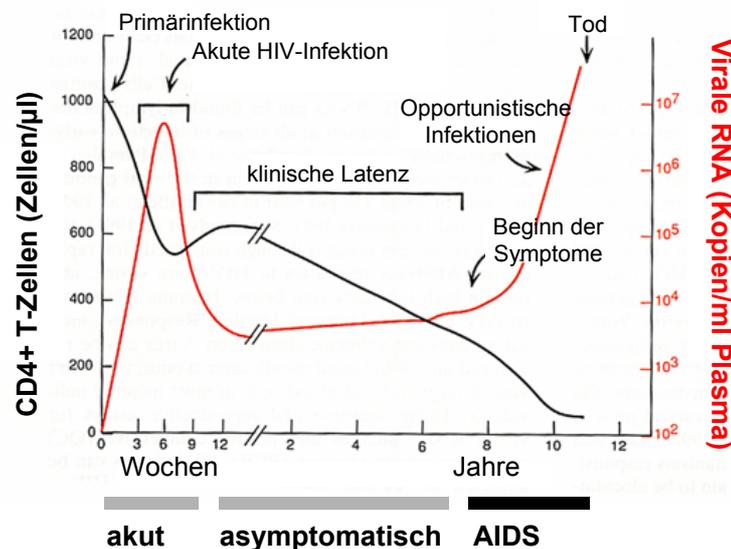


Abb. 6: Verlauf einer Infektion mit HIV/SIV. Der klinische Verlauf der CD4⁺-Zellzahl (schwarze Kurve) und der Viruslast (rote Kurve) im Verlauf einer Infektion mit einem Immundefizienzvirus sind hier schematisch dargestellt. Die Balken unter der Graphik geben die Stadien der Erkrankung von der akuten über die asymptomatische bis zur AIDS-Erkrankung an (modifiziert nach Pantaleo, Graziosi, Fauci, 1993 NEJM).

1.4 Die simianen Immundefizienzviren (SIV)

Bei Affen wurde kurz nach der Entdeckung von HIV auch ein simianes Immundefizienz-Syndrom (sAIDS) entdeckt (Letvin, et al., 1985). Die Isolierung des ersten simianen Immundefizienzvirus (SIV) gelang aus Rhesusaffen (*Macaca mulatta*, SIVmac), die in Gefangenschaft zusammen mit Halsbandmangaben (*Cercocebus atys*) gehalten wurden (Daniel, et al., 1985). Mittlerweile sind aus zahlreichen weiteren Affenarten SIVs isoliert worden. Die Lentiviren von Primaten lassen sich in fünf Gruppen einteilen: 1. HIV-1, SIVcpz (aus Schimpansen, *Pan troglodytes*); 2. SIVmnd (aus Mandrillen, *Papio sphinx*); 3. SIVagm (aus afrikanischen Grünen Meerkatzen, *Cercopithecus aethiops*); 4. SIVsyk (aus Syke's Affen, *Cercopithecus mitis*); 5. HIV-2, SIVmac (aus Rhesusaffen, *Macaca mulatta*), SIVsmm (aus Halsbandmangaben, *Cercocebus torquatus atys*) und SIVnem (aus Schweinsaffen, *Macaca Nemestrina*).

In ihren natürlichen Wirten lösen die SIVs keine Erkrankung hervor (Cichutek und Norley, 1993). In der Natur sind 30 bis 40 % der adulten Afrikanischen Grünen Meerkatzen (AGM) mit SIVagm infiziert (Kanki, et al., 1985), sie weisen keine Symptome des sAIDS auf und zeigen auch keinen Abfall der CD4+ Lymphozyten (Cichutek und Norley, 1993). Im Gegensatz dazu konnte man bei natürlicherweise nicht infizierten Affenarten (v.a. SIVs der Gruppe 5) sAIDS induzieren.

Für die Entstehung von HIV-1 wird eine SIVcpz-Transmission vom Schimpansen zum Menschen angenommen (Gao, et al., 1999; Hahn, et al., 2000). Das erste eindeutig HIV-positive Blutserum stammt aus dem Jahr 1959 aus Zentralafrika (Zhu, et al., 1998).

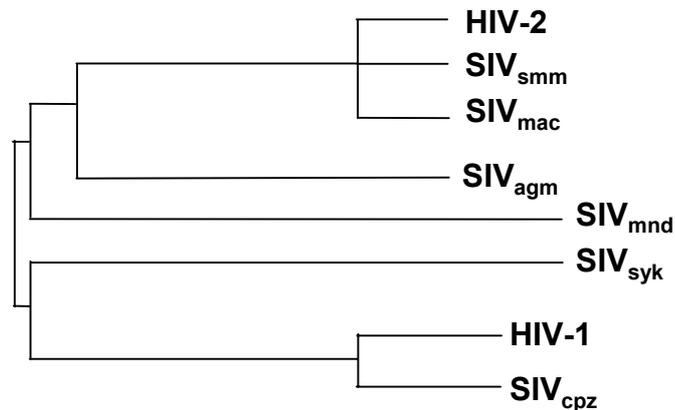


Abb. 7: Phylogenie der Lentiviren. Das Schema zeigt die fünf Gruppen der Primaten-Immundefizienzviren mit Unterteilungen (modifiziert nach Flint SJ, Enquist LW et al., Principles of Virology).

1.4.1 Das simiane Immundefizienzvirus SIV_{smm}PBj1.9

Neben *in vitro* Untersuchungen sind Tiermodelle von großer Bedeutung für das Verständnis einer HIV-Pathogenese. Dabei werden verschiedene SIV-Stämme für die Infektion nicht-humaner Primaten verwendet. Das simiane Immundefizienzvirus SIV_{smm}PBj14 ist ein Lentivirus mit einer extrem ausgeprägten akuten Phase des Infektionsverlaufs. SIV_{smm}PBj14 konnte nach einer experimentellen Übertragung von SIV_{smm}9 auf einen Schweinsaffen aus diesem isoliert werden (Fultz, et al., 1989). Im ursprünglichen Wirt, der Schopfmangabe, ist das parentale Isolat SIV_{smm}9 nicht pathogen, bei verschiedenen Makaken-Spezies führt es allerdings zu chronischen AIDS-ähnlichen Erkrankungen (Fultz, 1991; McClure, et al., 1989). Das Isolat SIV_{smm}PBj14 verursacht jedoch in Schweinsaffen und Cynomolgen (*Macaca fascicularis*) eine akute Erkrankung, begleitet von blutigen Durchfällen, Apathie, Anorexie, Austrocknung und Hautausschlag der infizierten Versuchstiere und kann bereits innerhalb von 8 – 14 Tagen zum Tode führen (Fultz, et al., 1989). In der Pathologie weisen diese Tiere starke Veränderungen im Darmbereich auf.

Nekrotische Läsionen ziehen sich über den gesamten Darmbereich und in histopathologischen Untersuchungen kann ein Verschmelzen und eine Verkürzung der Mikrovilli beobachtet werden (Fultz, et al., 1989). Weiterhin ist eine massive Infiltration von mononukleären Zellen in Mikrovilli, Lamina propria und in die Submukosa zu beobachten (Fultz, et al., 1989). Die Symptome der infizierten und schließlich sterbenden Tiere spiegeln ein Schock-ähnliches Syndrom wider, von dem angenommen wird, dass inflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle spielen. Tatsächlich wurden erhöhte IL-6- und TNF- α -Serumkonzentrationen bei infizierten Schweinsaffen festgestellt, was für eine Zell-aktivierende Eigenschaft der SIVsmmPBj-Viren spricht (Birx, et al., 1993; Schwiebert und Fultz, 1994). Ebenso weist eine erhöhte Expression der zellulären Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR auf den Blutlymphozyten infizierter Tiere auf eine Induktion einer Immunaktivierung durch SIVsmmPBj hin (Schwiebert und Fultz, 1994). Schweinsaffen, welche die akute Phase überleben entwickeln nach ein bis zwei Jahren sAIDS.

Von SIVsmmPBj14 wurden mehrere Moleklarklone isoliert, unter anderem SIV-PBj1.9. Dieser Moleklarklon induzierte ebenso wie SIVsmmPBj14 eine akute Pathogenese (Dewhurst, et al., 1990; Novembre, et al., 1993). Neben der Induktion akuter Pathogenese zeichnet sich SIVsmmPBj durch weitere spezifische Eigenschaften aus. Im Gegensatz zu anderen HIV- oder SIV-Isolaten ist SIVsmmPBj in der Lage, in nicht-stimulierten bzw. ruhenden peripheren mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) aus Affen zu replizieren (Fultz, et al., 1989; Fultz, 1991). Diese Replikation wird begleitet von einer Aktivierung der Lymphozyten und einer Induktion von Lymphozyten-Proliferation (Fultz, 1991; Schwiebert und Fultz, 1994).

Um die pathogenen Determinanten von SIVsmmPBj zu identifizieren wurden verschiedene Ansätze gewählt. Zunächst wurde das Genom von SIVsmmPBj mit dem Genom des apathogenen Parentalvirus SIVsmm9 verglichen. Dabei wurden 57 Punktmutationen gefunden (Dewhurst, et al., 1990). Davon waren 36 Mutationen, welche die Aminosäure-Sequenz veränderten. Außerdem wurden zwei Insertionen (22 bp in der LTR und 15 bp in *env*) identifiziert (Dewhurst, et al., 1990). Bei der Insertion in der LTR handelt es sich um eine Verdoppelung der Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Die Klonierung der LTR von SIVsmmPBj in apathogene SIV-Klone erzeugte

Virusklone, welche ebenfalls in der Lage waren in unstimulierten PBMC zu replizieren (Dittmar, et al., 1995). Jedoch zeigten diese erzeugten chimären Viren keine veränderte Pathogenese (Dewhurst, et al., 1990; Wagener, et al., 1998). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass chimäre Viren, die das PBJ-Genom unter der Kontrolle einer fremden LTR (SIVsmmH4) tragen, die gleiche Pathogenese wie das parentale SIVsmmPBJ zeigen, obwohl dort die Verdoppelung der NF- κ B-Bindungsstelle fehlt (Novembre, et al., 1993). Ein Einfluss dieser NF- κ B-Bindungsstellen auf die Pathogenese wird daher ausgeschlossen. Weitere Unterschiede zwischen SIVsmmPBJ und dem Parentalvirus SIVsmm9 wurden in *env* identifiziert. Novembre et al. zeigten auch, dass das PBJ-Env-Protein zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Pathogenese ist. Weitere virale Faktoren sind daher an der Induktion der Pathogenese beteiligt (Novembre, et al., 1993).

Eine gut untersuchte pathogene Determinante von SIVsmmPBJ ist das *nef*-Gen. Dieses Gen ist ebenso wie *env* für den akuten Krankheitsverlauf mitverantwortlich. *Nef*-deletierte Moleklarklone von SIVsmmPBJ sind weder in der Lage den akuten Krankheitsverlauf *in vivo* auszulösen, noch replizieren sie *in vitro* in unstimulierten PBMC (Novembre, et al., 1996). Im Nef-Protein liegt ein weiterer Unterschied zwischen SIVsmmPBJ und SIVsmm9, das ITAM (engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif) in SIVsmmPBJ. Dieses ITAM ist eines der kritischen pathogenen Determinanten von SIVsmmPBJ-Nef. Wurde das für das ITAM wichtige Tyrosin an Position 17 von Nef mutiert (Tyr \rightarrow Arg), replizierte der veränderte PBJ-Klon nicht mehr in unstimulierten PBMC und zeigte auch keine akute Pathogenese *in vivo* (Du, et al., 1996; Saucier, et al., 1998). Durch Arg \rightarrow Tyr Substitutionen im Nef-Protein wurde ein ITAM in den mäßig pathogenen SIVmac239, SIVagm9063 und SIVsmE543 erzeugt. Diese Virusmutanten waren daraufhin in der Lage, in unstimulierten PBMC zu replizieren und induzierten einige der Charakteristika des akuten Phänotyps von SIVsmmPBJ (Dehghani, et al., 2002; Du, et al., 1995). Allerdings waren die so erzeugten Viren nicht in der Lage eine akute Pathogenese von SIVsmmPBJ komplett zu simulieren, so dass man von einem multifaktoriellen Pathogeneseprozess ausgehen muss.

Ein genaues Zusammenspiel dieser verschiedenen viralen Determinanten und der Einfluss der einzelnen Faktoren, auch im Hinblick auf die betroffenen Wirtszellen, ist somit immer noch unklar und bedarf weiterer Aufklärung.

1.5 Das akzessorische Nef-Protein

Nef ist ein 27 – 34 kDa großes Protein und wird mit Tat und Rev als erstes während der viralen Replikation synthetisiert (Kim, et al., 1989; Peter, 1998). Allerdings liegt Nef in viel höheren Konzentrationen als die beiden anderen akzessorischen Proteine vor (Cullen, 1998). Das Nef-Protein ist zwischen HIVs und SIVs konserviert (Peter, 1998). Am N-Terminus ist Nef myristoyliert und wird dadurch an der Innenseite der Plasmamembran verankert (Peter, 1998). Interessanterweise wird Nef in Virionen verpackt und während der Partikelreifung durch die virale Protease gespalten (Kotov, et al., 1999; Pandori, et al., 1996).

Während Nef für die Replikation von HIV in den meisten Zelllinien nicht notwendig zu sein scheint, ist es für die Pathogenese *in vivo* äußerst wichtig. Studien an Affenmodellen, in denen eine Inaktivierung des *nef*-Gens im pathogenen SIVmac239 eine starke Reduktion des Virustiters bewirkte und den Ausbruch von AIDS verhinderte, zeigen eindeutig, dass ein funktionales *nef*-Gen für die AIDS-Pathogenese unerlässlich ist (Kestler, et al., 1991). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in HIV-Patienten gemacht, welche mit einer *nef*-Deletionsmutante von HIV-1 infiziert waren. Diese Patienten zeigten nur eine schwache HIV-Replikation, blieben asymptomatisch und entwickelten kein AIDS (Deacon, et al., 1995; Kirchhoff, et al., 1995; Mariani, et al., 1996). Ein weiterer Hinweis auf die wichtige Rolle, die Nef für die Pathogenese spielt, kommt von transgenen Mäusen, welche HIV-1-Nef exprimieren. Diese transgenen Mäuse entwickeln eine AIDS-ähnliche Erkrankung, welche mit der Nef-vermittelten Aktivierung von T-Zellen assoziiert ist (Hanna, et al., 1998).

Insgesamt werden dem akzessorischen Nef-Protein viele verschiedene Funktionen zugeschrieben, die sich in drei Klassen einteilen lassen:

- Veränderung des intrazellulären Transports von Oberflächenrezeptoren
- Erhöhung der Virion-Infektiosität und
- Nef-vermittelte Zellaktivierung.

1.5.1 Veränderung des intrazellulären Proteintransports durch Nef

In der ersten Hälfte der 1990er Jahre hat sich die Forschung an Nef vor allem auf die Veränderung des intrazellulären Proteintransports („Trafficking“) konzentriert. Dabei wurde zuerst die Verminderung der Oberflächenexpression von CD4 durch Nef beobachtet (Garcia und Miller, 1991). Dadurch wird die Ausbildung von Komplexen zwischen CD4 und neu gebildetem Env auf der Oberfläche von infizierten Zellen verhindert, was die Freilassung neuer Virionen vereinfacht (Benson, et al., 1993). Die Verminderung der CD4-Oberflächenexpression ist ein spezifischer Prozess, der durch die Steigerung der CD4-Endocytose und einer Erhöhung des lysosomalen CD4-Abbaus erreicht wird. Für die Endozytose ist eine Di-Leucin Region im zytoplasmatischen Teil von CD4 notwendig (Aiken, et al., 1994).

Auch die Verminderung von MHC-I (major histocompatibility complex) Rezeptor auf der Zelloberfläche wird durch Nef induziert (Schwartz, et al., 1996). In lymphoiden Zellen bewirkt Nef, dass MHC-I-Komplexe schnell endozytiert werden und in endosomalen Vesikeln akkumulieren, wo sie dann abgebaut werden (Schwartz, et al., 1996). Dieser MHC-I-Abbau ist von einem SH3-Domänen-Bindemotiv und einer Abfolge saurer Aminosäuren in Nef abhängig (Peter, 1998). Die zelluläre Aufgabe von MHC-I ist die Präsentation von Peptiden für zytotoxische T-Zellen, um diesen die spezifische Zerstörung von infizierten Zellen zu ermöglichen. Die Verminderung von MHC-I auf der Oberfläche scheint eine Strategie der infizierten Zelle sein, der antiviralen Immunantwort zu entgehen (Collins, et al., 1998).

Auch CD28 ist ein Rezeptor, dessen Oberflächenexpression durch Nef herunterreguliert wird (Swigut, et al., 2001). Interessanterweise scheint die Verminderung der Zelloberflächenexpression aller drei Proteine von der Zelloberfläche genetisch separierbar zu sein, was darauf hindeutet, dass diese drei Funktionen unabhängig von einander selektioniert wurden (Steffens und Hope, 2001).

1.5.2 Erhöhung der Virion-Infektiosität durch Nef

Die Virion-Infektiosität wird nicht nur durch die Verminderung von CD4 auf der Zelloberfläche erhöht, sondern auch durch einen zweiten, von CD4 unabhängigen Mechanismus (Spina, et al., 1994). Nef scheint seinen Einfluss auf die Infektiosität viraler Partikel in der partikelproduzierenden Zelle auszuüben, da HIV-1-Partikel infektiöser sind, wenn sie in der Anwesenheit von Nef produziert werden (Miller, et al., 1994). Eine Expression von Nef in den Zielzellen kann dies nicht kompensieren (Miller, et al., 1994). Virione, die in Abwesenheit von Nef produziert wurden, synthetisieren provirale DNA weniger effizient, obwohl Nef keinen Einfluss auf den Prozess der reversen Transkription selbst zu haben scheint (Schwartz, et al., 1996). Das Nef-Protein könnte also bei der Auflösung der Kapsid-Struktur in der Zielzelle, nach der Fusion, eine Rolle spielen.

1.5.3 Nef-vermittelte Zellaktivierung

Es gibt viele Studien, die einen Einfluss von Nef auf die Zellaktivierung belegen. Die Nef-vermittelte Zellaktivierung könnte durch eine Aktivierung der T-Zellrezeptor-Signaltransduktionskaskade erreicht werden. Durch eine Genexpressionsanalyse in induzierbaren T-Zelllinien wurde gezeigt, dass Nef und anti-CD3 vermittelte T-Zellaktivierung zu 97 % identisch sind (Simmons, et al., 2001). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass einige Proteine, die mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) assoziiert sind, wie z. B. Lck, Vav, Pak, PKC θ und die TCR- ζ Kette mit Nef interagieren (Renkema und Saksela, 2000).

Auch *in vivo* konnte eine Zellaktivierung durch Nef gezeigt werden. In transgenen Mäusen, welche HIV-Nef exprimieren, konnte eine erhöhte Aktivität der mitogen-activated protein kinases (MAPK) gezeigt werden (Hanna, et al., 1998). Für HIV-Nef konnte eine direkte Interaktion von Nef mit dem Mitglied der mitogenen Signalkaskade Raf nachgewiesen werden (Hodge, et al., 1998). Diese Interaktion erfolgte über die sogenannte Raf-Bindungs-Domäne (RBD) im C-terminalen Bereich von Nef. Die RBD ist durch ein Aspartat-Aspartat-X-X-X-Glutamin (X steht hierbei für eine beliebige Aminosäure) Motiv charakterisiert. Für eine Nef-Raf-Interaktion sind die zwei aufeinanderfolgenden Aspartate in der RBD unerlässlich. Werden diese beiden Aminosäuren zu Glycinresten mutiert, wird die

spezifische Virus-Wirtszell-Interaktion zerstört (Hodge, et al., 1998). Eine funktionelle Bedeutung der RBD wurde bisher nicht untersucht.

HIV-Nef scheint eine T-Zellaktivierung allerdings nur zu verstärken, aber nicht komplett zu initiieren (Schrager und Marsh, 1999; Schrager, et al., 2002), da eine Aktivierung von T-Zellen, z. B. durch anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper, für eine produktive Replikation von HIV *in vitro* notwendig ist. Das Nef-Protein könnte aber infizierte Zelle für eine Virusreplikation vorbereiten und die Schwelle für die Aktivierung der Zelle reduzieren. Diese Aktivitäten könnte Nef ohne nachweisbare Replikation ausüben, denn interessanterweise wird Nef nach einer Infektion von ruhenden Zellen mit HIV schon exprimiert, bevor das Provirus überhaupt in das Wirtsgenom integriert hat (Wu und Marsh, 2001).

Durch eine Interaktion von Nef mit TCR- ζ wird die erhöhte Oberflächenexpression des Fas-Liganden (FasL) induziert (Xu, et al., 1997; Xu, et al., 1999). Die Interaktion von FasL mit Fas auf der Oberfläche von CD8⁺-T-Zellen induziert Apoptose der FasL-tragenden und der reaktiven T-Zellen. Die Aktivierung der Rezeptor-vermittelte Apoptose in der infizierten Zelle wird aber wahrscheinlich durch eine Assoziation von Nef mit ASK1 (engl. „apoptosis signaling regulating kinase 1“) blockiert (Geleziunas, et al., 2001). Dies scheint ein Mechanismus infizierter Zellen zu sein, dem Immunsystem zu entgehen („immune evasion“).

1.6 Die mitogene Signalkaskade

Die Superfamilie der MAPK (engl. „mitogen-activated protein kinases“) spielt in eukaryotischen Zellen eine wichtige Rolle in der Übermittlung von extrazellulären Signalen. Die MAPK sind Serin/Threonin-Kinasen, welche im Zytoplasma als Antwort auf extrazelluläre Stimuli aktiviert werden, dann in den Zellkern wandern und dort verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren. Sie beeinflussen wichtige zelluläre Vorgänge wie Zellproliferation, Differenzierung, Zytokinsekretion, Stressreaktionen und Zelltod (Seger und Krebs, 1995).

In Säugetieren kennt man bislang drei verschiedene MAP-Kinasen: ERK (engl. „extracellular signal-regulated protein kinase“), SAPK/JNK (engl. „c-Jun NH2-terminal kinase“) und p38/RK (engl. „reactivating kinase“). Die beiden letztgenannten Kinasen spielen vor allem bei der zellulären Stressantwort eine Rolle, während ERK die klassische mitogen-aktivierte Proteinkinase darstellt

(Kyriakis, et al., 1994; Rouse, et al., 1994; Seger und Krebs, 1995). Allen MAPK-Signalwegen ist gemeinsam, dass es sich um eine hochkonservierte Kaskade aus drei Serin/Threonin-Kinasen handelt, die sich nacheinander durch zweifache Phosphorylierung an einem Tyrosin und einem Threoninrest aktivieren. Die MAP-Kinase als terminales Enzym wird von einer MAPK-Kinase (MAPKK) aktiviert, die ihrerseits durch eine MAPKK-Kinase (MAPKKK) zweifach phosphoryliert wird.

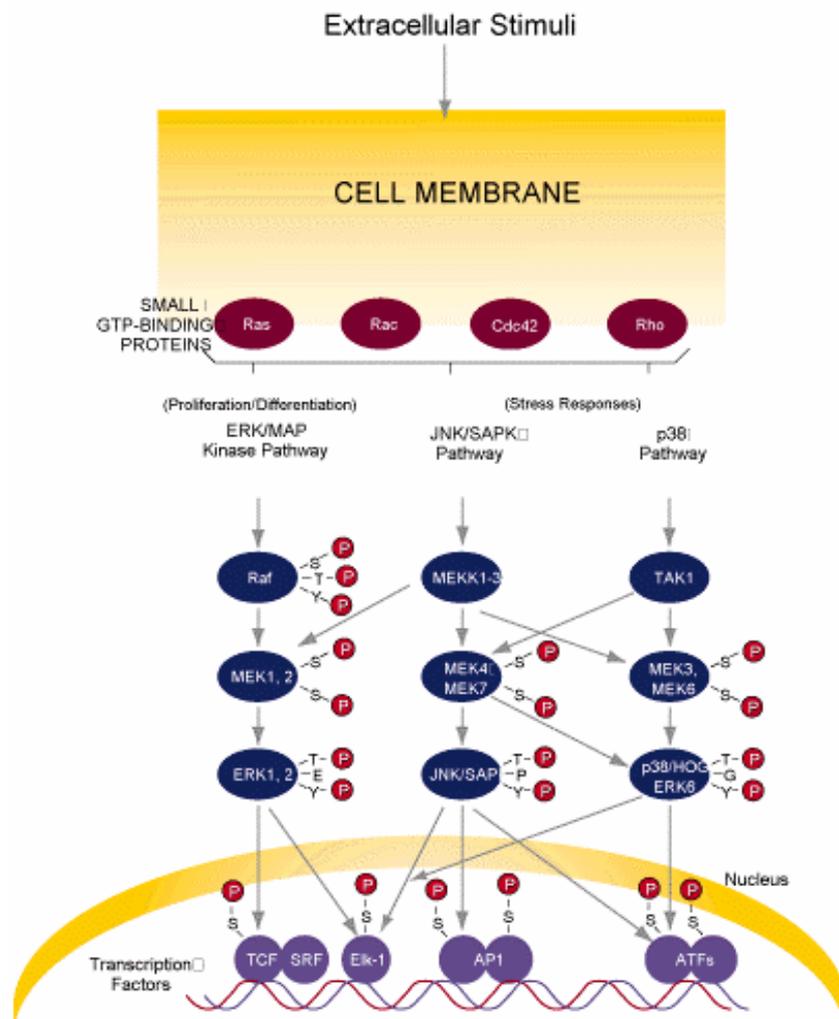


Abbildung 8: MAPK-Signalwege. Die drei MAPK-Signalwege sind schematisch dargestellt. Der klassische Raf/MEK/ERK-Signalweg ist auf der linken Seite aufgeführt.

1.6.1 Der Raf/MEK/ERK-Signalweg

Für die vorliegende Arbeit ist vor allem der Raf/MEK/ERK-Signalweg von Interesse. ERK wird durch extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder Phorbolster aktiviert (Daum, et al., 1994). Die Signalübermittlung wird eingeleitet, indem ein Wachstumsfaktor an den entsprechenden Zelloberflächenrezeptor bindet. Durch die Bindung wird die Dimerisierung des Rezeptors induziert und es erfolgt eine Autophosphorylierung an Tyrosinresten der zytoplasmatischen Rezeptordomäne. Für das Weiterleiten des Signals ist das Adapterprotein GRB2 notwendig. Das GRB2-Protein bindet mit seiner SH2-Domäne an den aktivierten Rezeptor und aktiviert mit seinen beiden SH3-Domänen Sos, ein Guanin-Nucleotid-Austausch-Protein (Chardin, et al., 1993) (Gale, et al., 1993). Sos induziert in dem membranverankerten Ras-Protein, einer monomeren GTPase, den Austausch von GDP (Guaninnukleotiddiphosphat) gegen GTP (Guaninnukleotidtriphosphat). Damit geht Ras in die aktive Form über und bindet an die N-terminale Domäne von Raf, einer Serin/Threonin-Kinase. Raf bindet und phosphoryliert nun MEK, das seinerseits ERK (engl. „extracellular regulated signal kinase“) phosphoryliert, wodurch es zu einer Aktivierung und Dimerisierung von ERK kommt (Adachi, et al., 1999). Die dimere Form von ERK ist nun in der Lage in den Zellkern einzuwandern und reguliert dort durch Phosphorylierung die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren. Eine Aktivierung von ERK kann zu verschiedenen zellulären Reaktionen wie der Ausschüttung von Zytokinen, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose bzw. Überleben der Zelle führen.

