

Universitätsklinikum Ulm

Institut für Molekulare Virologie, Prof. Dr. Frank Kirchhoff

Einfluss des Nef Proteins der humanen und
simianen Immundefizienzviren auf die virale
Sensitivität gegenüber Cyclosporin A

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Wibke Bauer
Stuttgart
2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Kirchhoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Barbara Spellerberg

Tag der Promotion: 08. Dezember 2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeines über humane Immundefizienzviren	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Abstammung	2
1.1.3 Replikationszyklus	3
1.2 Die Rolle von Cyclophylin A für die virale Replikation und Infektiosität	4
1.3 Überblick über die Funktionen des negativen Faktors	6
1.4 Möglicher Effekt des SIV Nef-Proteins auf die CsA-Sensitivität von HIV-1	7
1.5 Ziele der Studie	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.1.1 Plasmide	10
2.1.2 Eukaryote Zelllinien	12
2.1.3 Bakterien	13
2.1.4 Reagenzien und Hilfsmittel	13
2.1.5 Kulturmedien	15
2.1.6 Puffer und Lösungen	16
2.1.7 Reagenzsysteme	19
2.2 Methoden	19
2.2.1 Kulturen	19
2.2.2 Zytotoxizitäts-Assay	19

2.2.3	Transformation von Escherichia coli	20
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA	21
2.2.5	Generierung und Konzentrationsmessung von Virus- stammlösungen	21
2.2.6	Westernblot	23
2.2.7	Messung der Infektiosität mit β -Gal-Assay und Luziferase- Assay	23
2.2.8	Durchflusszytometrie	25
2.3	Graphische und statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Einfluss von CsA auf den Zellstoffwechsel	26
3.2	Bindung von zellulärem CypA an HIV-1 unter Einfluss von CsA	27
3.3	Nef-Effekt auf die Replikation unter CsA	29
3.4	Infektiosität 3 verschiedener Nef-Varianten unter CsA . . .	31
3.5	Infektiosität in CypA-defekten Jurkatzellen	36
4	Diskussion	38
4.1	Einfluss von CsA auf den Zellstoffwechsel und den Einbau von CypA in HIV-Partikel	39
4.2	Der Einfluss von Nef auf die Sensitivität gegenüber CsA und die Abhängigkeit von CypA	41
4.3	Ausblick	43
5	Zusammenfassung	45
6	Literaturverzeichnis	47
7	Danksagung	59

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome, erworbenes Immundefizienzsyndrom
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4	Cluster of Differentiation 4
CsA	Cyclosporin A
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CypA	Cyclophylin A
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonucleic acid
eGFP	enhanced green fluorescent protein, Fluoreszenzprotein
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay, Enzym-immuno-Test
env	envelope protein, Hüllprotein
FKS	fetales Kälberserum
gag	Gruppen-spezifisches Antigen
gp	Glykoprotein
HLA	human leukocyte antigen
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle

kDa	kilo-Dalton
LTR	long terminal repeat
M	Molar (mol/l)
MHC	major histocompatibility complex
Nef	Negativer Faktor
pol	Polymerase
ref	regulator of expression of virion proteins
RNA	Ribonucleinacid, Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
sAIDS	simian aquired immunodeficiency syndrome, Affen- Immundefizienzsyndrom
SIV	Simian Immunodeficiency Virus, Affenimmundefizi- enzvirus
tat	transactivator of transcription
TRIM5	Tripartite Motif
V	Volt
Vif	viral infectivity factor
Vpr	virales Protein R
Vpu	virales Protein U
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorgani- sation

1 Einleitung

1.1 Allgemeines über humane Immundefizienzviren

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 1981 erschienen Berichte über Fälle in New York und Los Angeles, bei welchen gehäuft tödlich verlaufende opportunistische Infektionen auftraten [58, 23]. Betroffen waren besonders intravenös Drogenabhängige und Empfänger von Blutprodukten. Die Betroffenen zeigten Symptome eines defekten Immunsystems. Alle Patienten waren anerg und lymphopen [23]. Die neue Erkrankung war assoziiert mit Pneumocystis-jiroveci-Infektionen und Candidiasis. Auch Zytomegalievirusinfektionen und Kaposi-Sarkome wurden beobachtet. 1982 wurde dieses Krankheitsbild von der Weltgesundheitsorganisation unter dem Namen Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS, dt: erworbenes Immundefizienzsyndrom) zusammengefasst. Im darauf folgenden Jahr wurde zum ersten Mal aus dem Serum eines Patienten mit Immundefizienzsyndrom ein T-lymotropes Virus isoliert [3]. Dieses Virus wurde später als Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) der Familie der Lentiviren zugeordnet [11]. Ebenfalls im Jahr 1986 wurde ein verwandtes Virus isoliert [10], das überwiegend in Westafrika und Indien vorkommt. Dieses wurde als HIV Typ 2 bezeichnet [38].

