

Universitätsklinikum Ulm  
Institut für Molekulare Virologie  
Leiter: Prof. Dr. Frank Kirchhoff

# **Bedeutung eines potentiellen Cholesterin-Erkennungs- Motifs für die Funktion des Nef-Proteins**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von  
Verena Kümmerlen  
aus Hanau am Main  
2011

Amtierender Dekan: Ú![-Ö:Ě/Q { æÁ äc@

1. Berichterstatter: Ú![-Ö:Ě/Šā&@~

2. Berichterstatter: Ú![-Ö:Ě/Šā•{ >|^!

Tag der Promotion: FJĚ ĚFF

*Für meine lieben Eltern Otto und Petra Kümmerlen  
In Gedenken an meinen Vater*

**Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis.....	III
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie und Entdeckung der humanen Immundefizienzviren.....	1
1.2 Der Ursprung von HIV .....	1
1.3 Struktur der Immundefizienzviren .....	2
1.4 Das Nef-Protein .....	3
1.5 Die potentielle Relevanz von Cholesterin für die virale Replikation .....	4
1.6 Aufgabenstellung .....	5
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>7</b>
2.1 Material.....	7
2.1.1 Eukaryotische Zelllinien.....	7
2.1.2 Bakterien .....	7
2.1.3 Nukleinsäuren .....	7
2.1.4 Enzyme .....	9
2.1.5 Reagenzien und Laborhilfsmittel .....	9
2.1.6 Reagenzsysteme (Kits) .....	10
2.1.7 Medien.....	10
2.1.8 Lösungen und Puffer .....	11
2.1.9 HIV-1 p24 Kapsid-Antigen-ELISA.....	12
2.1.10 Antikörper .....	12
2.2. Methoden .....	14
2.2.1 DNA-Methoden.....	14
2.2.2 Zellkultur.....	15
2.2.3 Bakterienkultur .....	15
2.2.4 Klonierung von <i>nef</i> -Allelen in provirale Vektoren.....	16
2.2.5 Virale Methoden .....	17
2.2.6 CYP51A1 Expressionsassay.....	19
2.2.7 FACS Analysen .....	19
2.2.8 Western Blot.....	20
2.2.9 Computerprogramme und Datenquellen .....	20
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>22</b>
3.1 Generierte Nef-Varianten.....	22

---

3.2 Das potentielle Cholesterin- Erkennungs-Motif ist nicht essentiell für die virale Infektiosität .....	24
3.3 Das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif ist nicht essentiell für die Nef-vermittelte Steigerung der Replikation .....	26
3.4 Rolle des potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motifs in der Nef-vermittelten Modulation von Oberflächenrezeptoren .....	29
3.5 Das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif hat keinen Einfluss auf die Nef-abhängige Beeinflussung der Cholesterinsynthese .....	34
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>43</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>48</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>50</b>
Danksagung	
Erklärung	

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AIDS	engl.: <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
Amp	Ampicillin
APC	engl.: <i>antigen presenting cell</i>
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] TTP	engl.: <i><math>\alpha</math>-32 phosphorus isotope-deoxythymidine triphosphate</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
$\beta$ -gal	$\beta$ -Galactosidase
c	centi ( $10^{-2}$ )
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	engl.: <i>cluster designation</i>
Ci	Curie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cpz	engl.: <i>chimpanzee</i>
CRM	engl.: <i>cholesterol recognition motif</i>
CTL	engl.: <i>cytotoxic T lymphocyte</i>
CYP51	Cytochrom P450 Enzym (Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase)
DMEM	engl.: <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleidsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	engl.: <i>envelope</i>
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i>
FDPS	Farnesyldiphosphatsynthase
g	Gramm
Gag	engl.: <i>group specific antigen</i>
HBS	engl.: <i>HEPES buffered saline</i>
HCl	Salzsäure

HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
h	Stunde
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HIV	engl.: <i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	engl.: <i>human leucozyte antigen</i>
HRP	engl.: <i>horse radish peroxidase</i>
li	engl.: <i>invariant chain</i> (CD74)
IL-2	Interleukin 2
IRES	engl. : <i>internal ribosomal entry site</i>
KCl	Kaliumchlorid
k	Kilo (10 <sup>3</sup> )
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	engl.: <i>Lysogeny Broth</i>
LTR	engl.: <i>long terminal repeat</i>
m	Meter
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
μ	Micro (10 <sup>-6</sup> )
M	Molarität (mol/l)
MFI	engl.: <i>mean fluorescence intensity</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i>
N	Normalität
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NK Zelle	Natürliche Killer Zelle
Nef	engl.: <i>negative factor</i>
NIG	engl.: <i>nef-IRES-eGFP</i>
NP-40	Nonyl Phenoxypropylpolyethoxyethanol
Oligo-dT	Oligodesoxythymidin

p	Signifikanzwert
PBL	engl.: <i>primary blood lymphocyte</i>
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohaemagglutinin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
Poly-A	Polyadenosin
PSL	engl.: <i>photo stimulated light emission</i>
<i>P.t.s.</i>	<i>Pan troglodytes schweinfurthii</i>
<i>P.t.t.</i>	<i>Pan troglodytes troglodytes</i>
Rev	engl.: <i>Regulator of expression of virion proteins</i>
RIPA buffer	Radioimmunoprecipitations Puffer
RLU	engl.: <i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i>
RPMI	engl.: <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Reverse Transkriptase
SEM	engl.: <i>standard error of the mean</i>
SD	engl.: <i>standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
SIV	engl.: <i>simian immunodeficiency virus</i>
SOC	engl.: <i>super optimal broth</i>
SRE	engl.: <i>sterol responsive element</i>
SREBP	engl.: <i>sterol regulatory element binding protein</i>
Strep	Streptomycin
Tab	Tabelle
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
Tat	engl.: <i>transactivator of transcription</i>



TCR	engl.: <i>T Cell Receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
Vif	engl.: <i>viral infectivity factor</i>
Vpr	engl.: <i>viral protein rapid</i>
Vpu	engl. : <i>viral protein out</i>
VSV-G	engl. : <i>vesicular stomatitis virus glycoprotein</i>
WT	Wildtyp
www	engl.: <i>world wide web</i>

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

## 1. Einleitung

### 1.1 Epidemiologie und Entdeckung der humanen Immundefizienzviren

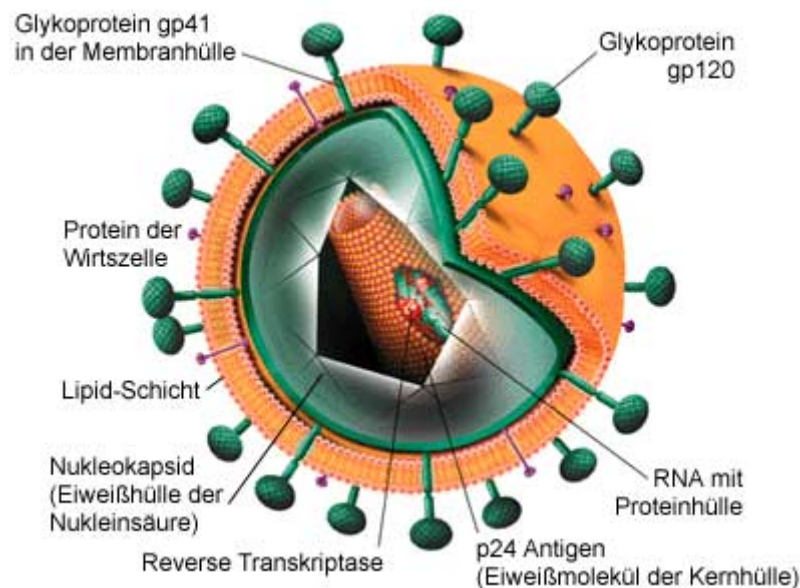
Derzeit sind ca. 33,2 Millionen Menschen weltweit mit HIV infiziert (www.unaids.org). Die Zahl der Neuinfektionen betrug im Jahr 2007 2,5 Millionen, und es wurden 2,1 Millionen Todesfälle verzeichnet. AIDS (engl.: *acquired immunodeficiency syndrome*) ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit, besonders in den Entwicklungsländern. Erstmals wurde AIDS 1981 als eine bisher unbekannte Erkrankung des Immunsystems bei Homosexuellen in New York und Los Angeles beschrieben (Gottlieb *et al.*, 1981; Masur *et al.* 1981). Es zeigte sich bei dieser Immunschwäche eine stetige Abnahme der CD4+ T-Zellen (Shaw *et al.*, 1995; Falk *et al.*, 1986; Ho *et al.*, 1995). Die neue Erkrankung wurde 1982 *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) benannt. 1983 gelang es, aus Blutproben von AIDS-Patienten ein Virus zu isolieren, welches drei Jahre später der Unterfamilie der Lentiviren als Humanes Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1) zugeordnet wurde (Coffin *et al.*, 1986). Noch im selben Jahr wurde in Blutlymphozyten eines westafrikanischen AIDS-Patienten ein zweiter HIV-Typ (HIV-2) gefunden (Clavel *et al.*, 1986).

### 1.2 Der Ursprung von HIV

Infektionen mit HIV-1 und HIV-2 verwandten Affen-Immundefizienzviren (SIV, engl.: *Simian Immunodeficiency Virus*) sind in vielen afrikanischen Primatenarten, welche meistens keine Krankheitssymptome entwickeln, zu finden (Hahn *et al.*, 2000; Santiago *et al.*, 2002). HIV-1 gelangte in die menschliche Population durch mehrere Übertragungen des in Schimpansen vorkommenden SIVcpz und in Gorillas vorkommenden SIVgor auf Menschen. Diese fanden in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts statt und führten zur Entwicklung der Gruppen HIV-1 M (engl. *HIV-1 major*), HIV-1 O (engl. *HIV-1 outlier*), HIV-1 N (engl. *HIV-1 non M, non O*) und HIV-1 P aus Gorillas (Sharp *et al.*, 2005; Keele *et al.*, 2006; Plantier *et al.*, 2009). Viren der Gruppe M stellen die Ursache der globalen AIDS-Pandemie dar (Kandathil *et al.*, 2005). Gruppe O kommt hauptsächlich im westlichen Zentralafrika vor und trägt weniger als 10% zu den weltweiten HIV-1-Infektionen bei (Yamaguchi *et al.*, 2002; Requeo *et al.*, 2006). Infektionen mit Viren der Gruppe N wurden nur vereinzelt in West Afrika beobachtet (Kandathil *et al.*, 2005).

### 1.3 Struktur der Immundefizienzviren

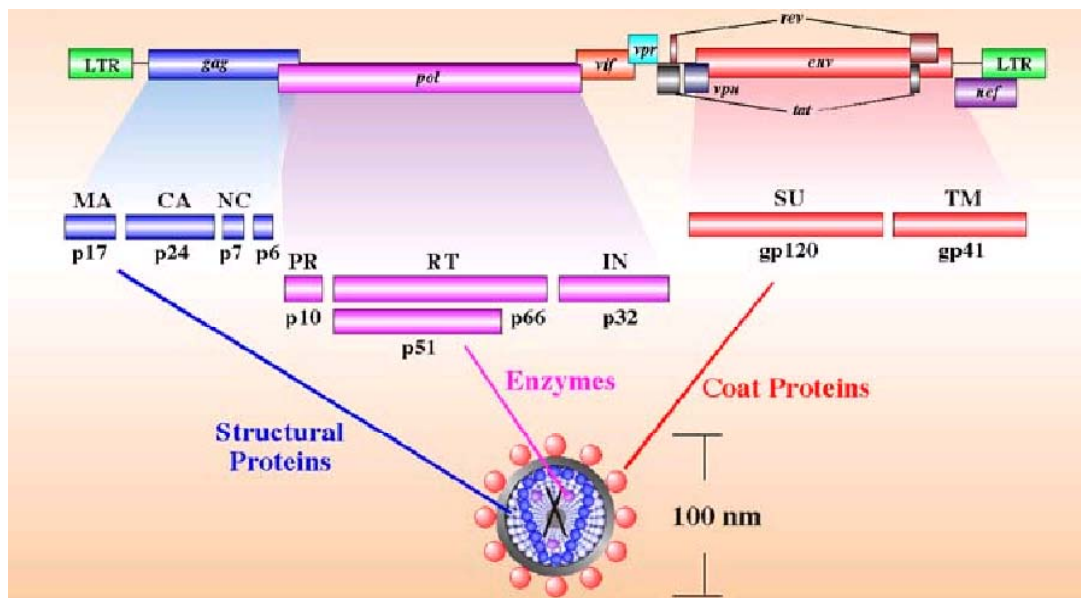
HIV-1 gehört zu der Familie der *Retroviridae* in der Subfamilie der Lentiviren. Es ist ein unbehülltes Virus, dessen Lipiddoppelmembran von der Wirtszellmembran stammt. Die HIV-1 Partikel haben einen Durchmesser von ca. 100nm (Abb. 1). In die Lipiddoppelmembran ist das virale Transmembranprotein gp120 eingelagert, welches über nicht-kovalente Bindung mit dem externen Hüllprotein gp41 assoziiert ist. Zur Innenseite hin ist die Membran mit einer Schicht aus p17 Matrixprotein stabilisiert, welche über Myristinsäurereste eng mit der Membran assoziiert sind. Das konische Kapsid im Zentrum des Virions ist aus p24 Kapsidproteinen aufgebaut. Im Innern des Kapsids befindet sich das virale Genom in Form von zwei Kopien eines einzelsträngigen (+)-Strang-RNA-Moleküls. Diese RNA-Moleküle sind mit den Nukleokapsidproteinen p7 und p9 komplexiert. Neben den Strukturproteinen werden auch die viralen Proteine Nef, Vpr und Vif in das Viruspartikel inkorporiert (Cohen *et al.*, 1990; Liao *et al.*, 1995; Welker *et al.*, 1996).



**Abb. 1:** Aufbau eines HIV-1 Partikels  
([http://www.hiv-info.de/img/hiv\\_cut.jpg](http://www.hiv-info.de/img/hiv_cut.jpg))

Die Genome von HIV-1 und SIV (Größe ca. 9,2 kb) enthalten die Gene *gag* (Gruppenspezifische Antigene), *pol* (Polymerase) und *env* (Hüllprotein, engl.: *Envelope*). Flankiert werden sie von langen Sequenzwiederholungen, den LTRs (engl.: *long terminal repeat*). Die 5'LTR dient als Promotor, die 3'LTR enthält das Polyadenylierungssignal (Abb. 2). *Gag* kodiert für die Proteine des Kapsids, der Matrix und des Nukleokapsids. *Pol* kodiert für die viralen Replikationsenzyme

Reverse Transkriptase, Integrase und Protease. *Env* kodiert für das Protein gp160, welches durch enzymatische Vorgänge in die beiden Hüllproteine gp120 und gp41 zerlegt wird. Zusätzlich besitzen die HI-Viren einige essentielle regulatorische Gene (*tat* und *rev*), sowie die akzessorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu* und *nef*.



**Abb. 2:** Genomorganisation von HIV-1.  
(<http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV-1b.jpg>)

#### 1.4 Das Nef-Protein

Das Nef-Protein von HIV-1 hat eine Länge von etwa 206 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa. Es ist ein aminoterminal myristiliertes Protein, welches zum Teil über eine Fettsäure mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle verbunden ist. In der frühen Phase der Replikation kodieren ca. 70% der gebildeten mRNAs für Nef. Nef ist *in vitro* in infizierten Zellkulturen nicht essentiell für die Replikation des Virus und wird deswegen zu den akzessorischen Virusproteinen gezählt. *In vivo* in HIV bzw. SIV infizierten Menschen und Affen spielt Nef jedoch eine wichtige Rolle für die effiziente virale Persistenz, Replikation und Infektiosität (Malim and Emerman, 2008; Kirchhoff *et al.*, 2008).

In den vergangenen Jahren sind viele Nef-Funktionen beschrieben worden. Beispielsweise hilft Nef dem Virus, sich der Kontrolle des antiviralen Immunsystems zu entziehen. Dies geschieht mittels der Nef-vermittelten Entfernung von MHC-I-Molekülen von der Oberfläche infizierter Zellen und die Blockierung der MHC-II-Antigenpräsentation durch die Heraufregulierung der

Invarianten Kette (CD74) (Yang *et al.*, 1996; Kirchhoff *et al.*, 2004; Münch *et al.*, 2005; Schindler *et al.*, 2006). Über MHC-I-Moleküle präsentiert die infizierte Zelle virale Peptide, welche von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, was zur Zerstörung der infizierten Zelle führt (Parham and Ohta, 1996). Somit wird, Nef-vermittelt, die Lyse der infizierten Zellen reduziert. Eine weitere Nef-Funktion ist die Entfernung des T-Zellrezeptorbestandteils und zugleich primären Rezeptor des HI-Virus CD4 von der Oberfläche infizierter Zellen (Garcia *et al.*, 1991). Der CD4-Rezeptor ist wichtig für die T-Zell-Aktivierung bei der Interaktion mit einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) (Miceli and Parnes, 1993). Die Entfernung von CD4 geschieht über Nef-vermittelte Internalisierung und anschließende Degradierung in Lysosomen (Aiken *et al.*, 1994; Grzesiek *et al.*, 1996; Greenberg *et al.*, 1997; Mangasarian *et al.*, 1997; Bresnahan *et al.*, 1998). Die Herabregulierung von CD4 erleichtert die Freisetzung neu gebildeter Partikel von der Zellmembran, da diese somit nicht wieder an das CD4 der Virus produzierenden Zelle binden (Lama *et al.*, 1999). Außerdem steigert Nef die virale Infektiosität und Replikation (Chowers *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994; Spina *et al.*, 1994; Aiken and Trono, 1995; Schwartz *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 1997; Glushakova *et al.*, 1999). Bei HIV-infizierten Menschen und SIVmac-infizierten Rhesusaffen ist ein intaktes *nef*-Gen essentiell für die effektive Virusvermehrung und beschleunigt die Progression zu AIDS (Kestler 1991; Kirchhoff, 1995; Deacon 1995).

### **1.5 Die potentielle Relevanz von Cholesterin für die virale Replikation**

Es wurde postuliert, dass das Lipid Cholesterin wichtig für die Infektiosität und Replikation des HI-Virus ist (Zheng *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2003; van't Wout *et al.*, 2005). Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen und wird, an Lipoproteine gebunden, im Blutplasma transportiert. Das meiste Cholesterin wird vom menschlichen Körper endogen synthetisiert, ein kleinerer Teil exogen über die Nahrung aufgenommen. Cholesterin spielt eine zentrale Rolle in verschiedenen biochemischen Prozessen und dem zellulären Stoffwechsel. Es ist Hauptbestandteil der Plasmamembran, wo es deren Stabilität erhöht und zusammen mit anderen Proteinen an der Ein- und Ausschleusung von Signalstoffen beteiligt ist. Des Weiteren ist Cholesterin eine Vorstufe der Gallensäuren und von Steroidhormonen. In der Plasmamembran gibt es Bereiche,

die besonders reich an Cholesterin und Sphingolipiden sind. Diese Bereiche werden als *Lipid Rafts* bezeichnet.