1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Der Einfluss der mitogenen Signalkaskade auf die Pathogenese einer HIV- oder SIV-Infektion ist bis heute weitgehend unbekannt, obwohl schon mehrere Studien eine Wechselwirkung zwischen HIV und der zellulären mitogenen Signalkaskade gezeigt haben. Unter anderem wurde eine direkte Interaktion von HIV-Nef mit der Raf-Kinase, einem wichtigen Mitglied der klassischen mitogenen Signalkaskade, beschrieben. In dieser Arbeit sollten daher die physiologischen Konsequenzen dieser Virus-Wirtszell-Interaktion analysiert werden. Für diese Untersuchungen

wurde das akut enteropathische SIVsmmPBj verwendet, da es im Gegensatz zu anderen Lentiviren in nicht-mitogen-stimulierten Zellen repliziert und Proliferation der unstimulierten Zellen induziert. Für eine Zellproliferation ist die Aktivierung mitogener Signale notwendig. Auch die Ursachen für die ausgeprägte akute Pathogenese von SIVsmmPBj sind nur unvollständig aufgeklärt. Daher sollte der Einfluss der mitogenen Signalkaskade auf die akute Pathogenese von SIVsmmPBj analysiert werden. Für diese Untersuchungen sollte ein replikationsfähiger Virusklon von SIVsmmPBj mit einer Mutation in der Raf-Bindungs-Domäne (RBD) im viralen Nef erzeugt werden, um so die Interaktion von Nef mit Raf zu zerstören. Um die Funktion dieser bisher funktionell nicht genauer charakterisierten Domäne genauer aufzuklären, sollten zunächst *in vitro* Experimente durchgeführt werden. Schließlich sollten Schweinsaffen mit dem Wildtypvirus oder dem neu konstruierten Virusklon infiziert werden, um die *in vivo* Eigenschaften beider Viren zu vergleichen und so die pathophysiologischen Konsequenzen der RBD zu analysieren.

2. Material und Methoden

2.1 Lösungen und Kulturmedien:

TE, pH 7,5/pH 8,0

Tris/HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH mit HCl einstellen	

TAE, pH 7,5

Tris-Acetat	40 mM
EDTA	1 mM

Luria-Bertani Medium (LB)

Bacto-Trypton	1,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	1,0% (w/v)

SOC Medium

Trypton	2,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glukose	20 mM

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)

DMEM Fertigmedium	400 ml	PEI
Hepes	10 mM	PEI
(N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)		
L-Glutamin	2mM	PEI
Streptomycin	100 µg/ml	PEI
Penicillin	100 U/ml	PEI
FKS	10% (v/v)	Biochrom KG, Berlin
(Fötale Kälberserum, 1h bei 56°C hitzeinaktiviert und sterilfiltriert)		

RPMI 1640

RPMI-1640 Fertigmedium	400 ml	PEI
Hepes	10 mM	PEI
(N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)		
L-Glutamin	2mM	PEI
Streptomycin	100 µg/ml	PEI
Penicillin	100 U/ml	PEI
FKS	10% (v/v)	Biochrom KG, Berlin
(Fötale Kälberserum, 1h bei 56°C hitzeinaktiviert und sterilfiltriert)		

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) pH 7,0

NaCl	100 mM	Merck, Darmstadt
KCl	2,7 mM	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	80 mM	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	20 mM	Merck, Darmstadt

Färbelösung zur Zellzahlbestimmung

Trypanblau in ddH ₂ O	0,1%	Sigma, Taufkirchen
----------------------------------	------	--------------------

2.1.1 Sonstige Materialien:

Nitrocellulose-Membran, Hybond™-C extra, Amersham, Braunschweig
 Filterpapier Whatman 3MM, Whatman, Maidstone (GB)
 Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Freiburg
 Agarose: SeaKem LE Agarose, Cambrex Bio Science, Rockland Inc., USA
 Protein A/Protein G Sepharose Beads, Pharmacia, Freiburg

2.1.2 Geräte:

Zentrifuge Modell Eppendorf Centrifuge 5415C und Heraeus Biofuge fresco
 Heizblock Modell Eppendorf Thermomixer 5436 comfort
 Power supply BioRad Power Pack 20
 Biometra Standard Power Pack P25
 Elektrophoresekammer SDS-PAGE NuPAGE-System, Invitrogen, Karlsruhe
 Western Blot Kammer, BioRad
 Kippschüttler Assistent 348/1
 Agarosegel-Kammer Modell Horizon 11-14, Life Technologies
 Multiscan RC ELISA-Reader, Software Ascent, Thermo LabSystems
 Gene Quant pro RNA/DNA Calculator, Pharmacia, Freiburg
 FACSScan Durchflusszytometer, BD, Heidelberg

2.1.3 Oligonukleotide:

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen:

PBj-U3(+)	5'-CTCGGCAGATCTCTGGAAGGGATTTATTACAG-3'
PBj-U3/R/TAR(-)	5'-GCTCGGAAGCTTGTCTTTAAGCAAGCAAGCGTG-3'
sense-nef Δ RBD	5'-ACAACTTCTCAGTGGGGTGGCCCCTGGGGAGAGG TACTGGC-3'
antisense-nef Δ RBD	5'-CCAGTACCTCTCCCCAGGGGCCACCCCACTGAGAAG TTTGT-3'
PBj-8841-for	5'-CATCAGAGTTCAGATAGCCT-3'
PBj-9631-rev	5'-CTTGTTTTCTTCTTGTCAGCC-3'

2.1.4 Plasmide:

Name	Bemerkung
SIV-PBj1.9	Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Patricia Fultz zur Verfügung gestellt.
pZeoSV2+	Dieses Plasmid wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) erworben.
pZeo-nef-PBj	Dieses Plasmid wurde von Michael Mühlebach am Paul-Ehrlich-Institut kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
pZeo-nef-PBj- Δ RBD	Dieses Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
SIV-PBj1.9- Δ RBD	Dieses Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
PGL3-Basic	Dieses Plasmid wurde von der Firma Promega (Mannheim) erworben.
PBj-wt-LTR	Dieses Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
PBj- Δ RBD-LTR	Dieses Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
pCR2.1-TOPO	Dieses Plasmid wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) erworben.

2.1.5 Verwendete Antikörper:

	Klon	Anwendung	eingesetzte Konzentration	Bezugsquelle
ISOTYPKONTROLLEN				
ITK IgG1-PerCP		FACS	5 µl	BD/Pharmingen
ITK IgG3-FITC		FACS	5 µl	BD/Pharmingen
ITK IgG2a-FITC		FACS	5 µl	BD/Pharmingen
ITK IgG3-PE		FACS	5 µl	BD/Pharmingen
ITK IgG1-FITC	X40	FACS	5 µl	BD/Pharmingen
ITK IgG2a-PE		FACS	5 µl	BD/Pharmingen
FLUORESZENZ-MARKIERTE ANTIKÖRPER				
anti-CD3-FITC	SP34	FACS	5 µl	BD/Pharmingen
anti-CD3-PE	SP34	FACS	5 µl	BD/Pharmingen
anti-CD4-PE	MT477	FACS	5 µl	BD/Pharmingen
anti-CD8-PerCP	SK1	FACS	5 µl	BD/Pharmingen
anti-CD25-FITC	2A3	FACS	5 µl	BD/Pharmingen
anti-CD69-FITC	L87	FACS	5 µl	BD/Pharmingen
anti-CD69-PerCP	L87	FACS	5 µl	BD/Pharmingen
WESTERN-BLOT/IMMUNPRÄZIPITATION/IMMUNPEROXIDASE-ASSAY ANTIKÖRPER				
α-human IgG	A8775	IPA		Sigma
Anti-HIV2-Nef		WB	1:500	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von E. Kremmer
anti-Erk2 (C-14)	polyklonal	IP, WB	1:2000	Santa Cruz
SEKUNDÄRANTI-KÖRPER				
anti-MausIgG-HRP		WB	1:5000	Amersham
anti-KaninchenIgG-HRP		WB	1:5000	Amersham
Protein A HRP		WB	1:3000	Amersham

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Lagerung von eukaryotischen Zelllinien

2.2.1.1 Suspensionszellen

C8166 Zellen: HTLV-transformierte humane T-Zelllinie. Diese Zelllinie ist besonders empfänglich für eine HIV- und SIV-Infektion und wurde für die Anzucht von Virusstocks verwendet.

A3.01 Zellen: humane Leukämie T-Zelllinie (CD4⁺, CXCR4⁺), bezogen von National Institute for Biological Standards and Control (NISBC), Hertford, Großbritannien (Folks, et al., 1985).

Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 Medium, versetzt mit 10 % Komplement-inaktiviertem (1h, 56°C) fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom KG, Berlin), 1 g/l Glucose, 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin) und Antibiotika (100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, Biochrom KG, Berlin) in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus, Hanau) bei 37°C, gesättigter Wasserdampf-atmosphäre und 5 % CO₂ kultiviert und zweimal pro Woche 1:10 mit frischem Medium versetzt.

2.2.1.2 Adhärenente Zellen

293T: humane embryonale Nierenzelllinie (293), transformiert durch großes T-Antigen von SV40 (DuBridge, et al., 1987).

Adhärenente Zellen wurden mittels 5 mM EDTA in PBS vom Kulturgefäßboden gelöst und anschließend resuspendiert.

2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Die Lagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Einfrieren wurden Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, Raumtemperatur, Varifuge K, Heraeus, Osterode), ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen in 800 μ l eiskaltem Medium (20 % FKS) resuspendiert und in ein 2 ml Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) auf Eis überführt. Tropfenweise wurden 800 μ l gekühltes DMEM bzw. RPMI mit 20 % FKS und 20 % DMSO (Merck, Darmstadt) zugefügt und die Zellen sofort bei -80°C eingefroren. 24 Stunden später konnten die Kryoröhrchen zur permanenten Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen in Stickstoff gelagerter Zellen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C zügig erwärmt. Zur Entfernung des zytotoxischen DMSO wurden die Zellen sofort in 10 ml erwärmtes Medium überführt und bei 1200 rpm 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Am nächsten Tag wurde erneut ein Mediumwechsel durchgeführt. Eventuell notwendige Selektionsmarker wurden dem Medium einen Tag nach dem Auftauen zugesetzt.

2.2.3 Präparation peripherer mononukleärer Blutzellen und Gewinnung von Plasma aus Blut

Zur Abtrennung des Plasmas von den peripheren mononukleärer Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurden zunächst Citratröhrchen (Sarstedt; Nümbrecht) zentrifugiert (1200 rpm, 25°C , 10 min, Minifuge T, Heraeus, Hanau). Danach wurde die obere Plasma-Phase in ein frisches 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (2200 rpm, 10 min, 25°C , Minifuge T, Heraeus, Hanau), um verbliebene Zellen abzutrennen. Die obere Plasma-Phase wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die im Citratröhrchen verbliebenen Zellen wurden vorsichtig auf 20 ml vorgewärmtes Ficoll Histopaque (Sigma, Taufkirchen) in einem 50 ml Röhrchen überschichtet und anschließend für 30 min eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (2200 rpm, 25°C , ohne Bremse, Minifuge T, Heraeus, Hanau). Bei dieser Trennmethode sedimentieren rote Blutkörperchen und Granulozyten auf den Boden des Röhrchens. Über der Ficoll-Lösung sammeln sich Lymphozyten,

Monozyten und Makrophagen (im „Lymphozytenring“). Der Lymphozytenring wurde abgenommen, in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt und zweimal mit 50 ml vorgewärmten PBS gewaschen. Danach erfolgte die Lyse restlicher Erythrozyten durch eine 10 – 20 minütige Inkubation der Zellen in PBS mit 0,86 % NH_4Cl bei 37°C . Zwei weitere Waschschrte mit je 50 ml PBS entfernten das NH_4Cl . Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen anschließend in einer Dichte von ca. $1 \times 10^6/\text{ml}$ in RPMI 1640 Medium mit 20 % fötalem Kälberserum aufgenommen.

2.2.4 Kultivierung von PBMC

Unstimulierte PBMC wurden in RPMI 1640 Medium, versetzt mit 10 – 20 % Komplement-inaktiviertem (1h, 56°C) fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom KG, Berlin), 1 g/l Glucose, 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin) und Antibiotika (100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, Biochrom KG, Berlin) in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus, Hanau) bei 37°C , gesättigter Wasserdampfatmosfera und 5 % CO_2 kultiviert und zweimal pro Woche 1:10 mit frischem Medium versetzt. Bei stimulierten Zellen wurde bei jeder Zugabe von frischem Medium 50 U/ml IL-2 zugesetzt.

2.2.5 Stimulation von PBMC

Nach der Isolation wurden Zellen zur Stimulation mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA (Genzyme, Rüsselsheim) behandelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und mit 15 U/ml rekombinantem humanem Interleukin-2 (Chiron, Trondheim, Norwegen) versetzt.

2.2.6 Infektion von Zellen

Zur Infektion wurden Zellen (PBMC, C8166) in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, Raumtemperatur; Minifuge T, Heraeus, Hanau) und mit Virusüberstände in definiertem Volumen resuspendiert. Dann folgte eine zweistündige Infektion im Brutschrank bei 37°C . Anschließend wurden die Röhrchen mit Medium aufgefüllt und die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm,

Raumtemperatur, 5 min). Die Zellen wurden weitere viermal mit Medium gewaschen und danach in Medium resuspendiert.

2.2.7 Gewinnung von Serum

Das Serum wurde nach Blutgerinnung durch Zentrifugation bei 2400 rpm für 10 min (Minifuge T, Heraeus, Hanau) aus 5 ml nicht-heparinisiertem Vollblut gewonnen. Zur Virusinaktivierung wurde das Serum infizierter Affen für 30 min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert.

2.2.8 Transfektion eukaryotischer adhärenter Zellen (Lipofectamin-Methode)

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Zur transienten oder stabilen Transfektion wurde DNA mit Lipidvesikeln komplexiert, welche anschließend mit den Membranhüllen der zu transfizierenden Zellen verschmelzen. Dafür wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) in Kombination mit dem vorkomplexierenden PLUS-Reagenz nach Angaben des Herstellers verwendet (Gibco/Life Technologies, Eggenstein). 24 h vor der Transfektion wurden die Zellen (293T Zellen) in einer Dichte von 7×10^5 pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion zu 60 – 90 % konfluent vorlagen. Pro Transfektionsansatz wurden bis zu 3 µg DNA in 100 µl OPTIMEM mit 6 µl PLUS Reagenz gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurden je Ansatz 5 µl Lipofectamin mit 100 µl OPTIMEM inkubiert. Nach den 15 min wurden beide Ansätze miteinander vermischt und es folgte eine weitere Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. In dieser Zeit wurde bei den zu transfizierenden Zellen das Kulturmedium abgenommen und durch 800 µl OPTIMEM ersetzt. Das DNA-Liposomengemisch wurde dann zu den Zellen gegeben und für 4 Stunden in einem Kulturschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte ein Medienwechsel mit 4 ml frischem DMEM Medium. Nach 48 h wurden die Überstände geerntet bzw. die Zellen analysiert.

2.2.9 Transfektion eukaryotischer Suspensionszellen (DMRIE-C-Methode)

Die transiente Transfektion nach der DMRIE-C-Methode beruht auf der Interaktion der DNA mit den Lipiden. DMRIE-C (Life Technologies, Gibco, Karlsruhe) enthält das Lipid DMRIE (1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy-ethyl-ammonium-bromid) und Cholesterol im Verhältnis 1:1.

Zur Transfektion von A3.01- oder C8166-Zellen wurden diese am Vortag in neues Medium überführt. Je Ansatz wurden 0,5 ml OPTIMEM (Gibco) mit 3,5 µl DMRIE-C vermischt und in eine 6-Loch-Platte vorgelegt. Durch Schwenken der Platte wurde die Flüssigkeit gleichmäßig in der Lochplatte verteilt. Dann wurden pro Ansatz die gewünschte Plasmid-DNA (etwa 0,5 µg-3 µg) in weiteren 0,5 ml OPTIMEM zugegeben, durch vorsichtiges Schwenken der Platte verteilt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die DNA-Lipid-Komplexe bilden konnten. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 5×10^5 Zellen in 0,5 ml OPTIMEM hinzugefügt. Die Transfektionsansätze inkubierten 4 – 5 h bei 37°C im Brutschrank, danach wurden je 1,5 ml normales Wachstumsmedium zugegeben. Zur Durchführung von Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurden die Zellen 48 h nach Transfektion lysiert.

2.2.10 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Das Auszählen von Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer mit definiertem Kammervolumen. Zur Bestimmung von Zellzahl und Vitalität wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:5 oder 1:10 mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Dieser Farbstoff dringt aufgrund der beschädigten Zellmembran nur in tote Zellen ein und färbt diese an. Die Zellzahl ergibt sich aus der Multiplikation von gezählten Zellen, Kammerfaktor (10^4) und Verdünnungsfaktor.

2.2.11 Proliferationsassay mit [³H]-Thymidin

Die Proliferation von Zellen kann durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA bei der Replikation von DNA-Doppelsträngen quantifiziert werden. Dafür wurde ein [³H]-Thymidin-Proliferationsassay verwendet. Die Anzahl der sich teilenden Zellen korreliert direkt mit der Radioaktivität. Es wurden daher

3×10^5 infizierte oder uninfizierte PBMC mit 1 μCi von [^3H]-Thymidin (Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien) für 18 h inkubiert. Die Thymidin-Inkorporation wurde dann in einem „Betaplate Scintillation Counter“ bestimmt (Perkin-Elmer, Turku, Finnland).

2.2.12 Aufreinigung von Viruspartikeln mit Optiprep

Für eine saubere Abtrennung viraler Partikel von zellulären Mikrovesikeln wurden Virusüberstände mit der „Optiprep-Methode“ aufgereinigt. Dafür wurde für eine Dichtegradientenzentrifugation 8 Fraktionen von „Optiprep Density Gradient Medium“ (Sigma, Seelze) in PBS vorsichtig in Ultrazentrifugationsröhrchen übereinander geschichtet, mit einer Konzentration von unten 18 % bis oben 8,4 % in 1,2 %-Schritten. Dann wurden 3 ml der Virus-enthaltenen Überständen auf den Gradienten aufgetragen, und für 90 min bei 35.000 rpm bei 4°C zentrifugiert (XL-90 Ultracentrifuge, Beckmann Coulter, Krefeld). Die oberen 6 ml, welche vor allem zelluläre Mikrovesikel enthalten wurden vorsichtig abgenommen und verworfen, die unteren 5 ml wurden mit PBS verdünnt und erneut zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen und das Viruspellet in PBS resuspendiert.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

2.3.1.1 Flüssigkultur:

Verwendete Bakterienstämme wurden in LB-Medium unter Zusatz des zur Selektion bestimmten Antibiotikums in den angegebenen Konzentrationen bei 37°C unter Schütteln kultiviert, bis eine OD_{600} von 0,5 – 0,6 erreicht wurde. Wenn Bakterien große Plasmide trugen (> 10 kb) oder Plasmide, die eine hohe Rekombinationswahrscheinlichkeit aufwiesen (wie z. B. Virusplasmide mit zwei LTR-Regionen), wurden die Bakterien bei 25°C inkubiert.

2.3.1.2 Nährböden:

Die Kultivierung von Bakterien auf Nährböden erfolgte durch Ausstreichen von 100 µl Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten (1,5 % (w/v) Agar-Agar), die ebenfalls mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum versetzt wurden. Die Platten wurden bei 25°C oder 37°C kultiviert, bis sich deutlich Kolonien zeigten. Bis zur weiteren Verwendung konnten diese Platten für einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

2.3.1.3 Lagerung:

Die Lagerung von Bakterien erfolgte bei -80°C in einer Bakterien-Suspension mit 15 % Glycerin. Für eine erneute Kultivierung wurde mit einer Impföse etwas von der gefrorenen Bakterien-Suspension in Flüssigkulturmedium überführt.

2.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Um eine effiziente Transformation von Bakterien zu ermöglichen, wurden *E. coli* Stämme mit einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode „kompetent“ für die Aufnahme von Fremd-DNA gemacht (Hanahan, 1983). Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit 2,5 ml einer 5 ml Übernachtskultur (37°C) angeimpft und bei 37°C im Bakterenschüttler inkubiert, bis eine Bakteriendichte von $OD_{550} = 0,5$ erreicht war. Danach wurden die Bakterien für 5 min auf Eis gestellt, anschließend auf zwei 50 ml Röhrchen (BD Falcon, Heidelberg) aufgeteilt und bei 4°C in einer Heraeus-Varifuge RF abzentrifugiert (6000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in je 20 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (6000 rpm, 10 min, 4°C), in 2 ml TFB2-Puffer resuspendiert, nach weiteren 15 min Inkubation auf Eis zu 100 µl aliquotiert, schockgefroren und bei -70°C gelagert.

TFB1-Puffer (pH5,8):	30 mM KAc 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂ /2 H ₂ O 50 mM Mn ₂ Cl ₂ /4 H ₂ O 15 % Glycerol (BTL) pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt sterilfiltriert
TFB2-Puffer (pH6,5):	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl ₂ 15 % Glycerol pH 6,5 mit KOH eingestellt sterilfiltriert

2.3.3 Transformation von Bakterien

Das Einbringen von Fremd-DNA in Bakterien wird Transformation genannt. Zur Transformation wurden je 100 µl kompetenter Bakterien (in der Regel *E. coli* TopF 10 und DH5α) auf Eis aufgetaut und mit 50 ng bis 1 µg Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 sec bei 42°C und einer weiteren zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden die Transformationsansätze mit 500 µl SOC Medium (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) versetzt und 60 bzw. 120 min bei 37°C bzw. bei 25°C geschüttelt. Danach wurden Zellen abzentrifugiert (13.000 rpm, 1 min) Überstand dekantiert und das Pellet im Restmedium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Die Platte wurde dann bei 25°C bzw. bei 37°C inkubiert, bis sich Bakterienkolonien deutlich zeigen.

Große Plasmide (> 10 kb) wurden vor allem in *E. coli* TopF 10, kleinere Plasmide in *E. coli* DH5α und Plasmide, die durch Bakterien nicht methyliert werden sollten, in *E. coli* GM2163 transformiert und amplifiziert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmiden auf Bakterien erfolgte mittels der Plasmid-Aufreinigungs-Kits der Firma Qiagen (Hilden). Für die Gewinnung kleinerer Mengen DNA aus 5 ml Übernachtskulturen wurde das „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ verwendet. Die Präparation größerer Mengen DNA erfolgte aus 250 ml Übernachtskulturen mittels des „Maxi-Prep Kits“. Die Präparation erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

2.4.2 Restriktion von DNA

Alle Restriktionen wurden mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) durchgeführt. Um eine Eigen-Ligation des linearisierten Klonierungsvektors zu vermeiden, wurden die Enden mittels alkalischer Phosphatase („calf intestinal alkaline phosphatase“, CIP, NEB, Schwalbach) dephosphoryliert. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.4.3 Auftrennung und Analyse von DNA über Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese in 1 x TAE-Puffer. Für Fragmente im Größenbereich von 0,1 – 2 kb wurden 2%ige, im Bereich 0,5 kb – 7 kb 1%ige und für Fragmente größer als 7 kb 0,7%ige Agarose-Gele verwendet. Der flüssigen Agarose (Gibco/Life Technologies, Eggenstein) wurde vor dem Erstarren Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 10 % DNA-Probenpuffer versetzt. Die aufgetrennten Banden konnten auf einem UV-Transilluminator (302 nm) dokumentiert werden. Als DNA-Größenstandard wurde *HindIII* restringierte Lambda-DNA (NEB, Schwalbach) oder *HaeIII* restringierte Φ X-174-RF DNA (NEB, Schwalbach) verwendet. Als Restriktionskontrolle wurde jeweils unverdautes Plasmid (1 µg DNA) aufgetragen.

DNA-Probenpuffer:	15 % Glycerin
	0,1 % Xylenblau (XL)
	0,075 % Bromphenolblau (BPB)
	10 mM EDTA

2.4.4 Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung der DNA nach enzymatischen Reaktionen wurde das Jetsorb Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) verwendet. Dabei wurde den Anweisungen des Herstellers gefolgt. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl H₂O, die Konzentration der DNA-Lösung wurde mit dem Luminometer bestimmt.

2.4.5 Ligation

Bei einer Ligation wird durch eine enzymatische Reaktion unter Verbrauch von ATP eine Phosphodiesterbindung zwischen den zu ligierenden DNA-Fragmenten geknüpft, wodurch eine kovalente Bindung hergestellt wird. Alle DNA-Ligationen wurden mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Die Ligation von restringierten DNA-Fragmenten erfolgte mit 2,5 Einheiten/Ansatz der T4-DNA-Ligase von Gibco/Life Technologies, Eggenstein und dem zugehörigen Ligationspuffer in einem Gesamtvolumen von 10 – 20 µl für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug in der Regel 1:3. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde zur Transformation von 100 µl kompetenter Bakterien eingesetzt.

2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, spezifische Nukleotidsequenzen ausgehend von genomischer DNA oder Plasmid-DNA zu amplifizieren (Mullis, et al., 1986; Mullis und Faloona, 1987; Saiki, et al., 1985). Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase ist unter geeigneten Puffer- und Zyklusbedingungen die Synthese eines durch zwei Primer (synthetische Starter-Oligonukleotide) eingegrenzten DNA-Fragmentes möglich. Verwendet wurde die *Taq*-Polymerase

(Perkin Elmer, Vaterstetten) aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus*, die ihr Temperaturoptimum bei 72°C hat.

Ein Standard-PCR-Ansatz (50 µl) enthielt: 1 x PCR-Puffer (10 mM Tris/HCL, pH 8,8; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,01 % Gelatine), 200 µM je Desoxynukleotid, 20 pmol (+)-Primer, 20 pmol (-)-Primer, 2,5 Einheiten *Taq*-Polymerase und 100 ng Plasmid-DNA mit der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz oder 2 µg genomische DNA.

Bei den Zyklusbedingungen richteten sich die Annealingtemperatur und die Synthesedauer nach den verwendeten Primern und der Länge des zu amplifizierenden Nukleotidfragments. Vor Beginn des 1. Zyklus wurde der gesamte Ansatz zuerst für 3 min auf 96°C gebracht, um eine vollständige Denaturierung zu erreichen. Jeder Zyklus beginnt mit einem 15 sec Denaturierungsschritt bei 96°C, in dem die DNA-Duplexe des vorangegangenen Zyklus aufgeschmolzen werden. Anschließend folgten 30 sec Anlagerung der Primer an die zu amplifizierende Sequenz. Die Temperatur dieses Schrittes richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer (nach Angabe der Hersteller). Schließlich folgte der Amplifikationsschritt bei 72°C für 1 min pro kb zu amplifizierender Sequenz. Nach Ende des letzten Zyklus erfolgte eine Inkubation über 7 min bei 72°C, um eine Vervollständigung der Polymerisation aller begonnenen Fragmente zu gewährleisten. Am Ende wurde der gesamte Ansatz auf 4°C gekühlt.