Seither hat sich HIV weltweit verbreitet. Im Jahr 2009 waren 33,3 Millionen Menschen Träger des HI-Virus. Die Weltgesundheitsorganisation schätzt

2,6 Millionen Neuinfektionen und 1,8 Millionen AIDS-Tote im Jahr 2009 [59]. Damit ist AIDS an siebter Stelle der Todesursachen weltweit. Eine Therapie ist bis heute nur für einen kleinen Teil der Weltbevölkerung zugänglich. Die 1996 eingeführte Kombinationstherapie aus mindestens drei verschiedenen antiretroviralen Medikamenten steigerte die Überlebenszeit der behandelten Patienten erheblich [42]. Derzeit werden hauptsächlich Inhibitoren der viralen Enzyme reverse Transkriptase und Protease zur Therapie eingesetzt. Eine Heilung ist bisher nicht möglich, da das Virus sein Genom in das der Wirtszelle integriert und in langlebigen Gedächtniszellen persistiert.

1.1.2 Abstammung

Der Mensch ist nicht der ursprüngliche Wirt der Immundefizienzviren. Die HI-Viren entstanden durch Speziestransfer von infizierten afrikanischen Affen auf den Menschen. Affenimmundefizienzviren lösen in ihren natürlichen Wirten sehr selten AIDS aus, auch wenn die Viruslast im Serum sehr hoch ist [25]. Durch Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass HIV-1 vom Schimpansen auf den Menschen übertragen wurde [21]. HIV-2 ist von der afrikanischen Rauchgrauen Mangabe auf den Menschen übergetreten [27]. In freier Wildnis ist diese Art zu 40 Prozent mit Affenimmundefizienzviren (SIV) infiziert. Inzwischen wurden Lentiviren aus über 40 verschiedenen Primatenarten isoliert.

1.1.3 Replikationszyklus

HIV infiziert Immunzellen, die den CD4-Rezeptor tragen, vor allem T-Lymphozyten und Makrophagen. Über das Glykoprotein 120 (gp120) bindet das Virus an den CD4-Rezeptor [36]. Als Korezeptoren fungieren CCR5 [2] und CXCR4 [16]. Nach dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle beginnt die reverse Transkriptase die virale RNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Die virale DNA wird in das zelluläre Genom integriert und als Provirus bezeichnet [15]. Die zelluläre RNA-Polymerase II beginnt nach der Integration mit der Transkription der viralen Gene. Die viralen Hüllproteine, die Vorläuferproteine des Gruppen-spezifischen Antigens (Gag) und der Polymerase (Pol) und ungespleißte RNA-Moleküle lagern sich an der Zellmembran an und formieren sich zu einem neuen Virus. Während des Zusammenbaus werden die regulatorischen Proteine Negativer Faktor (Nef), Virales Protein R (Vpr) und Viraler Infektivitätsfaktor (Vif) inkorporiert. Die Knospung erfolgt von der Zelloberfläche unter Mitnahme der Plasmamembran als Virushülle. Erst nach der Knospung reift das Virus aus. Dabei spaltet die HIV-Protease die Gag- und Pol-Vorläuferproteine, was zu Umlagerungen und zur Ausbildung des reifen Kapsids führt [19]. Das kegelförmige Kapsid besteht aus p24-Proteinen. Es enthält die viralen Enzyme reverse Transkriptase, Integrase, Protease und die regulatorischen Proteine Nef, Vpr und Vif. Darüber hinaus enthält das Kapsid zwei Kopien einzelsträngiger Plusstrang-RNA, die Nukleokapsidproteine p7 und p9 und das Protein Cyclophylin A (CypA)[18]. CypA ist ein zelluläres Protein, das ubiquitär vorkommt. Es gehört zur Familie der Hitzeschockproteine [17]. Hitzeschockproteine sind Eiweiße, die anderen Proteinen bei der Faltung oder bei der Erhaltung ihrer Sekundärstruktur unter Extrembedingungen,