Verschiedene Studien haben sich mit der Relevanz von Cholesterin für die virale Infektiosität und Replikation beschäftigt. Die Depletion von Cholesterin soll eine Inaktivierung und Permeabilisierung des HI-Virus bewirken (Graham *et al.*, 2003) und die Infektiosität vermindern (Campbell *et al.*, 2002). Weiterhin wurde beschrieben, dass Nef verschiedene, für die Cholesterinsynthese wichtige, Gene induziert und die Cholesterinaufnahme infizierter Zellen erhöht (van't Wout *et al.*, 2005). So wird z.B. die Expression des *Lowdensity-Lipoprotein-Rezeptors* (LDL-R) auf der Zelloberfläche erhöht. Der LDL-R vermittelt die Endozytose der cholesterin-reichen *Lowdensity-Lipoproteine* (LDL). Dieser Prozess findet in allen zellkernhaltigen Zellen statt. Die Synthese von LDL-Rezeptoren wird durch die Cholesterinkonzentration in der Zelle reguliert. Wenn mehr Cholesterin in der Zelle vorhanden ist als benötigt, wird die Transkription des für den Rezeptor kodierenden Genes blockiert. Viele cholesterinbindende Proteine enthalten ein bestimmtes Aminosäuremotif, welches als Cholesterin-Erkennungs-Motif (engl.: *Cholesterol recognition motif*) bezeichnet wird. Als Konsensussequenz wurde V/L - X (1-5)-Y-X (1-5)-K/R definiert (Li H, Papadopoulos V., 1998; Jamin *et al.*, 2005). Manche HIV-1 Nef-Proteine enthalten dieses potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motiv am C-terminus (Li *et al.*, 2001). Es wurde postuliert, dass dieses essentiell für die Nef-vermittelte Steigerung der viralen Infektiosität ist (Zheng *et al.*, 2003). Allerdings ist es in SIVcpz *nef*-Allelen nicht konserviert, obwohl diese in der Lage sind, die Infektion viraler Partikel zu erhöhen (Münch *et al.*, 2007).

## 1.6 Aufgabenstellung

Es wurde gezeigt, dass Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif des HIV-1 NL4-3 Nef-Proteins die virale Infektiosität beeinträchtigen (Zheng *et al.*, 2003). Allerdings wurde in dieser früheren Arbeit nur ein einziges *nef*-Allel analysiert. Weiterhin wurde nicht untersucht, ob diese Mutationen tatsächlich spezifisch die Bindung von Cholesterin und nicht auch andere Nef-Funktionen, beeinträchtigen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob tatsächlich die spezifische Bindung von Cholesterin an das C-terminale potentielle Erkennungsmotif für die Steigerung der Infektiosität viraler Partikel durch HIV-1 und SIVcpz Nef-Proteine notwendig ist. Dazu wurde

zunächst, mittels spezifischer Mutagenese, das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif in drei HIV-1 Nef-Proteinen zerstört und *vice versa* in zwei SIVcpz Nefs eingefügt. Anschließend wurde die Aktivität der hergestellten HIV-1 und SIVcpz Nef-Varianten in der Modulation verschiedener Oberflächenrezeptoren, der Steigerung der viralen Infektiosität und der Stimulierung der viralen Replikation untersucht. Weiterhin wurde analysiert, welchen Effekt diese Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif auf die Fähigkeit von Nef haben, die Expression von Enzymen und Regulatoren der Cholesterin-Synthese zu modulieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Eukaryotische Zellen

293T: Humane Nierenepithelzellen, die hohe Transfizierbarkeit auszeichnet. Diese wurden mit Adenovirus Typ 5 transformiert und exprimieren das SV40 (simian virus 40) large T-Antigen (Graham *et al.*, 1977).

THP-I: humane monozytäre Zelllinie (Tsuchiya *et al.*, 1980)

Jurkat: humane T-Zelllinie

P4-R5 MAGI: Zelllinie, die stabil humanes CD4, CCR5 und CXCR4 exprimiert. Enthält das Gen für  $\beta$ -Galaktosidase unter der Kontrolle der HIV-1-LTR (Charneau *et al.*, 1994).

PBMC: Humane periphere mononukleäre Zellen

#### 2.1.2. Bakterien

*Escherichia coli* XL2-Blue TM: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr] (Bullock *et al.*, 1987) (Stratagene; Heidelberg).

#### 2.1.3. Nukleinsäuren

Oligonukleotide

Die aufgelisteten Oligonukleotide wurden von Biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert.

- 1 Mlu-Na7nef198AAAA 5'-gcacgcggttcagctctgcggcggcctccggatgcgcctctcg-3'  
Mlu-
- 2 SIVcpznoah192LYK 5'-gcacgcggtttagctctttagtattcagggtgtagttctc-3'
- 3 Mlu-SIVcpzgab197LK 5'-gcacgcggttcagctcttgaataactcaggatgtagttctc-3'  
Mlu-
- 4 HIV43Pex198RSSL 5'-gcacgcggttcagcagttcaggaggagtcggatgcctctctcg-3'
- 5 Mlu-NA7nef198RSSL 5'-gcacgcggttcagcagttcaggaggactccggatgccgctctcg-3'
- 6 Mlu-Na7nefstp 5'-gctcgggccatgtg-3'
- 7 Mlu-JM206 5'tggaacttctcgagg-3'



## Plasmide

PCR®2.1-TOPO®-TA Vektor: Vektor zum direkten Klonieren von PCR-Produkten.

pBR-NL4-3-*nef*-IRES-eGFP: pBR322 Vektor, der das HIV-1 NL43 Provirus enthält. Dieses wurde so verändert, dass *nef* und *eGFP* mittels eines IRES-Elements von einer bicistronischen mRNA exprimiert werden (Schindler *et al.*, 2003; Schindler *et al.*, 2005).

pBR NL4-3-*nef*<sup>(-)</sup>-IRES-eGFP: Modifizierter pBR322-Vektor, enthält das NL43 *nef*-Allel. Aufgrund einer Mutation im Start-Codon und zwei Inframe Stop-Codons an Position 3 und 40 im Nef wird das Protein nicht exprimiert.

pBRNL4-3-*nef*-TPI: pBR322-Vektor, der das HIV-1 NL4-3-Provirus enthält. Das Provirus wurde so verändert, dass *nef* aufgrund einer Verkürzung der U3-Region (T-reiche Region, Polypurin-Trakt und für Integration benötigte Sequenzen) nicht mehr mit der 3'-LTR überlappt.

pBRNL4-3-*nef*<sup>(-)</sup>-TPI: Modifizierter pBR322-Vektor, enthält das NL43 *nef*-Allel. Aufgrund einer Mutation im Start-Codon und zwei Inframe Stop-Codons an Position 3 und 40 im Nef wird das Protein nicht exprimiert.

pHIT60: Expressionsvektor, der das Hüllprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) exprimiert (Schindler *et al.*, 2003).

## Längenstandard

„1-kb-Leiter“ Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)

## Nukleotide für PCR

dNTPs für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden von Invitrogen/Gibco (Karlsruhe) bezogen.

### 2.1.4. Enzyme

#### Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Enzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt a. M.) bezogen und die vom Hersteller empfohlenen Puffersysteme verwendet.

#### Sonstige Enzyme

Taq-DNA-Polymerase	Stratagene Europe AG (Heidelberg)
T4-DNA-Ligase	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
RNAse A aus Rinderpankreas	Boehringer (Mannheim)
Trypsin aus Rinderpankreas	Stratagene Europe AG (Heidelberg)

### 2.1.5. Reagenzien und Laborhilfsmittel

Sigma, München	Agarose-Ultra, Dithiothreitol (DTT), Ethanol, Isopropanol, Methanol, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumchlorid (NaCl)
Ratiopharm, Ulm	Ampicillin
Merck, Darmstadt	Bromphenol Blau, Glukose, 4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonsäure (HEPES), Salzsäure (HCl), Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ), Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> ), Paraformaldehyd (PFA), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Triton X-100, Tween 20
Applichem, Darmstadt	Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> ), Glyzin
J.T. Baker, Deventer, NL	Disodiumhydrophosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
Invitrogen/Gibco, Karlsruhe	Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Fetal calf serum (FCS), Geneticin (G418), Penicillin/Streptomycinsulfat, Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640)
Fluka, Neu-Ulm	Ethylene Diamine Tetraacetate (EDTA)
Biochrom, Berlin	Ficoll separation solution, L-Glutamine
Roth, Karlsruhe	Glycerol, Kaliumchlorid (KCl)
Miltenyi Biotec, Gladbach	Interleukin-2 (IL-2)
Gabler Saliter, Obergünzburg	Milk powder
USB Corporation, USA	Nonidet P 40 (NP40), Tris

Amersham Bios., München	Oligo dT
PAA, Marburg	Phosphate buffered saline (PBS)
Remel, Dartfort, UK	Phytohaemagglutinin (PHA)

### 2.1.6. Reagenzsysteme (Kits)

Gal-Screen System	Applied Biosystems (Foster City, CA; USA)
GeneClean II Kit	Dianova (Hamburg)
BD Cytotfix/Cytoperm™ Kit	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
HIV-1 p24 Kapsid-Antigen-ELISA	AIDS Repository (Frederick, MD; USA)
Luciferase Assay System	Promega (Madison, WI; USA)
NuPAGE Gele für Western Blot	Invitrogen (Karlsruhe)
QIAwell 8 Plasmid Kit	Qiagen (Hilden)
TA Cloning Kit	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Takara DNA Ligationskit	Böhringer Ingelheim (Heidelberg)
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Ultra Clene™ 15	MOBIO Laboratories INC. (Carlsbad, CA, USA)
Wizard™ Plus Midipreps	Promega (Madison, WI, USA)

### 2.1.7. Medien

#### Medien für Zellkulturen

Adhärente Zellen: DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium; Invitrogen/Gibco) mit 350µg/ml L-Glutamin, 120µg/ml Streptomycinsulfat, 120µg/ml Penicillin und 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS.

Suspensionszellen: RPMI-1640 Medium (Invitrogen/Gibco) mit 350µg/ml L-Glutamin, 120µg/ml Streptomycinsulfat, 120µg/ml Penicillin und 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS.

#### Bakterienkulturmedien

LB-Medium: 10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 8g/l NaCl, 1g/l Glukose; Zugabe von 100mg/l Ampicillin vor Gebrauch. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt

LBAMP Agar: 15g/l Agar und 100mg/l Ampicillin in LB-Medium;

SOC-Medium: 20g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 2,5mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM, MgSO<sub>4</sub>, 20mM Glukose.

### 2.1.8. Lösungen und Puffer

Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Resuspensionspuffer (P1), Lysispuffer (P2), Neutralisationspuffer (P3) (Qiagen, Hilden), 70% EtOH, 90% Isopropanol und LiChrosolv-H<sub>2</sub>O.

Calcium-Phosphat-Transfektion

2x HBS (10x Stock): Es wurden 8.18% NaCl (w/v), 5.94% HEPES (w/v) und 0.2% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (w/v) in destilliertem Wasser gelöst. Für die 2x HBS Lösung wurde die 10x Stock Lösung mit destilliertem Wasser verdünnt. Der pH-Wert wurde auf 7,12 eingestellt und die Lösung anschließend steril filtriert.

Reverse Transkriptase Test

RT Master Mix: 60 mM Tris pH 7.8, 75 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% (v/v) NP40, 2.02 mM EDTA pH 8.0, 5 µg/ml PolyA und 0.16 µg/ml Oligo dT in destilliertem Wasser. Kurz vor dem Gebrauch werden 4 mM DTT dazugegeben.

Wash buffer: 20x SSC Puffer (Eppendorf, Hamburg) verdünnt in destilliertem Wasser.

[α-<sup>32</sup>P] TTP: Perkin Elmer, Rodgau-Jugesheim.

Western Blot

RIPA Puffer: 1% Triton X-100 (v/v), 0.15 M NaCl, 50 mM Tris (pH 7.4), 5 mM EDTA und 1 mM PMSF in destilliertem Wasser.

Proben Puffer: 0.5 M Tris, 22% Glycerol, 0.1% Bromophenol blue, 10% SDS in destilliertem Wasser, pH auf 6,8 eingestellt.

Laufpuffer: 20x NuPAGE Mes SDS buffer (Invitrogen, Karlsruhe) verdünnt mit destilliertem Wasser

Transferpuffer: 47.9 mM Tris, 38.6 mM Glycin, 1.3 mM SDS und 20% Methanol (v/v) in destilliertem Wasser, pH-Wert auf 8,3 eingestellt .

Waschpuffer: 0,2% Tween 20 in PBS

Sonstige Lösungen und Puffer

FACS-Puffer: 1% FKS in PBS

50xTAE-Puffer: 5Prime, Hamburg

### 2.1.9. HIV-1 p24 Kapsid-Antigen-ELISA

Lyse-Lösung: 10ml Triton X-100 (Sigma, München), mit  
100ml mQ-H<sub>2</sub>O

Waschpuffer: 25ml 20x Waschkonzentrat (KPL, Maryland),  
mit 500ml H<sub>2</sub>O

ELISA-Platten: p24 antibody coated plates (AIDS Repository;  
USA)

Erster Antikörper: Rabbit anti-HIV-1 p24

Zweiter Antikörper: Goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP

Probenpuffer: 89,8 ml RPMI-1640; 10ml 10% BSA diluent  
(KPL; Maryland); 200ul Tween 20 (Sigma;  
München)

Lösung für den ersten Antikörper: 10% FCS und 2% Normales Maus Serum in  
RPMI-1640

Lösung für den zweiten Antikörper: 2% Normales Maus Serum; 5% Normales  
Ziegen Serum;  
0,01% Tween 20 in RPMI-1640

Substrat: TMB Peroxidase Substrat System (KPL,  
Maryland); 1N HCl

Blocklösung: 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 2.1.10. Antikörper

Western Blot

Goat Anti-Mouse IgG (KPL, Maryland, USA)

Goat Anti-Rabbit IgG (KPL, Maryland, USA)

Anti-HIV 1- Nef (Abi, Columbia, USA)

---

Anti-AU1-Tag	(Abi, Columbia, USA)
Rabbit Anti-FDPS	(Biozol, Eching)
Rabbit Anti-HMG-CoA-R	(Upstate, Lake Placid, USA)
Mouse Anti-CYP51A1	(Abnova, Heidelberg)
Rabbit Anti-Cholesterol	(AbD Serotec)
Durchflusszytometrie	
Anti-CD4-PE	(Caltag, Buckingham, UK)
Anti-CD28-PE	(Becton-Dickinson, Heidelberg)
Anti-CXCR4-PE	(Becton-Dickinson, Heidelberg)
Anti-MHC-I-PE	(Dako, Hamburg)
Anti-CD74-PE	(Ansell, Baypart, USA)
Anti-LDL-R	(Fitzgerald, Concord, USA)
Anti-Mouse-IgG2a-PE	(Acris Antibodies, Herford)
Rabbit Anti-SREBP	(Santa Cruz Antibodies, Santa Cruz, USA)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1 DNA-Methoden

#### Standardmethoden

Folgende Methoden wurden nach Protokollen von Maniatis et al. (1989) durchgeführt:

- Plasmid-DNA-Isolierung nach alkalischer Lyse der Bakterien
- Ethanol- und Isopropanolfällung der DNA
- Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren
- Dephosphorylierung von DNA 5' Enden mit alkalischer Phosphatase
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase
- Auftrennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese

#### Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA für Klonierungen wurde durch alkalische Lyse von Bakterien und anschließende Isolierung und Reinigung der DNA gewonnen (Maniatis et al., 1989). Für Sequenzierreaktionen oder die Transfektion eukaryoter Zellen wurden die Präparationen mit dem Wizard™ Plus Midipreps Kit (Promega; Madison, WI, USA) oder dem QIAwell 8 Miniprep Kit (Qiagen; Hilden) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die DNA-Konzentrationen wurden in einem Spektralphotometer (Eppendorf) bestimmt.

#### Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, unter Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (366nm) sichtbar gemacht und die DNA-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit dem GeneClean® II Kit (Dianova, Hamburg) entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert.

#### Ligation von DNA

Ligationen wurden mit dem Takara DNA Ligationskit (TaKaRa, Shiga, Japan) durchgeführt. Plasmid-DNA und Insert-DNA wurden im Verhältnis von 1 : 3 nach den Protokollen der Hersteller eingesetzt.

### DNA-Sequenzierung

Sequenzierreaktionen wurden kommerziell bei der Firma MWG-Biotec/Operon (Ebersberg) in Auftrag gegeben. 2µg DNA wurden bei 58°C eingedampft und eingeschickt.

### Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden nach dem Protokoll von Saiki et al. (1988), in einem Thermocycler (PTC-100TM, MJ Research) durchgeführt.

### 2.2.2. Zellkultur

#### Kultur adhärenter Zellen

Die adhärenenten Zellen wurden in 25cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen in DMEM bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich 1:10 bis 1:20 gesplittet.

#### Kultur von Suspensionszellen

Die Suspensionszellen wurden in 25cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen in RPMI-1640 bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich 1:10 bis 1:20 gesplittet.

#### Isolierung primärer Lymphozyten aus Buffy Coat

Zur Isolierung primärer Blutlymphozyten (PBL „primary blood lymphocyte“ oder PBMC „peripheral blood mononuclear cells“) wurde Buffy Coat (Lymphozytenkonzentrat aus 500ml Vollblut) von der Blutspendenzentrale Ulm bezogen und 1:3 in PBS verdünnt. Dann wurde das verdünnte Buffy Coat über Ficoll (Biochrome) geschichtet und über Dichtegradientenzentrifugation für 30min bei 2500rpm aufgetrennt. Die angereicherten Lymphozyten wurden aus der Interphase abgenommen und zweimal in PBS gewaschen. Dann wurden die aufgereinigten PBMCs in RPMI1640 mit 10%FCS und 1% Pen/Strep in einer Konzentration von 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml aufgenommen. Zur Stimulation der Lymphozyten erfolgte die Zugabe von 10ng/ml IL-2 und 2µg/ml PHA.

### 2.2.3. Bakterienkultur

Alle verwendeten Plasmide enthalten ein Ampicillin-Resistenzgen. Transformierte Bakterien wurden daher durch Zusatz von Ampicillin (100µg/ml) zum



Kulturmedium selektioniert. Verwendet wurde der *Escherichia coli*-Stamm *XL2TM-Blue*. Die Kulturen wurden für mindestens 12h bei 37 °C in LBamp-Flüssigmedium geschüttelt oder auf LBamp-Agar Platten inkubiert. Bakterienstocks wurden durch Vermischen von 500µl Bakterienkultur mit 500µl Glycerin erstellt und bei -80 °C eingefroren.

#### Transformation von *Escherichia coli XL2TM-Blue*

Nach dem Auftauen der kompetenten Zellen wurde β-Mercaptoethanol (2µl auf 100µl Bakterien) zugegeben und gemischt. Es folgte eine Inkubation von 10min auf Eis und die Zugabe von 3µl des Ligationsansatzes zu jeweils 10µl der kompetenten Zellen. Im Anschluß wurden die Bakterien für 30min auf Eis, für 30s bei 42°C im Wasserbad und für weitere 2min 30sek auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 200µl SOC-Medium und einer Inkubation von 30min bei 37°C wurde die Bakteriensuspension auf LBamp-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 2.2.4. Klonierung von *nef*-Allelen in provirale Vektoren

Die verwendeten Nef-Varianten wurden mittels Mutagenese-PCR hergestellt. Als Template dienen folgende Wildtyp-Konstrukte im pBRNL4-3-IRES-eGFP Vektor: NL4-3nef, NA7nef, Pexnef, SIVcpzNoahnef, SIVcpzGab2nef. Es wurde eine einstufige PCR mit den im Materialteil aufgeführten Primern durchgeführt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden nach Auftrennung durch Gel-Elektrophorese und Bandenaufreinigung in TA-Vektoren kloniert und amplifiziert. Nachdem die Sequenzierung bestätigt hatte, dass die gewünschten Mutationen erfolgreich generiert worden waren, wurden die Nef-CRM-Mut Inserts in pBRNL4-3-TPI und pBRNL4-3-IRES-eGFP Vektoren umklontiert. Dies geschah mittels Restriktionsverdau (Enzyme: HpaI, MluI), Bandenaufreinigung und anschließender Ligation in diese Vektoren. Nach erfolgter Klonierung wurde durch erneute Sequenzierung sichergestellt, dass keine zusätzlichen Mutationen aufgetreten sind.

Zum Expressionsnachweis wurden zusätzlich AU1-getaggte Varianten hergestellt, da der handelsübliche Nef-Antikörper nur NL43 *nef*-Allele erkennt und im Rahmen dieser Doktorarbeit auch andere *nef*-Allele verwendet wurden.