2.4.7 Gerichtete Punktmutagenese

Um gezielte Punktmutationen in DNA-Sequenzen einzuführen wurde das „QuickChange site-directed mutagenesis Kit“ (Stratagene, La Jolla, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die zu mutierende Sequenz musste auf einem höchstens 7 kb großen, methylierten Plasmid vorliegen. Die gewünschte Mutation wurde über höchstens 45 bp große Primer eingeführt, die die Mutation enthielten und up- und down-stream der Mutation(en) 10 – 15 bp komplementär zum Ausgangsplasmid waren. Die Primer lagen in einem Mutationsansatz sowohl in sense- als auch in anti-sense Richtung vor. Über 10 – 18 PCR-Zyklen wurden die einzelnen Plasmidstränge, ausgehend von den mutagenen Primern, vollständig komplementiert. Anschließend wurde die nicht mutierte, methylierte

Ausgangs-DNA mit Hilfe des Restriktionsenzym *DpnI*, das nur methylierte Sequenzen erkennt, abgebaut. Die neu synthetisierten, mutierten DNA-Stränge wurden in *E.coli* XL1-Blue transformiert, in den Bakterien religiert und amplifiziert. Alle Mutationen wurden durch Sequenzierung überprüft. Für die in die RBD eingefügten Punktmutationen wurden die Primer sense-*nef*ΔRBD“ und „antisense-*nef*ΔRBD“ verwendet.

2.4.8 Luciferase Reporter Assay

Zellsuspensionen wurden aus 6-Loch-Platten in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1200 rpm bei Raumtemperatur 5 min zentrifugiert (Varifuge K, Heraeus, Osterode). Die Zellpellets wurden in je 2 ml PBS gewaschen und abzentrifugiert, die Zellpellets wurden in je 100 µl Lysispuffer (Passive Lysis Buffer aus Luciferase Assay System, Promega) resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zelllysate bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 rpm, 5 min, 4°C, Biofuge, Heraeus, Osterode) abzentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Für den Reporter Assay wurde das Luciferase Assay Reagent (LAR) aus dem Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega (Mannheim) verwendet. LAR enthält Luciferin, das Substrat der Firefly-Luciferase. In Anwesenheit von ATP, Mg²⁺ und O₂ katalysiert das Enzym die Oxidation des Luciferins über das Luciferyl-AMP zu Oxyluciferin. Bei dieser Reaktion wird Fluoreszenzlicht emittiert.

Zur Messung der relativen Luciferase-Aktivität wurden je nach Größe der Ansätze 20 µl oder 40 µl der Zelllysate in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Im Luminometer (Microplate Luminometer LB 96 V, EG&G Berthold) wurden je Loch 50 µl LAR zugegeben und nach 2 sec beginnend die Lumineszenz 10 sec lang gemessen. Die gemessene relative Luciferase-Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration der Zelllysate standardisiert.

2.4.9 Isolierung viraler RNA aus Plasma

Aus 1 ml Plasma wurde das Virus mit einer Biofuge fresco (Heraeus, Hanau) abzentrifugiert (90 min, 13.000 rpm, 4°C) und das Pellet bis zur Isolierung der RNA bei -80°C gelagert. Die Präparation von viraler RNA wurde mittels des

„QIAamp Viral RNA Mini Kit“ der Firma QIAGEN (Hilden) durchgeführt. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.4.10 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Die Präparation von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wurde mittels des „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ der Firma QIAGEN (Hilden) durchgeführt. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es wurden 1×10^6 Zellen pro Ansatz eingesetzt. Die Ausbeute lag bei 20 – 30 µg genomischer DNA pro Ansatz.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Immun-Peroxidase-Assay (IPA)

Mit Hilfe dieses Testsystems können auf oder in Zellen exprimierte Antigene oder virale Proteine mittels Immunfärbung nachgewiesen werden. Zwei Wochen nach Infektion wurden von den entsprechenden Zellkulturen das Kulturmedium abgenommen, die Kulturen einmal mit PBS gewaschen und die Zellen wurden daraufhin mit Methanol (-20°C) fixiert und mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Die fixierten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur mit Blocking-Puffer inkubiert. Nach Entfernen des Blocking-Puffers wurde der Primärantikörper, ein 1:400 in Blocking-Puffer verdünntes HIV-Serum, zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Abziehen des Serums, welches durch einen 450 µm-Filter filtriert wurde und wieder verwendet werden kann, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der zweite, Peroxidase-gekoppelte Antikörper (α -human IgG, Sigma A8775), der 1:500 in Blocking-Puffer verdünnt wurde, zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die IPA-Färbelösung zugegeben und so lange inkubiert, bis sich unter dem Mikroskop die Färbung deutlich erkennen ließ. Danach wurde die Reaktion mit Wasser abgestoppt. Die Auswertung der Färbungen erfolgte unter dem Mikroskop.

Blocking Puffer: 2 % BSA in PBS

Substratlösung: 4 mg Farbstoff (3-Amino-9-Ethylcarbazol; Sigma, Taufkirchen)
1 ml Dimethylformamid (Sigma, Taufkirchen)
19 ml 0,02 M Na-Acetat-Puffer, pH 5,2
20 µl H₂O₂ (Sigma-Aldrich)

2.5.2 Proteinbestimmung

Zur Normalisierung der Luciferase-Aktivität wurde der Proteingehalt der Luciferase-Überstände bestimmt. Zu diesem Zweck wurde 5x Reagenz (Bio-Rad Protein Assay Dye conc, Bio-Rad, München) 1:5 mit ddH₂O verdünnt. Je 995 µl 1x Reagenz werden mit 5 µl Lysat gemischt und in eine Plastikkuvette überführt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD₅₅₀ im Photometer gemessen und über eine Standard-Eichkurve in Proteinkonzentration umgerechnet.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen innerhalb einer Gelmatrix. Das stark negativ geladene Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet dabei an hydrophobe Regionen der Proteine, führt zu deren Entfaltung und verleiht ihnen eine einheitliche negative Ladung. Die nachfolgende Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld erfolgt daher ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht. Die Zugabe von β-Mercaptoethanol in den Probenpuffer führt zur Denaturierung der Proteine und reduziert die Disulfidbrücken. Die zu analysierenden Zellysate wurden mit reduzierendem SDS-PAGE Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C erhitzt, nach Abkühlen in die Geltaschen geladen und bei 120 V (Sammegel) – 160 V (Trenngel) elektrophoretisch aufgetrennt (NuPAGE® 4-12% Bis-Tris-Gradientengelsystem, Invitrogen, Karlsruhe).

Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gels:

	Sammelgel (5%)	Trenngel (10%)
Aqua bidest	2,9 ml	3,1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %	0,83 ml	2,51 ml
Laemmli B	-	1,875 ml
Laemmli C	1,25 ml	-
APS 10 %	40 μ l	75 μ l
TEMED	3 μ l	4 μ l

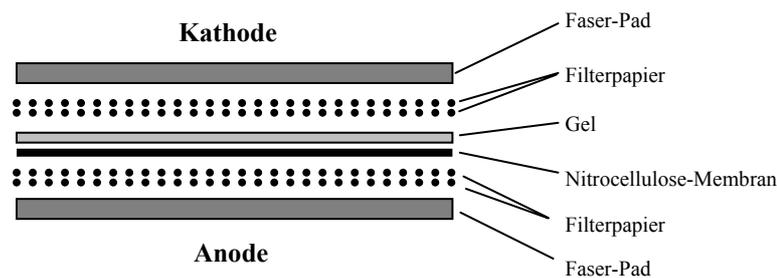
30 % Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese, Roth, Karlsruhe)

Laemmli B (pH 8,8)	1,5 ml Tris/HCl 0,4 % SDS
Laemmli C (pH 6,8)	0,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS
4 x Laufpuffer	0,1 M Tris/HCl, pH 8,3 0,77 M Glycin 0,4 % SDS
5 x Probenpuffer	0,312 M Tris/HCl, pH 6,8 50 % Glycerin 10 % SDS 25 % β -Mercapto-Ethanol 20 mg/l Bromphenolblau

Als Größenstandard wurde der Protein-Molekulargewichts-Marker „Full Range Rainbow“ (RPN 800, Amersham Biosciences, Freiburg) mit den Molekulargewichten 250/160/105/70/50/35/30/25/15/10 kDa verwendet.

2.5.4 Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran („blotting“) mittels spezifischer Antikörper analysiert werden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel kurz in $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ gespült und wie die Nitrocellulosemembran in Western Blot Transferpuffer equilibriert. Das Beladen der Transferkassette erfolgte wie in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.



Die Proteine wandern im elektrischen Feld gemäß ihrer negativen Ladung zur Anode und werden so vom Gel auf die Membran übertragen. Um einen optimalen Transfer zu gewährleisten, wurden bei der Beladung der Transferkassette alle Luftblasen entfernt. Ein farbiger Molekulargewichtsstandard diente dazu, den Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran zu kontrollieren. Der Transfer erfolgte bei 4°C mit 250 mA für 1 h. Nach dem „Blotting“ wurde die Membran mit $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ gespült und zur Kontrolle des Transfers sowie der geladenen Proteinmenge 5 min in Ponceau S gefärbt. Dieser Farbstoff färbt Proteine reversibel an. Die gefärbte Membran wurde zur Dokumentation fotografiert und die Proteine mit TBS wieder entfärbt. Unspezifische Bindestellen wurden mit 5% Milchpulver in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, die Membran mit TBST gewaschen und mit der jeweiligen Antikörper-Lösung (1:2000 in TBST, mit 5 % Milchpulver) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 3 x 10 min mit TBST gewaschen und mit HRP („Horseradish-peroxidase“)-markiertem Sekundärantikörper (1:3000 (Protein A-HRP) bis 1:5000 (anti-Kaninchen IgG-HRP) in TBST mit 1,7% Milchpulver) für 1 h bei Raumtemperatur gefärbt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min wurden die Antikörper-markierten Proteine mit dem ECL-Chemolumineszenz-System (Amersham, Braunschweig) detektiert.

Western Blot Transferpuffer pH 8,0:

Tris 25 mM, Merck, Darmstadt
Glycin 200 mM, Merck, Darmstadt
Methanol 20% (v/v), PEI
SDS 0,015% (v/v), Merck, Darmstadt
(Lagerung bei 4°C, kalt eingesetzt)

Western Blot Waschpuffer pH 8,0 mit Tween[®]20 (TBST):

Tris 10 mM, Merck, Darmstadt
NaCl 150 mM, Merck, Darmstadt
Tween[®]20 0,05 % (v/v), Merck, Darmstadt

Western Blot Blockierungslösung:

Magermilchpulver 5% (w/v), AppliChem, Darmstadt
in TBST

Western Blot HRP-Detektionsreagenz:

ECL-Fertiglösung 1+2, Amersham, Braunschweig
(Lagerung bei 4°C, im Verhältnis 1:1 frisch angesetzt)

Nitrocellulose-Membran, Hybond [™] -C extra	Amersham, Braunschweig
Filterpapier Whatman 3MM	Whatman, Maidstone/GB
ECL Western Blotting Detection System	Amersham, Braunschweig
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg

2.5.5 Immun-Komplex-Kinase-Assay

Kinasen, die mit Antikörpern präzipitiert werden, behalten ihre enzymatische Aktivität bei. Bei Inkubation mit radioaktiv markiertem [γ - ^{32}P]-ATP kann die Autophosphorylierung der Kinasen sowie die Phosphorylierung von präzipitierten Substraten nach elektrophoretischer Auftrennung autoradiographisch detektiert werden.

Zunächst wurden Zelllysate für die Immunpräzipitation hergestellt. Dabei darf der Lysepuffer keine EDTA enthalten, da die Aktivität von Kinasen kationenabhängig ist. Proteine des Zelllysats können mit spezifischen Antikörpern gebunden und die entstehenden Immunkomplexe über den Fc-Anteil von IgG-Antikörpern über Protein A – gekoppelte Sepharose-Beads präzipitiert werden. Zur Präzipitation wurden 5 μl des C-14AC α -ERK-2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) Antikörpers mit 30 μl gewaschenen Protein A Sepharose Beads (50% v/v in Lysepuffer) sowie mit Zelllysat für 2 h bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Die beladenen Beads wurden zweimal in Lysepuffer und einmal in Kinasepuffer gewaschen. Die Inkubation mit 5 μCi γ - ^{32}P -ATP (9,25 mBq / 25 μl ; Amersham, Braunschweig) in 15 ml Kinasepuffer und 1 μg ELK-1-Substrat erfolgte für 30 min bei 37°C. Die Proben wurden anschließend mit SDS-PAGE Probenpuffer 5 min gekocht. Die Auftrennung der präzipitierten Proteine erfolgte in einem SDS-PAGE Gel. Das Gel wurde anschließend auf eine Membran geblottet und Autoradiogramme angefertigt.

Lysepuffer: Nonidet[®]P40 (NP40) 1% (v/v) USB, Cleveland/Ohio, USA
Tris pH 7,4 20mM Merck, Darmstadt (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
Natriumchlorid 0,15 M Merck, Darmstadt

Frisch zugesetzte Inhibitoren

Inhibitor		Spezifität	eingesetzte Konzentration	Bezugsquelle
Aprotinin	APR	Serin-Protease Inhibitor	5 µg/ml	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	LEU	Trypsin/Cystein-Protease Inhibitor	5 µg/ml	Sigma, Taufkirchen
Benzamidin	BENZ		5 mM	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonyl-fluorid	PMSF	irreversible Inhibition von Serin-Proteasen	1 mM	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	SOV	inhibiert Phosphatasen, ATPasen, Adenylat-cyclasen	1 mM	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	SF	Protease Inhibitor	1 mM	Fluka
Natriumpyrophosphat	SPP	Protease Inhibitor	1 mM	Sigma, Taufkirchen
Complete [®]		Proteaselinhibitor Cocktail	1 Tablette auf 50 ml	Roche, Mannheim

(Lagerung bei 4°C)

Kinasepuffer (NEB): Tris Puffer pH 7,5 25 mM PEI
Magnesiumchlorid 10 mM Merck, Darmstadt
β-Glycerophosphat 5 mM Sigma, Heidelberg

frisch zugesetzte Inhibitoren:

DTT (Dithiothreitol) 2 mM Sigma, Heidelberg
Natrium-Orthovanadat 1 mM CalbioChem, Darmstadt
(Lagerung bei 4°C)

2.5.6 Analytische Durchflusszytometrie (FACS)

Die analytische Durchflusszytometrie (FACS, „Fluorescence Activated Cell Sorting“) dient der Bestimmung der Oberflächenexpression zellulärer Moleküle und Rezeptoren. Dabei werden die Zellen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und die Bindung der Antikörper im Durchflusszytometer analysiert. Es ist auch möglich, mehrere Antigene gleichzeitig auf einer Zellprobe zu unterscheiden, wenn die entsprechenden Antikörper an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind.

Je Ansatz wurden 5×10^5 Zellen abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min, Raumtemperatur; Heraeus Minifuge T, Hanau), alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellpellets wurden in 500 μ l FACS-Waschpuffer gewaschen und anschließend in je 40 μ l Waschpuffer aufgenommen. Es wurden je 5 – 10 μ l jedes Antikörpers zugegeben und die Zellen inkubierten 30 min im Dunkeln. Dann wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen und das Pellet schließlich in 500 μ l FACS-Fixierlösung aufgenommen (Lagerung bis zu einer Woche bei 4°C möglich).

Die Messungen erfolgten an einem FACStar^{Plus} (Becton Dickinson; San Jose, USA). Pro Probe wurden 7000 bis 25.000 Ereignisse (Zellen) eingemessen. Die Auswertung aller gemessenen Zellen erfolgte nach Eingrenzen (Gating) der erwarteten Zellpopulation im Forward-Sideward-Streuungs-Diagramm und Filterung der Zellaggregate im Histogramm, wo die Zellzahl gegen die jeweilige Fluoreszenzintensität aufgetragen wurde bzw. im Dot-Plot, wo zwei verschiedene Fluoreszenzen simultan ausgewertet werden konnten. Für jede Färbung wurde die Zellfraktion, an die der Antikörper unspezifisch bindet, durch Färbung der gleichen Zellen mit einem ebenfalls Fluoreszenz-Farbstoff markierten, unspezifischen Isotyp-Antikörper bestimmt.

FACS-Waschpuffer: 1 % BSA oder FKS
 0,1 % NaN₃
 in PBS

FACS-Fixierlösung: 1 % Paraformaldehyd
 In PBS

2.5.6.1 Analyse zellulärer Oberflächenmarker aus Vollblut

Zur direkten Färbung von Lymphozyten aus frischem Citrat-Blut, ohne eine vorherige Aufarbeitung, wurde das „Immunoprep Kit“ von Beckmann (Krefeld) verwendet. Dabei wurden 50 µl Voll-Blut mit 5 µl der jeweiligen Antikörper für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Erythrozyten mit 275 µl der „Solution A“ für 10 Sekunden unter vortexen lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 125 µl der „Solution B“ für 10 Sekunden gestoppt. Danach wurden 50 µl der „Solution C“ dazugegeben, um die Zellen zu fixieren. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in FACS-Fix aufgenommen und im FACSScan analysiert.

2.5.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Aufgrund der Eigenschaft von DNA, UV-Licht der Wellenlänge 260 nm zu absorbieren, kann die Konzentration einer DNA-Lösung durch photometrische Messung bestimmt werden (Spektralphotometer Perkin Elmer, Vaterstätten). Bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1 cm entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml. Aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm und 280 nm (hier absorbieren Proteine) kann die Reinheit der DNA abgeschätzt werden. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260}/OD_{280} Wert von ca. 1,8.

2.5.8 Reverse Transkriptase Test (RT-Test)

Der Lenti-RT Activity Assay von Cavid Tech (Uppsala, Schweden) bestimmt die Virusmenge in einer Lösung durch Messung der Aktivität der reversen Transkriptase (RT), die in allen Retroviren vorhanden ist. Im Assay synthetisiert die RT anhand eines RNA-Templates einen DNA-Strang, in den auch markierte Nukleotide (BrdUTP, Bromo-deoxyuridine triphosphate) eingebaut werden. In einem zweiten Schritt bindet dann ein Antikörper an die BrdUMPs, der an die alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Das Enzym katalysiert die Bildung eines Farbstoffs, der im ELISA-Reader (SLT Spectra, Crailsheim) bei 405 nm detektiert werden kann. Durch Mitführen einer Standardreihe (rRT-Standard) mit bekannten Virusmengen kann die Viruskonzentration der Probe bestimmt werden.

Der Assay wurde nach dem Cavid-Protokoll durchgeführt, mit folgenden Abweichungen:

- Verdünnungsstufen der Proben: 1:10, 1:25, 1:50, in Medium verdünnt, es wurden je 10 µl eingesetzt. Die Standardreihe wurde der Vorschrift entsprechend angesetzt.
- Es wurde nur eine PolyA-Platte verwendet. Nach Beginn der RT-Reaktion inkubierte diese Platte 3 h.
- Die Messung im ELISA-Reader erfolgte 30 min nach Zugabe des AP-Substrats.

Anhand der Standardreihe wurde eine Eichkurve erstellt, welche die Viruskonzentration in Abhängigkeit von der gemessenen optischen Dichte (OD_{405}) angibt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurden die Viruskonzentrationen aller Verdünnungsstufen der Probe, die sich im linearen Bereich der Eichkurve befanden, berechnet und daraus der Mittelwert gebildet.

2.5.9 IL-2 und IL-6 ELISA

Um die Konzentration von IL-2 und IL-6 in Zellkulturüberständen oder im Serum nachzuweisen, wurden die Monkey-IL-2 und Monkey-IL-6 ELISA-Kits der Firma Biosource (Camarillo, USA) verwendet. Dabei wurde den Anweisungen des Herstellers gefolgt.

2.6 Bestimmung virologischer Parameter nach Infektion von Schweinsaffen

2.6.1 Infektion von Schweinsaffen

Alle Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien, die im §8 Abs.1 „Deutsches Tierschutzgesetz“ (TierSchG, BGB1.1, S. 1105) aufgeführt sind. Die direkten Arbeiten an Schweinsaffen wurde von Veterinärmedizinern der Abteilung „Zentrale Tierhaltung“ am „Paul-Ehrlich-Institut“ durchgeführt.

Seronegative Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) wurden intravenös infiziert, während sie mit einer Mischung aus Xylazin Hydrochlorid (Rompun TS, Bayer, Leverkusen) und Ketamin Hydrochlorid (Ketamin 10 %, WDT, Garbsen) sediert waren. Die Schweinsaffen wurden dann mit einem Titer von 5×10^5 oder 5×10^6 TCID₅₀ von PBJ-wt oder PBJ-ΔRBD in einem Volumen von 5 ml (verdünnt mit PBS) inokuliert.

2.6.2 Messung der Zell-assoziierten Virusbelastung

Die Bestimmung der Anzahl produktiv infizierter PBMC erfolgte in einer gemeinsamen Kokultivierung mit permissiven C8166-Zellen. Als Ausgangskonzentration lagen 5×10^6 PBMC in 500 µl Medium vor. Diese wurden zunächst in Micronics-Röhrchen (Invitrogen/Life Technologies, Karlsruhe) in 8 Stufen jeweils im Verhältnis 1:5 verdünnt. In einer 24-Loch Platte wurden 1×10^6 C8166 Zellen in 1 ml Medium vorgelegt und jeweils 100 µl der vorverdünnten PBMC in drei Replikaten zugegeben, so dass 8 Verdünnungsstufen (1×10^6 – $1,28 \times 10^1$ PBMC/Loch) vorlagen. Nach zweiwöchiger Kultivierung wurde die Infektion der Indikatorzellen durch IPA nachgewiesen, wobei jeweils in Duplikaten 100 µl der Zellsuspension pro Loch entnommen wurden. Aus der Anzahl der Kavitäten, die positive Zellen oder Virusantigen beinhalten, wurde die zellassoziierte Virusbelastung als infizierte Zellen pro Millionen PBMC mit einem Poisson-Verteilungsmodell berechnet.

2.6.3 Bestimmung des Differentialblutbildes

Anhand 1 ml EDTA-Blutes wurde mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (Coulter counter JT, Krefeld) das Differentialblutbild bestimmt. Daraus konnte der Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten/µl Blut ermittelt werden.

2.6.4 Sequenzierung von Virusklonen

Damit überprüft werden konnte, ob es im Laufe der Infektion der Schweinsaffen zu Mutationen in der Raf-Bindungsdomäne oder im ITAM gekommen ist, wurden

einzelne Virusklone sequenziert. Dafür wurde jeweils 1 ml Plasma eines infizierten Schweinsaffen für 90 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco; Heraeus, Hanau) um das enthaltene Virus zu konzentrieren. Das erhaltene Viruspellet wurde bei -80°C gelagert. Die Isolierung der Virus-RNA erfolgte mit dem Viral RNA Miniprep Kit beschrieben. Die virale RNA wurde daraufhin mit Hilfe einer reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben. Dafür wurde das „SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) und der Primer PBJ-9631-rev verwendet, um spezifische virale DNA-Fragmente herzustellen. Diese DNA wurde mittels PCR und den beiden Primern PBJ-8841-for und PBJ-9631-rev amplifiziert. Die *Taq*-Polymerase, die in der PCR verwendet wird, hat eine Template-unabhängige Aktivität, einfache Deoxyadenosine (A) an das 3'-Ende des PCR Fragments anzuhängen. Daher können die amplifizierten PCR-Fragmente in einen Klonierungsvektor ligiert werden, der überhängende Deoxythymidine (T) hat. In dieser Arbeit wurde hierfür das Plasmid pCR2.1-TOPO vom „TOPO-TA Cloning Kit“ verwendet. Dieses Plasmid wurde sequenzspezifisch mit der Topoisomerase-I des *Vaccinia* Virus geöffnet, so dass ein T Überhang entstanden ist. Die amplifizierten DNA Fragmente wurden daher in pCR2.1-TOPO kloniert und dann eine Transformation von Bakterien durchgeführt. Aus mehreren gepickten Klonen wurde DNA isoliert und zu MWG (Ebersberg) geschickt, wo sie ausgehend von der Standard SP6-Sequenz, welche in pCR2.1-TOPO enthalten ist, sequenziert wurden.

2.6.5 Inno-LIA-Confirmation-Test

Mit dem Inno-LIA-Confirmation-Test (Innogenetics, Gent, Belgien) können HIV-spezifische Antikörper in Plasmaproben nachgewiesen werden. SIV-spezifische Antikörper kreuzreagieren dabei mit den HIV-2 Antigenen. Den Anweisungen des Herstellers wurde dabei gefolgt. Proben, welche zwei Banden aufwiesen wurden als positiv gewertet.

2.6.6 Histopathologie und Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Für eine detaillierte Analyse der Pathogenese infizierter Schweinsaffen wurde der Kolon der Tiere genau untersucht, da der Magen-Darmtrakt von einer SIVsmmPBJ-Erkrankung am stärksten betroffen ist. Die Pathologie wurde von

Dr. Roland Plesker vorgenommen. Dem Kolon infizierter Tiere wurden Gewebeschnitte entnommen, welche für mindestens 24 h in Formalin fixiert wurden. Die fixierten Präparate wurden in einem Einbettautomat STP-120 Microm (Microm International, Walldorf) entwässert. Dafür wurde das Präparat zunächst in wässrigen Ethanollösungen (mit steigender Ethanolkonzentration), gefolgt von Xylol und zuletzt mit Paraffin gewaschen. Danach wurden die Proben entnommen und in die Eingießstation TBS88 Medite (Medite GmbH, Burgdorf) eingegossen. Die ausgekühlten Proben wurden in einem Schlittenmikrotom HM430 (Microm International, Walldorf) eingespannt, angeschnitten und die Schnitte in einem Wasserbad gestreckt. Nachdem die Schnitte auf Objektträger (SuperFrost-Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen wurden, wurden die Objektträger für 2 h bei 60°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Die Proben wurden dann dreimal mit Xylol, zweimal mit Propanol, zweimal mit Ethanol (70 %) und zweimal mit Wasser gewaschen. Nach einer zweimaligen einminütigen Färbung mit einer Hämatoxylinlösung (Papanicolaou 1b, Merck) wurde erneut zweimal mit Wasser gewaschen. Die gefärbten Schnitte wurden dann für 1 min in HCL-Ethanol inkubiert und erneut mit Wasser und 70 % Ethanol gewaschen. Einer einminütigen Färbung mit einer Eosin-Lösung folgten 3 Waschschriffe mit 70 % Ethanol, 2 mit Propanol und 3 mit Xylol. Die gefärbten Proben wurden dann mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt und unter dem Mikroskop analysiert. Die Zellkerne erscheinen in solchen Präparaten blau, Zytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten rot.

HCL-Ethanol: 49,4% Ethanol (96%)
 49,4% Wasser
 0,2% HCL 37%

Eosin-Stammlösung: 20 g Eosin (Merck) ad 1000 ml Wasser
 1000 ml Ethanol 96%

Eosin-Lösung: 300 ml Wasser
 300 ml Ethanol 96%
 300 ml Eosin-Stammlösung

3. Ergebnisse

3.1 Konstruktion der Virusmutante PBj- Δ RBD

Der Einfluss der mitogenen Signalkaskade auf die Pathogenese einer HIV- oder einer SIV-Infektion wurde bisher kaum untersucht, obwohl eine direkte Interaktion von HIV-Nef mit der Raf-Kinase, einem Mitglied der klassischen mitogenen Signalkaskade, beschrieben wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die physiologische Relevanz dieses Zusammenspiels mit der mitogenen Signalkaskade untersucht. Dafür wurden die zwei für die Interaktion potentiell wichtigen Aminosäuren in der Raf-Bindungsdomäne (RBD) im Nef-Protein des akut enteropathischen SIVsmmPBj mutiert. Wie von Hodge et al. gezeigt werden konnte, verhinderte die Einführung der entsprechenden Mutation in HIV-1-*nef* die Interaktion zwischen HIV1-Nef und c-Raf (Hodge, et al., 1998).