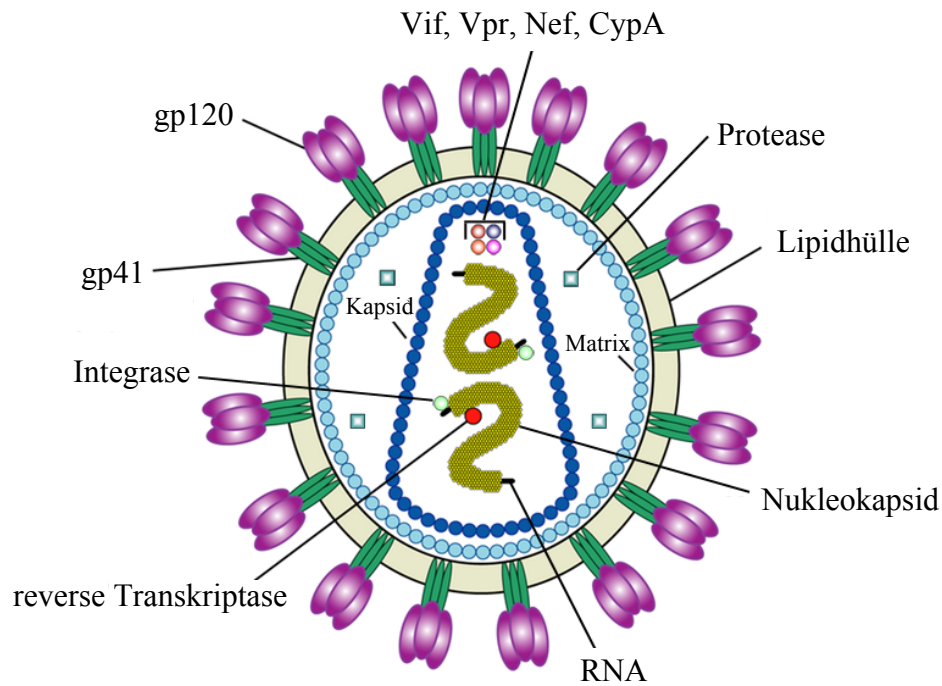


Abbildung 1.1: **HIV-Partikel:** HIV hat einen Durchmesser von 100 nm und wird von einer Phospholipidmembran umhüllt. Die Lipidhülle enthält das Transmembranprotein gp41 mit dem Protein gp120 und ist innen mit p17 Matrixproteinen ausgekleidet. Das kegelförmige Kapsid enthält zwei Kopien einzelsträngiger Plusstrang-RNA, die regulatorischen Proteine Nef, Vpr und Vif und das zelluläre Protein Cyclophylin A (CypA). Desweiteren enthält das Kapsid die viralen Enzyme reverse Transkriptase, Integrase und Protease. HIV: Humanes Immundefizienzvirus. (US National Institute of Health, modifiziert)

wie Hitze oder Ultraviolettstrahlung, helfen.

1.2 Die Rolle von Cyclophylin A für die virale Replikation und Infektiosität

CypA wird von HIV-1 und einigen SIV eingebaut und für deren volle Infektiosität benötigt [6, 26, 50].

Der Einbau von CypA in das Viruspartikel erfolgt über eine Interakti-

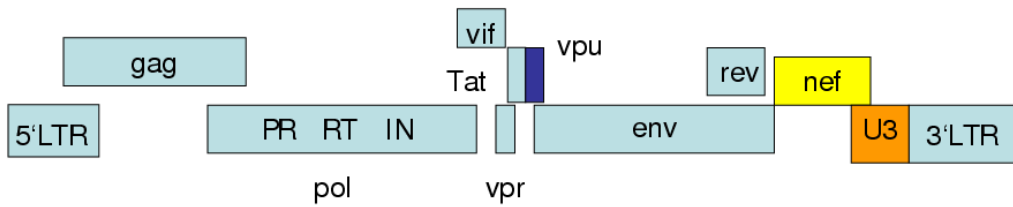


Abbildung 1.2: **HIV-1-Genom:** 5'-LTR: 5'-Long terminal repeat, gag: Gruppenspezifisches Antigen, pol: Polymerase, enthält Protease (PR), reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN), tat: transactivator of transcription, vif: viral infectivity factor, vpr: viral protein R, vpu: viral protein U, env: Envelopeprotein, enthält Glykoprotein 120 und Glykoprotein 41, rev: regulator of expression of virion proteins, nef: negativer Faktor, 3'-LTR: 3'-Long terminal repeat with U3 region.