### 2.2.5. Virale Methoden

Kalzium-Phosphat-Transfektion von 293T-Zellen zur Herstellung von Virusstocks  
Die Transfektion der 293T-Zellen wurde nach der Kalzium-Phosphat-Präzipitat-Methode durchgeführt. Am Tag vor der Transfektion wurden  $0,2 \times 10^6$  Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%igem  $\text{CO}_2$ -Gehalt inkubiert. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion zu 50-75% konfluent. Für die DNA-Arbeitslösung wurden  $5\mu\text{g}$  DNA mit  $13\mu\text{l}$  2M  $\text{CaCl}_2$  gemischt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf  $100\mu\text{l}$  aufgefüllt. Diese Lösung wurde tropfenweise zu  $100\mu\text{l}$  2 x HBS zugegeben. Nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur bildete sich ein milchiges Präzipitat. Der Transfektionscocktail wurde auf das Medium der Zellkulturen getropft, und die Zellen über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium (DMEM: 10% FKS, Glutamin, SP) erneuert. Die Virusstocks wurden am dritten Tag abgenommen und 3min bei 1300rpm abzentrifugiert.

#### HIV p24 Kapsid Antigen-ELISA

Die Konzentration viralen p24 Antigens in den Virusstocks wurde mittels HIV p24 Kapsid Antigen-ELISA (AIDS Repository; Frederick, MD; USA) bestimmt. Durch Lyse mittels Triton X-100 wurden die p24-Proteine freigesetzt. Nach angemessener Verdünnung wurden die Proben in eine p24 ELISA Mikrowellplatte überführt und für 2h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach wurde ungebundenes Material durch Waschen mit ELISA Waschpuffer entfernt. Für den p24 ELISA wird die sog. „sandwich“-ELISA Methode verwendet. Zuerst erfolgt die Inkubation mit primären rabbit anti-HIV-1 p24 polyklonalen Antikörper für 1h bei  $37^\circ\text{C}$ . Nach einem weiteren Waschschrift wurde der sekundäre goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP Antikörper für 1h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Platte gewaschen und TMB Substrat dazugegeben. Die Farbreaktion wurde durch 4N Schwefelsäure gestoppt. Die Farbkonzentration wird bei den Wellenlängen 450nm und 650nm im ELISA analysiert.. Die gemessene Farbkonzentration ist proportional zu der Menge an Kapsidprotein und wird in ng/ml p24 angegeben.

#### Bestimmung der viralen Infektiosität mittels des $\beta$ -Galaktosidase-Tests

P4R5-Zellen exprimieren CD4, CCR5 und CXCR4 und enthalten das Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase unter Kontrolle der HIV-1-LTR. Nach einer Infektion mit HIV kommt es zu einer Tat-vermittelten Expression von  $\beta$ -Galaktosidase, die sich

durch Lumineszenzmessung nachweisen lässt. Die Menge an  $\beta$ -Galaktosidase ist somit Maß für die Infektiosität der verschiedenen Viruspartikel. Es wurden 4000 Zellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2ng bzw. 10ng p24 Antigen in einem konstanten Volumen infiziert und für 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Drei Tage nach Infektion wurde das Medium entfernt und die Zellen in 40 $\mu$ l einer 1:1  $\beta$ -Gal-Screen/PBS-Lösung aufgenommen. Nach 30min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 35 $\mu$ l in Lumistripes überführt und anschließend in relativen Lichteinheiten pro 0,1ms im Chiron<sup>TM</sup>-Luminometer gemessen.

#### Bestimmung der viralen Replikation mittels des Reverse Transkriptase – Tests

Die Virusproduktion wurde mittels der Aktivität der Reversen Transkriptase quantifiziert (Sears *et al.*, 1999). Für RT-Tests zur Untersuchung der Replikationseigenschaften wurden PBMCs in 96-Well-Platten ausgesät (125.000 Zellen pro well) und mit den entsprechenden Virusstocks der pBRNL4.3-TPI-Viren infiziert (0,5ng p24 Antigen bzw. 1ng p24 Antigen).

Alle 2-3 Tage wurden anschließend 125 $\mu$ l Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren. Eine der abgenommenen Menge an Überstand äquivalente Menge an frischem Kultivierungsmedium wurde den Zellen wieder zugeführt. Dies geschah über 3-4 Wochen. Die Aktivität des Enzyms Reverse Transkriptase als RNA-abhängige DNA-Polymerase wird im RT-Test als Maß für die virale Replikation benutzt. Die Überstände wurden 1:5 mit PBS verdünnt und jeweils 5 $\mu$ l wurden in 96-U-well Platten (Greiner Bio-one, Frickenhausen) gegeben. Es folgte die Inkubation mit 25 $\mu$ l RT-Master-Mix (beinhaltet 25 $\mu$ Ci des [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-TTP-Isotops pro 96-well Platte) für 2h bei 37 °C. Nach der Inkubation wurden 5 $\mu$ l des Reaktionsgemisches auf Whatman- Filterpapier aufgetropft und für 10-20min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Filter wurden dreimal mit 2 x SSC-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift sollte in der SSC-Lösung keine Radioaktivität nachweisbar sein. Danach wurden die Filter kurz in 96% Ethanol gewaschen und für 1h bei 60°C getrocknet. Die Aktivitäten der Proben wurden mit Hilfe eines Phospho-Imagers (BAS2000, Fuji Photo Film Co., Ltd.; Japan) ermittelt und mit Hilfe der Computerprogramme Basread, Aida und Excel ausgewertet.

### **2.2.6. Bestimmung der Aktivität der Lanosterol-14alpha-Demethylase mit dem CYP51A1 Expressions Assay**

293T Zellen wurden mit den viralen Konstrukten und dem pGEM-CYP51-Luc Plasmid kotransfiziert. Dies geschah mittels der Kalzium-Phosphat-Präzipitat-Methode. Am dritten Tag nach Kotransfektion wurden die Überstände abgenommen und die Zelllysate mit dem Luziferase Assay analysiert. Die Expression der Luziferase, welche hier mit der Expression des CYP51-Enzyms korreliert, kann mittels Lumineszenzmessung ermittelt werden. Dafür wurde zu den Zellen 100µl Lysepuffer gegeben und das Lysat in eine weißwandige 96-well-Platte überführt. Die Luziferaseaktivität wurde nach der Zugabe von 50µl Luziferase-Substrat in relativen Lichteinheiten pro 0,1ms im Berthold Lunimometer bestimmt.

### **2.2.7 FACS-Analysen**

Modulation von Oberflächenmarkern auf T-Zellen

Zur FACS-Färbung wurden Zellen einer Transfektion bzw. Infektion in die entsprechende Zahl an Färbungen aufgeteilt und einmal mit 500µl FACS Puffer gewaschen. Nach der Zentrifugation für 5min bei 1300rpm wurden die Zellen in 100µl FACS-Puffer + 1-10µl PE konjugiertem Antikörper (nach Herstellerangaben) aufgenommen und für 45min bei 4°C gefärbt. Nach einem Waschschrift mit 1000µl FACS-Puffer wurden die Zellen in 200-300µl FACS-Puffer (nach Zellzahl) aufgenommen und im FACS (FACSCalibur, Becton-Dickinson) vermessen. Infizierte Zellen wurden vor der Analyse in 200µl FACS-Puffer mit 2% PFA 30min bei 4°C fixiert.

Intracellular Staining

Zur FACS-Färbung wurden Zellen einer Transfektion oder Infektion in die entsprechende Zahl an Färbungen aufgeteilt und einmal mit 500µl FACS Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200µl Fix/perm Lösung (BD Cytofix/Cytoperm™ Kit) und die Lagerung für 20min bei 4°C. Danach wurden die Zellen mit je 1ml der Perm/Wash Lösung (BD Cytofix/Cytoperm™ Kit) gewaschen und bei 1300rpm für 3min zentrifugiert. Die Färbung mit dem ersten Antikörper (µl Menge nach Herstellerangabe) erfolgte in 100µl Perm/wash Lösung für 30min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen wieder mit 1ml der Perm/Wash Lösung

gewaschen und abzentrifugiert. Die oben beschriebene Färbung wurde danach mit dem zweiten PE-konjugierten Antikörper wiederholt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 200µl FACS-Puffer mit 2% PFA 30min bei 4°C fixiert. Danach erfolgte die Analyse im FACS (FACSCalibur, Becton-Dickinson).

### **2.2.8. Herstellung von Zelllysaten und Proteinanalyse mittels Western Blot**

Nach der Abnahme der Virusstocks wurden die vom Wellboden gelösten transient transfizierten Zellen 5min bei 1200rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und jeweils 150µl Ripa Puffer dazugegeben. Nach Inkubation für 10min bei 4°C wurden die Proben 5min bei 14000rpm abzentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gefroren. Die so gewonnenen Zelllysate wurden mit Westernblot-Puffer auf ein Volumen von 20 µl gebracht, mit der gleichen Menge an 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min auf 95°C erhitzt und auf ein 10%iges SDS-PAGE-Gel (NuPAGE® Novex Bis-Tris; Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Die Proteine in dem Gel wurden mittels Trans-Blot SD Semi-Dry electrophoretic Transfer Cell (Bio rad; USA) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach dem Blocken der Membran in PBS/Tween mit 5% Milch wurde der erste Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden mit PBS/0,2%Tween ausgewaschen. Der zweite Antikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Membran erfolgte die Zugabe von BCIP/NBT Phosphatase Substrat (KPL, USA).

### **2.2.9 Computerprogramme und Datenquellen**

Computerprogramme zur Sequenzanalyse

Für die Auswertung von Aminosäure und DNA-Sequenzen wurden folgende Programme aus dem Internet benutzt: Sequence Reverse Complementor ([http://bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html/](http://bioinformatics.org/sms/rev_comp.html/)), Sequenz-Alignment Programm MultAlin V5.4.1 (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/>) und das Translate Tool (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>). Außerdem wurden die Programme Bioedit DNA/Aminosäuresequenz Programm Expasy-Tool V5.0.9 von Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, und Gene Construction Kit V2.0 von Bob Gross und Anders Putte zur Sequenzanalyse verwendet.

#### Computerprogramme zur FACS-Auswertung

Für die FACS-Auswertung wurde das Programm CellQuest-Pro von Becton Dickinson benutzt, sowie Microsoft Excel Office XP zur Tabellenkalkulation.

#### Statistische Auswertungen und Korrelationsanalysen

Die erhobenen Daten wurden zur späteren Erleichterung beim Aufstellen der Diagramme in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel des Betriebssystems Windows übertragen. Grundlegend erfolgte zunächst immer die deskriptive Statistik mit Angabe des Mittelwertes, sowie Darstellung der Standardabweichung. Für alle statistischen Analysen wurde das PRISM Programm Version 4.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) benutzt, sowie Microsoft Excel Office XP zur Tabellenkalkulation. P-Werte wurden mittels des Zweistichproben-t-Tests ermittelt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Generierte Nef-Varianten

Um zu untersuchen, ob das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif in Nef wichtig für die Steigerung der viralen Infektiosität und andere Funktionen ist, wurde dieses Motif durch Mutationen bei drei HIV-1 *nef*-Allelen (NL4-3*nef*, Pex*nef*, NA7*nef*) zerstört und *vice versa* in zwei SIVcpz *nef*-Allele (Noah*nef*, Gab2*nef*) eingefügt (Abb. 3). Bei den Allelen NL4-3*nef* und Pex*nef* wurde jeweils eine mutierte Variante (NL4-3-RSSL, Pex-RSSL) generiert. In NA7*nef* wurden drei verschiedene Mutationen eingefügt. Zum einen NA7-RSSL und NA7-AAAA, sowie NA7-e197\*, welches ein vorzeitiges Stoppcodon enthält, womit das komplette Cholesterin-Erkennungs-Motif eliminiert wurde. Insgesamt wurden somit fünf HIV-1 Nef-Varianten und zwei SIVcpz Nef-Varianten generiert. Das Vorhandensein der erwünschten und die Abwesenheit von zusätzlichen Mutationen wurde durch Sequenzierung überprüft.

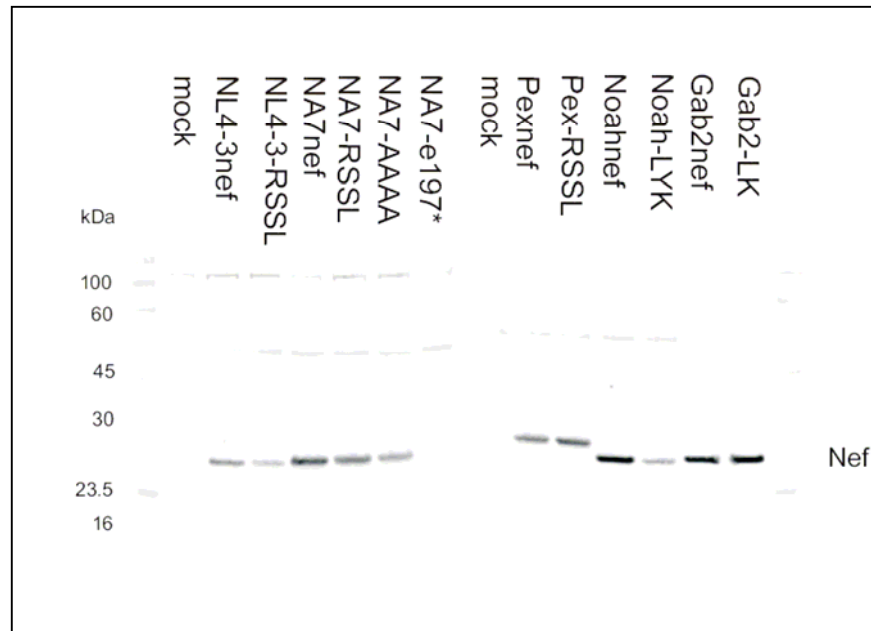
<b>1</b>	206
NL4-3 <i>nef</i>	NTSL <sup>L</sup> LHPVSL HGMDDPEREV LEWRFD <sup>S</sup> SRLA FHHVARE <sup>L</sup> LHP E <sup>Y</sup> F <sup>K</sup> N <sup>C</sup>
NL4-3-RSSL	.....R...SSL..
<b>2</b>	206
Pex <i>nef</i>	NNCLLHPMNQ HGMDDPKEV LMWKFD <sup>S</sup> SRLA FHHMARE <sup>L</sup> LHP E <sup>Y</sup> Y <sup>K</sup> N <sup>C</sup>
Pex-RSSL	.....R...SSL..
<b>3</b>	206
NA7 <i>nef</i>	NNSLLHPMSL HGME <sup>A</sup> EREV LQWKFD <sup>S</sup> SRLA FHHMARE <sup>L</sup> LHP E <sup>Y</sup> Y <sup>K</sup> D <sup>C</sup>
NA7-RSSL	.....R...SSL..
NA7-AAAA	.....A...AAA..
NA7-e197*	.....*
<b>4</b>	198
Noah <i>nef</i>	FKLVPVESPP DDERNILLHP ACTHGDGDPH KEILRWEFDA SLMRRHIARE RHPEYFRD
Noah-LYK	..... <u>L</u> ..... <u>YK</u> ..
<b>5</b>	205
Gab2 <i>nef</i>	WCFKLVPVSP EAVEEANKGE DNLLHPLCT HGFEDDEEKEV LIWKFD <sup>S</sup> SRLA LRHLARE <sup>K</sup> HPEY <sup>R</sup> D
Gab2-LK	..... <u>L</u> ..... <u>K</u> ..

**Abb. 3: Vergleich der Aminosäuresequenzen der HIV-1 NL4-3, Pex, NA7, SIVcpz Noah und Gab2 Nef-Proteine mit den hergestellten Nef-Varianten.** Die Aminosäuren des potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif (Lx1-5Yx1-5K) sind unterstrichen dargestellt.

Für FACS-Analysen wurden die Wildtyp und die mutierten *nef*-Allele in replikationsfähige HIV-1-NL4-3-IRES-eGFP provirale Konstrukte kloniert. Zellen, die mit diesen proviralen Konstrukten infiziert sind, koexpressieren Nef und eGFP von einer bicistronischen mRNA (Schindler *et al.*, 2003; Schindler *et al.*, 2005). Dies macht die eGFP-bedingte grüne Fluoreszenz zu einem Marker der Nef-Expression und somit der Infektion der Zelle. Die HIV-1-NL4-3-IRES-eGFP Konstrukte ermöglichen es, den Effekt von Nef auf die Oberflächenexpression verschiedener Rezeptoren zu analysieren. Sie sind jedoch für Replikationsanalysen weniger geeignet, da das IRES-eGFP-Element die Vermehrungsfähigkeit beeinträchtigt und verloren gehen kann. Aus diesem Grund wurden die *nef*-Allele auch in die HIV-1-NL4-3-TPI provirale Konstrukte kloniert, bei denen die Überlappung der LTR-Region mit *nef* eliminiert wurde. Dies ermöglicht es, die Nef-Funktionen im Rahmen replikationsfähiger Viren zu untersuchen, ohne die LTR-Sequenzen und *cis*-regulatorische Elemente zu verändern. Für Untersuchungen der viralen Infektiosität und Replikation, sowie für die Western Blot Analysen und die Bestimmung der Expression des cholesterogenen Enzyms CYP51 wurden die HIV-1-NL4-3-TPI Varianten verwendet. Mittels der HIV-1-NL4-3-IRES-eGFP Varianten wurde die Modulation von Oberflächenrezeptoren und des Cholesterinsynthese-Regulatorproteins SREBP (engl.: *Sterol Regulatory Element Binding Protein*) untersucht, welches eine wichtige Rolle bei der Cholesterinsynthese spielt.

Um die Expression der *nef*-Allele zu überprüfen, wurden Western Blot Analysen von 293T Zellen, welche mit proviralen Konstrukten transfiziert worden waren, durchgeführt. Es wurden provirale HIV-1 Konstrukte verwendet, die AU1-getaggte Nef-Proteine exprimieren, da der verfügbare Nef-Antikörper nur das HIV-1 NL4-3 Nef-Protein erkennt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl Wildtyp als auch die mutierten Nef-Proteine effektiv exprimiert wurden (Abb. 4). Wie erwartet, zeigte die C-terminal verkürzte NA7e197\* Variante ein geringeres Molekulargewicht als die vollständigen Nef-Proteine. Außerdem führte die Verkürzung zur Reduktion der Proteinexpression (Abb. 4). Als Negativkontrolle wurde bei den Experimenten ein *nef*-defektes (*nef*-) HIV-1 NL4-3 Konstrukt verwendet.





**Abb. 4: Effektive Expression der untersuchten HIV-1 und SIVcpz Nef-Proteine.** Lysate von 293T Zellen wurden mittels Western Blot auf Nef-Expression getestet. Die 293T-Zellen sind zuvor mit proviralen Konstrukten, welche die dargestellten *nef*-Gene enthalten, transfiziert worden. Es wurden provirale HIV-1 Konstrukte verwendet, die AU1-getaggte Nef-Proteine exprimieren, da der verfügbare Nef-Antikörper nur das HIV-1 NL4-3 Nef-Protein erkennt und in dieser Arbeit aber auch andere Nef-Proteine verwendet wurden. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-Au1-Tag Antikörper. Mock stellt die uninferzierte Kontrolle dar. Als Längenstandard zur Bestimmung der Proteingröße wurde eine „Protein-Leiter“ verwendet, die es erlaubt die Größe der untersuchten Nef-Proteine in Kilo-Dalton (kDa) zu ermitteln.