Zunächst wurde ein Teil des Genoms von SIVsmmPBj, welcher für *nef* kodiert, in den Klonierungsvektor pZeoSV2+ eingefügt, um die Nukleotide, die für die beiden Aminosäuren kodieren, durch gezielte Punktmutagenese zu verändern. Dies erfolgte durch die Ligation eines 2432 bp-Fragments, welches durch EcoRI/NotI-Verdau aus dem molekularen Virusklon SIV-PBj1.9 geschnitten wurde, in das pZeoSV2+-Plasmid.

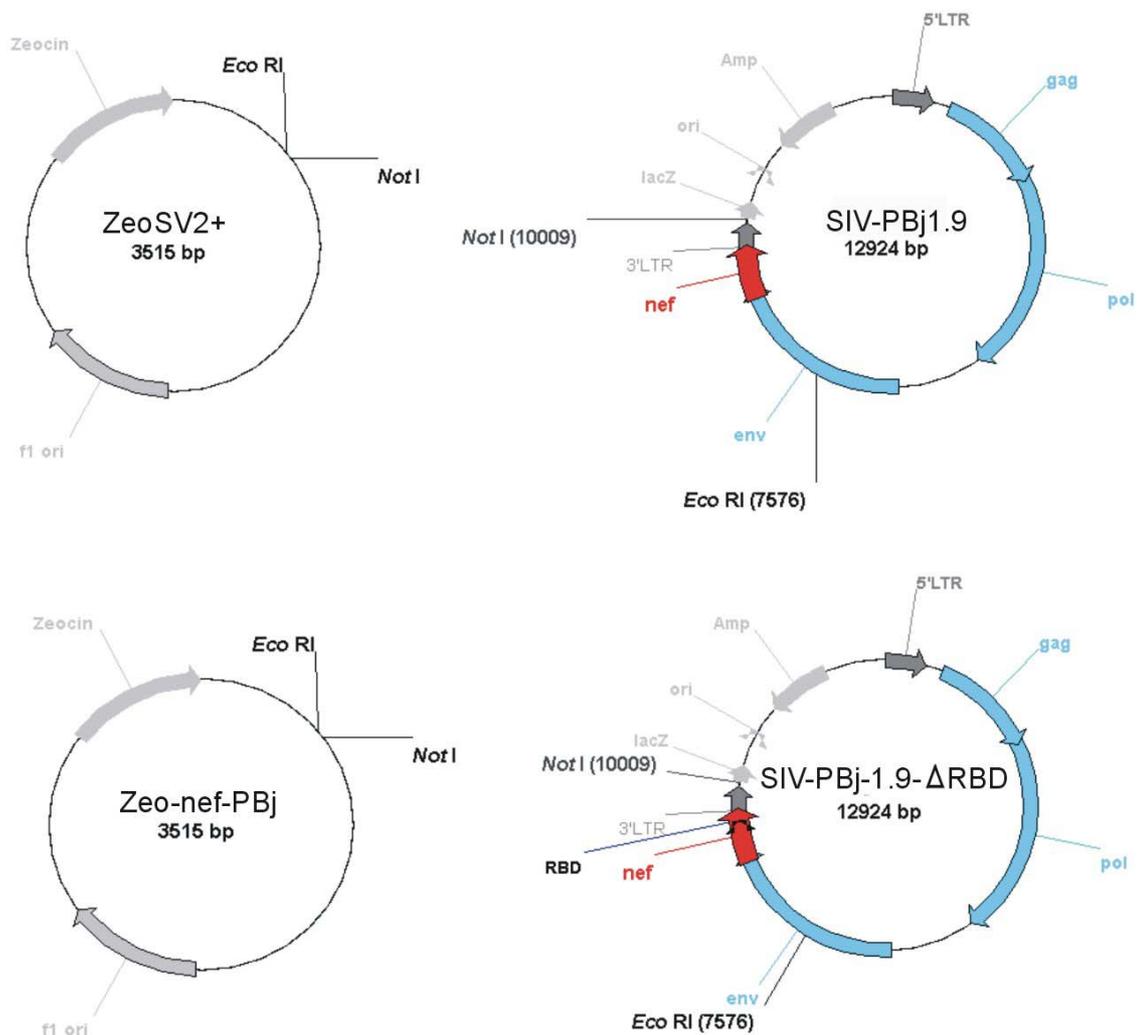
Im pZeo-*nef*PBj-Plasmid wurden danach mit dem „QuickChange Site directed Mutagenesis Kit“ zwei Punktmutationen eingeführt. Dafür wurde das komplette Plasmid pZeo-*nef*-PBj mit den Mutagenese-Oligonukleotiden „sense-*nef* Δ RBD“ und „antisense-*nef* Δ RBD“ über PCR amplifiziert. In dem entstandenen pZeo-*nef*-PBj- Δ RBD sind an den Positionen 9474 und 9477 (die Nukleotidpositionen beziehen sich auf die in der EMBL/DDBJ/Genbank dargestellte Sequenz des SIV-PBj1.9) je ein Adenin zu einem Guanin substituiert worden (Abb. 9 A). An den Positionen 202 und 203 des Nef-Proteins veränderte sich dadurch jeweils ein Aspartat in ein Glycin. Das Aspartat-Aspartat-X-X-X-Glutamin-Motiv in der RBD wurde dadurch zu Glycin-Glycin-X-X-X-Glutamin verändert (Schema in Abb. 9 B).

Aus dem pZeo-*nef*PBj- Δ RBD wurde durch einen erneuten EcoRI/NotI-Verdau das mutierte 2432 bp-Fragment zurück in das linearisierte

SIV-PBj1.9-Plasmid kloniert, wodurch SIV-PBj-1.9- Δ RBD entstand. Durch Sequenzierung des *nef*-Gens konnte die Sequenzidentität der Mutationen verifiziert werden.

Zur Produktion von Viruspartikeln wurden C8166 T-Zellen mit 1 μ g des SIV-PBj-1.9- Δ RBD-Plasmids mit DMRIE-C transfiziert. Überstände wurden an verschiedenen Zeitpunkten von 7 – 14 Tagen nach der Transfektion abgenommen und durch einen 0,45 μ m-Filter filtriert, um Zellen abzutrennen. Die gewonnenen Virus-Überstände wurden bei -80°C eingefroren und für alle weiteren Experimente verwendet. Sie werden im Weiteren als PBj- Δ RBD bezeichnet. Parallel wurden Überstände mit SIV-PBj1.9 generiert, die im Weiteren als PBj-wt bezeichnet werden. Die Virustiter dieser Virusstocks wurde durch Titration auf C8166-Zellen bestimmt.

A



B

Aminosäuresequenz in der RBD:

Position in PBj-Nef:	202	–	203	–	204	–	205	–	206	–	207
PBj-wt:	Asp	–	Asp	–	X	–	X	–	X	–	Glu
PBj-ΔRBD:	Gly	–	Gly	–	X	–	X	–	X	–	Glu

Abb. 9: Klonierung von PBj-ΔRBD. (A) Durch die Ligation eines durch EcoRI/NotI-Verdau aus dem molekularem Klon SIV-PBj1.9 geschnittenen 2432 bp Fragments in das pZeoSV2+-Plasmid entstand pZeoNef-PBj. In pZeoNef-PBj wurden zwei Punktmutationen eingeführt und das EcoRI/NotI-Fragment, welches die Mutation enthielt, wurde wieder zurück in das SIV-PBj1.9-Plasmid kloniert. Das entstehende Plasmid wurde SIV-PBj1.9-ΔRBD genannt. (B) Durch die eingeführten Punktmutationen hat sich die Aminosäuresequenz in Nef von PBj-ΔRBD verändert (Die Veränderungen sind rot markiert).

3.2 Eigenschaften von PBj- Δ RBD *in vitro*

3.2.1 Replikation von PBj- Δ RBD in PBMC

Zunächst wurde getestet, ob das neu konstruierte Virus weiterhin die für SIVsmmPBj charakteristische Fähigkeit besaß, in ruhenden PBMC zu replizieren. Hierzu wurden Schweinsaffen-PBMC über Ficoll isoliert und ein Teil der PBMC wurde für 2 Tage mit PHA/IL-2 stimuliert, ein anderer Teil der PBMC wurde nicht stimuliert. Je 3×10^6 stimulierte oder unstimulierte PBMC wurden mit einer multiplicity of infection (moi) von 1 entweder mit PBj-Wildtyp (PBj-wt) oder mit PBj- Δ RBD infiziert. An verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden Überstände abgenommen und die Viruskonzentration mittels eines reverse-Transkriptase-Test (RT-Test) bestimmt. Wie Abb. 10 A zeigt, waren beide Viren in der Lage zu gleichen Viruskonzentrationen in PHA/IL-2 stimulierten Zellen zu replizieren, mit einem Maximum der Replikation an Tag 5 nach der Infektion. Darüber hinaus replizierte PBj- Δ RBD zu ähnlich hohen Viruskonzentrationen wie PBj-wt in unstimulierten PBMC, wobei das Maximum der Replikation an Tag 9 erreicht wurde, bei beiden Viren also etwas später als in stimulierten Zellen (Abb. 10 B).

Die Fähigkeit von SIV-PBj in unstimulierten PBMC zu replizieren blieb somit durch die zwei in die RBD eingeführten Mutationen erhalten.

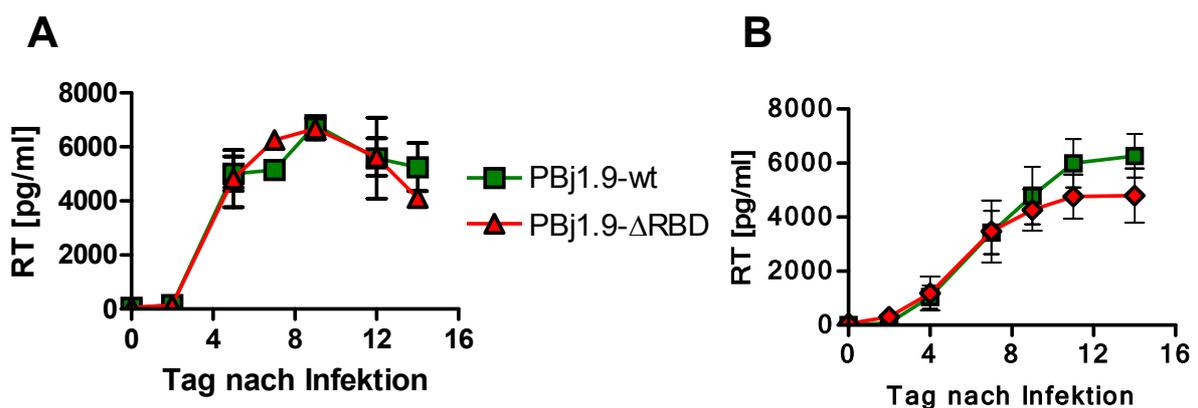


Abb. 10: Replikationskinetik von PBj-wt und PBj- Δ RBD *in vitro*. An verschiedenen Tagen nach der Infektion von Schweinsaffen-PBMC mit PBj-wt oder PBj- Δ RBD mit einer moi von 1 wurden RT-Werte bestimmt. Die angegebenen Werte sind das Ergebnis aus 6 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. **(A)** Replikationskinetik in stimulierten PBMC. **(B)** Replikationskinetik in unstimulierten PBMC.

3.2.2 Expression von Nef nach Infektion von PBMC mit PBj- Δ RBD

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob die in *nef* eingefügten Mutationen die Protein-Expression von Nef beeinflussen. Dafür wurden 3×10^6 C8166-Zellen mit einer *moi* von 1 von PBj- Δ RBD oder PBj-wt infiziert und 8 Tage nach Infektion lysiert. Durch Western Blot Analyse mit einem HIV-2-Nef spezifischen Antikörper wurde die Expressionsstärke von Nef analysiert. Wie Abb. 11 zeigt, war die Expression des ca. 30 kDa großen Nef-Proteins in PBj- Δ RBD- und PBj-wt-infizierten Zellen identisch. Im Kontrolllysat uninfizierter C8166 Zellen wurde kein Nef exprimiert. Die Expressionsstärke von Nef wurde somit nicht durch die in die RBD eingefügten Mutationen verändert.

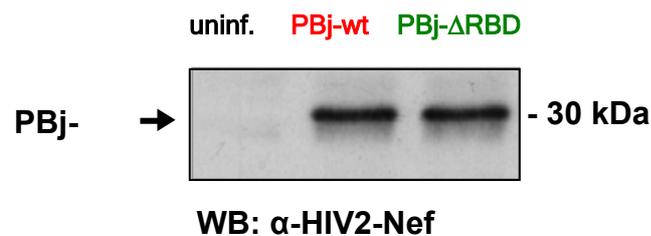


Abb. 11: Nef-Expression in PBj-wt- oder PBj- Δ RBD-infizierten C8166 Zellen *in vitro*. C8166 Zellen wurden mit PBj-wt oder PBj- Δ RBD infiziert und 10 Tage nach Infektion lysiert. Das Lysat wurde mit einem HIV-2-Antikörper im Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurden uninfizierter C8166 Zellen verwendet.

3.2.3 LTR-Transkriptionsaktivität von PBj- Δ RBD in A3.01-Zellen

Die Punktmutationen, welche in die RBD eingefügt wurden, liegen in einem Bereich des PBj-*nef*-Gens, der mit dem Leserahmen der viralen LTR überlappt. Daher wurde untersucht, ob die eingeführten Punktmutationen die transkriptionelle Aktivität der LTR veränderte. Promoterregion, R-Region und TAR-Region der LTR wurden dafür aus den Plasmiden SIV-PBj-1.9 und SIV-PBj-1.9- Δ RBD über PCR mit den Primern PBj-U3(+) und PBj-U3/R/TAR(-) amplifiziert. Die Primer enthielten am 5' Ende die Schnittstelle für BgIII und am 3'-Ende für HindIII. Die amplifizierten Fragmente wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in das pGL3-Basic-Plasmid 5' vom Reporter-Gen Luciferase kloniert. Es entstanden

Plasmide mit LTR-getriebener Luciferase: PBj-wt-LTR und PBj- Δ RBD-LTR. Jeweils 2 μ g der Plasmide wurden in A3.01-T-Zellen mit DMRIE-C transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen lysiert und ein Luciferase-Reporter-Gen-Assay durchgeführt. Die Luciferase-Aktivität in mit PBj-wt-LTR transfizierten Zellen war identisch zu der Luciferase-Aktivität in PBj- Δ RBD-LTR transfizierten Zellen, allerdings 36-fach höher als in mit 2 μ g Kontrollvektor (pGL3-Basic) transfizierten Zellen (Abb. 12).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die in die RBD eingefügten Punktmutationen keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität der LTR hatten.

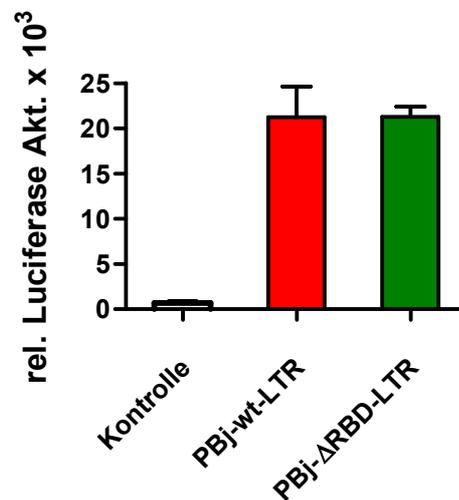


Abb. 12: Transkriptionelle Aktivität von PBj-wt- oder PBj- Δ RBD-LTR *in vitro*. A3.01-T-Zellen wurden mit PBj-wt-LTR oder PBj- Δ RBD-LTR Plasmid transfiziert und 2 Tage nach Transfektion lysiert. Das Zelllysate wurde mit einem Luciferase-Reporter-Gen-Assay auf die transkriptionelle Aktivität der LTR analysiert und auf die Proteinkonzentration normalisiert. Als Kontrolle wurde pGL3-Basic-Plasmid transfiziert. Die angegebenen relativen (rel.) Luciferase Aktivitäten sind das Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

3.2.4 Proliferation von PBMC nach Infektion mit PBj- Δ RBD

Von mehreren Gruppen wurde beschrieben, dass SIVsmmPBj die Fähigkeit besitzt, die Proliferation unstimulierter PBMC zu induzieren (Dehghani, et al., 2002; Fultz, et al., 1989). Deswegen wurde in einem Proliferationsassay untersucht, ob die in die RBD eingeführten Mutationen diese Fähigkeit beeinflussen. Unstimulierte PBMC von 3 verschiedenen Schweinsaffen wurden daher mit einer moi von 1 mit PBj-wt oder PBj- Δ RBD infiziert. Zu mehreren Zeitpunkten nach der Infektion wurden die Zellen für 18 h mit 1 μ Ci [3 H]-Thymidin inkubiert und anschließend die Inkorporation von [3 H]-Thymidin in die Zellen gemessen. Als Kontrolle wurden sowohl der [3 H]-Thymidin-Einbau von PHA/IL-2 stimulierten als auch von unstimulierten Zellen gemessen. Es zeigte sich, dass mit PBj-wt infizierte Zellen, mit im Durchschnitt 23.400 cpm, 3,5 fach höhere Proliferation induzierte als PBj- Δ RBD-infizierte Zellen mit 6.900 cpm oder uninfizierte Zellen mit 2.900 cpm. Erwartungsgemäß zeigten PHA/IL-2 stimulierte Kontrollzellen mit 43.300 cpm eine noch höhere Proliferation der Zellen (Abb. 13).

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass die RBD für die durch SIVsmmPBj induzierte Proliferation eine wichtige Rolle spielt.

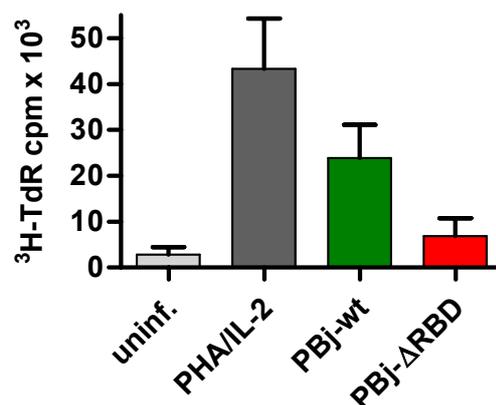


Abb. 13: Proliferation von mit PBj-wt oder mit PBj- Δ RBD infizierten PBMC. Schweinsaffen-PBMC von 3 verschiedenen Donoren wurden mit einer moi von 1 von PBj-wt oder PBj- Δ RBD infiziert. Am Tag 10 nach der Infektion wurden die Zellen für 18 Stunden mit 1 μ Ci [3 H]-Thymidin gepulst. Im Anschluss wurde die Thymidin-Inkorporation bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

3.2.5 ERK-Aktivität nach Infektion von PBMC mit PBJ- Δ RBD

Für die Proliferation von Zellen ist die Aktivierung der mitogenen Signalkaskade notwendig. Die Aktivierung der Signalkaskade wurde über die Aktivität von ERK analysiert. Zelluläres ERK ist ein Signalprotein, das seine Funktion unterhalb der Raf-Kinase in der mitogenen Signalkaskade ausübt. Um zu analysieren, ob PBJ-wt und auch PBJ- Δ RBD die Aktivierung von ERK induzieren, wurde ein *in vitro*-Immunkomplex-Kinase-Assay durchgeführt. Dafür wurden Schweinsaffen-PBMC mit einer *moi* von 1 mit PBJ-wt oder PBJ- Δ RBD infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion lysiert. Aus dem Zelllysat wurde eine Immunpräzipitation mit einem ERK-2 Antikörper durchgeführt. Die Kinase-Aktivität von ERK1/2 wurde durch die Phosphorylierung des zugesetzten ERK-Substrat ELK-1 mit [³²P]-ATP in einem Kinase Assay ermittelt. Für jeden Zeitpunkt wurden 3×10^6 Zellen infiziert. Wie Abb. 14 zeigt, konnte weder in infizierten noch in uninfizierten Zellen 30 min nach Infektion der PBMC eine Phosphorylierung von ELK-1 und damit eine Aktivierung von ERK1/2 nachgewiesen werden. Zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion wurde allerdings durch PBJ-wt ERK1/2-Aktivität induziert. Mit zeitlich fortschreitender PBJ-wt-Infektion nahm die ERK1/2-Aktivität immer weiter zu (von Tag 2, über Tag 5 bis Tag 8). Im Gegensatz dazu wurde an keinem Zeitpunkt nach der Infektion von PBMC mit PBJ- Δ RBD eine Induktion der ERK1/2 Aktivität beobachtet.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die RBD eine Aktivierung der klassischen mitogenen Signalkaskade induziert. Diese Aktivierung erfolgt vermutlich durch eine Interaktion von PBJ-Nef mit zellulärem Raf, wie es bereits für HIV-1-Nef beschrieben wurde (Hodge, et al., 1998).

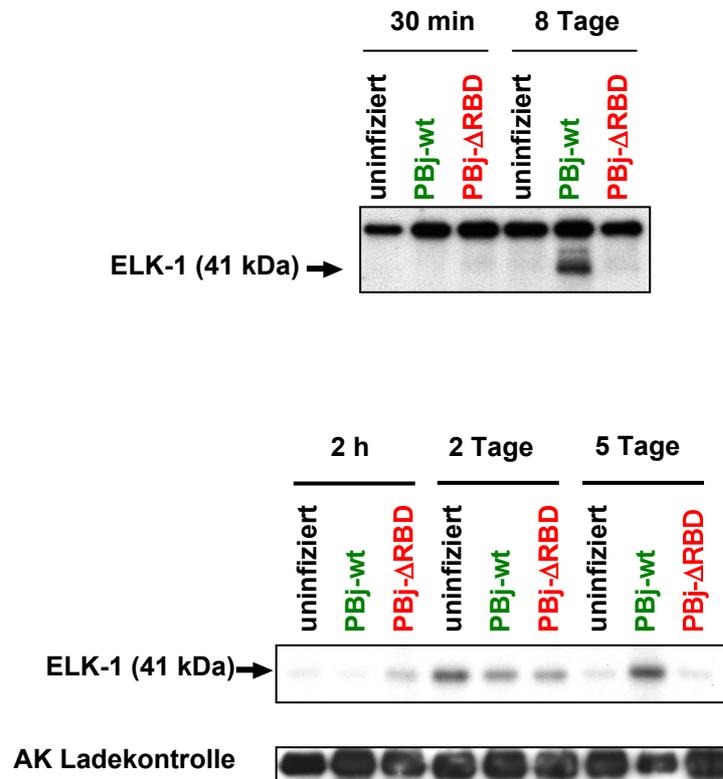


Abb. 14: ERK-Kinase-Aktivität in PBj-wt- oder PBj-ΔRBD-infizierten PBMC. Schweinsaffen-PBMC wurden mit einer moi von 1 von PBj-wt oder PBj-ΔRBD infiziert und an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion lysiert. Aus dem Zelllysate wurde mit einem ERK immunpräzipitiert und mit dem ERK-Substrat ELK-1 und [³²P]-ATP inkubiert. Die Antikörper (AK) Ladekontrolle zeigt, dass die gleiche Menge an ERK-Antikörper für die Immunpräzipitation eingesetzt wurde.

3.2.6 Expression von Aktivierungsmarkern nach Infektion von PBMC mit PBJ- Δ RBD

Durch die Induktion der Kinase-Aktivität von ERK kann es neben einer Zellproliferation zu verschiedenen zellulären Reaktionen kommen, wie der Aktivierung von Lymphozyten, der Differenzierung und der Ausschüttung von Zytokinen. Aktivierte T-Zellen exprimieren frühe und späte Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche, die somit als Marker für die Aktivierung genutzt werden können.

Zur Quantifizierung der Expression vom frühen und vom späten Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf der Zelloberfläche wurden jeweils 3×10^6 Schweinsaffen-PBMC entweder mit PBJ-wt oder mit PBJ- Δ RBD infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern gerichtet gegen CD69 und CD25 gefärbt und die Fluoreszenz der Zellen in einem FACS-Analysegerät gemessen.

Eine Infektion von PBMC mit PBJ-wt oder mit PBJ- Δ RBD erhöhte sowohl den Anteil der CD25- als auch den Anteil der CD69-exprimierenden Zellen, verglichen mit uninfizierten Zellen. Dabei stieg der Anteil der CD69-exprimierenden Zellen im Verlauf der Infektion an, mit einem Maximum am letzten analysierten Zeitpunkt am Tag 13 nach der Infektion, an dem ca. 25 % der infizierten Zellen CD69 exprimierten, gegenüber etwa 13 % bei uninfizierten Zellen (Abb. 15 A). Von den PBJ-wt-infizierten Zellen exprimierten zu jedem Zeitpunkt mehr Zellen CD69 auf der Zelloberfläche als von den PBJ- Δ RBD-infizierten Zellen. Der Anteil der CD25 exprimierenden infizierten Zellen erreichte ein Maximum am Tag 9 nach der Infektion, danach ging die Expression wieder zurück. Am Tag 9 nach der Infektion exprimierten 58 % der PBJ-wt-infizierten PBMC CD25 auf der Zelloberfläche. Demgegenüber konnte nur bei 38 % der mit PBJ- Δ RBD infizierten Zellen und wiederum nur bei 16 % der uninfizierten Zellen eine CD25-Expression nachgewiesen werden (Abb. 15 B). Um eine statistisch relevante Auswertung zu erhalten, wurden PBMC von 6 verschiedenen Schweinsaffen mit einer MOI von 1 von PBJ-wt oder PBJ- Δ RBD infiziert. Da der Höhepunkt der Expression der Aktivierungsmarker zwischen Tag 9 und Tag 13 lag, wurde deren Oberflächenexpression am Tag 10 nach der Infektion gemessen. In den PBMC aller Schweinsaffen war der Anteil an CD69 exprimierenden Zellen in mit PBJ-wt

infizierten PBMC mit im Durchschnitt 24 % um ca. 6 % höher als in PBj- Δ RBD-infizierten PBMC mit im Durchschnitt 18 %, während nur 10 % der uninfizierten PBMC CD69 exprimierten (Abb. 16 B). Der Anteil CD25-positiver Zellen war in PBj-wt-infizierten PBMC in 5 von 6 Schweinsaffen höher als in PBj- Δ RBD-infizierten PBMC. Im Durchschnitt exprimierten 63 % der mit PBj-wt infizierten PBMC CD25 und nur 43 % der mit PBj- Δ RBD infizierten PBMC, während CD25 im Durchschnitt auf 16 % der uninfizierten PBMC exprimiert wurde (Abb. 16 A).

Es konnte also anhand der durchgeführten Analyse der Expression von Aktivierungsmarkern gezeigt werden, dass es durch die Infektion von Zellen mit PBj-wt *in vitro* zu einer stärkeren Aktivierung der Zellen kam als mit PBj- Δ RBD.