on mit dem Gag-Protein, welches das Kapsid bildet. Es wird etwa ein CypA-Molekül pro zehn Gag-Moleküle eingebaut [18]. Mutationen in der CypA-Bindungsstelle führen zu einer wenig effizienten Virusvermehrung in humanen Zellen [18]. Neuere Studien zeigen, dass die Interaktion mit dem Kapsid für die Infektiosität von Bedeutung ist [26, 50]. Dies mag daran liegen, dass die CypA-Bindungsstelle am Kapsid wahrscheinlich zellulären Restriktionsfaktoren als Erkennungssequenz dient [55, 51]. Dies würde gut eine verminderte Infektiosität unter CypA-Mangel erklären, denn dabei wäre die Bindungsstelle frei für Restriktionsfaktoren. In vitro Infektion von CypA-defekten Jurkatzellen zeigte eine verzögerte Replikation von HIV-1. Die Replikation war um das 100- bis 1000-fache reduziert. Hingegen war die Replikation von HIV-2, welches kein CypA einbaut, unbeeinträchtigt [7].

Desweiteren zeigten Braaten et al. [5], dass CypA für die effiziente DNA-Synthese in infizierten T-Zellen benötigt wird. Sie konnten keine Defekte bei der RNA-Synthese, bei der Translation oder bei der Proteinprozessie-

rung feststellen. Auch der Zusammenbau der Partikel ist unbeeinträchtigt. Die Aktivität von CypA kann durch Cyclosporin A (CsA) gehemmt werden. CsA ist ein Immunsuppressivum und bindet an CypA. CsA reduziert die Infektiosität von HIV-1 sowohl während der Virusproduktion als auch während der Infektion der Zielzelle. Sokolskaja et al. [52] wiesen nach, dass die Reduktion der Infektiosität durch CsA während der Virusproduktion unabhängig von CypA ist. Bei Virusproduktion reduziert CsA das Virus-assoziierte gp120 und gp41 und erschwert damit die Infektion einer neuen Zelle [52]. Zusammenfassend kann man sagen, dass CsA an zwei Stellen auf die Infektiosität wirkt: zum Einen bei der Virusproduktion durch Reduktion der Glykoproteine und zum Anderen während der Infektion über Hemmung von CypA.

Im nächsten Absatz soll ein virales Protein vorgestellt werden, das ebenfalls zu einer Steigerung der Infektiosität von HIV beiträgt.

1.3 Überblick über die Funktionen des negativen Faktors

Nef ist ein viraler Faktor, der wichtig für die virale Vermehrung ist. Rhesusaffen, die mit *nef*-defekten Viren infiziert waren, zeigten eine 100- bis 1000-fach geringere Viruslast als Tiere, die mit dem Wildtypvirus infiziert waren. Ausserdem zeigten sie keine Progression zu sAIDS (engl.: simian AIDS). Auch der für lange Zeit asymptomatische Verlauf bei Patienten, die mit *nef*-defekten HI-Viren infiziert sind, ist durch eine persistierende hohe CD4-Zellzahl und eine niedrige Viruslast gekennzeichnet [13, 32]. Im Vergleich dazu ist die Infektion mit Wildtypviren mit wesentlich rascherer

Progression zu AIDS assoziiert.

Nef ist ein Protein von 200 bis 280 Aminosäuren und 27 bis 35 kilo-Dalton (kDa). Es ist in allen primaten Lentiviren vorhanden. Nef induziert hohe Virustiter, sowohl in vivo als auch in Zellkultur [14] und erhöht die virale Pathogenität [29] und Infektiosität [40]. Im Tiermodell zeigte sich, dass ein defektes *nef*-Gen innerhalb von vier Wochen zum Wildtyp revertiert [41]. Dies unterstreicht die Bedeutsamkeit dieses Proteins für die Vermehrung und Ausbreitung des Virus.

Sowohl Nef als auch das zelluläre Protein CypA steigern die Infektiosität und sind wichtig für die Vermehrung von HIV-1. Möglicherweise gibt es dabei einen gemeinsamen Mechanismus. Auf diese Frage soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

1.4 Möglicher Effekt des SIV Nef-Proteins auf die CsA-Sensitivität von HIV-1

Khan et al. [30] untersuchten ob Nefs aus CypA-unabhängigen Viren einen Einfluss auf die CsA-Resistenz haben. Dabei stellten sie fest, dass HIV-1-Viren, die SIV- oder HIV-2-Nefs statt dem eigenen Nef exprimieren, resistent gegenüber CsA wurden. Normale HIV-1-Viren, die in Gegenwart von CsA produziert wurden, waren wesentlich weniger infektiös als HIV-1-Viren, die das SIV-Nef exprimierten. Gleiche Effekte fanden sie, wenn CsA während der Infektion der Zielzellen zugegeben wurde [31]. Daraus folgerten sie, dass es entweder direkte oder indirekte Interaktionen zwischen Nef und CypA gibt oder dass SIV-Nef und HIV-2-Nef die Rolle von CypA übernehmen könnten. Der genaue Mechanismus, der zur CsA-Resistenz und zur

Unabhängigkeit von CypA führt, ist bisher nicht geklärt und umstritten.