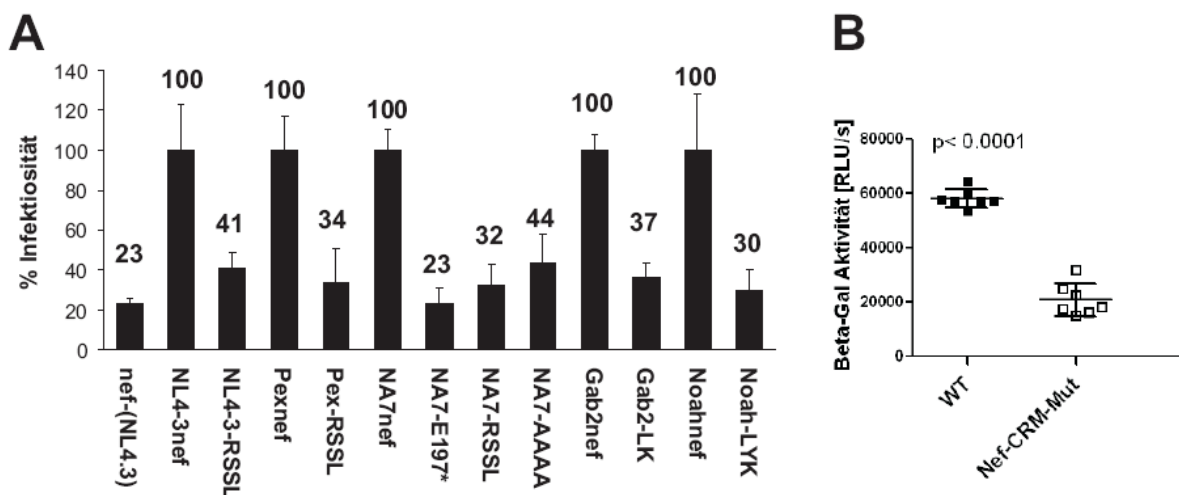
### 3.2 Das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif ist nicht essentiell für die Nef-vermittelte Steigerung der viralen Infektiosität

Es wurde postuliert, dass das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif am C-Terminus des Nef-Proteins wichtig für dessen Fähigkeit ist, die virale Infektiosität zu steigern (Zheng *et al.*, 2003). In dieser Studie wurde jedoch lediglich das NL4-3 Nef analysiert. Somit blieb unklar, ob dieses Motif von genereller Bedeutung für die Nef-vermittelte Steigerung der Infektiosität von HIV-1 ist. Die Nef-Proteine der direkten Vorläufer von HIV-1, SIVcpz, enthalten kein potentiell Cholesterin-Erkennungs-Motif. Hier sollte untersucht werden, ob das Einfügen dieses Motifs deren Aktivität in der Steigerung der viralen Infektiosität weiter erhöht.

Durch transiente Transfektion von 293T-Zellen wurden Virusstocks der pBRNL4-3-*nef*-TPI Konstrukte hergestellt. Anschließend wurden Indikatorzellen

(P4-CCR5 Zellen) mit äquivalenten Mengen p24 Antigen infiziert. Das Genom der P4-CCR5 Zellen enthält ein stabiles  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen, welches unter der Kontrolle des HIV-LTR-Promotors steht. Kommt es zur Infektion der Zelle und damit zur Expression des viralen Tat-Proteins, welches an den LTR-Promotor bindet, bildet die infizierte Zelle  $\beta$ -Galaktosidase. Diese wird mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-Test photometrisch im Luminometer gemessen. Somit ist die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität proportional zur viralen Infektiosität.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass alle Veränderungen im C-terminalen Bereich von Nef die Fähigkeit, die virale Infektiosität zu steigern, reduzieren, unabhängig davon, ob ein potentielles Cholesterin-Erkennungs-Motif zerstört oder generiert wurde (Abb. 5). Das C-terminal verkürzte NA7 E197\* Nef-Protein war vollständig inaktiv in der Steigerung der viralen Infektiosität. Die anderen mutierten HIV-1 und SIVcpz Nef-Proteine zeigten eine geringe Aktivität und eine virale Infektiosität von 30-44% der jeweiligen Wildtypen (Abb. 5 A). Der Unterschied zwischen den Wildtyp (WT) Nef-Proteinen und den Nef-Varianten (Nef-CRM-Mut) in der Steigerung der viralen Infektiosität war hoch signifikant (Abb. 5 B). Die Ergebnisse zeigen, dass der C-terminale Bereich des Nef-Proteins wichtig für dessen Fähigkeit ist, die virale Infektiosität zu steigern. Allerdings ist die funktionelle Bedeutung dieser Region des Nef Proteins nicht vom Vorhandensein eines potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motifs abhängig.



**Abb. 5: Das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif ist nicht essentiell für die Nef-vermittelte Steigerung der Infektiosität.** P4-CCR5 Zellen wurden mit 10ng viralem p24 Antigen enthaltenden Virusstocks der pBRNL4-3-*nef*-TPI Varianten bzw. der Wildtypen infiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen lysiert und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität als Maß für die virale Infektiosität in RLU (*engl. Relative Light Unit*) pro Sekunde gemessen. Daraus wurden die entsprechenden RLU/s für 10ng p24 Antigen berechnet.

(A) Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Infektiosität (Ordinate) der untersuchten Nef-Varianten in Bezug zum jeweiligen HIV-1 Wildtyp Nef-Protein (100%) . Als Negativkontrolle diente ein Konstrukt mit einem defektem *nef*-Gen (*nef*-).

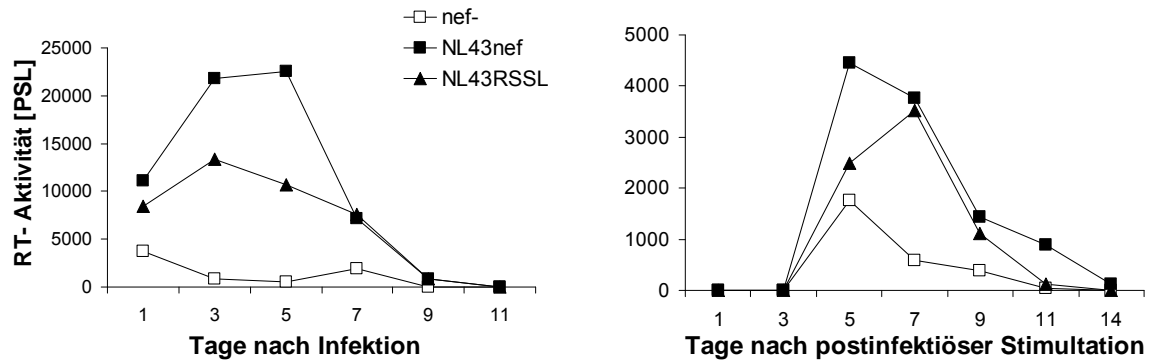
(B) Vergleich der Infektiosität der Wildtypen (WT) mit den Nef-Varianten (Nef-CRM-Mut) mittels des Zweistichproben-t-Tests.

### 3.3 Das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif ist nicht essentiell für die Nef-vermittelte Steigerung der Replikation

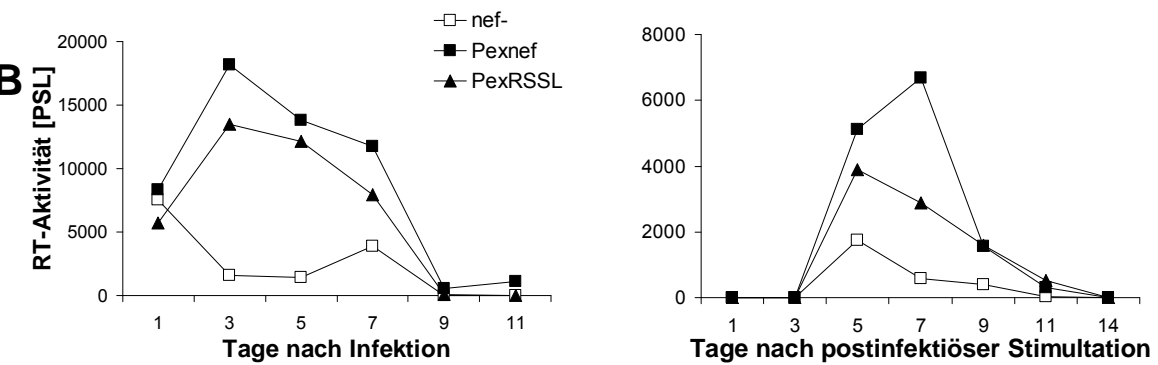
Nef erhöht, unabhängig von der Infektiositätssteigerung, die virale Replikation in peripheren Blutmonozyten (PBMCs) (Miller *et al.*, 1994; Spina *et al.*, 1994). Ob das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif essentiell für diese Nef-Funktion ist, blieb unklar. Um dies zu klären, wurden PBMCs mit den pBRNL4-3-*nef*-TPI Konstrukten infiziert und die Virusproduktion über einen Zeitraum von zwei Wochen analysiert. Konstrukte, die intakte *nef*-Allele enthielten, replizierten im Durchschnitt drei- bis fünffach effizienter als das *nef*-defekte (*nef*-) Kontrollvirus (Abb.6 A – E). Sowohl die HIV-1 Nef-Varianten mit zerstörtem Cholesterin-Erkennungs-Motif als auch die SIVcpz Varianten mit eingefügtem Motif replizierten schlechter als die zugehörigen Wildtypen. Die NA7 Nef-Proteine mit einer C-terminalen Verkürzung (NA7-e197\*, ausgeschaltetes Cholesterin-Erkennungs-Motif) und oder vier Punktmutationen (NA7-AAAA) waren nicht in der Lage, die Virusvermehrung zu steigern (Abb. 6C und 7). Die Replikation liegt hier im Bereich der Negativkontrolle (*nef*-) mit 43% (NA7-e197\*) bzw. 44% (NA7-AAAA) im Vergleich zum Wildtyp NA7*nef* (Abb. 7). Die anderen Varianten führten zu einem intermediären Phänotyp zwischen den Wildtyp und den *nef*-defekten Viren. Die kummulative Virusproduktion, angegeben in % der jeweiligen Wildtypreplikation, verdeutlicht dies. Hier variierte die Virusproduktion der HIV-1 Mutanten zwischen 59% (NL4-3-RSSL) und 72% (Pex-RSSL) und die der SIVcpz Varianten von 79% (NoakLYK) bis 85% (Gab2LK) (Abb. 7).

Analog zur Steigerung der viralen Infektiosität ist somit der C-terminale Bereich von Nef wichtig für die Stimulierung der viralen Replikation in PBMCs unabhängig vom potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif.

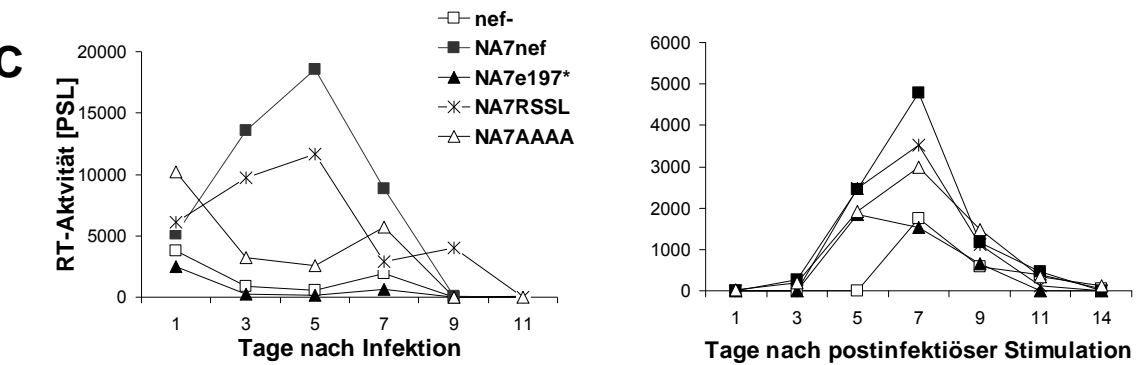
**A**



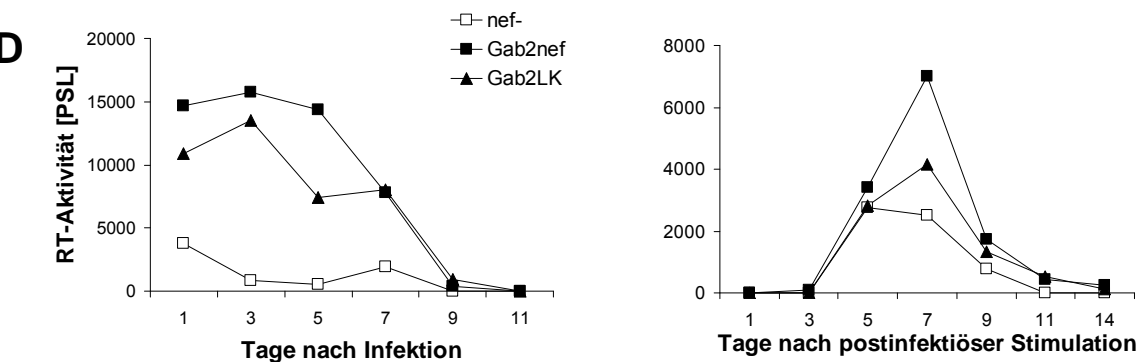
**B**



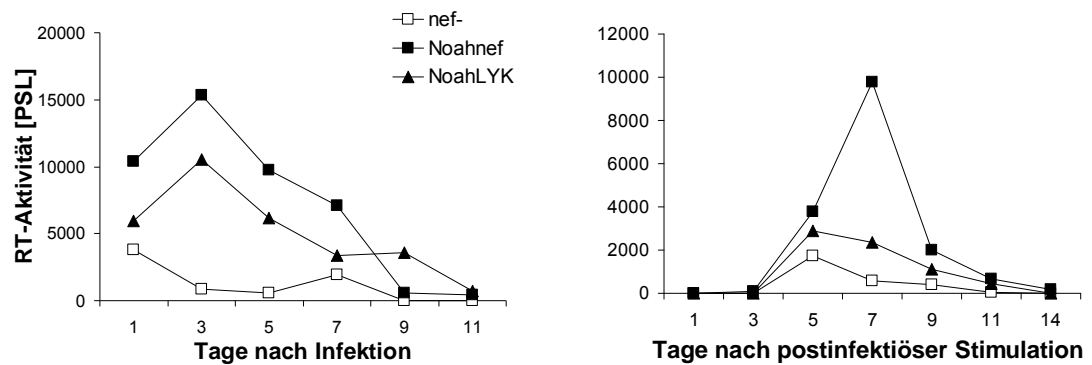
**C**



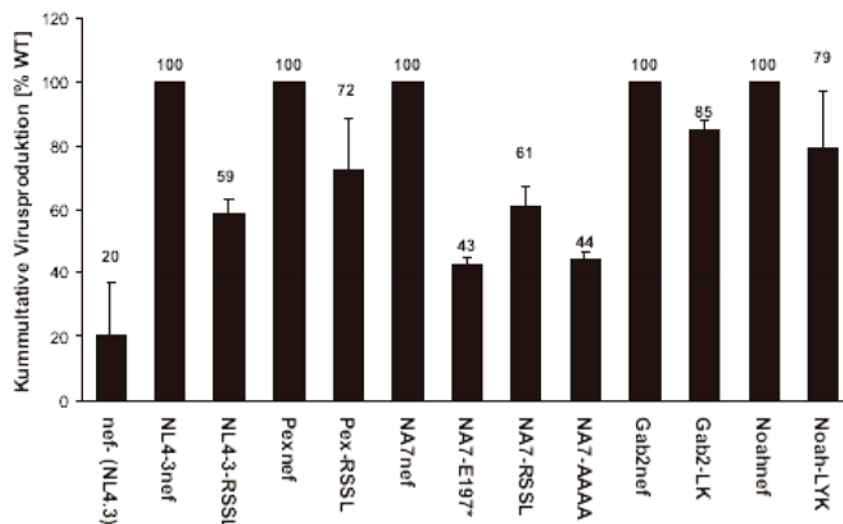
**D**



E



**Abb. 6: Replikation der Nef-Varianten in Peripheren Blutmonozyten (PBMCs).** Die PBMCs wurden mit 1ng viralem p24 Antigen enthaltenden Virusstocks der pBRNL4-3-*nef*-TPI Varianten bzw. der Wildtypen (A-E) in Doppelansätzen infiziert: Links die repräsentativen Replikationskinetiken in prästimulierten (2µg/ml PHA, 10ng/ml IL-2 für drei Tage) PBMCs über 11 Tage. Rechts die repräsentativen Replikationskinetiken in drei Tage nach Infektion stimulierten (6µg/ml PHA, 20ng/ml IL-2) PBMCs über 14 Tage. Die Replikation wurde mittels RT-Tests von jedem zweiten bis dritten Tag aus dem Kulturmedium gewonnenen Überständen ermittelt. Vergleichbare Ergebnisse wurden in einem zweiten Experiment mit PBMCs eines weiteren Spenders erhalten. Die RT-Aktivität als Maß für die virale Replikation wurde in PSL (engl.: *photo stimulated light emission*) ermittelt.



**Abb. 7: Kummulative Virusproduktion in Peripheren Blutmonozyten (PBMCs).** Die PBMCs wurden mit 1ng viralem p24 Antigen enthaltenden Virusstocks der pBRNL4-3-*nef*-TPI Varianten bzw. der Wildtypen in Doppelansätzen infiziert. Die Virusproduktion wurde in prästimulierten (2µg/ml PHA, 10ng/ml IL-2 für drei Tage) PBMCs über 11 Tage ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der kummulativen Virusproduktion (Ordinate) der untersuchten Nef-Varianten in Bezug zum jeweiligen HIV-1 Wildtyp (WT) Nef-Protein (100%). Als Negativkontrolle diente ein Konstrukt mit einem defektem *nef*-Gen (*nef*-).

### 3.4 Rolle des potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motifs in der Nef-vermittelten Modulation von Oberflächenrezeptoren

In infizierten Zellen moduliert Nef die Oberflächenexpression verschiedener Rezeptoren, die für die Funktionalität von Immunzellen von Bedeutung sind (Bevan and Braciale, 1995; Yang *et al.*, 1996; Kirchhoff *et al.*, 2004; Münch *et al.*, 2005; Schindler *et al.*, 2006). Ob Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif sich auf diese Nef-Funktionen auswirken, wurde in früheren Arbeiten allerdings nicht untersucht. Es war von Interesse herauszufinden, wie sich die mutierten HIV-1 und SIVcpz Nef-Proteine im Vergleich zu den Wildtypen verhalten und ob sich manche Mutationen selektiv auf die Modulation bestimmter Oberflächenrezeptoren auswirken.

Dies wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Dazu wurden durch Kotransfektion mit Vesikulärem Stomatitis Virus G (VSV-G) pseudotypisierte Virusstocks der pBRNL4-3-*nef*-IRES-eGFP Varianten hergestellt. Die pseudotypisierten Viren tragen das Hüllprotein des Vesikulären Stomatitis Virus, was eine von CD4 unabhängige Infektion der Zellen bewirkt. So kann die Nef-vermittelte Steigerung der Infektiosität umgangen werden. Außerdem wird eine hohe Transduktionseffizienz erreicht und somit die Analyse einer großen Anzahl infizierter Zellen im FACS ermöglicht. Infizierte Zellen koexpressieren Nef und eGFP von einer bicistronischen mRNA. Dies macht die grüne Fluoreszenz zu einem Marker der Nef-Expression und somit der Infektion der Zelle. Die Zellen können nun mit einem Antikörper gegen bestimmte Oberflächenrezeptoren gefärbt werden. Die FACS-Analyse ermöglicht dann eine Korrelation der Rezeptormodulation mit der Nef-Expression.