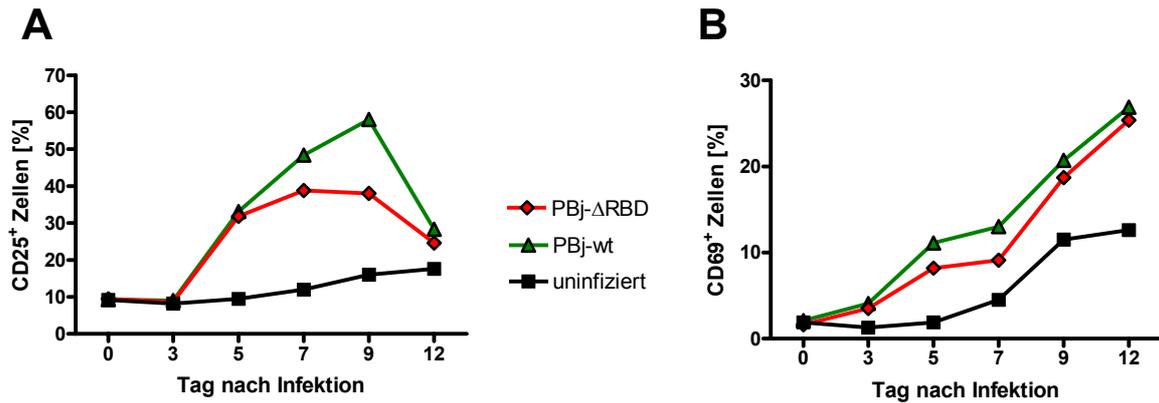


Abb. 15: Verlauf der Expression von Aktivierungsmarkern auf PBj-wt- oder PBj- Δ RBD-infizierten PBMC. Schweinsaffen-PBMC wurden mit einer moi von 1 von PBj-wt oder PBj- Δ RBD infiziert. An verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde mittels FACS-Analyse die Expression der Aktivierungsmarker CD25 (A) und CD69 (B) auf den Zellen bestimmt.

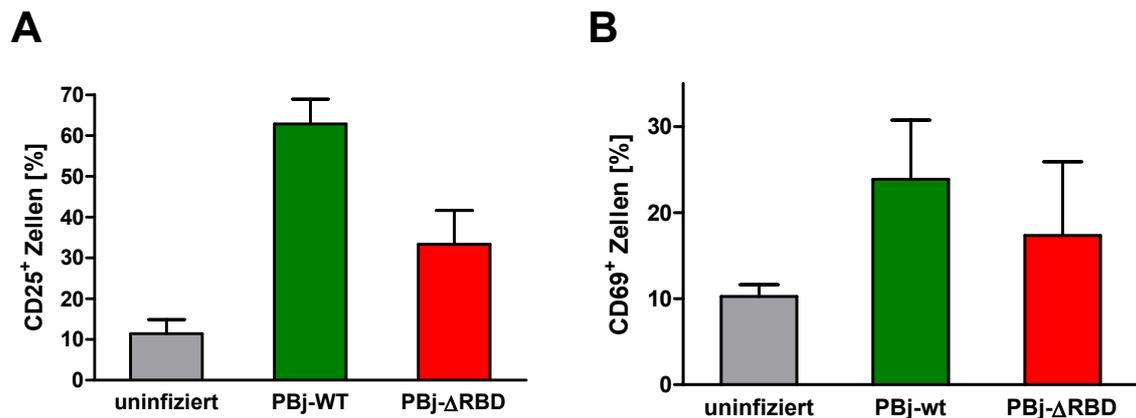


Abb. 16: Expression von Aktivierungsmarkern auf PBj-wt- oder PBj- Δ RBD-infizierten PBMC. Schweinsaffen-PBMC von 6 verschiedenen Donoren wurden mit einer moi von 1 von PBj-wt oder PBj- Δ RBD infiziert. Am Tag 10 nach Infektion wurde mittels FACS-Analyse die Expression der Aktivierungsmarker CD25 (A) und CD69 (B) auf den Zellen bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

3.2.7 Zytokinsekretion nach Infektion von PBMC mit PBj- Δ RBD

Die Sekretion von IL-2 wird unter anderem durch ERK-abhängige Signalwege reguliert. Daher wurde auch die Sekretion von Zytokinen in das Zellkulturmedium infizierter PBMC gemessen. Dafür wurden jeweils 3×10^6 Schweinsaffen-PBMC mit einer moi von 1 von PBj-wt oder von PBj- Δ RBD infiziert und an mehreren Zeitpunkten nach Infektion wurden Aliquots der Überstände abgenommen und im ELISA die Konzentrationen von IL-2, IL-6 bestimmt. Wie vermutet sezernierten PBj-wt-infizierte PBMC IL-2 ins Medium mit einem Maximum der Sekretion an Tag 9 (340 pg/ml). Im Gegensatz dazu konnte bei mit PBj- Δ RBD infizierten PBMC, wie auch bei uninfizierten PBMC, keine IL-2-Sekretion nachgewiesen werden (Abb. 17 A). Die Analyse von IL-6 im Medium zeigte, dass sowohl PBj-wt- als auch PBj- Δ RBD-infizierte PBMC IL-6 sezernierten, mit einem Höhepunkt der Sekretion an Tag 2 mit ca. 90 U/ml. Uninfizierte Zellen sezernierten nur an Tag 2 nach Kultivierung durchschnittlich 50 U/ml IL-6 ins Medium (Abb. 17 B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei PBj- Δ RBD durch die eingefügte Mutation zwar die Fähigkeit IL-2 zu induzieren verloren ging, jedoch nicht die Fähigkeit zur Induktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6.

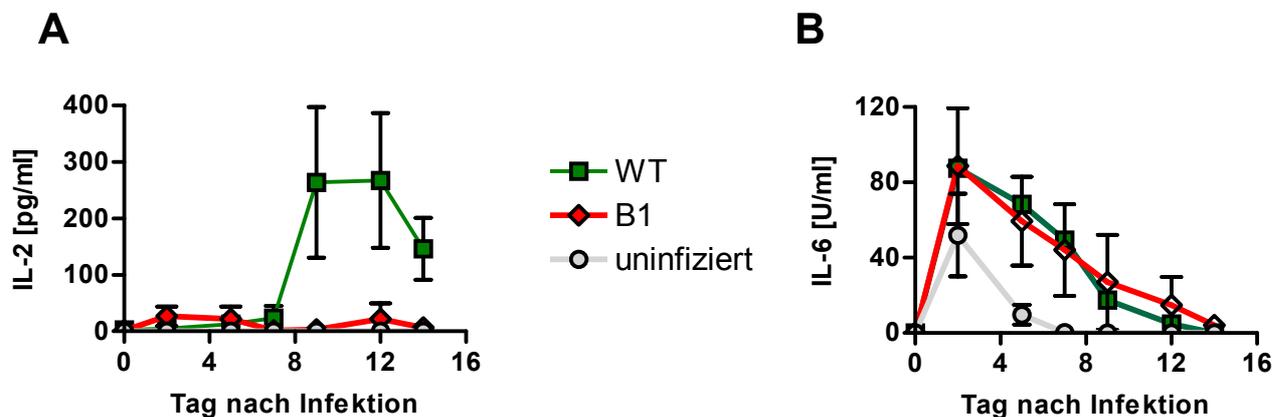


Abb. 17: Zytokinsekretion von PBj-wt- oder PBj- Δ RBD-infizierten PBMC. Schweinsaffen- PBMC von 3 verschiedenen Donoren wurden mit einer moi von 1 von PBj-wt oder PBj- Δ RBD infiziert oder blieben uninfiziert. An verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die IL-2 (**A**) und die IL-6 (**B**) Konzentration im Zellkulturüberstand im ELISA bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

3.3 Analyse der Eigenschaften von PBj- Δ RBD *in vivo*

3.3.1 Infektion von Schweinsaffen

Nach der vergleichenden Analyse der *in vitro*-Eigenschaften von PBj- Δ RBD gegenüber PBj-wt wurde der Einfluss der RBD auf den akut pathogenen Verlauf nach einer Infektion *in vivo* untersucht. Dazu wurden seronegative Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) mit PBj- Δ RBD und PBj-wt mit zwei verschiedenen Dosen intravenös infiziert, wie in Abb. 18 zusammengefasst:

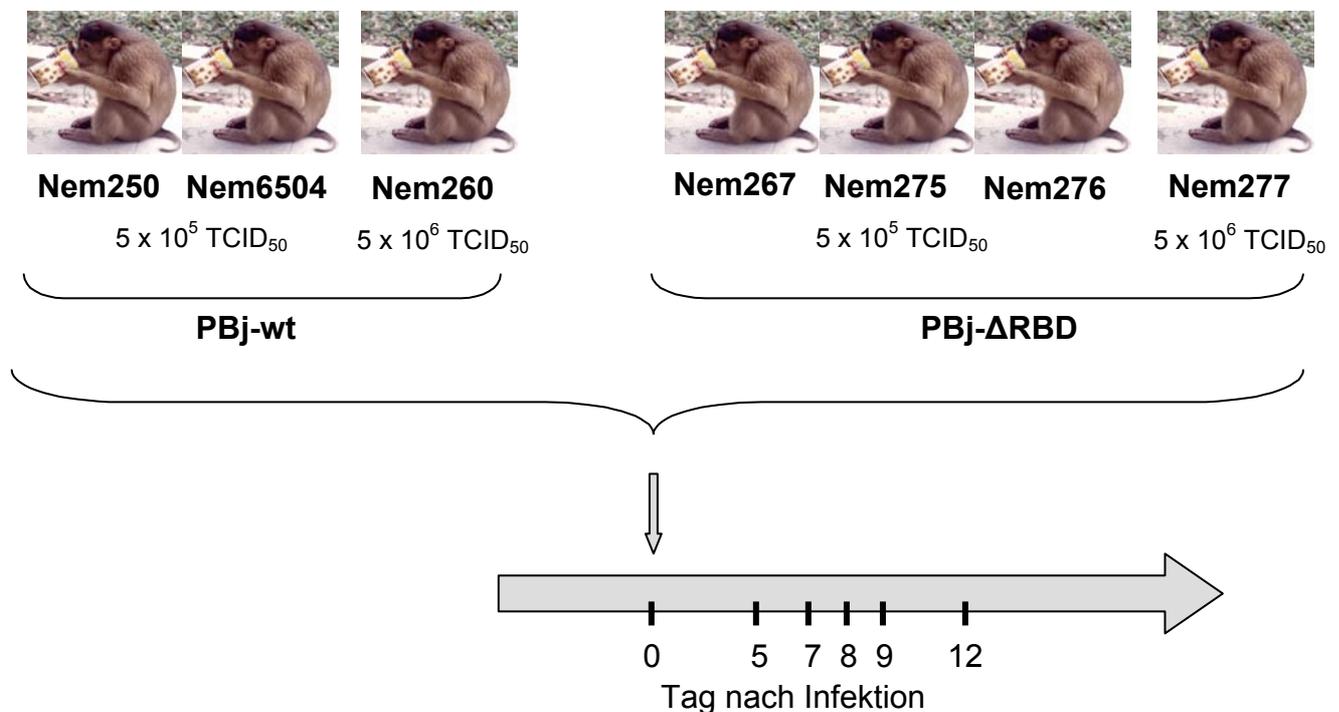


Abb. 18: Schema des Zeitraums der Infektion und der Blutentnahmen

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien, die im §8 Abs.1 „Deutsches Tierschutzgesetz“ (TierSchG, BGB1.1, S. 1105) genannt sind, durchgeführt. Blutabnahmen und Infektionen der Schweinsaffen wurden von Veterinärmedizinern der Abteilung „Zentrale Tierhaltung“ am „Paul-Ehrlich-Institut“ vorgenommen.

Um den akuten Verlauf zu beobachten wurde den Affen 5 Tage, 7 Tage, 8 Tage, 9 Tage und 12 Tage nach der Inokulation Blut abgenommen und analysiert. Zusätzlich wurden die Tiere jeden Tag intensiv auf PBJ-typische Krankheitszeichen untersucht. Aus diesen Blutproben wurden verschiedene Virusparameter und wirtsspezifische Parameter ermittelt.

3.3.2 Klinische Symptome nach Infektion von Schweinsaffen

Während des Verlaufs der akuten Phase der Infektion wurden die infizierten Affen mehrmals täglich auf Krankheitszeichen hin untersucht. Schon am Tag 5 nach der Infektion wurde bei dem mit der höchsten Dosis von PBJ-wt infizierten Affen Nem260 Durchfall beobachtet, eins der charakteristischen Krankheitssymptome der akuten Phase. Danach folgte der typische Krankheitsverlauf der akuten PBJ-Infektion: Anzeichen von Anorexie und blutigem Durchfall an Tag 6, an Tag 7 zusätzliche Symptome wie Exikose, Bauchschmerzen und Apathie. In der Nacht von Tag 7 auf Tag 8 starb das Tier und wurde daraufhin einer histopathologischen Untersuchung unterzogen. Auch die Affen (Nem250, Nem6504), die mit der niedrigen Dosis von 5×10^5 TCID₅₀ PBJ-wt-infiziert wurden, zeigten das gesamte Spektrum der typischen Symptome für den akuten SIVsmmPBJ-Krankheitsverlauf. Hier traten die ersten Symptome an Tag 7 nach der Infektion auf. Nem6504 wurde an Tag 8 mit massiven Symptomen euthanasiert und es wurde eine histopathologische Untersuchung durchgeführt. Der dritte PBJ-wt-infizierte Affe (Nem250) zeigte ein Abklingen der Symptome an Tag 12 und ist seit Tag 15 symptomfrei.

Im Gegensatz dazu zeigte keines der mit PBJ- Δ RBD infizierten Tiere Symptome, die typischerweise mit der akuten PBJ-Infektion verbunden sind. Für eine weitergehende vergleichende histopathologische Untersuchung wurden zwei Affen (Nem277, Nem267), die mit verschiedenen Dosen PBJ- Δ RBD infiziert wurden, am Tag 8 nach der Infektion euthanasiert. Die beiden anderen Affen sind während des gesamten bisherigen Untersuchungszeitraums von 14 Monaten symptomfrei geblieben (Zusammenfassung der Symptome in Abb. 19).

Diese Versuche zeigen eindeutig, dass die RBD für die Entstehung der charakteristischen Symptome der akuten SIVsmmPBj-Infektion notwendig ist, da keines der mit PBj- Δ RBD infizierten Tiere eines der für die akute SIVsmmPBj-Infektion charakteristischen Symptome zeigte.

Virus	<i>Macaca Nemestrina</i>	Dosis (TCID ₅₀)	Anorexie	Exikose	Blutiger Durchfall	Apathie	Hautaus- schlag
PBj-wt	Nem260	5x10 ⁶	+	+	+	+	-
	Nem250	5x10 ⁵	+	+	+	+	+
	Nem6504	5x10 ⁵	+	+	+	+	-
PBj- Δ RBD	Nem277	5x10 ⁶	-	-	-	-	-
	Nem267	5x10 ⁵	-	-	-	-	-
	Nem275	5x10 ⁵	-	-	-	-	-
	Nem276	5x10 ⁵	-	-	-	-	-

Abb. 19: Zusammenfassung der klinischen Symptome nach Infektion von Schweinsaffen mit PBj-wt oder PBj- Δ RBD. Schweinsaffen wurden mit verschiedenen Dosen von PBj-wt oder PBj- Δ RBD infiziert. Zwischen Tag 5 und Tag 14 nach der Infektion wurden bei den PBj-wt-infizierten Affen die aufgeführten Symptome festgestellt, während die PBj- Δ RBD-infizierten Tiere symptomfrei blieben.

3.3.3 Virusbelastung nach Infektion von Schweinsaffen

Für die Charakterisierung der Infektionskinetik *in vivo* wurde die Zell-assoziierte Viruslast in den infizierten Tieren gemessen. Produktiv infizierte Zellen waren am Tag 5 nach der Infektion in allen infizierten Affen nachzuweisen. Die Zell-assoziierte Viruslast erreichte bei allen infizierten Schweinsaffen zwischen Tag 9 und Tag 12 ein Maximum und sank danach wieder ab. Im Verlauf der akuten Phase war nur an Tag 9 ein Unterschied zwischen den mit PBj-wt infizierten Affen (Nem250) und den mit PBj- Δ RBD infizierten Affen festzustellen. An Tag 9 nach der Infektion waren in dem PBj-wt-infizierten Affen Nem250 3,5 % aller PBMC infiziert. In den PBj- Δ RBD-infizierten Schweinsaffen waren durchschnittlich 0,05 % aller PBMC infiziert und damit um einen Faktor 100 weniger als in Nem250. Es ist allerdings anzumerken, dass von den PBj-wt-infizierten Affen nur Nem250 bis Tag 9 überlebte, so dass über diesen Tag keine statistisch relevante Aussage getroffen werden kann. An den anderen Tagen der akuten Phase der Infektion konnte kein signifikanter Unterschied in der Zell-assoziierten Viruslast zwischen PBj-wt-infizierten und PBj- Δ RBD-infizierten Affen festgestellt werden (Abb. 20).

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei allen Affen eine produktive Infektion stattgefunden hat. Die Infektionsprofile zwischen PBj-wt- und den PBj- Δ RBD-infizierten Affen zeigen keinen signifikanten Unterschied. Die RBD scheint also auch für die Replikationskinetik von SIV-PBj *in vivo* keine wichtige Rolle zu spielen.

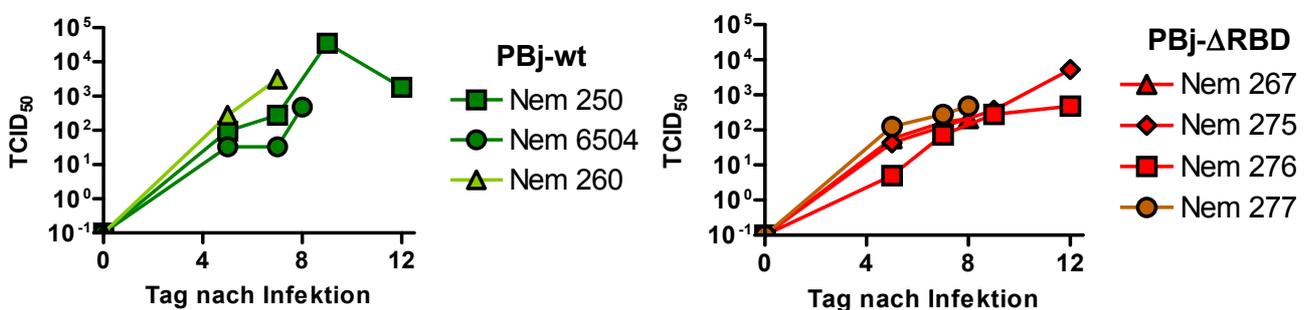


Abb. 20: Zell-assoziierte Virusbelastung nach Infektion von Schweinsaffen mit PBj-wt oder PBj- Δ RBD. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde von den infizierten Schweinsaffen Blut abgenommen und die Zell-assoziierte Virusbelastung durch Titration auf C8166-Zellen bestimmt. Gezeigt sind TCID₅₀-Werte.

3.3.4 Virale Nukleotidsequenz nach Infektion von Schweinsaffen

Um eventuelle Reversionen der eingefügten RBD-Mutation oder eine Mutation an anderen Positionen des *nef*-Gens (z. B. das ITAM-Motiv) auszuschließen, wurde virale RNA aus dem Plasma aller infizierten Affen isoliert und sequenziert. Dazu wurde von Plasmaproben an Tag 12 nach der Infektion (bzw. bei den getöteten Tieren von Plasmaproben vom Tag des Todes) das Virus abzentrifugiert. Danach wurde aus dem Viruspellet mittels des „QIAamp Viral RNA Mini Kits“ RNA isoliert. Von dieser RNA wurde mit dem „SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ eine komplementäre DNA (cDNA) im *nef*-Bereich mit dem Nef-Oligo-rev-Primer synthetisiert. Die synthetisierte cDNA-Sequenz wurde durch PCR mit den PBJ-9631-rev- und PBJ-8841-for-Oligonukleotiden amplifiziert. Das erhaltene Amplifikat mit einer Länge von 790 bp wurde in das „TOPO-TA-Cloning“ Vektorsystem eingefügt. Nach Transformation in Bakterien wurde von jedem Schweinsaffen aus mehreren unabhängigen Bakterienklonen DNA mittels des „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ aufgereinigt und sequenziert. Es zeigte sich, dass alle 13 Sequenzen aus mit PBJ-wt infizierten Affen keine Mutation in der RBD zeigten. Auch keine der 15 Sequenzen aus mit PBJ- Δ RBD infizierten Affen zeigten eine Mutation in dieser Region, das heißt, die ursprüngliche Asp-Asp \rightarrow Gly-Gly Mutation blieb in allen sequenzierten Klonen erhalten. Auch das ITAM war in keiner der analysierten Sequenzen mutiert. Dies bedeutet, dass nach *in vivo* Replikation in der akuten Phase jeweils die ursprüngliche Sequenz erhalten geblieben ist.

3.3.5 Lymphozytenzahl nach Infektion von Schweinsaffen

Die Messung der absoluten Lymphozytenanzahl liefert einen Hinweis auf den Verlauf einer SIV-Infektion. Daher wurde mit Hilfe eines Differentialblutbilds die Anzahl der Lymphozyten bestimmt. Da die absolute Anzahl von Lymphozyten von Tier zu Tier schwankt, wurden jeweils die Veränderungen der Lymphozytenzahl im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Infektion betrachtet. Wie in Abb. 21 gezeigt, war in allen PBJ-wt-infizierten Tieren eine starke Lymphopenie bis zum Tag 9 festzustellen. Dabei fiel die Lymphozytenzahl im Durchschnitt auf 25 % des Anfangswertes. Bei Nem250, welcher die akute Phase überlebte, zeigte sich an Tag 12 eine Überkompensation, mit einer starken Zunahme der Lymphozytenzahl.

Drei von vier Tieren, die mit PBJ- Δ RBD infiziert wurden, zeigten ebenfalls ein Abfallen der Lymphozytenzahl, im Durchschnitt auf 52 % des Anfangswerts. Eines der mit PBJ- Δ RBD infizierten Tiere zeigte keine signifikante Veränderung der Lymphozytenzahl.

Dies weist darauf hin, dass die RBD bei der Induktion einer Reduktion der Lymphozytenzahl im Blut eine Rolle spielen könnte.

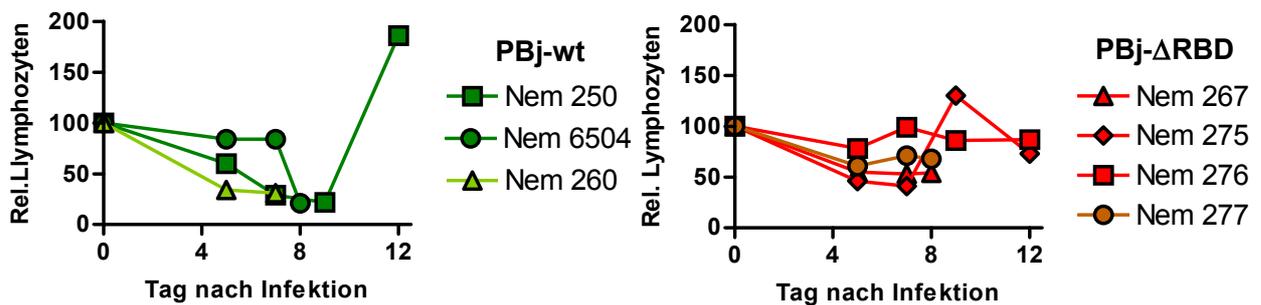


Abb. 21: Relative Lymphozytenzahl von PBJ-wt- oder PBJ- Δ RBD-infizierten Schweinsaffen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde von den infizierten Schweinsaffen Blut abgenommen und mit einem automatischen Zellzähler die Gesamtzahl der Lymphozyten/ μ l Blut ermittelt. Die Gesamtzahl ist relativ zur Anzahl der Lymphozyten am Tag der Infektion dargestellt.

3.3.6 Serokonversion nach Infektion von Schweinsaffen

Um die gegen SIV-gerichtete humorale Immunantwort der infizierten Affen zu untersuchen, wurde im Plasma die Bildung von SIV-spezifischen Antikörpern, die mit HIV-2 kreuzreagieren, mit dem „Inno-LIA-Confirmation-Test“ ermittelt. Keiner der untersuchten Affen zeigte SIV-spezifischen Antikörper zum Zeitpunkt der Infektion am Tag 0. Dies bestätigte, dass keines der Tiere vor Beginn des Experiments mit SIV infiziert war. Nach Infektion konnte ab Tag 27 bei allen infizierten Schweinsaffen SIV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 22).

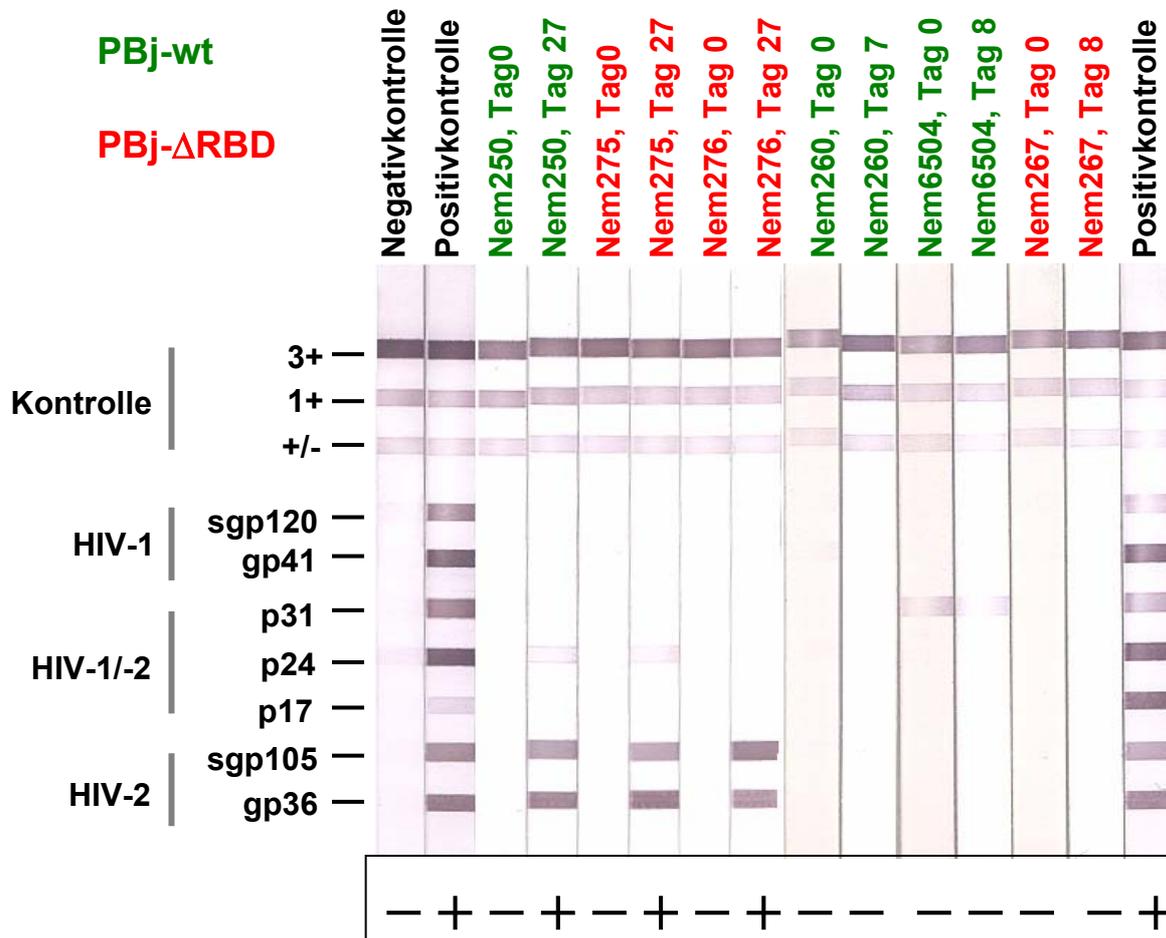


Abb. 22: Serokonversion der infizierten Affen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde von den infizierten Schweinsaffen Serum mit dem „Inno-LIA-Confirmation Test“ auf SIV-spezifische Antikörper untersucht, die mit dem HIV-2-spezifischen Test kreuzreagieren. Proben, die mit mehr als einer Bande reagieren, werden als positiv gewertet. Positive Proben sind durch ein + gekennzeichnet, negative durch ein -.