1.5 Ziele der Studie

Mehrere Veröffentlichungen lassen annehmen, dass HIV-1 durch CypA vor zellulären Restriktionsfaktoren geschützt wird [55, 51, 26]. Die Bindungsstelle für CypA könnte gleichzeitig das Ziel von Restriktionsfaktoren sein. Diese können nur wirken, wenn kein CypA an das Kapsid gebunden ist. Dies ist der Fall unter Einfluss von CsA, welches CypA an sich bindet, und in Zellen, die kein CypA produzieren. Allerdings benötigen nur HIV-1 und einige SIV CypA zum Schutz vor Restriktionsfaktoren. Da die Immundefizienzviren alle sehr ähnlich aufgebaut sind, stellt sich die Frage wie sich die übrigen SIV schützen. Zwei Veröffentlichungen von Khan et al. mutmaßten, dass eine Funktion des Nef-Proteins von SIVmac und HIV-2 CypA-unabhängige Viren schützt. Diese Funktion ist bisher nicht näher untersucht worden.

Wie von Khan et al. [30] vorgeschlagen, sollen einige Nefs in diesem Zusammenhang untersucht werden. Erstes Ziel der Studie ist die Ermittlung von CsA-Konzentrationen, die nur wenig zytotoxisch sind. Denn Beeinträchtigungen des Zellstoffwechsels vermindern gleichzeitig auch die Virusreplikation. Dies würde zu Effekten führen, die nicht auf den Mangel an CypA zurück zu führen sein würden. Das zweite Ziel der Studie ist die Untersuchung der Virus-Varianten NL4.3-NL4.3nef (HIV-1-Nef), NL4.3-NL4.3nef* (HIV-1-Nef*), NL4.3-SIVmac239nef (SIVmac-Nef) und NL4.3-HIV-2Benef (HIV-2-Nef) auf ihre Replikationsfähigkeit (ELISA) unter CsA. Es wird erwartet, dass die Menge an messbarem Virusprotein nicht

reduziert ist [5]. Im dritten Schritt soll die Infektiosität dieser Viren getestet werden. Dazu sollen erstens Virusstocks unter CsA produziert werden und mit diesen Infektionsversuche durchgeführt werden. Zweitens sollen Zellen in Gegenwart von CsA infiziert werden. In beiden Fällen wird eine CsA-Resistenz von NL4.3-SIVmac239nef und NL4.3-HIV-2Bennef erwartet. Ausserdem wird eine reduzierte Infektiosität von HIV-1 erwartet. Da CsA auch in niedrigen Konzentrationen nicht nur in die Virusreplikation, sondern auch in den Zellstoffwechsel eingreift, wird die Arbeit in einem vierten Schritt um eine Methode erweitert: In CypA-defekten Jurkatzellen wird die Infektiosität und Replikation untersucht. In diesen Zellen wird eine verminderte Infektiosität von HIV-1 erwartet. Die Reduktion der Infektiosität sollte durch Expression des SIVmac-Nef oder HIV-2-Nef zu vermeiden sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Plasmide

Um den Effekt von Nef auf (1) die CsA-Resistenz und (2) die CypA-Abhängigkeit zu untersuchen, wurden Varianten des pBRNL4.3-Klons verwendet. Dabei enthält ein pBR322 Vektor das HIV-1 NL4.3 Provirus. Bei den Varianten wurde das *nef* Gen deletiert oder durch das SIVmac239, bzw. HIV-2ben *nef* ersetzt [44, 45]. Die verwendeten Virus-Varianten unterscheiden sich somit ausschließlich im *nef* Gen. Alle viralen Proteine werden unter der Kontrolle des LTR-Promotors exprimiert. Diese Plasmide sind denen von Khan et al. [31], R7 und R7 SIV Nef, sehr ähnlich. Der einzige Unterschied besteht darin, dass sie *nef* und die U3-Region in voller Länge und ohne Überschneidung enthalten. Dagegen überschneidet sich bei den R7-Plasmiden die U3-Region mit der *nef*-kodierenden Region und wurde beim Klonieren der *nef*-Allele ebenfalls ersetzt (siehe Abb. 2.1). Bei den für die Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting) verwandten Varianten wurde das NL4.3-Provirus im pBR322 Vektor so verändert, dass *nef* und *eGFP* mittels eines IRES-Elements von einer bizistronischen mRNA exprimiert werden [44, 45]. Nef und eGFP werden dadurch in äquivalenten Mengen exprimiert und die Messung von eGFP