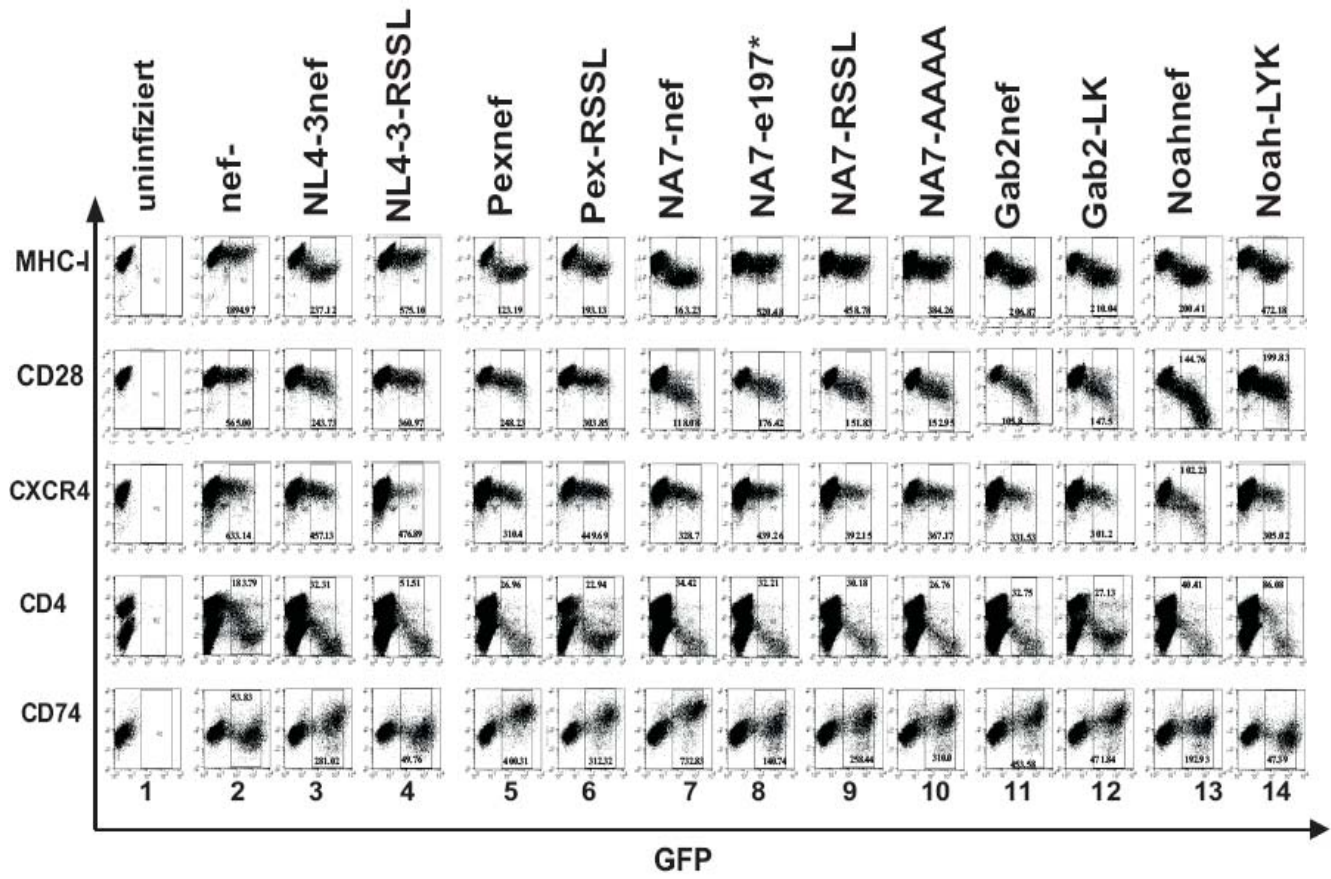
Die Ergebnisse zeigen, dass der Effekt von Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif des Nef-Proteins auf dessen Fähigkeit zur Modulation zellulärer Rezeptoren stark vom jeweiligen *nef*-Allel abhängt (Abb. 8A). Viren, die funktionelle Wildtyp Nef-Proteine exprimieren, regulieren MHC-I, CD28 und CD4 herunter und CD74 herauf (Abb. 8 B-F). Die Modulation von MHC-I, CD28 und CXCR4 wurde in Jurkat-Zellen, einer humanen T-Zelllinie, untersucht. MHC-I Rezeptoren dienen der Antigenpräsentation und sind auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus zu finden (Bach *et al.*, 1976). Bei CD28 und CXCR4 handelt es sich um Rezeptoren, die auf T-Zellen zu finden sind. CD28 spielt eine Rolle bei der T-Zell-Aktivierung (Linsley *et al.* 1993). Der Chemokinrezeptor

CXCR4 dient HIV als Korezeptor für die Bindung und den Eintritt in T-Zellen (Doranz *et al.*, 1997). Alle HIV-1 Varianten und die SIVcpz Variante Noah-LYK zeigten eine reduzierte Aktivität in der Herabmodulation von MHC-I (Abb. 8B). Bei SIVcpz Gab2-LK war kein Unterschied zum Wildtyp zu beobachten. Ähnlich verhält es sich bei der CD28-Modulation (Abb.8 C). Alle HIV-1 und SIVcpz *nef*-Allele hatten nur einen geringen Effekt auf die CXCR4-Expression und nur die SIVcpz Noah-LYK Nef Variante war weniger aktiv als das Wildtyp Nef-Protein (Abb.8 D).

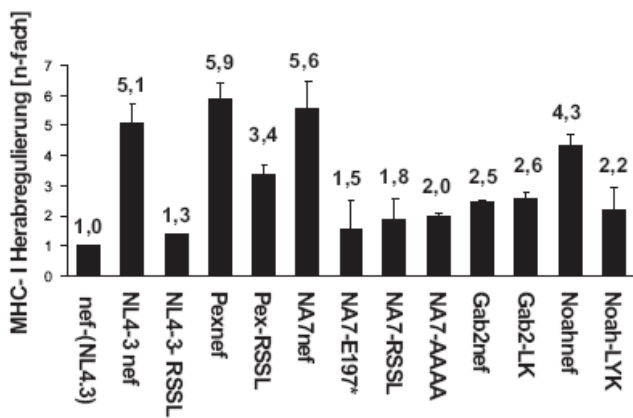
Die CD4-Modulation durch Nef wurde in peripheren Blutmonozyten untersucht. Nef-intakte Viren sind in der Lage, CD4 von der Zelloberfläche herunterzuregulieren (Abb. 8 E). Das virale Protein Vpu hat ebenfalls einen Effekt auf die Expression von CD4 an der Zelloberfläche. CD4 Rezeptoren sind auf T-Zellen, Monozyten und Makrophagen zu finden und wichtig als Korezeptor für die Antigenerkennung (Sattentau *et al.*, 1988, Lifson *et al.*, 1989). HIV und SIV nutzen CD4 als Rezeptor, um T-Zellen und Makrophagen zu infizieren (Lama, 2003). Drei der untersuchten Nef-Varianten, Pex-RSSL, NA7-AAAA und Noah-LYK, zeigten eine reduzierte Aktivität in der Herabregulierung von CD4. Bei den restlichen Varianten war kein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Wildtypen festzustellen (Abb. 8 E).

Die Modulation von CD74 wurde in THP-I Zellen untersucht. MHC Klasse II Moleküle präsentieren Peptide, die durch Degradation endozytotisch aufgenommener Antigene entstehen. CD74 ist ein wichtiges akzessorisches Molekül, das die intrazelluläre Faltung und Antigenbeladung der MHC Klasse II Moleküle kontrolliert. Stabile Expression von CD74 behindert die Antigenpräsentation (Roche *et al.*, 1992; Stumptner-Cuvelette *et al.*, 2002). Nef-intakte Viren regulieren CD74 hinauf (Abb. 8 F). Alle HIV-1 Varianten und die SIVcpz Variante Noah-LYK steigerten die Oberflächenexpression von CD74 weniger stark als die Wildtypen. Lediglich das SIVcpz Gab2-LK war ebenso aktiv wie das Wildtyp Gab2 Nef-Protein (Abb. 8 F).

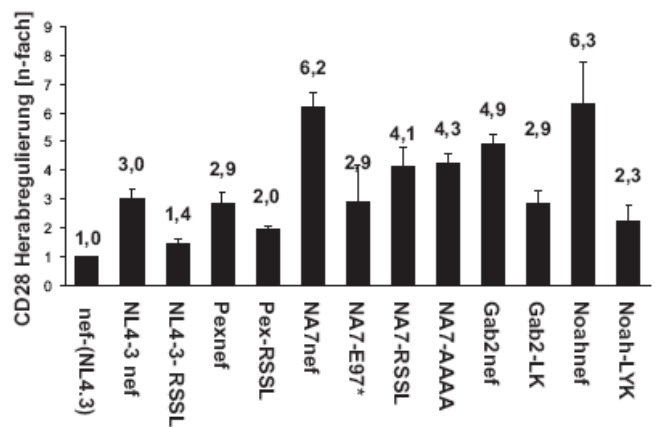
**A**



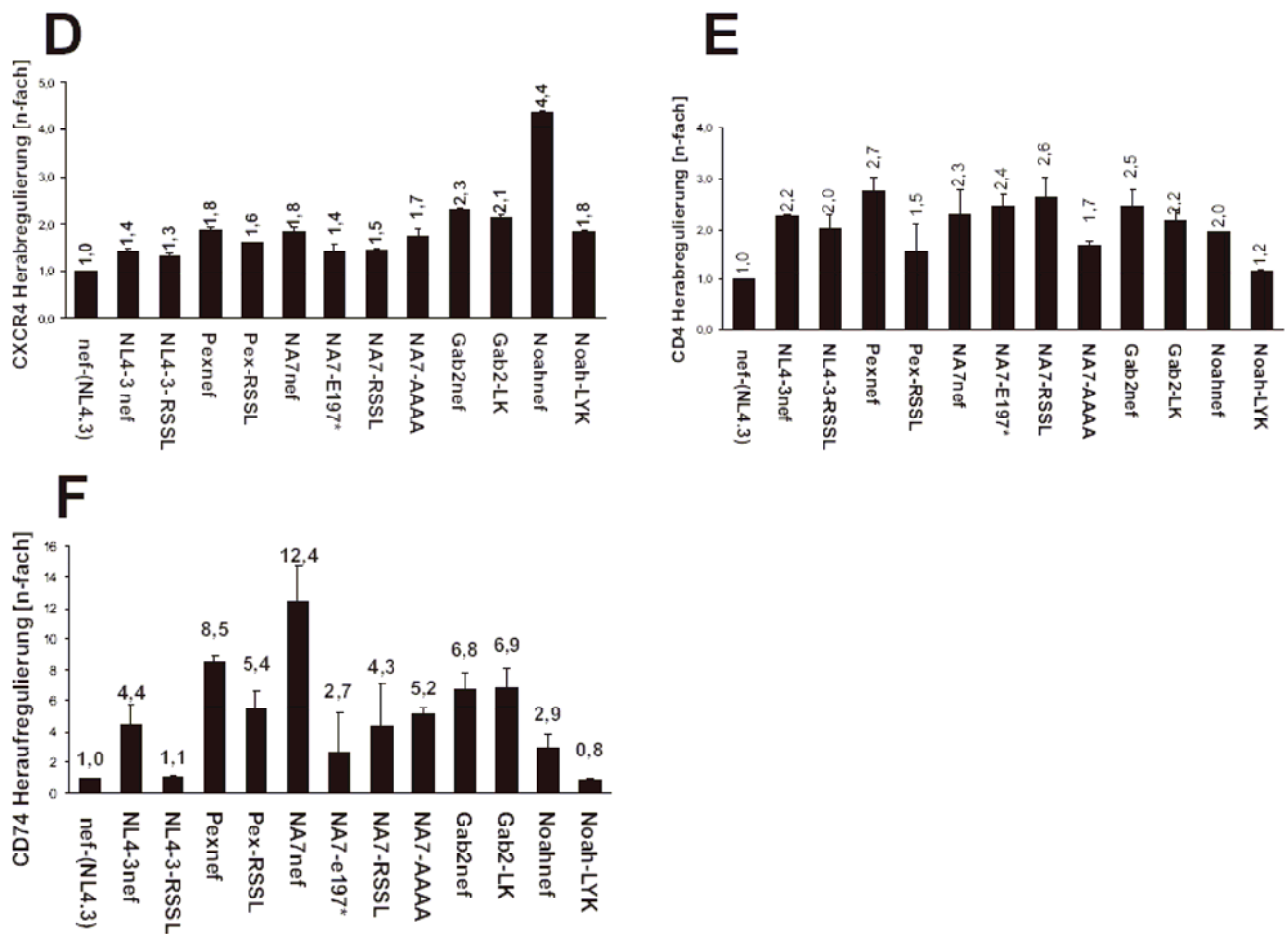
**B**



**C**





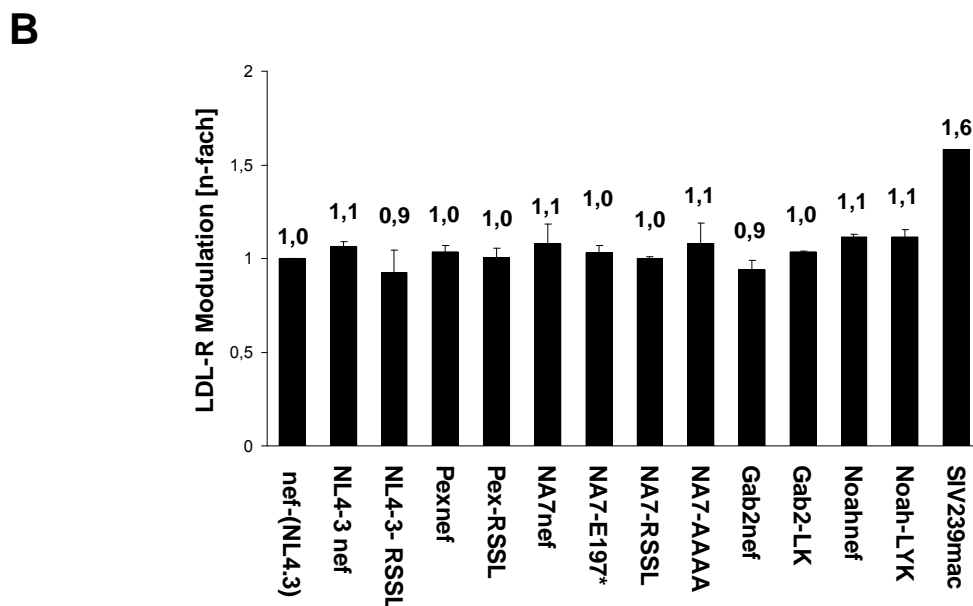
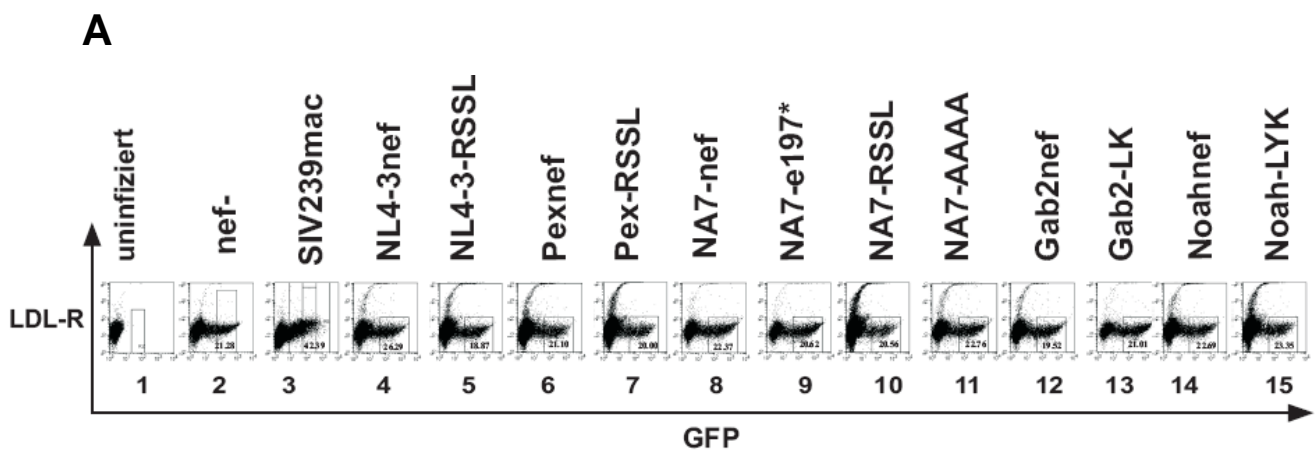


**Abb. 8: Modulation von Oberflächenrezeptoren.** (A) Dargestellt sind repräsentative Primärdaten der FACS-Analysen. Jurkat Zellen, prästimulierte Periphere Blutmonozyten (PBMCs) und THP-1 Zellen wurden mit Virusstocks der HIV-1 und SIVcpz Varianten, entsprechenden Wildtypen und Negativkontrolle (nef-) infiziert. Drei Tage später erfolgte die Färbung mit den verschiedenen PE-konjugierten Antikörpern und die FACS-Analyse. Infizierte Zellen koexpressieren Nef und eGFP von einer bicistronischen mRNA. Dies macht die grüne Fluoreszenz zu einem Marker der Nef-Expression und somit der Infektion der Zelle. Auf den Abszissen ist die Intensität der Grünfluoreszenz (GFP) zu erkennen, welche die Stärke der Nef-Expression anzeigt. Auf den Ordinaten ist die Intensität der Rotfluoreszenz zu erkennen, welche die relative Gesamtmenge der detektierten Oberflächenrezeptoren auf der Zelle widerspiegelt. Die FACS-Analyse ermöglicht dann eine Korrelation der Rezeptormodulation mit der Nef-Expression. Diese Ergebnisse konnten jeweils in zwei bis drei weiteren Experimenten bestätigt werden.

(B –F) Dargestellt ist die n-fache Modulation von MHC-I (A), CD28 (B), CXCR4 (C) und CD4 (D) (Herabregulierung), sowie von CD74 (E) (Heraufregulierung). Die n-fache Regulierung der Oberflächenmarker wurde berechnet, indem die rote mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) eines definierten Bereiches der eGFP-Expression (in A gekennzeichnet) der Negativkontrolle (nef-) durch die MFI derselben Region der jeweiligen Nef-Variante geteilt wurde.

### 3.4.1 Analyse des Lowdensity-Lipoprotein-Rezeptors

Es wurde beschrieben, dass in Zellen, die mit *nef*-intakten HIV-1 infiziert sind, die Aktivität zahlreicher cholesterogener Gene gesteigert ist. So ist unter anderem die Anzahl an Lowdensity-Lipoprotein-Rezeptoren (LDL-R) auf der Zellmembran vermehrt (van't Wout *et al.*, 2005). In früheren Experimenten wurde beobachtet, dass das aus Rhesusaffen stammende SIV239mac den LDL-Rezeptor heraufreguliert (unveröffentlichte Daten, Schindler *et al.*). Dieser Effekt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abb. 9B). Im Gegensatz dazu modulierte keines der untersuchten HIV-1 und SIVcpz Nef-Proteine die Oberflächenexpression des LDL-Rezeptors.