3.3.7 Expression von Aktivierungsmarkern auf Lymphozyten in verschiedenen Organen nach Infektion von Schweinsaffen

Eine durch PBj-wt-induzierte T-Zell-Aktivierung konnte *in vitro* durch die Aktivierung von ERK, erhöhte Expression von Aktivierungsmarkern und der Sezernierung von IL-2 gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob T-Zellen auch *in vivo* aktiviert wurden, wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 zu verschiedenen Zeitpunkten auf T-Zellen im peripheren Blut untersucht.

Während der akuten Phase der PBj-Infektion konnte kein signifikanter Unterschied zwischen PBj-wt- und PBj- Δ RBD-infizierten Schweinsaffen bei der Expression von CD25 auf CD3⁺CD4⁺- oder CD3⁺CD8⁺-T-Zellen im Blut festgestellt werden. Allerdings war der Anteil an CD69-exprimierenden CD3⁺CD8⁺ T-Zellen im Blut an allen Tagen der akuten Phase, zwischen Tag 5 und Tag 12, in den mit PBj-wt infizierten Affen höher als in den PBj- Δ RBD-infizierten Affen. In den PBj-wt-infizierte Affen exprimierten im Durchschnitt 14 % der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen CD69 am Höhepunkt der Infektion an Tag 9. Damit wurde in PBj-wt-infizierten Tieren auf ca. dreimal so vielen Zellen CD69 nachgewiesen als in PBj- Δ RBD-infizierten Affen. In diesen exprimierten im Durchschnitt nur 5 % der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen CD69. In uninfizierten Tieren zeigten 2 % der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen CD69 auf der Oberfläche (Abb. 23 A). Auch der Anteil der CD69 exprimierenden CD3⁺CD4⁺ positiven T-Zellen ist an allen Tagen der akuten Infektion höher in den mit PBj-wt infizierten Affen als in den mit PBj- Δ RBD infizierten Affen. An Tag 7 exprimierten in PBj-wt-infizierten Affen im Durchschnitt 2,85 % der CD3⁺CD4⁺ positiven T-Zellen CD69. Dies sind dreimal mehr Zellen, als in den PBj- Δ RBD-infizierten Affen mit 0,82 % CD69 exprimierender CD3⁺CD8⁺ T-Zellen (Abb. 23 B).

Es ist anzumerken, dass aktivierte T-Zellen aus der Peripherie in die lymphatischen Organe einwandern. Daher wurde auch die Expression der Aktivierungsmarker auf T-Zellen in Milz und Lymphknoten der gestorbenen Affen untersucht. Hier zeigte sich erneut, dass der Schweinsaffe, der mit PBj-wt infiziert wurde, in allen untersuchten Organen höhere Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 aufwies als die PBj- Δ RBD-infizierten Affen. Sehr deutlich war dies auf T-Zellen der Milz zu sehen. In Nem6504, der mit der niedrigeren Dosis von PBj-wt infiziert wurde, exprimierten 50,7 % aller CD3⁺CD8⁺ positiven T-Zellen in der Milz CD69, während in Nem267, welcher mit der niedrigeren Dosis von PBj-

Δ RBD infiziert wurde, nur 18,1 % der $CD3^+CD8^+$ positiven T-Zellen in der Milz $CD69$ exprimierten (Abb. 23 C,D).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die RBD für die Induktion einer T-Zellaktivierung *in vivo* eine wichtige Rolle spielt. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den *in vitro* Beobachtungen überein.

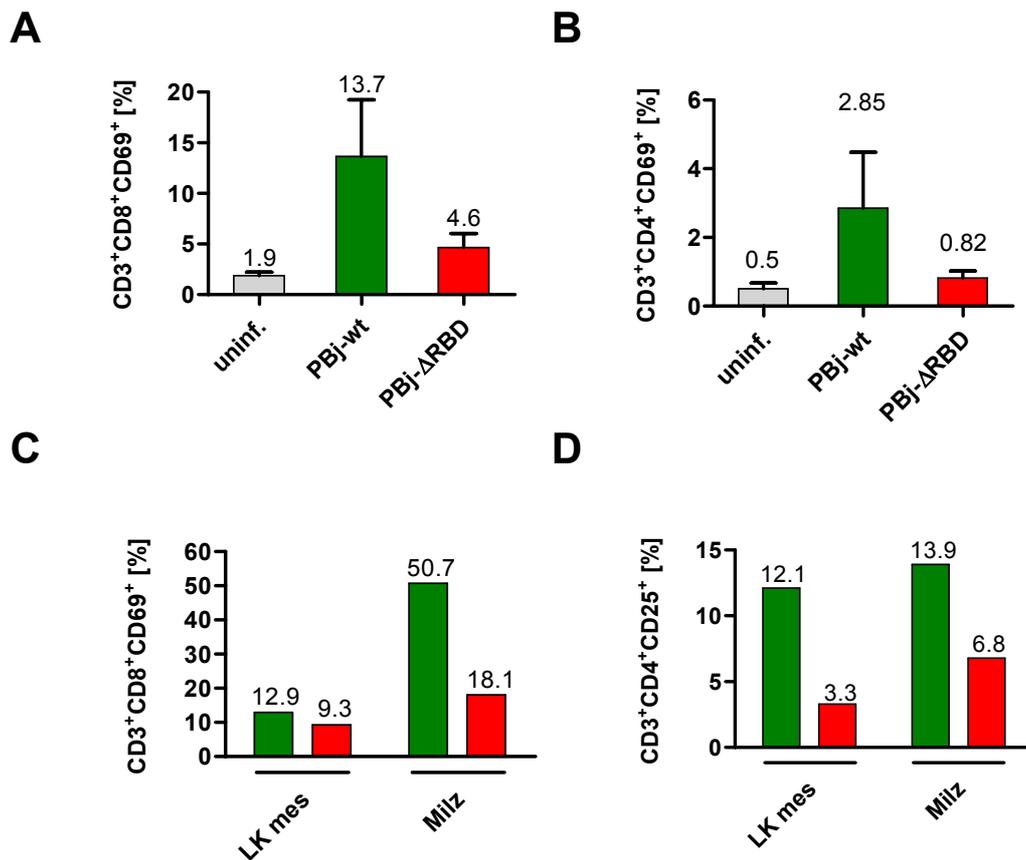


Abb. 23: Expression von Aktivierungsmarker auf T-Zellen in infizierten Schweinsaffen. (A, B) Am Höhepunkt der akuten Phase der PBj-wt-infizierten Affen (Tag 7, 8 oder 9 nach Infektion) wurde den infizierten Affen Blut abgenommen und mittels FACS-Analyse der Anteil der $CD69$ exprimierenden $CD3^+CD8^+$ (A) oder $CD3^+CD4^+$ (B) T-Zellen bestimmt. Als Kontrolle wurde Blut von uninfizierten Affen abgenommen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Der Anteil der positiven T-Zellen ist angezeigt. (C, D) Von den euthanasierten Affen (■ Nem6504, ■ Nem267) wurde in den lymphatischen Organen Milz und mesenterialen Lymphknoten (LK mes) der Anteil der T-Zellen bestimmt, welche die Aktivierungsmarker $CD25$ oder $CD69$ exprimierten. (C) Anteil der $CD69$ exprimierenden $CD3^+CD8^+$ T-Zellen. (D) Anteil der $CD25$ exprimierenden $CD3^+CD4^+$ T-Zellen. Der Anteil der positiven T-Zellen ist angezeigt.

3.3.8 Zytokinkonzentration im Serum nach Infektion von Schweinsaffen

An verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden Blutproben abgenommen. Mittels eines ELISA wurde die Konzentration von IL-2 und IL-6 im Serum der infizierten Schweinsaffen bestimmt. In allen mit PBJ-wt infizierten Affen konnte IL-2 im Serum nachgewiesen werden, mit einem Maximum zwischen Tag 7 und Tag 9. An diesen Tagen wurden 16,2 pg/ml (Nem6504) bzw. 6,5 pg/ml (Nem250) IL-2 in den Schweinsaffen, die mit der niedrigeren Dosis von 5×10^5 TCID₅₀ von PBJ-wt infiziert wurden, gemessen. Nem260, welcher mit der höheren Dosis PBJ-wt infiziert wurde, zeigte am Tag 8 nach Infektion mit 130,6 pg/ml IL-2 eine noch höhere IL-2 Konzentration. Im Gegensatz dazu konnte bei keinem der mit PBJ- Δ RBD infizierten Affen zu irgendeinem Zeitpunkt IL-2 im Serum nachgewiesen werden. Das IL-2 im Serum PBJ-wt-infizierter Affen weist also wiederum auf eine erhöhte T-Zell-Aktivität in den infizierten Affen hin (Abb. 24 A).

Das gleiche Bild zeigte sich nach der Quantifizierung der Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 im Serum der infizierten Schweinsaffen. Bei den PBJ-wt-infizierten Tieren wurden im Serum 1,0 U/ml (Nem6504) oder 6,0 U/ml (Nem250) IL-6 zwischen Tag 7 und Tag 9 nach der Infektion nachgewiesen. In Nem260, welcher mit der höheren Dosis von PBJ-wt infiziert wurde, wurde sogar eine Konzentration von 76,8 U/ml am Tag 8 nach der Infektion bestimmt. Im Gegensatz dazu konnte erneut in keinem der mit PBJ- Δ RBD infizierten Affen IL-6 im Serum nachgewiesen werden (Abb. 24 B).

Da nur die PBJ-wt-infizierten Affen nachweisbare Mengen der Zytokine IL-2 und IL-6 im Plasma aufwiesen, ist festzustellen, dass die RBD für eine Induktion der Zytokinsekretion *in vivo* benötigt wird.

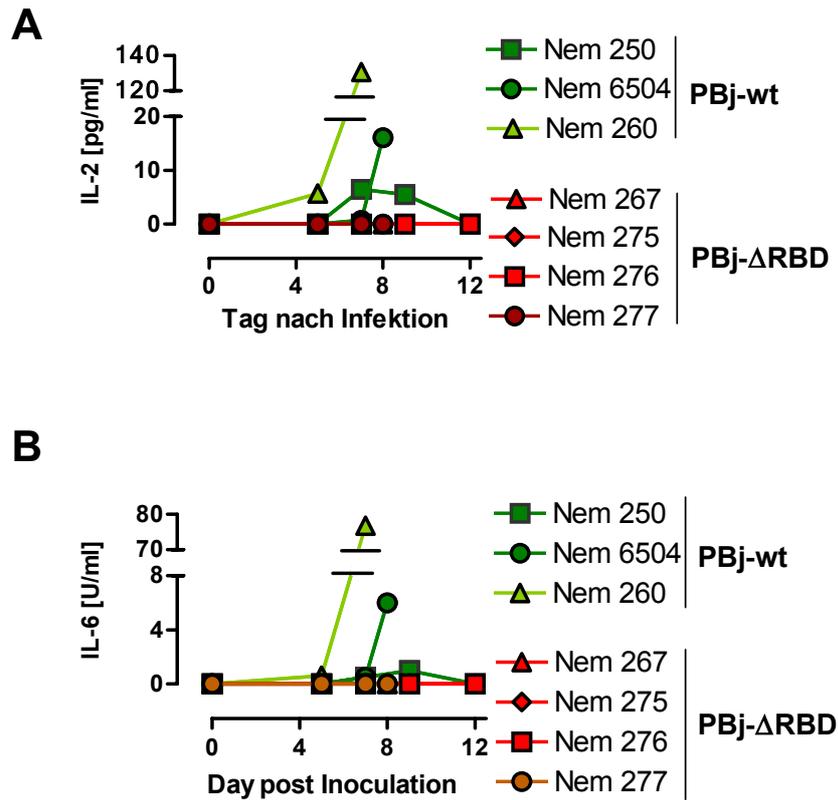


Abb. 24: Zytokinkonzentration im Serum infizierter Schweinsaffen. An verschiedenen Zeitpunkten wurde von den infizierten Schweinsaffen Blut abgenommen und über ELISA die Konzentration von IL-2 (**A**) und IL-6 (**B**) im Serum bestimmt.

3.3.9 Histopathologie nach Infektion von Schweinsaffen

Die ausgeprägtesten pathologischen Veränderungen während einer akuten SIVsmmPBj-Infektion sind im Darmbereich sichtbar. Um den Einfluss der RBD auf die Enteropathie zu analysieren, wurden alle getöteten Affen einer intensiven histopathologischen Untersuchung unterzogen. Die histopathologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung „Zentrale Tierhaltung“ unter der Leitung von Dr. Roland Plesker vorgenommen.

Beide mit PBj-wt infizierten Tiere zeigten eine massive folliculäre Milzhyperplasie und eine massive Vergrößerung der Mesenteriallymphknoten und der akzessorischen Darmlymphknoten. Die akzessorischen Darmlymphknoten wiesen teilweise bis zu linsengroße weiße Herde im Parenchym auf (Nem260), die auf Nekrosen hindeuten können. Außerdem zeigten sich teilweise im Magen, aber vor allem im Darm bis 2 cm große Erosionen. In allen Darmbereichen wie Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum und im Kolon waren herdförmige rote Stellen in der Darmwand, Erosionen und Nekrosen mit Hämorrhagien (Nem260) bzw. nekrotische Herde mit umgebenden hämorrhagischen Randsaum zu beobachten (Abb. 25 A). In der histologischen Untersuchung von Hämotoxylisin/Eosin gefärbten Gewebeschnitten des Kolon war ein kompletter Verlust der Mikrovillstruktur zu erkennen, wobei es zu Fusionen und Verkürzung der Villi kommt. Außerdem war eine massive Infiltration von Lymphozyten in Mikrovilli, Lamina propria und auch tiefer in die Submukosa zu beobachten (Abb. 25 B).

Im Gegensatz dazu war der gesamte Darmbereich in den PBj- Δ RBD-infizierten Affen makroskopisch ohne Befund (Abb. 25 A). Es zeigte sich eine folliculäre Milzhyperplasie und eine Vergrößerung der akzessorischen und der Darmlymphknoten, allerdings geringer als bei den mit PBj-wt infizierten Affen. Bei der histologischen Untersuchung der mit PBj- Δ RBD infizierten Affen wurde nur eine leichte Infiltration von Lymphozyten in die Schleimhaut und wenige Fusionen von Villi beobachtet. Die Struktur der Mikrovilli war aber erhalten geblieben (Abb. 25 B).

Nur die PBj-wt-infizierten Affen zeigten eine starke Enteropathie und eine massive Infiltration von Lymphozyten in die Darmmukosa, während die PBj- Δ RBD-infizierten Schweinsaffen nur kleinere Veränderungen im Darm zeigten. Somit zeigt sich, dass RBD für die Induktion einer Enteropathie eine sehr wichtige Rolle zu spielen scheint.

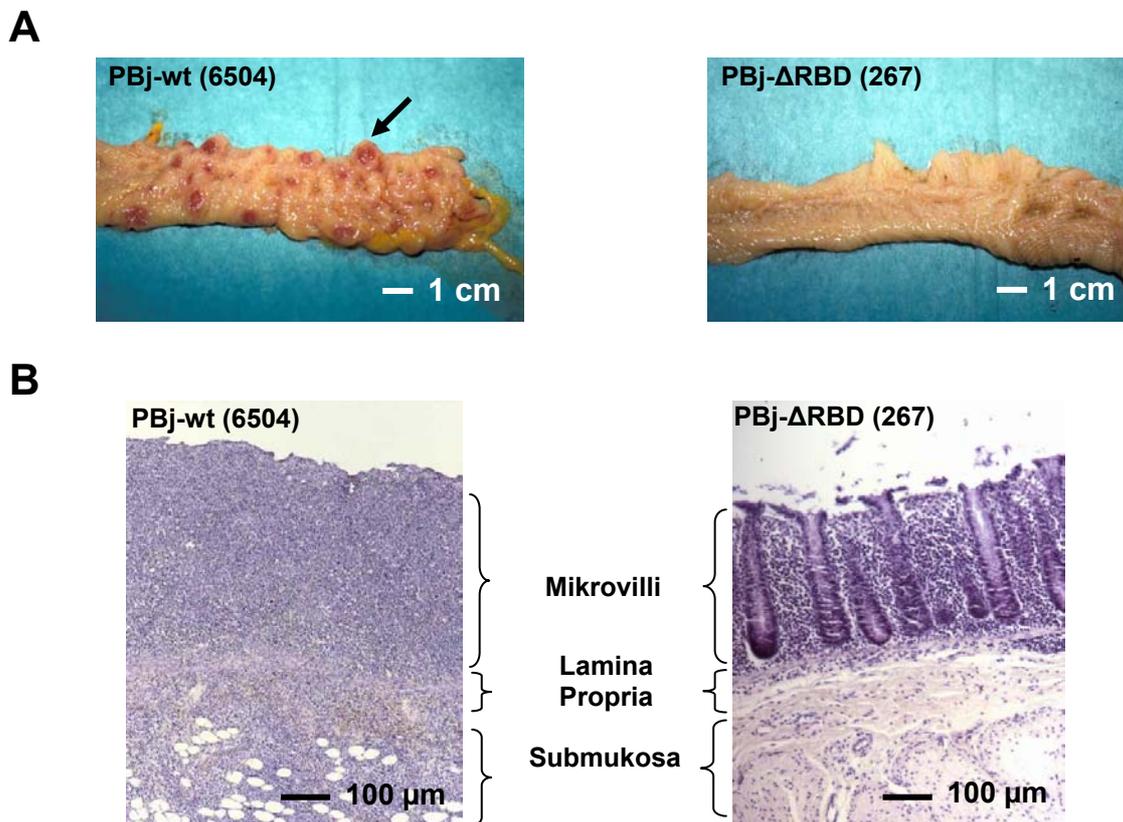


Abb. 25: Histopathologie von PBj-wt- oder PBj- Δ RBD-infizierten Schweinsaffen. An Tag 8 nach der Infektion wurden die euthanasierten Schweinsaffen (PBj-wt, Nem6504; PBj- Δ RBD, Nem267) einer histopathologischen Untersuchung unterzogen. **(A)** Makroskopisches Bild des Kolon der euthanasierten Affen: Im PBj-wt-infizierten Affen Nem6504 sind ulcerativ-nekrotische Läsionen erkennbar. Eine charakteristische Läsion ist mit einem Pfeil markiert. Der Kolon des PBj- Δ RBD-infizierten Nem267 ist makroskopisch ohne Befund. **(B)** Repräsentative Schnitte durch den Kolon, mit Hämotoxilysin/Eosin gefärbt. Der mit PBj-wt infizierte Affe Nem6504 zeigt ein Verschmelzen und eine Verkürzung von Mikrovilli, bis hin zu einen kompletten Verlust der Mikrovilli-Struktur. Außerdem ist eine massive Einwanderung von Lymphozyten in Mikrovilli, Lamina Propria und Submukosa zu beobachten. Im PBj- Δ RBD-infizierten Affen 267 ist die Mikrovilli-Struktur intakt und nur eine moderate Infiltration von Lymphozyten in die Mikrovilli ist zu beobachten.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Einwirkungen zellulärer Signalkaskaden auf die Pathogenese des SIVsmmPBj. Insbesondere ist der Einfluss der mitogenen Signalkaskade auf die Pathogenese einer HIV- oder SIV-Infektion bis heute kaum untersucht, obwohl bereits mehrere Studien eine Wechselwirkung zwischen HIV und Mitgliedern dieser zellulären Signalkaskade gezeigt haben (Hanna, et al., 1998; Schragar und Marsh, 1999; Schragar, et al., 2002). So wurde unter anderem eine direkte Interaktion von HIV-Nef mit der Raf-Kinase, einem Mitglied der klassischen mitogenen Signalkaskade, beschrieben (Hodge, et al., 1998). Für derartige Untersuchungen eignet sich das akut enteropathische SIVsmmPBj, da es im Gegensatz zu anderen Lentiviren in nicht-mitogen-stimulierten Zellen repliziert und deren Proliferation induziert (Fultz, et al., 1989; Fultz, 1991), wofür eine Aktivierung mitogener Signale notwendig ist. Die Mechanismen, die zu der ausgeprägten akuten SIVsmmPBj-Pathogenese führen, sind nur unvollständig aufgeklärt.

Daher wurde ein replikationsfähiger Virusklon von SIVsmmPBj konstruiert, in welchem eine Mutation in die für HIV-Nef beschriebenen Raf-Bindungs-Domäne eingefügt wurde. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde dieser Virusklon *in vitro* charakterisiert und mit dem Wildtypvirus verglichen. Im zweiten Teil wurde im Tierexperiment der Einfluss der Raf-Bindungs-Domäne auf die Pathogenese untersucht.

4.1 Konstruktion von PBj- Δ RBD

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Basis des SIV-PBj1.9-Plasmids der Virusklon PBj- Δ RBD generiert, der zwei Punktmutationen im kodierenden Bereich des *nef*-Gens trägt. Der Basenaustausch führte im Nef-Protein an den Positionen 202 und 203 jeweils zu einer Substitution des Aspartat durch Glycin. Aspartat 202 und Aspartat 203 bilden den zentralen Bestandteil der Raf-Bindungs-Domäne (RBD), die für HIV-1-Nef beschrieben wurde. Wie von Hodge et al. gezeigt, verhindert das

Einfügen der entsprechenden Mutationen in HIV-1-Nef eine direkte Interaktion von Nef mit c-Raf (Hodge, et al., 1998).

Die Raf-Bindungs-Domäne ist zwischen HIV und einigen SIV-Stämmen, unter anderem SIVsmmPBj, stark konserviert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass auch SIVsmmPBj-Nef mit Raf-1 interagiert und dass durch die eingefügten Aspartat -> Glycin Substitutionen eine solche Interaktion verhindert wird. Die Interaktion selbst wurde deswegen nicht erneut untersucht.

4.2 Eigenschaften von PBj- Δ RBD *in vitro*

Zunächst wurde getestet, ob die neu konstruierte Virusmutante PBj- Δ RBD wie SIVsmmPBj die Fähigkeit besitzt, in unstimulierten PBMC zu replizieren. Die Ergebnisse zeigten, dass PBj- Δ RBD sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten Schweinsaffen-PBMC eine vergleichbare Replikationskinetik wie PBj-wt hatte. Dies zeigt eindeutig, dass die RBD für die Replikation in unstimulierten PBMC keine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang scheint vielmehr das ITAM-Motiv in PBj-Nef eine wichtige Rolle zu spielen. Wie von den Gruppen von Desrosier und Hirsch gezeigt, war eine Virusvariante von SIVsmmPBj, welche in dem für das ITAM Motiv zentrale Tyrosin 17 mutiert war, nicht mehr in der Lage in unstimulierten PBMC zu replizieren (Dehghani, et al., 2002; Du, et al., 1996; Saucier, et al., 1998). Die genauen molekularen Mechanismen für diese Eigenschaft sowie eine mögliche Beteiligung weiterer Faktoren sind allerdings nicht bekannt.

Mehrere Gruppen haben gezeigt, dass SIVsmmPBj die Proliferation unstimulierter PBMC induziert (Fultz, et al., 1989). In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die in die RBD eingefügten Punktmutationen diese zentrale Eigenschaft verändern. Erwartungsgemäß induzierte PBj-wt die Proliferation unstimulierter Schweinsaffen-PBMC, während PBj- Δ RBD die Proliferation der Zellen nicht induzieren konnte. Die RBD spielt also für die PBj-spezifische Induktion der Zellproliferation eine wichtige Rolle.

Ein initialer Schritt in der Induktion der Zellproliferation ist die Aktivierung mitogener Signalwege. Aus diesem Grund wurde die Aktivität der klassischen mitogenen Signalkaskade in infizierten PBMC untersucht. Die Stimulation dieser Raf/MEK/ERK-Signalkaskade führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von

ERK. In dieser Arbeit wurde daher die Aktivierung von ERK1/2 in infizierten PBMC untersucht. Tatsächlich war nach Infektion von unstimulierten PBMC mit PBJ-wt eine anhaltende Aktivierung von ERK1/2 nachweisbar. Im Gegensatz dazu war PBJ- Δ RBD nicht in der Lage die Aktivierung der ERK-Kinase zu induzieren. Die RBD scheint demnach für eine Aktivierung von ERK1/2 wichtig zu sein. Vermutlich induziert in mit PBJ-wt infizierten Zellen die Interaktion von Nef mit c-Raf, vermutlich durch die RBD, die Aktivität der Raf-Kinase, wahrscheinlich gefolgt von einer nachgeschalteten Aktivierung des in der mitogenen Signalkaskade darunter liegenden ERK. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass aktives Raf die Aktivierung von ERK zur Folge hat (Kyriakis, et al., 1992).

Wahrscheinlich spielt die konservierte RBD in HIV eine ähnliche Rolle wie bei SIVsmmPBJ, denn auch für HIV wurde ein Einfluss von Nef auf die Zellaktivierung beschrieben. Die Gruppe um Jon Marsh konnte zeigen, dass HIV-1-Nef die T-Zellaktivierung, gemessen anhand der Sezernierung von IL-2, verstärkte. Diese Aktivierung war abhängig von einer Stimulation über CD3 und CD28 (Schrager und Marsh, 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass HIV-1-Nef die Aktivität von ERK in T-Zellen verstärkte, wenn die Zellen über CD3 oder CD28 stimuliert wurden (Schrager, et al., 2002). Zusätzlich wurde auch *in vivo* eine erhöhte Aktivierung von ERK durch HIV-1-Nef beobachtet. In transgenen Mäusen, welche HIV-1-Nef in CD4⁺ T-Zellen exprimierten, wurde ebenfalls eine verstärkte ERK-Aktivierung nach Stimulation der T-Zellen über CD3 und CD28 nachgewiesen (Hanna, et al., 1998). Die Ergebnisse einer Studie von Alexander et al. weisen darauf hin, dass Nef-vermittelte Zellaktivierung durch die mitogene Signalkaskade induziert wird (Alexander, et al., 1997). In dieser Studie replizierte *nef*-kodierendes SIV in einer IL-2 abhängigen Affenzelllinie, während *nef*-defizientes SIV in diesen Zellen nicht replizieren konnte. Sowohl HIV-Nef, als auch aktives v-Ras konnte in diesem System SIV-Nef ersetzen (Alexander, et al., 1997).