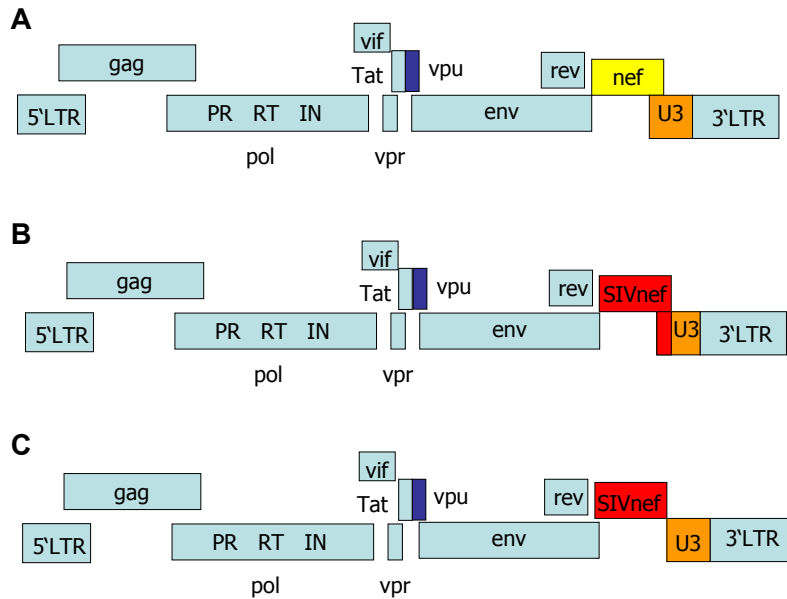


Abbildung 2.1: **NL4.3-NL4.3nef (A), R7 SIV Nef (B) und NL4.3-SIVmac239nef (C)**: Im NL4.3-Genom (A) überschneiden sich die Region des Nef und die U3-Region. Bei R7 SIV Nef wurde das Nef inklusive eines Teils der U3-Region ausgetauscht (B). Im NL4.3-SIVmac239nef (C) wurden diese beiden Regionen hintereinander kloniert und nur das NL4.3 *nef* gegen das SIVmac239 *nef* ausgetauscht.

kann als Maß für die Menge der infizierten Zellen verwendet werden. Um die Infektionsrate zu steigern, wurde in einigen Versuchen VSV-G, ein Expressionsplasmid, der das Hüllprotein G des Vesiculären Stomatitisvirus enthält, benutzt.

Folgende Plasmide wurden verwendet:

pBRNL4.3-NL4.3nef	pBRNL43-IRES _{eGFP} -NL4.3nef
pBRNL4.3-NL4.3nef*	pBRNL43-IRES _{eGFP} -NL4.3nef*
pBRNL4.3-SIVmac239nef	pBRNL43-IRES _{eGFP} -SIVmac239nef
pBRNL4.3-HIV-2Bennef	pBRNL43-IRES _{eGFP} -HIV-2Bennef

2.1.2 Eukaryote Zelllinien

Zur Transfektion von Plasmid-DNA wurden 293T, humane adherente Nierenepithelzellen, verwendet. Diese sind mit Adenovirus Typ 5 transformiert und exprimieren das Simian-Virus 40 large T-Antigen. Infiziert wurden folgende Zellen:

- P4CCR5: Adherente Zelllinie, die die humanen Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 stabil exprimiert, selektioniert mit Puromycin. Die Zelllinie enthält das β -Galactosidasegen unter der Kontrolle des HIV-1 Promotors. Das heisst, jedesmal wenn bei der Replikation eines HI-Virus der Promotor aktiviert wird, wird äquivalent zur Virusvermehrung β -Galactosidase gebildet, deren Aktivität im Luminometer gemessen werden kann.
- TZMBL: Adherente HeLa-Zelllinie, die große Mengen CD4 und CCR5 stabil exprimiert. Sie enthält die Gene für Luziferase und β -Galactosidase unter der Kontrolle des HIV-1 Promotors, die zur Quantifizierung der Virusausbreitung dienen.
- CEMx174 5.25 M7: Zellhybrid aus humaner T- und B-Zelllinie, der zusätzlich CCR5 exprimiert. Er enthält Gene für GFP und Luziferase unter der Kontrolle des HIV-1 Promotors.
- Jurkat: Suspensionszelllinie humaner T-Zellen.
- Jurkat CypA KO: Untergruppe der Jurkatlinie mit Knock out des CypA-Gens.