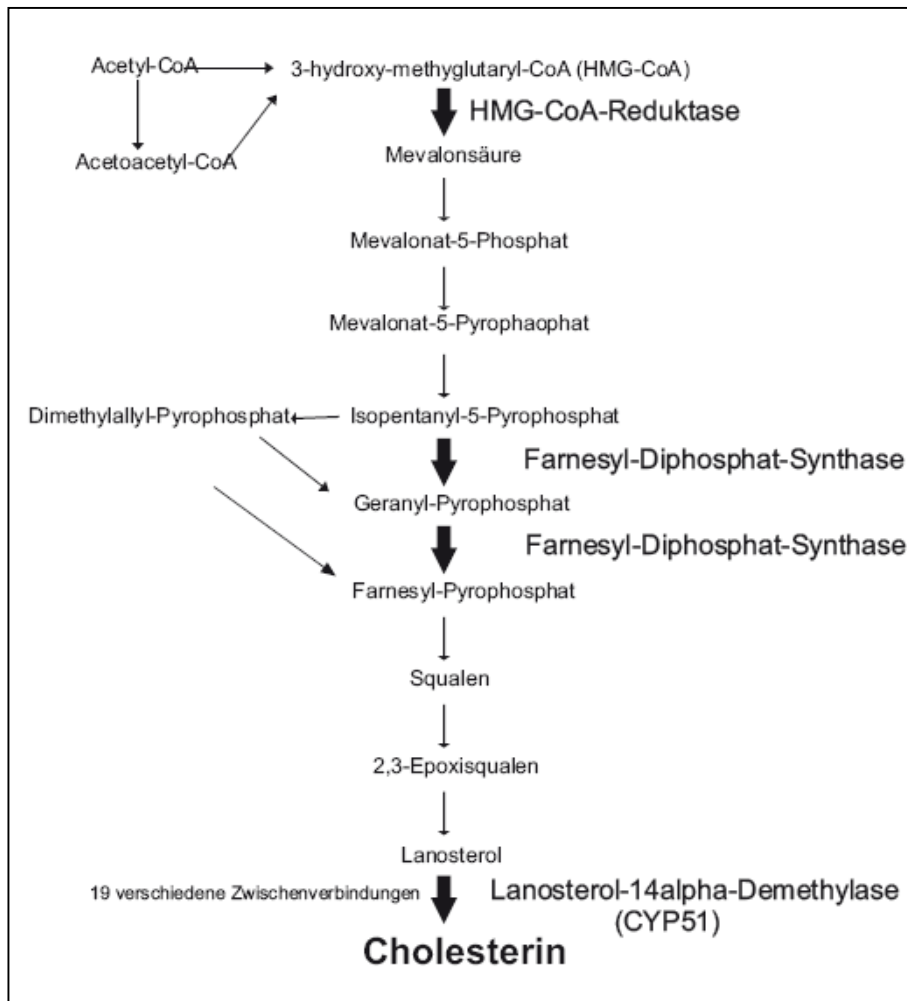


**Abb. 9: Effekt von Nef auf die Expression des Low Density Lipoprotein-Rezeptors (LDL-R).** (A) Dargestellt sind repräsentative Primärdaten der FACS-Analysen. Jurkat Zellen wurden mit Virusstocks der pBRNL4-3-*nef*-IRES-eGFP Varianten und entsprechenden Wildtypen, Negativkontrolle (*nef*-), sowie SIV239mac als Positivkontrolle infiziert. Drei Tage später erfolgte die Färbung mit dem LDL-R Antikörper und einem zweiten PE-konjugierten Antikörpers, sowie die FACS-Analyse. Infizierte Zellen koexpressieren Nef und eGFP von einer bicistronischen mRNA. Dies macht die grüne Fluoreszenz zu einem Marker der Nef-Expression und somit der Infektion der Zelle. Auf den Abszissen ist die Intensität der Grünfluoreszenz (GFP) zu erkennen, welche die Stärke der Nef-Expression anzeigt. Auf den Ordinaten ist die Intensität der Rotfluoreszenz zu erkennen, welche die relative Gesamtmenge der detektierten Oberflächenrezeptoren auf der Zelle widerspiegelt. Die FACS-Analyse ermöglicht dann eine Korrelation der Rezeptormodulation mit der Nef-Expression. Diese Ergebnisse konnten jeweils in zwei bis drei weiteren Experimenten bestätigt werden.

(B) Dargestellt ist die n-fache Modulation der Nef-CRM-Mut Varianten und entsprechenden Wildtypen. Die n-fache Regulierung der Oberflächenmarker wurde berechnet, indem die rote mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) eines definierten Bereiches der eGFP-Expression (in A gekennzeichnet) der Negativkontrolle (*nef*-) durch die MFI derselben Region der jeweiligen Nef-Variante geteilt wurde.

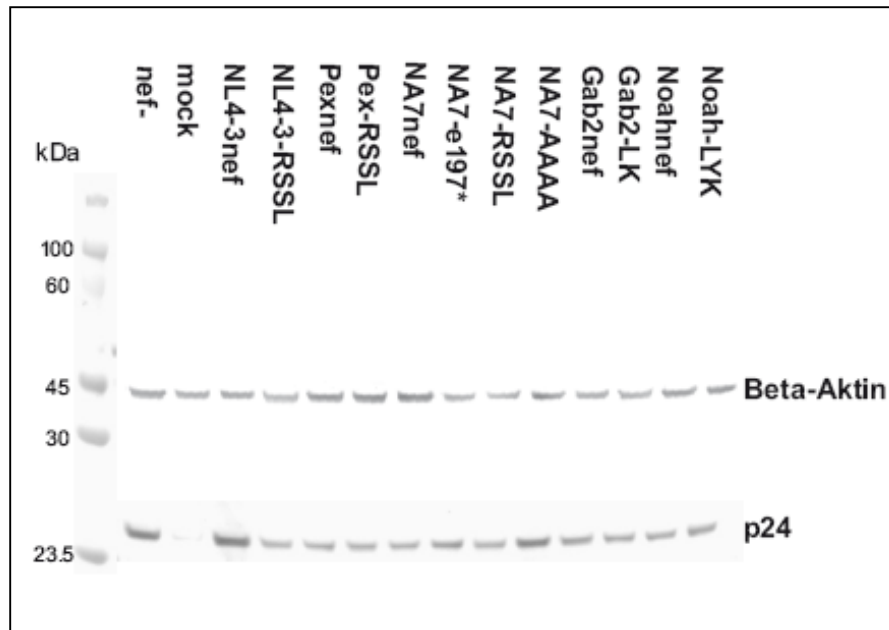
### **3.5 Das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif hat keinen Einfluss auf die Nef-abhängige Beeinflussung der Cholesterinsynthese**

In früheren Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass HIV-1 verschiedene Enzyme der Cholesterinsynthese hochreguliert und dieser Effekt von einem intaktem *nef*-Gen abhängt (van't Wout *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif diese Nef-Aktivität beeinträchtigen. Es wurde die Expression von drei Enzymen der Cholesterinsynthese untersucht (Abb. 10). Zum einen das Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese: Die 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA Reduktase (HMG-CoA-Reduktase). Des Weiteren die Expression der Farnesyl-Diphosphat-Synthase (FDPS) und der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51), welche laut früherer Arbeiten durch Nef in ihrer Expression gesteigert werden (van't Wout *et al.*, 2005).



**Abb. 10: Schematische Darstellung der Cholesterinsynthese.** Die untersuchten Enzyme und die von ihnen katalysierten Reaktionsschritte sind hervorgehoben.

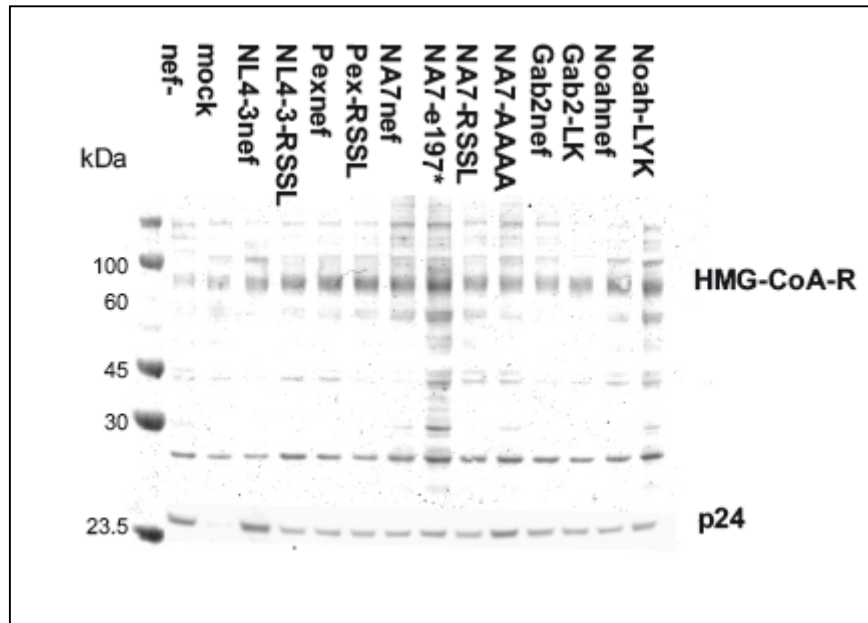
Zur Kontrolle der Transfektion und erfolgreichen Virusproduktion wurden die Proben zusätzlich auf das virale p24 Protein und auf Aktin als Ladekontrolle geprüft. In allen untersuchten Zelllysaten waren vergleichbare Mengen an p24 Antigen und Beta-Aktin nachweisbar (Abb. 11).



**Abb. 11: Nachweis von Beta-Aktin und dem viralen p24 Antigen.** Die untersuchten Lysate von 293T-Zellen, welche mit den pBRNL4.-3-*nef*-TPI Varianten und den entsprechenden Wildtypen transfiziert worden waren, wurden mittels Western Blot auf Beta-Aktin als Ladekontrolle und auf das virale p24 Antigen als Kontrolle der vorhandenen Virusproduktion getestet. Mock stellt die uninfierte Kontrolle dar. Als Längenstandard zur Bestimmung der Proteingröße wurde eine „Protein-Leiter“ verwendet, die es erlaubt die Größe der untersuchten Nef-Proteine in Kilo-Dalton (kDa) zu ermitteln.

### 3.5.1 Das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif ist nicht essentiell für die Expressionssteigerung der HMG-CoA-Reduktase

Western Blot Analysen zeigten, dass Nef die Expression der HMG-CoA-Reduktase steigert. Es war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp Nef-Proteinen und den C-terminal mutierten Nef-Varianten zu erkennen (Abb. 12). Der verwendete Anti-HMG-CoA Reduktase Antikörper erkannte nicht nur die 94-97kDa große HMG-CoA-Reduktase, sondern auch einige kleinere Fragmente, die durch die proteolytische Degradation der HMG-CoA-Reduktase entstanden sind (Abb. 12).



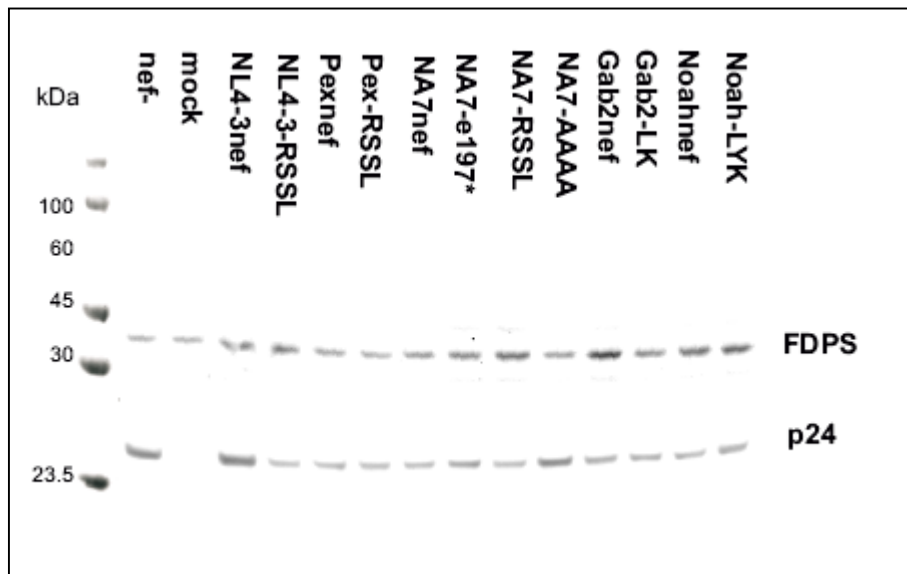
**Abb. 12: Expression der HMG-CoA Reduktase.**

Lysate von 293T-Zellen, welche mit den HIV-1 und SIVcpz Varianten und den entsprechenden Wildtypen transfiziert worden waren, wurden mittels Western Blot auf die Expression dieses Enzyms getestet. Das virale p24 Antigen diente als Kontrolle der vorhandenen Virusproduktion getestet. Mock stellt die uninfierte Kontrolle dar. Als Längenstandard zur Bestimmung der Proteingröße wurde eine „Protein-Leiter“ verwendet, die es erlaubt die Größe der untersuchten Nef-Proteine in Kilo-Dalton (kDa) zu ermitteln.

Dieses Ergebnis konnte in einem zweiten Experiment mit Lysaten einer weiteren Transfektion bestätigt werden.

### 3.5.2 Die Expression der Farnesyldiphosphatsynthase (FDPS) wird nicht durch Nef beeinflusst

Bei der Analyse der Expression des Enzyms FDPS zeigten sich vergleichbare Bandstärken bei allen untersuchten HIV-1 und SIVcpz *nef*-Allelen. Zu der Negativkontrolle (*nef*-) und uninfierte Kontrolle (mock) war kein Unterschied zu beobachten (Abb. 13).



**Abb. 13: Expression der Farnesyldiphosphatsynthase (FDPS).** Lysate von 293T Zellen, welche mit den HIV-1 und SIVcpz Varianten und den entsprechenden Wildtypen transfiziert worden waren, wurden mittels Western Blot auf die Expression der FDPS getestet. Als Kontrolle der vorhandenen Virusproduktion wurde das virale p24 Protein detektiert. Mock stellt die uninfiizierte Kontrolle dar. Als Längenstandard zur Bestimmung der Proteingröße wurde eine „Protein-Leiter“ verwendet, die es erlaubt die Größe der untersuchten Nef-Proteine in Kilo-Dalton (kDa) zu ermitteln.

Dieses Ergebnis konnte in einem zweiten Experiment mit Lysaten einer weiteren Transfektion bestätigt werden.

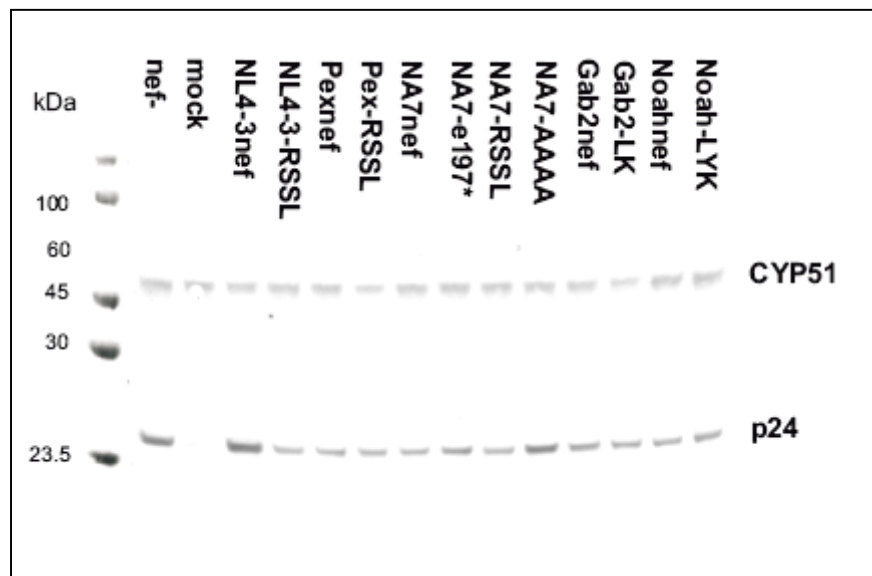
### 3.5.3 Das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif ist nicht essentiell für die Steigerung der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51) Expression durch Nef

Das bei dieser Untersuchung verwendete pGEM-CYP51-Luc Plasmid (freundlicherweise von der Peterlin Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt) enthält den CYP51-Promotor, welcher vor ein Luziferase-Reportergen kloniert wurde. Die Aktivierung des CYP51-Promotors führt zur Expression des Luziferase-Reportergens, die sich leicht nachweisen lässt.

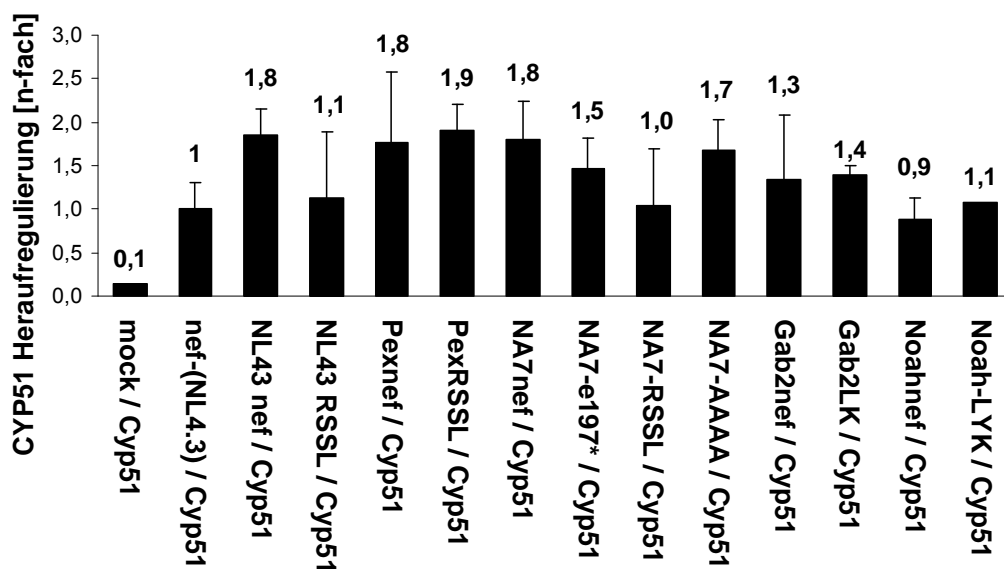
Es wurde für das HIV-1 NL4-3 Nef-Protein postuliert, dass es die Expression der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51) steigert (Zheng *et al.*, 2003). Dies ließ die Frage offen, ob dieser Effekt auch bei anderen HIV *nef*-Allelen und den Vorläufern SIVcpz zu beobachten ist. Des Weiteren war es von Interesse, ob die Mutationen in dem potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif eine Auswirkung auf diese Nef- Funktion haben. Die Expression von CYP51 wurde

sowohl auf Proteinebene mittels Western Blot als auch auf Ebene der Genexpression mittels des CYP51-Expressionsassay untersucht. Im Western Blot zeigte sich, dass Nef nicht die Proteinexpression von CYP51 beeinflusst (Abb. 14 A). Die Analyse der Genexpression offenbarte eine gesteigerte Expression von CYP51 durch alle HIV-1 *nef*-Allele, wenn auch nur bis zu 1,9fach (Abb. 14 B). Alle untersuchten SIVcpz *nef*-Allele hatten nur einen geringen Effekt auf die Genexpression von CYP51, welche durch die Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif nicht signifikant beeinflusst wurde.

A



B





**Abb. 14: Expression der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51).** (A) Lysate von 293T Zellen, welche mit den HIV-1 und SIVcpz Varianten und den entsprechenden Wildtypen transfiziert worden waren, wurden mittels Western Blot auf die Expression von CYP51 getestet. Als Kontrolle der vorhandenen Virusproduktion wurde das virale p24 Protein detektiert. Mock stellt die uninfierte Kontrolle dar. Als Längenstandard zur Bestimmung der Proteingröße wurde eine „Protein-Leiter“ verwendet, die es erlaubt die Größe der untersuchten Nef-Proteine in Kilo-Dalton (kDa) zu ermitteln. Dieses Ergebnis konnte in einem zweiten Experiment mit Lysaten einer weiteren Transfektion bestätigt werden.