Zusammenfassend zeigt dies, dass auch HIV-1-Nef eine Aktivierung von ERK und eine T-Zellaktivierung induzieren kann, hier aber weitere Kostimuli, wie z. B. über CD3 oder CD28 notwendig sind. Wie Nef die Aktivierung von ERK induzieren kann, ist bisher unbekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass die RBD für die Aktivierung der mitogenen Signalkaskade eine wichtige Rolle spielt. Möglicherweise sind allerdings für die Aktivierung von

c-Raf außer der RBD weitere Kofaktoren bzw. weitere molekulare Wechselwirkungen notwendig.

Ein Einfluss der Aktivierung der klassischen mitogenen Signalkaskade auf verschiedene Phasen des Replikationszyklus von HIV wurde in mehreren Publikationen beschrieben. So erhöhte die Aktivierung von ERK die Expression viraler Gene über die HIV-LTR und die HIV-Replikation (Flory, et al., 1998; Yang, et al., 1999). Außerdem scheint die ERK-Signalkaskade bei der Regulation der Infektiosität viraler Partikel eine Rolle zu spielen. Wurden beispielsweise Partikel produzierende Zellen mit Inhibitoren der ERK-Signalkaskade behandelt, reduzierte sich die Infektiosität der produzierten Partikel (Jacque, et al., 1998; Yang und Gabuzda, 1999), wurde ERK dagegen aktiviert, erhöhte sich die Infektiosität der produzierten Partikel (Jacque, et al., 1998; Yang und Gabuzda, 1999). Eine Aktivierung von ERK über die RBD könnte daher für die HIV-Replikation Vorteile haben, da Replikation und Infektiosität der Partikel erhöht würden. Zusätzlich kann HIV, wie schon erwähnt, nur in mitogen-stimulierten PBMC replizieren. Eine Aktivierung der Zellen durch die RBD könnte daher das zelluläre Reservoir infizierender Zellen erhöhen bzw. für die Replikation notwendige Stimuli reduzieren.

4.2.1 PBJ-induzierte Zellaktivierung *in vitro*

Eine Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade induziert neben Zellproliferation weitere zelluläre Antworten. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer Infektion mit PBJ-wt oder PBJ- Δ RBD auf weitere physiologische Parameter untersucht. Zunächst wurde die Expression zellulärer Aktivierungsmarker auf infizierten PBMC analysiert. Die Experimente zeigten, dass von PBJ-wt-infizierten PBMC ein höherer Anteil CD25 und CD69 auf der Zelloberfläche exprimierten als von PBJ- Δ RBD-infizierten Zellen. Dies ist durch eine Aktivierung der mitogenen Signalkaskade in PBJ-wt-infizierten Zellen zu erklären. So konnte Taylor-Fishwick et al. zeigen, dass aktiviertes c-Raf die Expression von CD69 auf der Oberfläche verstärkte (Taylor-Fishwick und Siegel, 1995).

Ein weiteres Anzeichen für eine T-Zellaktivierung ist die Sekretion von IL-2. Aus diesem Grund wurde die Sezernierung von Zytokinen in das Medium

infizierter PBMC untersucht. Wiederum konnte nur PBj-wt eine Sezernierung von IL-2 ins Medium induzieren, während PBj- Δ RBD-infizierte Zellen kein IL-2 sezernierten. Andere Gruppen konnten zeigen, dass aktive Raf-Kinase für die IL-2-Produktion und -Sekretion notwendig ist (Avots, et al., 1997; Owaki, et al., 1993). Auch für HIV-1 wurde eine Nef-stimulierte Sekretion von IL-2 beschrieben, welche allerdings abhängig von Kostimuli war (Schrager, et al., 2002). Es ist daher anzunehmen, dass die RBD eine wichtige Rolle bei der PBj-induzierten Sekretion von IL-2 spielt.

Im Hinblick auf eine Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 zeigten PBj-wt und PBj- Δ RBD keinen Unterschied. Beide Viren waren in der Lage IL-6-Sekretion zu induzieren. Allerdings ist bekannt, dass für die Sekretion von IL-6 andere Stimuli benötigt werden, als für die Sekretion von IL-2.

Um auszuschließen, dass verschiedene Expressionsstärken der Nef-Proteine für die beobachteten Unterschiede zwischen PBj-wt und PBj- Δ RBD verantwortlich sind, wurde die Nef-Expression von PBj-wt und PBj- Δ RBD verglichen. Die Analysen zeigten, dass die Expression von Nef in PBj- Δ RBD und mit PBj-wt infizierten Zellen vergleichbar war.

Da die in Nef eingefügte Aminosäuresubstitution in einem Bereich liegt, wo der *nef*-kodierende Bereich mit der für die Transkription wichtigen LTR überlappt, wurde außerdem die transkriptionelle Aktivität der LTR untersucht. Auch die LTR-Expression zeigte keine Unterschiede zwischen PBj- Δ RBD-LTR und PBj-wt-LTR. Ein Unterschied in der Nef-Expression, transkriptionellen LTR-Aktivität und Replikation scheiden daher aus, das unterschiedliche physiologische Verhalten von PBj- Δ RBD und PBj-wt zu erklären.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die RBD in Nef für die Aktivierung von ERK und die physiologischen Folgen wie Zellproliferation, Expression von Aktivierungsmarkern und IL-2-Sekretion notwendig ist. Weder ERK-Aktivierung, Zellproliferation noch IL-2-Sekretion sind allerdings für die einzigartige Fähigkeit von SIVsmmPBj, in unstimulierten PBMC zu replizieren, erforderlich. Es bleibt deshalb weiter unklar, welche genauen Mechanismen für diese Fähigkeit verantwortlich sind.

4.3 Charakteristika von PBJ- Δ RBD *in vivo*

4.3.1 Replikationskinetik *in vivo*

Nach der Untersuchung der *in vitro* Eigenschaften des neu konstruierten Virusklons wurde der Einfluss der RBD auf die Pathogenese *in vivo* untersucht. Zunächst wurde dabei analysiert, ob PBJ- Δ RBD auch *in vivo* replizieren konnte. Es zeigte sich, dass PBJ- Δ RBD und PBJ-wt ähnliche Replikationskinetiken in infizierten Affen aufwiesen. Die RBD hatte also keinen großen Einfluss auf die replikativen Fähigkeiten *in vivo*. Dies stimmt mit den *in vitro* Beobachtungen überein.

Bei der Beobachtung des Krankheitsverlaufs zeigte sich, dass die mit PBJ-wt infizierten Affen wie erwartet die für SIVsmmPBJ beschriebene akute Pathogenese aufwiesen. Alle mit PBJ-wt-infizierten Schweinsaffen wiesen die charakteristischen Symptome wie Anorexie, Exikose und blutigen Durchfall auf. Der Affe, der mit der höheren Dosis von PBJ-wt infiziert wurde, starb am Tag 8 nach der Infektion. Im Gegensatz dazu zeigte keines der mit PBJ- Δ RBD infizierten Tiere eines dieser Symptome. Für die Induktion der akuten Pathogenese spielt demnach die Replikationskinetik oder die Fähigkeit, in unstimulierten PBMC zu replizieren, die sowohl PBJ-wt als auch PBJ- Δ RBD zeigten, keine Rolle.

4.3.2 Wirtsparemeter *in vivo*

Für den genauen Verlauf der akuten Erkrankung wurde die Lymphozytenzahl der infizierten Schweinsaffen untersucht. Während die mit PBJ-wt infizierten Affen eine starke Lymphopenie zeigten, sank die Lymphozytenzahl in den mit PBJ- Δ RBD infizierten Affen nur wenig. Die starke Abnahme der Lymphozytenzahl im Blut der mit PBJ-wt infizierten Affen kann wahrscheinlich zum Teil mit einem Einwandern der Lymphozyten in Milz, Lymphknoten und in das Darmgewebe begründet werden. Tatsächlich wurde in den PBJ-wt-infizierten Affen eine starke Milzhyperplasie und eine massive Hyperplasie der Lymphknoten beobachtet. Die

PBj- Δ RBD-infizierten Tiere zeigten dagegen nur eine schwache Hyperplasie von Milz und Lymphknoten.

Das Organ, welches von einer akuten SIVsmmPBj-Erkrankung am stärksten betroffen ist, ist der Darm. Daher wurde speziell dieser Bereich einer extensiven histopathologischen Untersuchung unterzogen. In den PBj-wt-infizierten Schweinsaffen waren schon makroskopisch nekrotische Läsionen des Kolons sichtbar. Eine genauere histologische Untersuchung des Kolons zeigte einen kompletten Verlust der normalen Villusarchitektur mit Fusionen und Verkürzungen der Mikrovilli. Zusätzlich war, wie schon für SIVsmmPBj-Infektionen beschrieben, in den PBj-wt-infizierten Tieren eine massive Infiltration von Lymphozyten in Lamina propria und auch in tieferliegende Gewebe wie in die Submukosa des Darms zu beobachten. Im Gegensatz dazu wurde bei den PBj- Δ RBD-infizierten Tieren nur wenige Fusionen von Villi und nur eine moderate Infiltration von Lymphozyten in die Darmmukosa beobachtet. Es scheint also, dass die RBD für das Auftreten einer akuten Enteropathie, mit den starken Kolonveränderungen wie in den mit PBj-wt infizierten Tieren zu beobachten, eine wichtige Rolle spielt.

4.3.3 Zytokinausschüttung *in vivo*

Dehghani et al. haben gezeigt, dass hohe Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine in SIVsmmPBj-infizierten Tiere mit der akuten Pathogenese assoziiert sind (Dehghani, et al., 2002). Allerdings blieb unklar, ob die Ausschüttung dieser Zytokine ursächlich oder nur ein sekundärer Effekt war. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden daher IL-2 und IL-6 im Serum der infizierten Tiere untersucht. Die Ergebnisse zeigten einen erhöhten Serumlevel der Zytokine IL-2 und IL-6 in PBj-wt-infizierten Tieren. Dies ist konsistent mit der Sekretion dieser Zytokine in das Medium infizierter PBMC *in vitro*. In PBj- Δ RBD-infizierten Tieren konnte allerdings weder IL-2 noch IL-6 im Serum nachgewiesen werden. Für IL-2 entsprach dies den Erwartungen, da auch PBj- Δ RBD-infizierte PBMC kein IL-2 im Medium zeigten. Für IL-6 scheint sich jedoch die *in vitro* Situation von der *in vivo* zu unterscheiden, da im Serum PBj- Δ RBD-infizierter Tiere kein IL-6 nachweisbar war, während *in vitro* infizierte PBMC IL-6 in das Medium sezernierten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die RBD bei der Induktion der

Sezernierung von IL-2 und IL-6 *in vivo* wichtig ist. Es bleibt aber unklar, ob die Ausschüttung dieser Zytokine ursächlich für die akute Pathogenese ist.

4.3.4 Aktivierung von T-Zellen *in vivo*

Da in dieser Studie gezeigt wurde, dass PBJ-wt eine T-Zellaktivierung *in vitro* induzierte, wurde auch die Aktivierung von Lymphozyten *in vivo* untersucht. Die Sezernierung von IL-2 in PBJ-wt-infizierten Tieren deutet schon auf eine Aktivierung von Lymphozyten hin. Eine genauere Analyse der Zellaktivierung erfolgte aber durch die Analyse der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf T-Zellen. Wie erwartet zeigten die mit PBJ-wt infizierten Tieren einen hohen Anteil aktivierter T-Zellen. Im Blut PBJ-wt-infizierter Tiere wurden am Höhepunkt der akuten Phase der Erkrankung deutlich mehr aktivierte CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen als im Blut PBJ-ΔRBD-infizierter Tiere. Weil aktivierte Lymphozyten in lymphatische Gewebe einwandern, wurde in den gestorbenen Tieren auch die Expression der Aktivierungsmarkern auf den Lymphozyten in Milz und Lymphknoten untersucht. Hier zeigte sich ein noch stärkerer Unterschied in der Anzahl aktivierter T-Zellen zwischen den PBJ-wt- und den PBJ-ΔRBD-infizierten Tieren. In allen untersuchten Geweben war der Anteil der CD25 und CD69 exprimierenden CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen im PBJ-wt-infizierten Tier höher als in den mit PBJ-ΔRBD infizierten Tieren. Die Aktivierung der T-Zellen in den infizierten Tieren ist wahrscheinlich ein Resultat einer ERK-Aktivierung durch PBJ-Nef.

Eine Aktivierung von T-Zellen scheint für das Auftreten von Enteropathien eine wichtige Rolle zu spielen. In fötalen, humanen Explant-Kulturen des humanen Dünndarms konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von T-Zellen eine Villus-Atrophie zur Folge hatte (MacDonald und Spencer, 1988). Dabei korrelierte das Ausmaß der Veränderungen in der Mukosa mit der Aktivierung von T-Zellen, gemessen anhand der CD25-Oberflächenexpression. Weiterhin führte in dieser Studie die Stimulation von T-Zellen durch anti-CD3-Antikörper dosisabhängig zu Villus-Atrophie (Lionetti, et al., 1993; MacDonald und Spencer, 1988). Auch in einer *in vivo* Studie an Mäusen wurde gezeigt, dass eine T-Zell-Aktivierung Gewebeschäden in der Mukosa des Darms erzeugen kann. Dafür wurde Mäusen ein anti-CD3 Antikörper injiziert, welcher T-Zellen aktivierte. Die Mäuse entwickelten bereits nach 4 h Durchfall und in der Histologie zeigten sie

Gewebeveränderungen von Villus-Atrophie bis zu einem kompletten Verlust der Villus-Architektur (Merger, et al., 2002). Durch ähnliche Versuche in Knock-out Mäusen konnte der Beitrag einzelner Gene zur Enteropathie analysiert werden. In Perforin-Knock-out Mäusen war die durch CD3-induzierte Enteropathie am schwächsten ausgeprägt (Merger, et al., 2002). Dies deutet auf einen wichtigen Beitrag von Perforin bei der Entstehung dieser Enteropathie hin. Andere Proteine, wie TNF- α oder IFN- γ schienen in dieser Studie jedoch kaum eine Rolle für die Enteropathie zu spielen (Merger, et al., 2002). Durch diese Ergebnisse wird allerdings auch ein direkter Beitrag proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder IL-6 für die durch SIVsmmPBj induzierte Enteropathie in Frage gestellt.

Auch für HIV und SIV wurde ein Beitrag aktivierter CD8⁺-T-Zellen an Gewebeerstörungen im Darm vermutet (Smit-McBride, et al., 1998). Bei mehr als 75 % aller Patienten mit einer HIV-Infektion zeigen sich Symptome im Magen-Darm-Trakt wie Bauchschmerzen, Exikose, Durchfall und Malabsorption, induziert durch Villus-Atrophie. Damit sind gastrointestinale Erkrankungen eine der häufigsten Begleiterscheinungen und möglicherweise auch Ursachen für Morbidität und Mortalität von Patienten mit HIV und AIDS (Obinna, et al., 1995). Enteropathien von HIV-Patienten wird sowohl opportunistischen Infektionen als auch direkten Effekten von HIV zugeschrieben (Batman, et al., 1998; Zeitz, et al., 1998). Die Erkrankung, die direkt durch HIV induziert wird, wird HIV-Enteropathie genannt. Die Symptome der HIV-Enteropathie sind den durch SIVsmmPBj induzierten sehr ähnlich, allerdings verläuft die HIV-Enteropathie milder. Obwohl der Phänotyp von SIVsmmPBj eine extreme Ausprägung hat, unterscheidet er sich aber eher quantitativ als qualitativ vom HIV-Phänotyp (Whetter, et al., 1998). Es lässt sich deswegen vermuten, dass die HIV-Enteropathie ähnliche Ursachen hat wie die durch SIVsmmPBj induzierte Enteropathie. SIVsmmPBj stellt dadurch ein wichtiges Modellsystem dar, um die Ursachen der HIV-Enteropathie zu untersuchen.

Abschließend lässt sich vermuten, dass die RBD auch bei HIV eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen und damit verbunden auch für die Pathogenese, speziell für die HIV-Enteropathie, spielt.

4.4 Modell für die Induktion der SIVsmmPBj-induzierten Enteropathie

Zusammenfassend lässt sich ein Modell zur Entstehung der SIVsmmPBj-induzierten akuten Enteropathie aufstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass SIVsmmPBj-Nef über die RBD mit Raf interagiert und die Aktivierung dieser Kinase induziert. Diese Aktivierung stimuliert die klassische mitogene Signalkaskade, was in einer Aktivierung von ERK mündet. Aktives ERK induziert nachfolgend zelluläre Antworten wie Zellproliferation, IL-2-Ausschüttung und Zellaktivierung. Dafür sind höchstwahrscheinlich weitere Stimuli notwendig, die offensichtlich auch durch SIVsmmPBj induziert werden. Bei HIV scheinen für die Induktion dieser Kostimuli weitere extravirale Faktoren notwendig zu sein. Eine Aktivierung von T-Zellen führt *in vivo* zu einer massiven Infiltration von aktivierten CD8⁺-T-Zellen in die Schleimhäute des Magen-Darm-Trakts. Wahrscheinlich schütten die aktivierten CD8⁺-T-Zellen hier Perforin aus und induzieren auf diese Weise massive Gewebsveränderungen der Mukosa. Dadurch kommt es zu Symptomen wie blutigem Durchfall und darauf folgend zu Exikose. Ähnliche Mechanismen könnten auch bei der HIV-Enteropathie eine Rolle spielen.

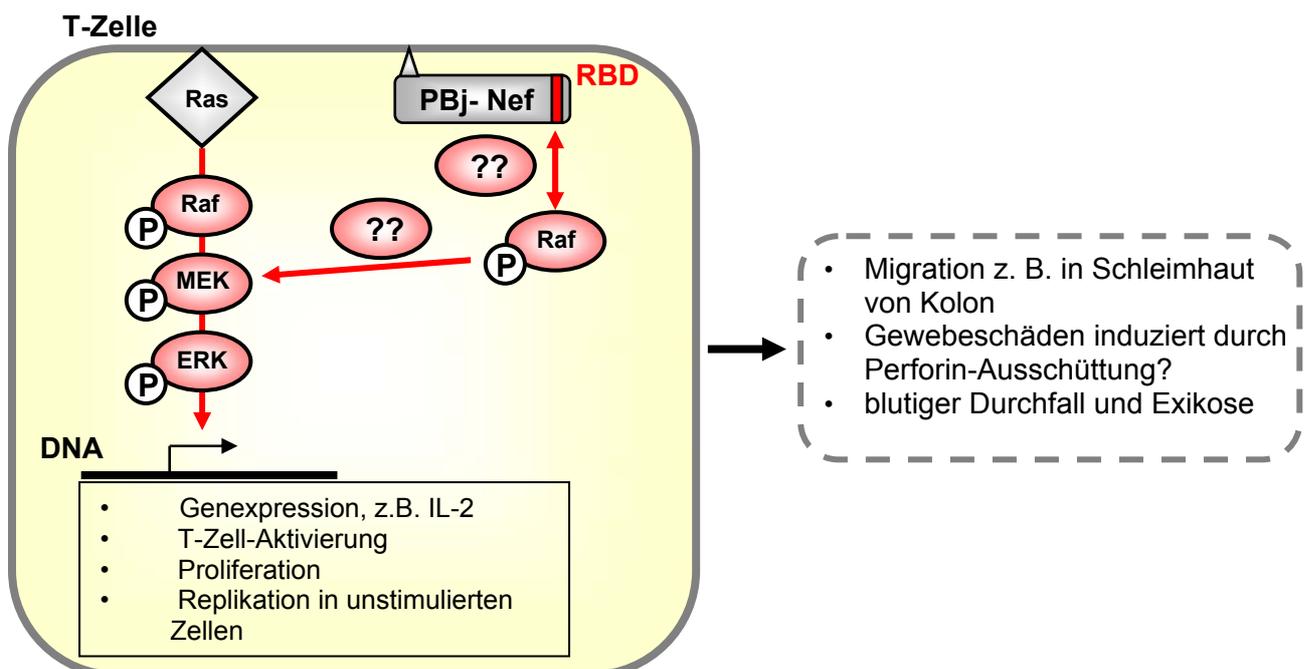


Abb. 26: Modell einer PBj-induzierten Enteropathie.

4.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind grundlegende Mechanismen, die eine akute Enteropathie induzieren, untersucht worden. Für die Überprüfung der oben beschriebenen Hypothese bietet es sich an, die Perforin-Ausschüttung von durch PBj-wt aktivierten PBMC zu untersuchen und Perforin *in vivo* in Gewebeschnitten des Darms durch Immunfärbungen nachzuweisen. In einer weiteren Langzeitstudie sollte auch der Einfluss der RBD auf die AIDS-Pathogenese von SIVsmmPBj untersucht werden.

Um die Relevanz der erzielten Ergebnisse für HIV zu verifizieren, sollten Versuche an humanen PBMC und Untersuchungen an HIV-Patienten vorgenommen werden. Zuerst müssten HIV-*nef*-Gene, sowie zum Vergleich PBj-wt-*nef* und PBj- Δ RBD-*nef*, in ein Expressionsplasmid kloniert werden, um dann die 2 (Aspartat \rightarrow Glycin)-Aminosäuresubstitutionen in die konservierte RBD in HIV-Nef einzufügen. Dann könnten die verschiedenen HIV- oder SIVsmmPBj-*nef*-Gene in T-Zellen transfiziert werden, um den Einfluss auf die Expression von Aktivierungsmarkern und ERK-Aktivierung zu untersuchen. Speziell bei HIV-*nef* sollte eine Aktivierung der T-Zellen durch Nef auch noch mit Kostimuli, wie z.B. durch anti-CD3-Antikörper unterstützt werden. Es wäre zu erwarten, dass Unterschiede in der Zellaktivierung zwischen PBj-wt-Nef und PBj- Δ RBD-Nef zu sehen sind. Darüber hinaus könnte bei HIV-Patienten, die an HIV-Enteropathie leiden, eine Biopsie der Darmmukosa entnommen werden, um dort den Aktivierungsstatus von T-Zellen zu untersuchen.

Für eine detailliertere molekulare Untersuchung ist vorstellbar, die Interaktion von SIVsmmPBj-Nef mit Raf durch Peptide zu inhibieren bzw. die Aktivierung der mitogenen Signalkaskade durch Raf mit Kinase-Inhibitoren zu verhindern. Nach Gabe von Inhibitoren sollte wieder der Einfluss von PBj-wt auf die ERK-Aktivierung und Zellaktivierung untersucht werden. Dadurch könnte geklärt werden, ob der Phänotyp von PBj- Δ RBD nachgeahmt werden könnte. Danach bietet sich an, Schweinsaffen mit PBj-wt zu infizieren und die getesteten Inhibitoren zu applizieren. Dadurch könnte untersucht werden, ob das Auftreten einer akuten Enteropathie verhindert werden kann. In dieser Studie erfolgreiche Inhibitoren könnten somit eventuell zur Verhinderung von HIV-Enteropathien eingesetzt werden.

5. Zusammenfassung

Der Einfluss der zellulären mitogenen Signalkaskade auf die Pathogenese einer Infektion mit HIV oder SIV (humanes, simianes Immundefizienzvirus) ist bis heute weitgehend unbekannt, obwohl in mehreren Studien eine Wechselwirkung zwischen HIV und dieser Signalkaskade festgestellt wurde. Unter anderem wurde eine direkte Interaktion von HIV-1-Nef mit c-Raf, einem wichtigen Mitglied der klassischen mitogenen Signalkaskade, beschrieben. In dieser Arbeit sollten daher die physiologischen Konsequenzen dieser Virus-Wirtszell-Interaktion analysiert werden. Für die Untersuchungen ist der akut enteropathische SIV-Stamm PBj ein geeignetes Modellsystem, da PBj im Gegensatz zu anderen Lentiviren in nicht-mitogen-stimulierten Zellen repliziert. Außerdem induziert PBj die Proliferation von unstimulierten Zellen, wofür eine Aktivierung mitogener Signale notwendig ist. Weiterhin sind die Ursachen für die ausgeprägte PBj-induzierte akute Erkrankung nur unvollständig aufgeklärt.

Für die Untersuchungen wurde ein replikationsfähiger Virusklon von PBj mit zwei Punktmutationen in der Raf-Bindungs-Domäne (RBD) des viralen Nef-Proteins erzeugt. In der erzeugten Virusmutante, PBj- Δ RBD, wurden im Nef-Protein zwei benachbarte Aspartate zu Glycin verändert. Die erzeugte Virusmutante PBj- Δ RBD war in der Lage in unstimulierten primären Zellen zu replizieren und zeigte die gleiche Replikationskinetik wie das Wildtypvirus (PBj-wt). Im Gegensatz zu PBj-wt induzierte PBj- Δ RBD *in vitro* keine Zellproliferation, ERK1/2-Aktivierung oder IL-2-Sezernierung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die RBD für die Fähigkeit, in unstimulierten Zellen zu replizieren, nicht benötigt wird. Dagegen ist die RBD für eine Induktion der ERK-Aktivität, Zellproliferation oder IL-2 Sezernierung notwendig.

Die Infektion von Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) mit PBj-wt induzierte wie erwartet eine akute Enteropathie mit Symptomen wie blutigem Durchfall, Anorexie, Exikose und Tod. In pathologischen Untersuchungen wurden in den mit PBj-wt infizierten Tieren nekrotische Läsionen im gesamten Darmbereich beobachtet. Die Histopathologie des Kolons zeigte, dass die gesamte Mikrovilli-Struktur der

Darmschleimhäute zerstört war. Darüber hinaus war eine massive Infiltration von Lymphozyten in die Mikrovilli erkennbar. Im Gegensatz dazu entwickelte keiner der mit PBj- Δ RBD infizierten Schweinsaffen eines der für SIV-PBj charakteristischen Symptome, trotz einer vergleichbaren Replikationskinetik *in vivo*. Zusätzlich waren makroskopisch keine Veränderungen des Kolons festzustellen. Die histologische Untersuchung des Kolons der PBj- Δ RBD-infizierten Schweinsaffen zeigte lediglich eine moderate Infiltration von Lymphozyten in die Mikrovilli. Die Analyse der frühen und späten Aktivierungsmarker auf T-Zellen im peripheren Blut und in den lymphatischen Geweben Milz und Lymphknoten zeigte, dass in PBj-wt-infizierten Schweinsaffen ein deutlich erhöhter Anteil aktivierter CD3⁺-T-Zellen im Vergleich zu PBj- Δ RBD-infizierten Affen nachweisbar war.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass in PBj-infizierten Zellen über eine Interaktion von PBj-Nef mit c-Raf die klassische mitogene Signalkaskade aktiviert wird. Dies induziert wiederum physiologische Aktivitäten wie Zellproliferation, Zellaktivierung und IL-2-Ausschüttung. Die festgestellte Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen führt *in vivo* zu einer massiven Infiltration von aktivierten CD8⁺-T-Zellen in die Schleimhäute des Magen-Darm-Trakts. Es ist anzunehmen, dass die aktivierten CD8⁺-T-Zellen hier Perforin ausschütten und auf diese Weise massive Gewebsveränderungen der Mucosa induzieren. In der Folge kommt es zu den beobachteten Symptomen wie blutigem Durchfall und daraufhin zu Exikose. Ähnliche Mechanismen könnten auch bei der HIV-Enteropathie eine Rolle spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine Verhinderung der Nef-Raf-Interaktion das Auftreten einer Enteropathie unterdrücken könnte. Die Nef-Raf-Interaktion ist somit ein potentielles Ziel für einen therapeutischen Ansatz.