2.1.3 Bakterien

Zur Transformation wurden Escherichia coli XL2-Blue™ (Stratagene Europe AG; Heidelberg) verwendet. Sie enthalten folgende Gene: recA1 endA1 gyr A96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^I) Amy Cam^I.

2.1.4 Reagenzien und Hilfsmittel

Agarose	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Ampicillin	Bayer (Leverkusen)
Antioxidant	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Cyclosporin A	Sigma (München)
Dimethylsulfoxid	Fluka (Neu-Ulm)
Ethidiumbromid	Sigma (München)
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Sigma (München)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (München)

Normales Mausserum	Sigma (München)
Normales Ziegenserum	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma (München)
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Phosphat-Buffered-Saline (PBS)	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
50x TAE-Puffer	Eppendorf (Hamburg)
Triton X-10	Sigma (München)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
Whatmanpapier	Whatman (Maidstone, Kent; GB)
1-kb-Leiter	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)

Antikörper

Anti-Cyclophylin A	Biomol (Hamburg; DE)
Anti-p24	AIDS Repository (Frederick; USA)
Anti-Aktin	Abcam (Cambridge; USA)
Anti-Kaninchen, Phosphatase markiert	KPL (Maryland; USA)

Enzyme

Trypsin aus Rinderpankreas	Stratagene Europe AG (Heidelberg)
Phosphatase aus Kälberdarm	Boehringer (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Schwalbach, Traunstein)
Puffersysteme für Enzyme	New England Biolabs (Schwalbach, Traunstein)

2.1.5 Kulturmedien

Zellkulturmedien

Adherente Zellen:	DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, Invitrogen/Gibco) ergänzt mit 350 μ g/ml L-Glutamin, 120 μ g/ml Streptomycinsulfat, 120 μ g/ml Penicillin und 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum.
Suspensionszellen:	RPMI-16-40 Medium (Invitrogen/Gibco) ergänzt mit 350 μ g/ml L-Glutamin, 120 μ g/ml Streptomycinsulfat, 120 μ g/ml Penicillin und 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum.

Bakterienkulturmedien

LB-Medium:	Lysogeny-Broth-Medium: 10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 8 g/l Natriumchlorid, 1g/l Glucose; 100mg/l Ampicillin wurde vor Gebrauch zugegeben. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,12 eingestellt.
LB _{AMP} Agar:	15g/l Agar und 100mg/l Ampicillin wurden in LB-Medium gelöst.
SOC-Medium:	Super Optimal broth with Catabolite repression Medium: 20g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 2,5mM NaCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ 20mM Glucose.

2.1.6 Puffer und Lösungen

Zytotoxizitäts-Assay

MTT:	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid in Hanks' balanced salt solution (HBSS) 5mg/ml
Lösungsmittel:	Dimethylsulfoxid und Ethanol im Verhältnis 1:1

Calcium-Phosphat Transfektion

2x Hepes Buffered Saline:	10x Stock: 8,18% Natriumchlorid, 5,94% HEPES (w/v), 0,2% Na ₂ HPO ₄ . Die Lösung wurde auf den pH-Wert 7,12 eingestellt und steril filtriert. Unmittelbar vor Gebrauch erfolgte die Verdünnung auf 2x Stock.
2M CaCl ₂ :	Calciumchlorid in Wasser gelöst und steril filtriert.