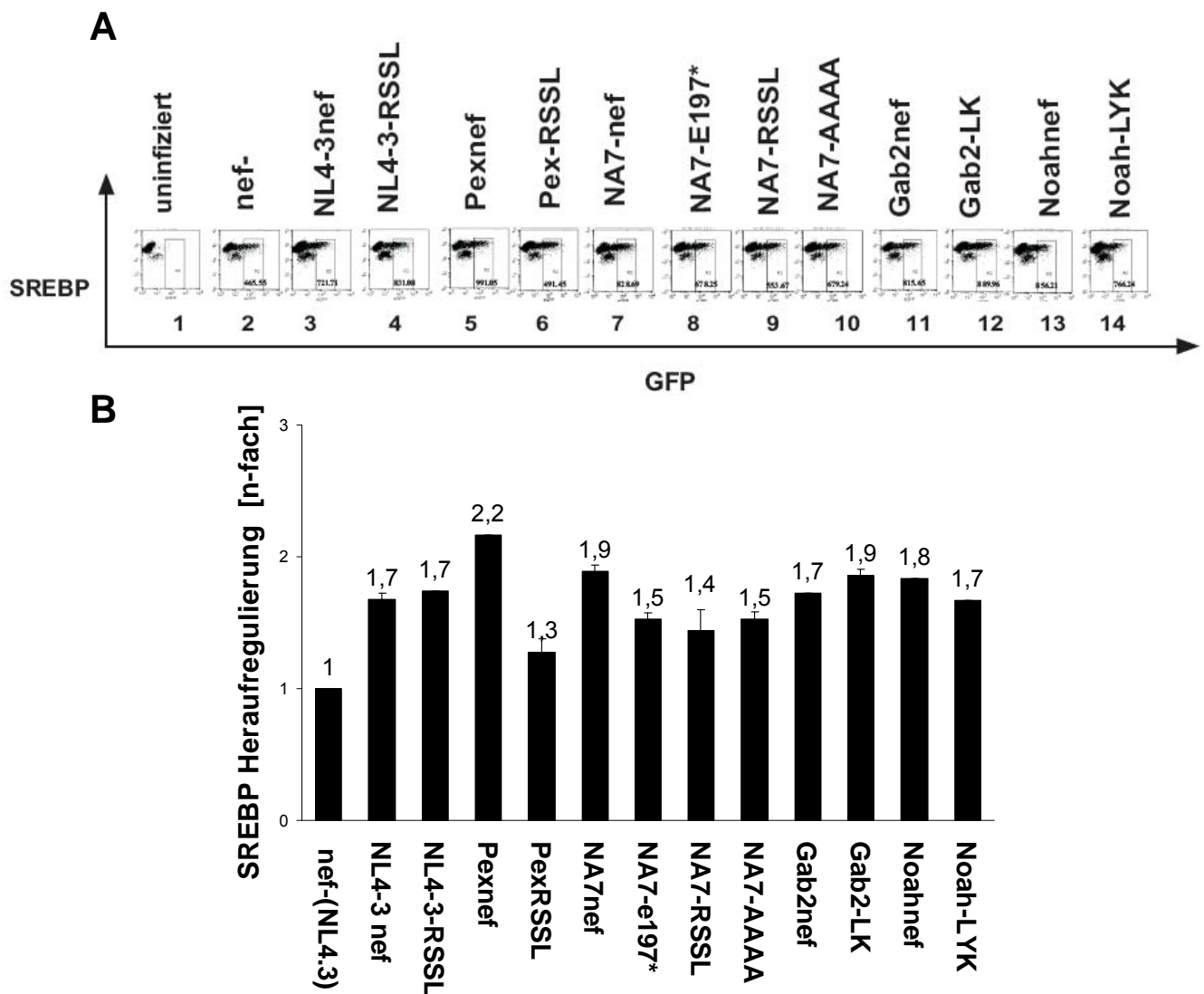
(B) Dargestellt ist die n-fache Heraufregulierung von CYP51. Das bei dieser Untersuchung verwendete pGEM-CYP51-Luc Plasmid enthält den CYP51-Promotor, welcher vor ein Luziferase-Reportergen kloniert wurde. Die Aktivierung des CYP51-Promotors führt zur Expression des Luziferase-Reportergens. Dies macht die messbare Luziferase-Aktivität zu einem Marker der CYP51-Expression.

Die n-fache Expression von CYP51 wurde berechnet, indem der Mittelwert der Luziferase-Aktivität der Negativkontrolle (nef-) durch den Mittelwert der jeweiligen Nef-Variante geteilt wurde.

Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten.

### **3.5.4 Das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif ist nicht essentiell für die Nef-vermittelte Steigerung der Expression von SREBP**

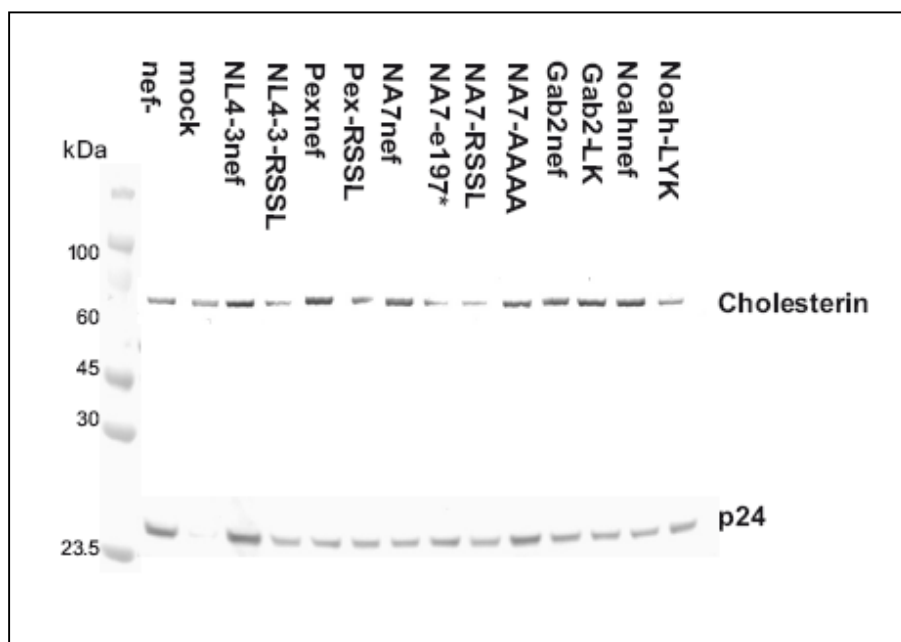
In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass HIV-1 Nef die Expression des Cholesterinsynthese-Regulatorproteins SREBP (engl.: *Sterol Regulatory Element Binding Protein*) erhöht (van't Wout *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob andere HIV-1 und SIVcpz Nef-Proteine ebenfalls diese Funktion ausüben und ob das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif zu diesem Effekt beiträgt. Die Daten zeigen, dass alle untersuchten *nef*-Allele die Expression des *Sterol Regulatory Element Binding Proteins* (SREBP) steigern (Abb. 15 A). Im Vergleich zur Negativkontrolle (nef-) regulierten alle *nef*-Allele SREBP herauf. Die HIV-1 und SIVcpz Nef-Proteine steigerten die Expression von SREBP zwischen 1,3- (Pex-RSSL) und 2,2-fach (Pexnef) (Abb. 15 B). Das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif war nicht essentiell für diesen Effekt.



**Abb. 15: Modulation des Transkriptionsfaktors SREBP.** (A) Dargestellt sind repräsentative Primärdaten der FACS-Analysen. Jurkat Zellen wurden mit Virusstocks der HIV-1 und SIVcpz Varianten, entsprechenden Wildtypen und der Negativkontrolle (nef-), infiziert. Drei Tage später erfolgte die Färbung mit dem SREBP- Antikörper und einem zweiten PE-konjugierten Antikörper, sowie die FACS-Analyse. Infizierte Zellen koexpressieren Nef und eGFP von einer bicistronischen mRNA. Dies macht die grüne Fluoreszenz zu einem Marker der Nef-Expression und somit der Infektion der Zelle. Auf den Abszissen ist die Intensität der Grünfluoreszenz (GFP) zu erkennen, welche die Stärke der Nef-Expression anzeigt. Auf den Ordinaten ist die Intensität der Rotfluoreszenz zu erkennen, welche die relative Gesamtmenge der detektierten Oberflächenrezeptoren auf der Zelle widerspiegelt. Die FACS-Analyse ermöglicht dann eine Korrelation der Rezeptormodulation mit der Nef-Expression. Dieses Ergebnis konnte jeweils durch zwei Experimente ermittelt werden. (B) Dargestellt ist die n-fache Heraufregulierung bezogen auf die Negativkontrolle (nef-). Die n-fache Regulierung der Oberflächenmarker wurde berechnet, indem die rote mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) eines definierten Bereiches der eGFP-Expression (in A gekennzeichnet) der Negativkontrolle (nef-) durch die MFI derselben Region der jeweiligen Nef-Variante geteilt wurde. Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten.

### 3.5.5 HIV-1 und SIVcpz mit funktionellem *nef*-Gen steigern den Cholesteringehalt infizierter Zellen

Es wurde beschrieben, dass das HIV-1 NL4-3 Nef-Protein die Cholesterinsynthese und somit den Cholesteringehalt in infizierten Zellen steigert (Zheng *et al.*, 2003; van't Wout *et al.*, 2005). Ob dies bei anderen HIV-1 *nef*-Allelen und für SIVcpz der Fall ist, wurde nicht untersucht. Auch war nicht bekannt, ob die Mutationen in dem potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif einen Effekt hervorrufen und wie sich die SIVcpz Varianten mit dem eingefügten Motif verhalten. Western Blot Analysen zeigten, dass sowohl die HIV-1 Wildtypen mit intaktem Nef als auch die SIVcpz Wildtypen den Cholesteringehalt infizierter Zellen steigern (Abb. 16). Im Vergleich zu den uninfizierten Zellen (mock) und der Negativkontrolle (*nef*-) wurden stärkere Banden beobachtet. Die mutierten Varianten zeigten bis auf SIVcpz Gab2LK schwächere Banden und waren somit beeinträchtigt. Dies zeigt, dass sich in infizierten Zellen der Cholesteringehalt verändert und sowohl Nef als auch das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif dabei eine Rolle spielen.



**Abb. 16: Analyse des Cholesteringehaltes infizierter Zellen.** Lysate von 293T Zellen, welche mit den HIV-1 und SIVcpz Varianten und den entsprechenden Wildtypen transfiziert worden waren, wurden mittels Western Blot auf die Expression des Lipids Cholesterin getestet. Als Kontrolle der vorhandenen Virusproduktion wurde das virale p24 Protein detektiert. Mock stellt die uninfizierte Kontrolle dar. Als Längenstandard zur Bestimmung der Proteingröße wurde eine „Protein-Leiter“ verwendet, die es erlaubt die Größe der untersuchten Nef-Proteine in Kilo-Dalton (kDa) zu ermitteln. Dieses Ergebnis konnte in einem zweiten Experiment mit Lysaten einer weiteren Transfektion bestätigt werden.

#### 4. Diskussion

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass Mutationen im C-terminalen potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif des HIV-1 NL4-3 Nef-Proteins dessen Fähigkeit ausschalten, die virale Infektiosität zu steigern (Zheng *et al.*, 2003). Die Autoren postulierten, dass durch die Bindung von Cholesterin an dieses Motif in Nef und die anschließende Inkorporation in Virionen deren Infektiosität erhöht wird. Allerdings wurde in dieser Studie lediglich das HIV-1 NL4-3 *nef*-Allel untersucht. Somit blieb unklar, ob dieses Motif tatsächlich von allgemeiner Bedeutung für diese Nef-Funktion ist. Außerdem wurde nicht analysiert, ob Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif auch andere Nef-Funktionen beeinträchtigen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit herauszufinden, ob tatsächlich die Bindung von Cholesterin dafür verantwortlich ist, dass HIV-1 und SIVcpz Nef-Proteine die Infektiosität viraler Partikel steigern und zu analysieren, ob Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motifs auch andere Nef-Funktionen beeinträchtigen. Dazu wurde dieses Motif mittels Mutagenese in drei funktionell gut charakterisierten HIV-1 *nef*-Allelen zerstört. In den Nef-Proteinen von SIVcpz, dem direkten Vorläufer von HIV-1, ist kein potentielles Cholesterin-Erkennungs-Motif vorhanden. Es wurde deshalb durch spezifische Mutagenese eingefügt, um herauszufinden, ob es deren Fähigkeit, die Virusinfektion zu erhöhen, weiter steigert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass alle Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif der drei untersuchten HIV-1 Nef-Proteine die virale Infektiosität reduzieren. Auf den ersten Blick scheint dieses Ergebnis die in der früheren Arbeit postulierte, wichtige funktionelle Rolle des potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motifs zu bestätigen (Zheng *et al.*, 2002). Allerdings erhöhten SIVcpz Nef-Proteine die virale Infektiosität mit ähnlicher Effizienz wie die von HIV-1, obwohl sie kein potentielles Cholesterin-Erkennungs-Motif enthalten. Außerdem steigerte das Einfügen eines solchen Motifs in SIVcpz Nef-Proteine deren Aktivität in der Erhöhung der Virusinfektiosität nicht weiter, sondern reduzierte sie. Dies zeigt, dass der C-terminale Bereich des Nef-Proteins wichtig für dessen Fähigkeit, ist die virale Infektiosität zu steigern. Das Vorhandensein des potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motifs spielt dabei jedoch keine Rolle.

Zheng *et al.* postulierten des Weiteren, dass Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif von Nef die Replikation von HIV-1 reduzieren. Mechanistisch soll das HIV-1 Nef-Protein sowohl die Cholesterinsynthese induzieren, als auch den Einbau von Cholesterin in Virionen erhöhen und so die Virusvermehrung steigern. Dem widersprechend wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass die Nef-vermittelte Steigerung der viralen Infektiosität in primären T-Zellen nicht mit der Infektiosität der viralen Partikel sondern mit der Herabregulierung von CD4 korreliert (Glushakova *et al.*, 2001; Lundquist *et al.*, 2002). Diese Herabregulierung erleichtert die Freisetzung neu gebildeter Partikel von der Zellmembran, da diese nicht wieder an das CD4 der virusproduzierenden Zelle binden (Lama *et al.*, 1999). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass die Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif von HIV-1 die Fähigkeit der Nef-Proteine zur Stimulation der viralen Replikation reduzieren. Allerdings führte auch das Einfügen eines potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif in die SIVcpz Proteine zum Aktivitätsverlust. In den durchgeführten Untersuchungen zeigten sich die HIV-1 *nef*-Allele in der Steigerung der viralen Infektiosität stärker beeinträchtigt als in ihrem Einfluss auf die virale Vermehrungsfähigkeit in PBMC-Kulturen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen früherer Arbeiten (Chowers *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994; Spina *et al.*, 1994; Aiken and Trono, 1995; Schwartz *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 1997; Glushakova *et al.*, 1999) ist also keine Korrelation zwischen der Nef-vermittelten Steigerung der Infektiosität viraler Partikel und der Effizienz der Virusvermehrung in PBMCs festzustellen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Effektivität der viralen Replikation wahrscheinlich von verschiedenen Nef-Funktionen abhängt (Kirchhoff *et al.*, 2008). Neben der Herabregulierung von CD4 spielen die Modulation von Signalwegen, die Induktion von Transkriptionsfaktoren und die zelluläre Aktivierung eine wichtige Rolle bei der Virusvermehrung.

Ob sich das Vorhandensein des potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif auf die Nef-vermittelte Modulation von Oberflächenrezeptoren auswirkt, wurde in früheren Arbeiten nicht untersucht. Um Informationen über die funktionelle Relevanz des potentiellen Motifs und den C-terminalen Bereich von Nef zu erhalten, wurde dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Herabregulierung von MHC-I, CD28, CXCR4 sowie CD4 und die Heraufregulierung von CD74

untersucht. Es zeigte sich, dass der Einfluß der Mutationen stark vom jeweiligen *nef*-Allel abhängt. Einige Mutationen im Cholesterin-Erkennungs-Motifs von Nef hatten beispielsweise einen starken Einfluss auf die Herabregulierung von MHC-I (Abb. 8A). Dies ist interessant, da eigentlich andere Domänen als der C-terminale Bereich des HIV-1 Nef-Proteins wichtig für die Modulation von MHC-I sein sollen. So wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass eine Region am N-Terminus in die Herabregulierung von MHC-I involviert ist (Greenberg *et al.*, 1998; Mangasarian *et al.*, 1999). Allerdings wurde auch postuliert, dass einige HIV-1 und SIV *nef*-Allele mit Mutationen in dieser Region MHC-I ebenfalls effizient herabregulieren können (Specht *et al.*, 2008). Dies zeigt, dass offensichtlich eine Vielzahl an Prozessen und entsprechenden Domänen an diesem Effekt beteiligt sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der C-Terminus des Nef-Proteins an der Herabregulierung von MHC-I beteiligt ist.

Die Rekrutierung von Cholesterin in Viruspartikel mittels Bindung an das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motif ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht wichtig für die Steigerung der viralen Infektiosität. Dies ist nicht überraschend, weil nur sehr wenige Nef-Moleküle in die Virionen eingebaut werden (Malim and Emerman, 2008; Kirchhoff *et al.*, 2008). Allerdings wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass Nef zur gesteigerten Cholesterinsynthese in infizierten Zellen beiträgt und dadurch die Zusammensetzung der viralen Membran moduliert (van't Wout *et al.*, 2005). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abb. 16). Die Modulation war allerdings unabhängig vom potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif im Nef-Protein. In der Studie von van't Wout und Kollegen wurde ebenfalls, mittels Microarray Analysen, gezeigt, dass HIV-1 die Genexpression und mRNA-Level des LDL-Rezeptor-Gens induziert bzw. moduliert. Dies ist interessant, da über eine vermehrte Expression des LDL-R die Cholesterin-aufnahme und somit auch der Cholesteringehalt einer Zelle gesteigert wird. Dementsprechend ergab sich für die vorliegende Arbeit die Frage, ob eine Nef-vermittelte Steigerung der Proteinexpression des LDL-Rezeptors in infizierten Zellen nachgewiesen werden kann. Das war jedoch nicht der Fall.

Des Weiteren erfolgte eine ebenfalls auf Proteinebene ausgeführte Analyse der möglichen Expressionssteigerung von Enzymen der Cholesterinsynthese. Die von van't Wout *et al.* (2005) in ihren Microarrayanalysen gefundenen Expressions-steigerungen der HMG-CoA-Reduktase, der

Farnesyldiphosphatsynthase und des *Sterol responsive element binding Proteins* (SREBP) konnten nur für das SREBP bestätigt werden. Auf Grund der schon in den uninfizierten Zellen sehr hohen Expression von SREBP und der nur geringen Steigerung dieser Expression in infizierten Zellen ist es jedoch fraglich, ob die Modulation durch Nef signifikant ist (Abb.15). Weiterhin konnte das Ergebnis von Zheng *et al.* (2003) einer Nef-vermittelten Expressionssteigerung des Enzyms Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51) bestätigt werden. Allerdings war der Effekt geringer als in der früheren Untersuchung (im Mittel nur eine 1,4fache Expressionssteigerung) und nicht bei allen *nef*-Allelen konserviert.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der C-terminale Abschnitt von Nef zwar eine wichtige Rolle für Steigerung der viralen Infektiosität spielt, dieser Effekt jedoch unabhängig vom Vorhandensein des Cholesterin-Erkennungs-Motifs ist. Der Einbau von Cholesterin in Virionen ist somit nicht der Mechanismus, über den Nef die virale Infektiosität steigert. Welche Interaktionen mit dem C-terminalen Bereich von Nef für die Infektiositätssteigerung wichtig sind, muss in zukünftigen Arbeiten geklärt werden. Beispielsweise soll die Interaktion zwischen Nef und der GTPase Dynamin2 wichtig für die Infektiositätssteigerung sein (Göttlinger *et al.*, 2007). Unbekannt sind jedoch der genaue Bindungsmechanismus und die Bindungsstelle für Dynamin2. Eine Beteiligung des C-terminalen Bereichs ist also denkbar und muss in zukünftigen Arbeiten geprüft werden. Von Interesse wäre dabei außerdem, ob sich die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Nef-Varianten in der Bindung von Dynamin2 unterscheiden und ob dies mit der Infektiositätssteigerung korreliert.