6. Literaturverzeichnis

(1989). HIV-associated enteropathy. *Lancet* 2, 777-8.

Adachi, M., Fukuda, M. und Nishida, E. (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *Embo J* 18, 5347-58.

Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E. und Trono, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76, 853-64.

Alexander, L., Du, Z., Rosenzweig, M., Jung, J. U. und Desrosiers, R. C. (1997). A role for natural simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 nef alleles in lymphocyte activation. *J Virol* 71, 6094-9.

Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. und Berger, E. A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272, 1955-8.

Avots, A., Hoffmeyer, A., Flory, E., Cimanis, A., Rapp, U. R. und Serfling, E. (1997). GABP factors bind to a distal interleukin 2 (IL-2) enhancer and contribute to c-Raf-mediated increase in IL-2 induction. *Mol Cell Biol* 17, 4381-9.

Barre-Sinoussi, F., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-71.

Batman, P. A., et al. (1998). HIV enteropathy: comparative morphometry of the jejunal mucosa of HIV infected patients resident in the United Kingdom and Uganda. *Gut* 43, 350-5.

Benson, R. E., Sanfridson, A., Ottinger, J. S., Doyle, C. und Cullen, B. R. (1993). Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J Exp Med* 177, 1561-6.

Birx, D. L., et al. (1993). Association of interleukin-6 in the pathogenesis of acutely fatal SIVsmm/PBj-14 in pigtailed macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9, 1123-9.

Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. und Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-73.

Chardin, P., Camonis, J. H., Gale, N. W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M. H. und Bar-Sagi, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260, 1338-43.

- Choe, H., et al.** (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85, 1135-48.
- Cichutek, K. und Norley, S.** (1993). Lack of immune suppression in SIV-infected natural hosts. *Aids 7 Suppl 1*, S25-35.
- Clark, S. J., et al.** (1991). High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 324, 954-60.
- Clavel, F., et al.** (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343-6.
- Clayton, L. K., Hussey, R. E., Steinbrich, R., Ramachandran, H., Husain, Y. und Reinherz, E. L.** (1988). Substitution of murine for human CD4 residues identifies amino acids critical for HIV-gp120 binding. *Nature* 335, 363-6.
- Coffin, J., et al.** (1986). What to call the AIDS virus? *Nature* 321, 10.
- Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D. und Baltimore, D.** (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 391, 397-401.
- Cooper, D. A., et al.** (1985). Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1, 537-40.
- Cullen, B. R.** (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93, 685-92.
- Cummins, A. G., LaBrooy, J. T., Stanley, D. P., Rowland, R. und Shearman, D. J.** (1990). Quantitative histological study of enteropathy associated with HIV infection. *Gut* 31, 317-21.
- Daar, E. S., Moudgil, T., Meyer, R. D. und Ho, D. D.** (1991). Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 324, 961-4.
- Daniel, M. D., et al.** (1985). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* 228, 1201-4.
- Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H. W., Troppmair, J. und Rapp, U. R.** (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 19, 474-80.
- Deacon, N. J., et al.** (1995). Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270, 988-91.
- Dehghani, H., Brown, C. R., Plishka, R., Buckler-White, A. und Hirsch, V. M.** (2002). The ITAM in Nef influences acute pathogenesis of AIDS-inducing simian immunodeficiency viruses SIVsm and SIVagm without altering kinetics or extent of viremia. *J Virol* 76, 4379-89.

Deng, H., et al. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661-6.

Dewhurst, S., Embretson, J. E., Anderson, D. C., Mullins, J. I. und Fultz, P. N. (1990). Sequence analysis and acute pathogenicity of molecularly cloned SIVSMM-PBj14. *Nature* 345, 636-40.

Dittmar, M. T., Cichutek, K., Fultz, P. N. und Kurth, R. (1995). The U3 promoter region of the acutely lethal simian immunodeficiency virus clone smmPBj1.9 confers related biological activity on the apathogenic clone agm3mc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1362-6.

Dragic, T., et al. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667-73.

Du, Z., et al. (1995). Identification of a nef allele that causes lymphocyte activation and acute disease in macaque monkeys. *Cell* 82, 665-74.

Du, Z., Ilyinskii, P. O., Sasseville, V. G., Newstein, M., Lackner, A. A. und Desrosiers, R. C. (1996). Requirements for lymphocyte activation by unusual strains of simian immunodeficiency virus. *J Virol* 70, 4157-61.

DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H. und Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-87.

Falk, S., Muller, H., Schmidts, H. L. und Stutte, H. J. (1986). [Morphological findings in the lymphadenopathy syndrome (LAS) and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)]. *Dtsch Med Wochenschr* 111, 714-8.

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. und Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-7.

Finzi, D. und Siliciano, R. F. (1998). Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell* 93, 665-71.

Flory, E., Weber, C. K., Chen, P., Hoffmeyer, A., Jassoy, C. und Rapp, U. R. (1998). Plasma membrane-targeted Raf kinase activates NF-kappaB and human immunodeficiency virus type 1 replication in T lymphocytes. *J Virol* 72, 2788-94.

Folks, T., et al. (1985). Characterization of a continuous T-cell line susceptible to the cytopathic effects of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-associated retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4539-43.

Fultz, P. N., McClure, H. M., Anderson, D. C. und Switzer, W. M. (1989). Identification and biologic characterization of an acutely lethal variant of simian immunodeficiency virus from sooty mangabeys (SIV/SMM). *AIDS Res Hum Retroviruses* 5, 397-409.

- Fultz, P. N.** (1991). Replication of an acutely lethal simian immunodeficiency virus activates and induces proliferation of lymphocytes. *J Virol* 65, 4902-9.
- Gaines, H., et al.** (1990). Immunological changes in primary HIV-1 infection. *Aids* 4, 995-9.
- Gale, N. W., Kaplan, S., Lowenstein, E. J., Schlessinger, J. und Bar-Sagi, D.** (1993). Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* 363, 88-92.
- Gao, F., et al.** (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 436-41.
- Garcia, J. V. und Miller, A. D.** (1991). Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 350, 508-11.
- Geleziunas, R., Xu, W., Takeda, K., Ichijo, H. und Greene, W. C.** (2001). HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature* 410, 834-8.
- Gu, Y. und Sundquist, W. I.** (2003). Good to CU. *Nature* 424, 21-2.
- Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M. und Sharp, P. M.** (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287, 607-14.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80.
- Hanna, Z., Kay, D. G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S. und Jolicoeur, P.** (1998). Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95, 163-75.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M. und Markowitz, M.** (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123-6.
- Hodge, D. R., Dunn, K. J., Pei, G. K., Chakrabarty, M. K., Heidecker, G., Lautenberger, J. A. und Samuel, K. P.** (1998). Binding of c-Raf1 kinase to a conserved acidic sequence within the carboxyl-terminal region of the HIV-1 Nef protein. *J Biol Chem* 273, 15727-33.
- Jacque, J. M., Mann, A., Enslin, H., Sharova, N., Brichacek, B., Davis, R. J. und Stevenson, M.** (1998). Modulation of HIV-1 infectivity by MAPK, a virion-associated kinase. *Embo J* 17, 2607-18.
- Jameson, B. A., Rao, P. E., Kong, L. I., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Hood, L. E. und Kent, S. B.** (1988). Location and chemical synthesis of a binding site for HIV-1 on the CD4 protein. *Science* 240, 1335-9.

- Kanki, P. J., Alroy, J. und Essex, M.** (1985). Isolation of T-lymphotropic retrovirus related to HTLV-III/LAV from wild-caught African green monkeys. *Science* 230, 951-4.
- Kapembwa, M. S., Batman, P. A., Fleming, S. C. und Griffin, G. E.** (1989). HIV enteropathy. *Lancet* 2, 1521-2.
- Kestler, H. W., 3rd, Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D. und Desrosiers, R. C.** (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65, 651-62.
- Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J. und Baltimore, D.** (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol* 63, 3708-13.
- Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettler, D. B., Sullivan, J. L. und Desrosiers, R. C.** (1995). Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* 332, 228-32.
- Kotov, A., Zhou, J., Flicker, P. und Aiken, C.** (1999). Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol* 73, 8824-30.
- Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R. und Avruch, J.** (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417-21.
- Kyriakis, J. M., et al.** (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-60.
- Landau, N. R., Warton, M. und Littman, D. R.** (1988). The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature* 334, 159-62.
- Letvin, N. L., et al.** (1985). Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science* 230, 71-3.
- Lionetti, P., Breese, E., Braegger, C. P., Murch, S. H., Taylor, J. und MacDonald, T. T.** (1993). T-cell activation can induce either mucosal destruction or adaptation in cultured human fetal small intestine. *Gastroenterology* 105, 373-81.
- MacDonald, T. T. und Spencer, J.** (1988). Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. *J Exp Med* 167, 1341-9.
- Maddon, P. J., Dalglish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A. und Axel, R.** (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333-48.

- Mariani, R., Kirchoff, F., Greenough, T. C., Sullivan, J. L., Desrosiers, R. C. und Skowronski, J.** (1996). High frequency of defective nef alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **70**, 7752-64.
- McClure, H. M., Anderson, D. C., Fultz, P. N., Ansari, A. A., Lockwood, E. und Brodie, A.** (1989). Spectrum of disease in macaque monkeys chronically infected with SIV/SMM. *Vet Immunol Immunopathol* **21**, 13-24.
- Melikyan, G. B., Markosyan, R. M., Hemmati, H., Delmedico, M. K., Lambert, D. M. und Cohen, F. S.** (2000). Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* **151**, 413-23.
- Mellors, J. W., Rinaldo, C. R., Jr., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A. und Kingsley, L. A.** (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**, 1167-70.
- Merger, M., et al.** (2002). Defining the roles of perforin, Fas/FasL, and tumour necrosis factor alpha in T cell induced mucosal damage in the mouse intestine. *Gut* **51**, 155-63.
- Miedema, F., Tersmette, M. und van Lier, R. A.** (1990). AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunol Today* **11**, 293-7.
- Miller, M. D., Warmerdam, M. T., Gaston, I., Greene, W. C. und Feinberg, M. B.** (1994). The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med* **179**, 101-13.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Novembre, F. J., Johnson, P. R., Lewis, M. G., Anderson, D. C., Klumpp, S., McClure, H. M. und Hirsch, V. M.** (1993). Multiple viral determinants contribute to pathogenicity of the acutely lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj variant. *J Virol* **67**, 2466-74.
- Novembre, F. J., et al.** (1996). Deletion of the nef gene abrogates the ability of SIV smmPBj to induce acutely lethal disease in pigtail macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**, 727-36.
- Obinna, F. C., et al.** (1995). Comparative assessment of small intestinal and colonic permeability in HIV-infected homosexual men. *Aids* **9**, 1009-16.

- Owaki, H., Varma, R., Gillis, B., Bruder, J. T., Rapp, U. R., Davis, L. S. und Geppert, T. D.** (1993). Raf-1 is required for T cell IL2 production. *Embo J* 12, 4367-73.
- Page, K. A., Landau, N. R. und Littman, D. R.** (1990). Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity. *J Virol* 64, 5270-6.
- Pandori, M. W., Fitch, N. J., Craig, H. M., Richman, D. D., Spina, C. A. und Guatelli, J. C.** (1996). Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J Virol* 70, 4283-90.
- Pantaleo, G., Graziosi, C. und Fauci, A. S.** (1993). New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 328, 327-35.
- Peter, F.** (1998). HIV nef: the mother of all evil? *Immunity* 9, 433-7.
- Renkema, G. H. und Saksela, K.** (2000). Interactions of HIV-1 NEF with cellular signal transducing proteins. *Front Biosci* 5, D268-83.
- Rouse, J., et al.** (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027-37.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4.
- Saucier, M., Hodge, S., Dewhurst, S., Gibson, T., Gibson, J. P., McClure, H. M. und Novembre, F. J.** (1998). The tyrosine-17 residue of Nef in SIVsmmPBj14 is required for acute pathogenesis and contributes to replication in macrophages. *Virology* 244, 261-72.
- Schrager, J. A. und Marsh, J. W.** (1999). HIV-1 Nef increases T cell activation in a stimulus-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8167-72.
- Schrager, J. A., Der Minassian, V. und Marsh, J. W.** (2002). HIV Nef increases T cell ERK MAP kinase activity. *J Biol Chem* 277, 6137-42.
- Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. und Heard, J. M.** (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2, 338-42.
- Schwiebert, R. und Fultz, P. N.** (1994). Immune activation and viral burden in acute disease induced by simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14: correlation between in vitro and in vivo events. *J Virol* 68, 5538-47.
- Seger, R. und Krebs, E. G.** (1995). The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9, 726-35.

Shaw, G. M., et al. (1985). HTLV-III infection in brains of children and adults with AIDS encephalopathy. *Science* 227, 177-82.

Shearer, G. M. und Clerici, M. (1998). Cytokine profiles in HIV type 1 disease and protection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 Suppl 2, S149-52.

Simmons, A., Aluvihare, V. und McMichael, A. (2001). Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity* 14, 763-77.

Smit-McBride, Z., Mattapallil, J. J., McChesney, M., Ferrick, D. und Dandekar, S. (1998). Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J Virol* 72, 6646-56.

Spina, C. A., Kwoh, T. J., Chowes, M. Y., Guatelli, J. C. und Richman, D. D. (1994). The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J Exp Med* 179, 115-23.

Steffens, C. M. und Hope, T. J. (2001). Recent advances in the understanding of HIV accessory protein function. *Aids* 15 Suppl 5, S21-6.

Swigut, T., Shohdy, N. und Skowronski, J. (2001). Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *Embo J* 20, 1593-604.

Taylor-Fishwick, D. A. und Siegel, J. N. (1995). Raf-1 provides a dominant but not exclusive signal for the induction of CD69 expression on T cells. *Eur J Immunol* 25, 3215-21.

Tindall, B. und Cooper, D. A. (1991). Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *Aids* 5, 1-14.

Wagener, S., et al. (1998). The U3 promoter and the nef gene of simian immunodeficiency virus (SIV) smmPBj1.9 do not confer acute pathogenicity upon SIVagm. *J Virol* 72, 3446-50.

Wei, X., et al. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373, 117-22.

Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387, 426-30.

Whetter, L., Novembre, F. J., Saucier, M., Gummuluru, S. und Dewhurst, S. (1998). Costimulatory pathways in lymphocyte proliferation induced by the simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14. *J Virol* 72, 6155-8.

Wu, Y. und Marsh, J. W. (2001). Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* 293, 1503-6.

- Xu, X. N., et al.** (1997). Evasion of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses by nef-dependent induction of Fas ligand (CD95L) expression on simian immunodeficiency virus-infected cells. *J Exp Med* 186, 7-16.
- Xu, X. N., et al.** (1999). Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J Exp Med* 189, 1489-96.
- Yang, X., Chen, Y. und Gabuzda, D.** (1999). ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappaB. *J Biol Chem* 274, 27981-8.
- Yang, X. und Gabuzda, D.** (1999). Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* 73, 3460-6.
- Zeit, M., Ullrich, R., Schneider, T., Kewenig, S., Hohloch, K. und Riecken, E. O.** (1998). HIV/SIV enteropathy. *Ann N Y Acad Sci* 859, 139-48.
- Zhu, T., Korber, B. T., Nahmias, A. J., Hooper, E., Sharp, P. M. und Ho, D. D.** (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391, 594-7.

7. Abkürzungsverzeichnis

Basen und Aminosäuren

A	Adenin	T	Thymin	Arg	Arginin
G	Guanin	U	Uracil	Ser	Serin
C	Cytosin			Th	Threonin
Ala	Alanin	Ile	Isoleucin	Val	Valin
Cys	Cystein	Lys	Lysin	Trp	Tryptophan
Asp	Aspartat	Leu	Leucin	Tyr	Tyrosin
Glu	Glutamat	Met	Methionin		
Phe	Phenylalanin	Asn	Asparagin		
Gly	Glycin	Pro	Prolin		
His	Histidin	Gln	Glutamin		
X	beliebige Aminosäure				

Abkürzungen

aa	„aminoacid“, dt. Aminosäure
Abb.	Abbildung
agm	Afrikanische grüne Meerkatze,
AIDS	„Aquired Immunodeficiency Syndrome“, dt. erworbene Immunschwäche
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz-Gen
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ASK1	„apoptosis signaling regulating kinase 1“
ATP	Adenosin-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CA	Kapsid-Protein
cDNA	„complementary“ dt. komplementäre DNA
CIP	„Calf intestinal phosphatase“ dt. Phosphatase aus Kälberdarm
CPZ	Schimpanse, <i>Pan troglodytes</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
ds	„double stranded“, dt. doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced Green Fluorescence Protein
env	„envelope“, Gen für virales Hüllprotein

Env	virales Hüllprotein
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	„extracellular signal-regulated protein kinase“
<i>et al.</i>	und andere
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung/-analyse
FasL	Fas-Ligand
FKS	fötales Kälberserum
FITC	5'-Fluoroisothiocyanat
G	Gramm
<i>gag</i>	„Group-specific antigen“, dt. virales Strukturgen
GDP	Guanosinnukleotiddiphosphat
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosinnukleotidtriphosphat
h	Stunde(n)
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HTLV	humanes T-Zell-Leukämievirus
HRP	„horse radish peroxidase“, dt. Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
IN	virale Integrase
IPA	<i>in situ</i> Immun-Peroxidase-Assay
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
JNK	„c-Jun NH2-terminal kinase“
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	β-Galaktosidase-Gen
LB-Medium	Luria Bertani Medium
Lsg	Lösung
LTR	„long terminal repeat“
Luc	Luciferase
m	Milli-
M	molar
MA	virales Matrixprotein
mac	Rhesusaffe, <i>Macaca mulatta</i>
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	„major histocompatibility complex“
mdn	Mandrille, <i>Papio sphinx</i>
min	Minute(n)
μ	micro
moi	„multiplicity of infection“ dt. Multiplizität der Infektion
mRNA	„messenger RNA“, dt. Boten-RNA
n	Nano-
NC	virales Nukleokapsidprotein
Nef	Negative Factor; akzessorisches virales Protein
nem	Schweinsaffen, <i>Macaca nemestrina</i>
NSP	Kombination Neomycin-Streptomycin-Penicillin
OD	optische Dichte
ORF	„open reading-frame“, dt. offener Leserahmen
ori	„origin of replication“, dt. Replikationsursprung
PBMC	„peripheral blood mononuclear cells“, dt. periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	„phosphate buffered saline“

PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	PE conjugiert mit Cyan5
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PHA	Phytohemagglutinin
p.i.	„post infection“, dt. nach Infektion
PIC	Präintegrationskomplex
<i>pol</i>	Gen für virale Enzyme (RT, PR, IN)
PR	virale Protease
RBD	Raf-Bindungsdomäne
Rev	virales regulatorisches Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“, dt. Umdrehungen pro Minute
RPMI	Kulturmedium aus dem „Roswell Park Memorial Institute“
RRE	Rev-responsive-Elemente
RT	virale reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SHIV	simianes-humanes Immundefizienzvirus (Hybrid)
SIV	simianes Immundefizienzvirus
smm	„sootey mangabey monkee“, dt. Schopfmangabe, <i>Cercocebus torquatus atys</i>
SP	Kombination Streptomycin-Penicillin
ss	„single stranded“, dt. einzelsträngig
SU	Oberflächeneinheit des Hüllproteins
syk	Syke's Affe, <i>Cercopithecus mitis</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAR	„Trans-Activator-Region“
Tat	viraler transkriptioneller Transaktivator
TCR	„T cell receptor“, dt. T-Zell-Rezeptor
TM	Transmembraneinheit des Hüllproteins
U	„unit“, dt. Einheit
UZ	Ultrazentrifuge
Vif	„viral infectivity factor“, akzessorisches Protein
Vpr	„viral protein r“, akzessorisches Protein
Vpu	„viral protein u“, akzessorisches Protein
Vpx	„viral protein x“, akzessorisches Protein
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

8. Danksagung

Herrn Dr. Egbert Flory danke ich für die sehr angenehme und freundliche Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe, sowie für seine wissenschaftliche Anleitung, seinen Enthusiasmus und die ständige Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz vom Institut für Humangenetik der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main danke ich für die freundliche, fachübergreifende und unkomplizierte Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Cichutek für seine wissenschaftliche Unterstützung, der Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Abteilung Medizinische Biotechnologie am Paul-Ehrlich-Institut, sowie der freundlichen und hilfsbereiten Art seine Abteilung zu leiten.

Speziell möchte ich mich auch bei Dr. Ralf Sanzenbacher, Sylvia Raupp und Renate Wenig für die wissenschaftliche Unterstützung und die hervorragende Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Abteilung Medizinische Biotechnologie, die mir bei der Bewältigung des Laboralltags zur Seite standen, stets zur fachlichen Diskussion bereit waren und durch ihre Kollegialität, Witz und Humor für ein sehr angenehmes Arbeitsklima sorgten. Danke an: Christoph Merten, Heide Muckenfuss, Michael Mühlebach, Matthias Hamdorf, Nina Wolfrum, Tanja Kearns, Dr. Jörn Stitz, Dr. Renate König, Dr. Steffi Steidl, Daphne Nikles, Irene Hartl, Sabine Fengler, Sile Schuele, Richard Schneider, Dr. Carsten Münk, Dr. Christian Buchholz und Dr. Matthias Schweizer.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden: Amir, Suelika, Sascha, Jana, Michael, Vicky, Stefan, Knut, Frank, Nina, Thomas, Julia, Tanja, Celian, Giuseppe und den anderen. Ihre Unterstützung war für mich eine große Hilfe.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Cheick Coulibaly, Dr. Roland Plesker und Julia Seidl bedanken für die Zusammenarbeit und die fachlichen Tips, die sie mir während der Durchführung der Arbeit gegeben haben.

Ein besonderer Dank geht an meine Freundin Anja Gießamer für die Hilfe bei dieser Doktorarbeit und die Unterstützung und Motivation, die sie mir gegeben hat.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern Guido und Christine Tschulena, meinem Bruder Ralf und seiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung das Studium und die Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären, und auf deren Hilfe ich mich immer verlassen konnte.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ulrich Tschulena
Geburtsdatum/-ort	23. 4.1976 in Frankfurt am Main
Familienstand	ledig
Nationalität	österreichisch

Wissenschaftliche Tätigkeit und Ausbildung

01 / 2001 – dato	Promotionsstudium der Biologie Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt
01 / 2001 – 03 / 2001	Doktorarbeit Paul-Ehrlich-Institut, Langen Abt. Medizinische Biotechnologie Leitung: Prof. Dr. K. Cichutek Titel: „Einfluss der Raf-Bindungsdomäne im Nef-Protein auf die Pathogenität von SIVsmmPBj“
11 / 2000	Diplom: Diplom-Biologe, Gesamtnote 1,1
03 / 2000 – 11 / 2000	Diplomarbeit European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg Leitung: Dr. Pernille Rorth Titel: „Functional characterization of Drosophila Endosulfine“
10 / 1997 – 11 / 2000	Hauptstudium der Biologie Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Schwerpunkte: Molekularbiologie, Zellbiologie, Biochemie
10 / 1998 – 07 / 1999	ERASMUS-Stipendium University of Glasgow, Großbritannien
09 / 1997	Vordiplom: Biologie, Gesamtnote „sehr gut“
10 / 1995 – 09 / 1997	Grundstudium der Biologie Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
06 / 1995	Abitur (Allgemeine Hochschulreife) Christian-Wirth-Schule, Usingen

Publikationsliste zur Dissertation von Ulrich Tschulena

(„Einfluss der Raf-Bindungsdomäne im Nef-Protein auf die Pathogenität von SIVsmmPBj“)

Publikationen: “Raf-binding domain in Nef of SIVsmmPBj is essential for acute lethal enteropathy”; **Tschulena U***, Sanzenbacher R*, Plesker R, Cheick C, Raupp S, Wenig R, Cichutek K, Flory E; eingereicht im März 2004. * contributed equally

“Reduction of HIV-1 infection in primary human blood cells using a bicistronic MLV derived retroviral vector expressing a siRNA against CCR5 coreceptor”; **Tschulena U**, Agami R, Wenig R, Raupp S, Hamdorf M, Sanzenbacher R, Muckenfuss H, Cichutek K, Flory E; im *European Journal of Medical Research* (2003) Vol. 8, p 83.

„Stable transduction of quiescent human primary celly by simian lentiviral vector PBj“; Mühlebach MD, Wolfrum N, Völker B, **Tschulena U**, Sanzenbacher R, Flory E, Cichutek K, Schweizer M; eingereicht im März 2004

„SIVagm3 induces Interleukine-2 expression via the CD28RE located on the IL-2 promoter“; Muckenfuss H, Sanzenbacher R, Hamdorf M, **Tschulena U**, Distler E, Cichutek K, Flory E; International Cytokine Society: Annual Meeting 2003; Medimond, Bologna.

„Interleukin-2 induction by SIVagm3 involves MAPK activity and is independent on calcineurin/NF-AT signaling“; Muckenfuss H, Sanzenbacher R, Hamdorf M, **Tschulena U**, Avots A, Cichutek K, Flory E; Manuskript in Vorbereitung.

“Development of an inducible siRNA expression cassette“; Manuskript in Vorbereitung.

Präsentationen: “Reduction of HIV-1 infection in primary human blood cells using a MLV derived retroviral vector expressing an siRNA against primary HIV-1 coreceptor”; **Tschulena U**, Wenig R, Raupp S, Hamdorf M, Sanzenbacher R, Muckenfuss H, Agami R, Grez M, Steidl S, Schweizer M, Cichutek K, Flory E” (2003) Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Berlin.

“Disruption of specific crosstalk between viral accessory protein and mitogenic signaling cascade abrogates acute retroviral pathogenesis”, **Tschulena U**, Sanzenbacher R, Plesker R, Coulibaly C, Raupp S, Wenig R, Cichutek K, Flory E (2003) European AIDS Conference in Warschau, Polen.

Poster:

“A novel siRNA expression system for human cells mediates specific inhibition of target genes”; **Tschulena U**, Hamdorf M, Sanzenbacher R, Buchholz C, Muckenfuß H, Wenig R, Koenig R, Cichutek K, Flory E (2002) European Society of Gene Therapy Meeting in Antibes, Frankreich.

“Tat protein of SIVagm3 is a phosphorylation target of MAP kinase Erk 2 in virus-induced interleukin-2 activation”; Muckenfuss H, Sanzenbacher R, **Tschulena U**, Holznagel E, Avots A, Cichutek K, Flory E, (2003) Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Berlin.

“A novel siRNA expression system for human cells mediates specific inhibition of target genes”; Hamdorf M*, **Tschulena U***, Sanzenbacher R, Buchholz CJ, Muckenfuss H, Wenig R, Koenig R, Flory E, Cichutek K, (2003) Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Berlin. * contributed equally

“Reduction of HIV-1 infection in primary human blood cells using a bicistronic MLV derived retroviral vector expressing a siRNA against CCR5 coreceptor”; **Tschulena U**, Agami R, Wenig R, Raupp S, Hamdorf M, Sanzenbacher R, Muckenfuss H, Cichutek K, Flory E, (2003) Meeting of the German-Austrian AIDS Society in Hamburg.