Die starke Abhängigkeit der viralen Replikationssteigerung und der Modulation verschiedener zellulärer Rezeptoren davon, in welchem *nef*-Allel die Mutation des Cholesterin-Erkennungs-Motifs eingefügt wurde, wirft neue Fragestellungen auf. Bislang war der C-terminale Bereich des HIV-1 lediglich als potentiell Cholesterin-Erkennungs-Motif bekannt. Warum diese Region in manchen Nef-Proteinen für die Modulation bestimmter Rezeptoren wichtig ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Bestätigt werden konnte, dass die HIV-Infektion den Cholesteringehalt infizierter Zellen steigert. Allerdings deuten die Ergebnisse darauf hin, dass dieser Effekt nicht mit der Nef-vermittelten Steigerung der viralen Infektiosität in Zusammenhang steht. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass die Beeinflussung der Cholesterinhomöostase und

Veränderungen im Cholesterintransport HIV-infizierter Zellen eine relevante Rolle bei der viralen Replikation von HIV und der Pathogenese von AIDS in infizierten Patienten spielen. Zusätzlich zu Untersuchungen der funktionellen Bedeutung des C-terminalen Bereichs von Nef muss dies durch weiteregehende, *in vivo* Analysen primärer Zielzellen von HIV, sowie durch Bindungs- und Funktionsanalysen geklärt werden.



## 5. Zusammenfassung

Das HIV-1 Nef-Protein übt eine Vielzahl von Funktionen aus, die wichtig für die virale Replikation und Pathogenität sind. Viele HIV-1 Nef-Proteine enthalten ein potentielles Cholesterin-Erkennungs-Motiv am C-terminus. Mutationen dieses Motifs im HIV-1 NL4-3 Nef-Protein reduzierten die virale Infektiosität und Vermehrungsfähigkeit. Aufgrund dieser Beobachtung wurde postuliert, dass Nef die virale Infektiosität dadurch steigert, dass es den Einbau von Cholesterin in Viruspartikel erhöht. Die Untersuchung beschränkte sich jedoch auf das HIV-1 NL4-3 Nef-Protein. Weiterhin wurde nicht analysiert, ob die Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif nicht auch andere Nef-Funktionen beeinträchtigen. Zudem ist dieses Motif in SIVcpz *nef*-Allelen nicht konserviert, obwohl diese in der Lage sind, die Infektion viraler Partikel zu erhöhen.

Hieraus ergaben sich die Ziele der vorliegenden Arbeit: (i) Herauszufinden, ob tatsächlich die Bindung von Cholesterin an das Cholesterin-Erkennungs-Motif in Nef verantwortlich für die Steigerung der viralen Infektiosität ist; (ii) zu klären, ob das generelle Vorhandensein eines potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motivs die Fähigkeit von Nef steigert, die virale Infektiosität zu erhöhen; (iii) den Effekt von HIV-1 und SIVcpz Nef-Varianten mit und ohne ein solches Erkennungs-Motif auf die Cholesterinhomöostase zu charakterisieren und (iv) aufzuklären, ob Mutationen im potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motivs auch andere Nef-Funktionen beeinträchtigen. Dazu wurden, mittels spezifischer Mutagenese, das potentielle Cholesterin-Erkennungs-Motiv in drei HIV-1 Nef-Proteinen zerstört und *vice versa* in zwei SIVcpz Nefs eingefügt und diese Nef-Varianten umfassend funktionell charakterisiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der C-terminale Bereich aller untersuchten HIV-1 und SIVcpz Nef-Proteine, unabhängig vom Vorhandensein eines Cholesterin-Erkennungs-Motif, eine wichtige Rolle bei der Erhöhung der viralen Infektiosität spielt. Sowohl das Zerstören dieses Motifs in drei HIV-1 *nef*-Allelen, als auch das Einfügen in zwei SIVcpz Nef-Proteine reduzierten deren Fähigkeit, die virale Infektiosität zu steigern. Somit sind also nicht die Bindung von Cholesterin an das potentielle Erkennungs-Motifs, sondern andere Interaktionen bzw. Funktionen des C-terminalen Bereichs von Nef wichtig für die virale Infektiosität. Obwohl HIV-1 die Cholesterinsynthese in infizierten Zellen induzierte, hing dieser Effekt ebenfalls nicht vom potentiellen Cholesterin-Erkennungs-Motif

im Nef-Protein ab. Weiterhin konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Mutationen in diesem potentiellen Motif häufig auch andere Nef-Funktionen, wie z.B. die Modulation von Oberflächenrezeptoren, beeinträchtigen. Welche Interaktionen und Funktionen des C-terminalen Bereichs im Nef-Protein für die Steigerung der viralen Infektiosität verantwortlich sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aiken C., Konner J., Landau N.R., Lenburg M.E., Trono D. (1994): Nef induces CD4 replication. *J Biol Chem.* 278: 3991.
2. Alexander, L., Z. Du, M. Rosenzweig, J. U. Jung, and R. C. Desrosiers. (1997): A role for natural simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 nef alleles in lymphocyte activation. *J. Virol.* 71: 6094-6099.
3. Aloia, R.C., Tian, H., Jensen, F.C. (1993) : Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 5181-5185.
4. Arganaraz ER, Schindler M, Kirchhoff F, Cortes MJ, Lama J. (2003): Enhanced CD4 down-modulation by late stage HIV-1 nef alleles is associated with increased Env incorporation and viral replication. *J Biol Chem.* 278: 33912-33919.
5. Baltimore, D. (1970): RNA-dependent DNA-polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature (Lond.)* 226: 1209.
6. Barbaro, G. (2006): Metabolic and cardiovascular complications of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. *Curr HIV Res.* 4: 79–85.
7. Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinét-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science* 220: 868-871.
8. Bevan, M. J. and T. J. Braciale. (1995): Why can't cytotoxic T cells handle HIV? *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92: 5765-5767.
9. Bour, S., Geleziunas, R., Wainberg, M.A. (1995): The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev.* 59: 63-93.

10. Bresnahan P.A., Yonemoto W., Ferrell S., Williams-Herman D., Geleziunas R., Greene W.C. (1998): A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr Biol.* 8: 1235-1238.
11. Bukrinsky, M.I., Sharova, N., Dempsey, M.P., Stanwick, T.L., Bukrinskaya, A.G., Haggerty, S., Stevenson, M. (1992): Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 6580-6584.
12. Campbell, S-M., Crowe, S.M., Mak, J. (2001): Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J Clin Virol.* 22: 217-227
13. Chowes, M. Y., C. A. Spina, T. J. Kwoh, N. J. Fitch, D. D. Richman, and J. C. Guatelli. (1994): Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J. Virol.* 68: 2906-2914.
14. Clavel F., Guyader M., Guetard D., Salle M., Montagnier L., Alizon M. (1986): Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature.* 324: 691-695.
15. Cohen EA, Dehni G, Sodroski JG, Haseltine WA. (1990): Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol.* 64: 3097-3099.
16. Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus and P. L. Vogt. (1986): What to call the AIDS virus? *Nature* 321:10.
17. Deacon N.J., Tsykin A., Solomon A., Smith K., Ludford-Menting M., Hooker D.J., McPhee D.A., Greenway A.L., Ellett A., Chatfield C., et al. (1995): Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270: 988-991.
18. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR,

- Landau NR. (1996): Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* Jun 20 381: 661-666.
19. DeVita, V.T., S. Hellmann and S. Rosenberg. (1997): *AIDS*. Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York.
20. Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P., Paxton, W.A. (1996): HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. 381: 667-673.
21. Epand, R.M., (2006): Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Prog Lipid Res.* 45: 279-294.
22. Falk, S., Muller, H., Schnidts, H.L., Stutte, H.J. (1986): Morphological findings in the lymphadenopathy syndrome (LAS) and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Dtsch Med Wochenschr.* 111: 714-718.
23. Fauci, AS. (1993): Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science.* 262: 1011-1018.
24. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A. (1996): HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science.* 272: 872-877.
25. Fielding, P.E., Fielding C.J. (1996): Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry.* 35: 14932-14938.
26. Garcia J.V., Miller A.D. (1991): Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature.* 350: 508-511.
27. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. (2000): DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 100: 587-597.

28. Glushakova, S., J. C. Grivel, K. Suryanarayana, P. Meylan, J. D. Lifson, R. Desrosiers, and L. Margolis. 1999: Nef enhances human immunodeficiency virus replication and responsiveness to interleukin-2 in human lymphoid tissue ex vivo. *J. Virol.* 73: 3968-3974.
29. Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanler, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf and A. Sanyon. (1981): Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305: 1426-1431.
30. Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59-74.
31. Greenberg M.E., Bronson S., Lock M., Neumann M., Pavlakis G.N., Skowronski J. (1997): Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J.* 6: 6964-6976.
32. Grzesiek S, Stahl SJ, Wingfield PT, Bax A. (1996): The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry.* 35: 10256-10261.
33. Hahn B.H., Shaw G.M., De Cock K.M., Sharp P.M. (2000): AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications. *Science.* 287: 607-614.
34. Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M. & Markowitz, M. (1995): Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 373: 123-126.
35. Ho DD. (1998): Toward HIV eradication or remission: the tasks ahead. *Science* 280: 1866-1867.
36. Jamin N, Neumann JM, Ostuni MA, Vu TK, Yao ZX, Murail S, Robert JC, Giatzakis C, Papadopoulos V, Lacapère JJ. (2005): Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol Endocrinol.* 19: 588-594.

37. Kandathil, A.J., Ramalingam, S., Kannangai, R., David, S., Sridharan, G. (2005): Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res.* 121: 333-344.
38. Keele, B. F., Van, Y. Li, E. Bailes, J. Takehisa, M. L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, Y. Chen, L. V. Wain, F. Liegeois, S. Loul, E. M. Ngole, Y. Bienvenue, E. Delaporte, J. F. Brookfield, P. M. Sharp, G. M. Shaw, M. Peeters, and B. H. Hahn. (2006): Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313: 523-526.
39. Kirchhoff, F., T. C. Greenough, D. B. Brettler, J. L. Sullivan, and R. C. Desrosiers. (1995): Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 332: 228-232.
40. Kirchhoff, F., M. Schindler, N. Bailer, G. H. Renkema, K. Saksela, V. Knoop, M. C. Muller-Trutwin, M. L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, M. T. Dittmar, J. L. Heeney, B. H. Hahn, and J. Munch. (2004): Nef proteins from simian immunodeficiency virus-infected chimpanzees interact with p21-activated kinase 2 and modulate cell surface expression of various human receptors. *J. Virol.* 78: 6864-6874.
41. Kirchhoff, F., M. Schindler, A. Specht, N. Arhel, and J. Munch. (2008): Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* 65: 2621-2636.
42. Kestler H.W., Ringler D.J., Mori K., Panicali D.L., Sehgal P.K., Daniel M.D., Desrosiers R.C. (1991): Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell.* 65: 651-662.
43. Knipe D.M., (2001): *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> ed. Lippincott, Williams & Wilkins.
44. Lama J., Mangasarian A., Trono D. (1999): Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol.* 9: 622-631.
45. Li, H., Papadopoulos, V. (1998): Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol

- recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology*. 139: 4991-4997.
46. Liao, Z., Graham, D.R., Hildretj, J.E. (2003): Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*.19: 675-687.
47. Liu, H., Wu, X., Newman, M., Shaw, G.M., Hahn, B.H., and Kappes, J.C. (1995): The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J Virol*. 69: 7630-7638
48. Lundquist CA., Tobiume M., Zuoh J., Unumaz D, Aiken C. (2002): Nef-mediated downregulation of CD4 enhances human immunodeficiency type 1 replication in primary T Lymphocytes. *J Virol*. 76: 4625-4633
49. Malim, M. H. and M. Emerman. (2008): HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host. Microbe* 3: 388-398.
50. Mangasarian A., Foti M., Aiken C., Chin D., Carpentier J.L., Trono D. (1997): The HIV-1 Nef protein acts as a connector with sorting pathways in the Golgi and at the plasma membrane. *Immunity*. 6: 67-77.
51. Masur, H., M. A. Michaelis and J. B. Greene. (1981): An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia. *N. Engl. J. Med*. 305: 1431-1438.
52. Miceli, M. C. and J. R. Parnes. (1993): Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv. Immunol*. 53: 59-122.
53. Miller, M. D., M. T. Warmerdam, I. Gaston, W. C. Greene, and M. B. Feinberg. (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*. 179:101-113.
54. Morrow, C.D., Prak, J., Wakefield, J.K. (1994): Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *Am J Physiol*. 266: C1135-1156.



55. Munch J, Standker L, Adermann K, Schulz A, Schindler M, Chinnadurai R, Pohlmann S, Chaipan C, Biet T, Peters T, Meyer B, Wilhelm D, Lu H, Jing W, Jiang S, Forssmann WG, Kirchhoff F. (2007): Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide. *Cell*. 129: 263-275.
56. Munch J, Stolte N, Fuchs D, Stahl-Hennig C, Kirchhoff F. (2001): Efficient class I major histocompatibility complex down-regulation by simian immunodeficiency virus Nef is associated with a strong selective advantage in infected rhesus macaques. *J Virol*. 75: 10532-10536.
57. Nguyen, D.H., Taub, D. (2002): CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection. *J Immunol*. 168: 4121-4126.
58. Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J. & Holmberg, S. D. (1998): Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N.Engl.J.Med*. 338: 853-860.
59. Parham, P. and T. Ohta. (1996): Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 272: 67-74.
60. Pepin, J., Morgan, G., Dunn, D., Gevao, S., Mendy, M., Gaye, I., Scollen, N., Tedder, R., and Whittle, H. (1991): HIV-2 induced immunosuppression among asymptomatic West African prostitutes: evidence that HIV-2 is pathogenic, but less so than HIV 1. *AIDS* 5: 1165-1172.
61. Pizzato M, Helander A, Popova E, Calistri A, Zamborlini A, Palù G, Göttlinger HG. (2007): Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 6812-6817.
62. Requejo, HI. (2006): Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica*. 40: 331-345.
63. Santiago ML, Rodenburg CM, Kamenya S, Bibollet-Ruche F, Gao F, Bailes E, Meleth S, Soong SJ, Kilby JM, Fahey B, Muller MN, Ayouba A, Nerrienet E, McClure HM, Heeney JL, Pusey AE, Collins DA, Boesch C, Wrangham RW,

- Goodall J, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH. (2002): SIVcpz in wild chimpanzees. *Science* 295: 465.
64. Schindler, M., Wurfl, S., Benaroch, P., Greenough, T. C., Daniels, R., Easterbrook, P., Brenner, M., Munch, J., Kirchhoff, F. (2003): Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J.Virol.*, 77: 10548-10556.
65. Schindler, M., J. Munch, and F. Kirchhoff. (2005): Human immunodeficiency virus type 1 inhibits DNA damage-triggered apoptosis by a Nef-independent mechanism. *J. Virol.* 79: 5489-5498.
66. Schindler, M., J. Munch, O. Kutsch, H. Li, M. L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, M. C. Muller-Trutwin, F. J. Novembre, M. Peeters, V. Courgnaud, E. Bailes, P. Roques, D. L. Sodora, G. Silvestri, P. M. Sharp, B. H. Hahn, and F. Kirchhoff. (2006): Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. *Cell* 125:1055-1067.
67. Schwartz O., Marechal V., Le Gall S., Lemonnier F., Heard J.M. (1996): Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med.* 2: 338-342 .
68. Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH. (2005): Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees. *J Virol.* 79: 3891-902
69. Shaw, G. M., Harper, M. E., Hahn, B. H., Epstein, L. G., Gajdusek, D. C., Price, R. W., Navia, B. A., Petito, C. K., O'Hara, C. J., Groopman, J. E. (1985): HTLV-III infection in brains of children and adults with AIDS encephalopathy. *Science* 227: 177-182.
70. Smart, E.J., Ying, Y., Donzell, W.C., Anderson R.G. (1996): A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem.* 271: 29427-29435.

71. Specht, A., DeGottardi MQ, Schindler M, Hahn B, Evans DT, Kirchhoff F. (2008): Selective Downmodulation of HLA-A and -B by Nef alleles from different groups of primate lentiviruses. *Virology* 373: 229-237
72. Spina, C. A., T. J. Kwok, M. Y. Chow, J. C. Guatelli, and D. D. Richman. (1994): The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179: 115-123.
73. Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, Le Gall S, Raposo G, Schwartz O, Benaroch P. (2001): HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc Natl Acad Sci.* 98: 12144-12149.
74. Swigut T., Shohdy N., Skowronski J. (2001): Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J.* 20:1593-604.
75. van 't Wout AB, Swain JV, Schindler M, Rao U, Pathmajeyan MS, Mullins JI, Kirchhoff F. (2005): Nef Induces Multiple Genes Involved in Cholesterol Synthesis and Uptake in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected T Cells. *J Virol.* 79: 10053-10058.
76. Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H. R., Kräusslich, H. G. (1996): Human immunodeficiency virus type 1 Nef is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virol.* 219: 228-236.
77. Wildum, S., Schindler, M., Munch, J., Kirchhoff, F. (2006): Contribution of Vpu, Env and Nef to CD4 down-modulation and resistance of HIV-1 infected T-cells to superinfection. *J Virol.* 80: 8047-8059.
78. Yamaguchi, J., Vallari, AS., Swanson, P., Bodelle, P., Kaptue, L., Ngansop, C. (2002): Evaluation of HIV type 1 group O isolates: identification of five phylogenetic clusters. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 18: 269-282.
79. Yang, O. O., P. T. Nguyen, S. A. Kalams, T. Dorfman, H. G. Gottlinger, S. Stewart, I. S. Chen, S. Threlkeld, and B. D. Walker. (2002): Nef-mediated resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiviral cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 76: 1626-1631.

80. Zheng, Y.H., Plemenitas, A., Fielding, C.J., Peterlin, B.M. (2003): Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progenyvirions. Proc Natl Acad Sci U S A. 100: 8460-8465.
81. Aufbau des HI-Virus. URL: [http://www.hiv-info.de/img/hiv\\_cut.jpg](http://www.hiv-info.de/img/hiv_cut.jpg) (Stand: 15.06.2010).
82. Genomorganisation von HIV-1. URL: <http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV-1b.jpg> (Stand: 15.06.2010).

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei all jenen ganz herzlich bedanken, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

**Prof. Dr. Thomas Mertens** für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung Virologie am Universitätsklinikum Ulm durchzuführen.

**Prof. Dr. Frank Kirchhoff** für seine exzellente Betreuung und Förderung meiner Arbeit. Dafür, dass ich immer eigene Ideen zu meinem Projekt beisteuern konnte und wir gemeinsam das Beste aus dem Thema dieser Dissertation herausgeholt haben.

**Prof. Dr. Jan Münch**, der mich vom ersten Tag wunderbar betreute, sich immer Zeit für mich nahm und dessen Begeisterung für die Wissenschaft förmlich auf mich übergriff.

**Daniela Krnavek, Kerstin Regensburger, Martha Meyer und Nicola Bailer** für die tatkräftige technische Unterstützung.

Allen **Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Kirchhoff** für die tolle kollegiale Atmosphäre im Labor.

Bei **meinen Eltern** möchte ich mich für einfach alles bedanken. Nicht nur für die finanzielle Unterstützung meines Studiums, sondern auch für den familiären Rückhalt. Ihr habt mich gelehrt, dass ich alles erreichen kann, was ich mir in den Kopf gesetzt habe. Diese Doktorarbeit ist ein Stück davon und ohne Euch im Hintergrund wäre sie sicherlich nicht entstanden. Ich habe Euch sehr lieb – Danke!

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass diese Arbeit von mir selbständig verfasst wurde, und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel zur Anwendung kamen.

Verena Kümmerlen

Berlin, den