HIV p24 Kapsid-Antigen ELISA

Lyse-Lösung:	10ml Triton X-100 auf 100ml H ₂ O
Waschpuffer:	25ml 20x Waschkonzentrat (KPL, Maryland) auf 500ml H ₂ O
Probenpuffer:	RPMI-1640 Medium mit 1% Rinderserumalbumin und 0,2% Tween 20
Lösung für den ersten Antikörper:	RPMI-1640 Medium mit 10% FKS und 2% normalem Mausserum
Lösung für den zweiten Antikörper:	RPIM-1640 Medium mit 2% normalem Mausserum, 5% normalem Ziegenserum und 0,01% Tween 20
Substrat:	TMB Peroxidase Substrat (KPL, Maryland)
Stopplösung:	1N HCl

Westernblot

Probenpuffer:	NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen) in 2-Mercaptoethanol
Laufpuffer:	25ml MES SDS Running Buffer (Invitrogen) auf 475ml H ₂ O
Transferpuffer:	25ml NuPAGE Transfer Buffer, 50ml Methanol und 425ml H ₂ O
Waschpuffer:	25ml 20x Waschkonzentrat auf 500ml H ₂ O
Längenstandard	Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (Bio-Rad, Hercules)

Sonstige Lösungen

FACS-Puffer:	PBS mit 1% FKS
RIPA:	Radioimmunoprecipitation assay buffer: 1% Triton X-100 (Sigma, München), 0,15M NaCl, 50mM Tris HCl pH 7,4 und 5mM EDTA. Vor Gebrauch 1mM NaF, 1mM Na ₂ VO ₃ und 1mM Phenylmethansulfonylfluorid in Ehtanol dazugeben.

2.1.7 Reagenzsysteme

Gal-Screen Systems Applied Biosystems (Foster City; USA)

HIV-1 p24 Kapsid-Antigen- AIDS Repository (Frederick; USA)
ELISA

Luziferase Assay System Promega (Madison; USA)

Wizard™ Plus Midipreps Promega (Madison; USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturen

Kultur adherenter Zellen

Die adherenten Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen in DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, Invitrogen/Gibco) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 bis 1:20 gesplittet.

Kultur von Suspensionszellen

Die Suspensionzellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen in RPMI-1640 bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 bis 1:20 gesplittet.

2.2.2 Zytotoxizitäts-Assay

Vor Beginn der Infektiositätsversuche wurde die Zytotoxizität von CsA an den verwendeten Zelllinien getestet. Für den Zytotoxizitäts-Assay wurden

5000 P4CCR5 oder TZMBL Zellen oder 25000 CEMx174 5.25 M7-Zellen oder Jurkatzellen pro Well ausgesät und in Medium mit verschiedenen Konzentrationen von CsA für 3 Tage inkubiert. Nach 3 Tagen wurde der wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgezogen und die gebildeten Formazan-Kristalle in Ethanol und Dimethylsulfoxid gelöst. Bei einer Wellenlänge von 550-570nm wurde die Konzentration im Spektrophotometer bestimmt. MTT wird über die mitochondriale Dehydrogenase verstoffwechselt und zeigt die metabolische Aktivität an. Nur in lebenden Zellen entstehen Formazan-Kristalle.

2.2.3 Transformation von *Escherichia coli*

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 10 μ l Bakterien wurden mit 3 μ l Plasmid-DNA für 20 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie für 30 Sekunden bei 42°C auf den Heizblock und für weitere drei Minuten auf Eis gestellt wurden. Nach Zugabe von 200 μ l Super Optimal broth with Catabolite repression Medium (SOC-Medium) wurden die Bakterien für 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Kulturen für mindestens 12 Stunden bei 37°C in Lysogeny-Broth-Medium (LB-Medium) geschüttelt oder auf LB_{AMP}Agar Platten inkubiert. Alle verwendeten Plasmide enthalten ein Ampicillin-Resistenzgen. Die Selektion der transformierten Bakterien wurden daher durch Ampicillin im Kulturmedium (100 μ g/ml) gewährleistet.

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA

Folgende Methoden wurden nach den Protokollen von Maniatis et al. [37] durchgeführt:

- Plasmid-DNA-Isolierung nach alkalischer Lyse der Bakterien
- Ethanol- und Isopropanolfällung der DNA
- Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Auftrennung von Nucleinsäuren mittels Gelelektrophorese

Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse von Bakterien und anschließende Isolierung und Reinigung der DNA gewonnen. Die Präparationen wurden mit dem WizardTM Plus Midipreps (Promega; Madison, WI; USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA-Konzentrationen wurden in einem Spektralphotometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen. Zur Überprüfung der Transformation hinsichtlich ungewollter DNA-Rekombinationen wurde die Plasmid-DNA mittels Restriktionsendonukleasen in den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen gespalten und die Anteile mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Banden wurden auf zusätzliche oder fehlende Fragmente überprüft.

2.2.5 Generierung und Konzentrationsmessung von Virusstammlösungen

Virusstammlösungen wurden in 293T-Zellen durch Transfektion von Plasmid-DNA mit der Calcium-Phosphat-Methode generiert. Am Tag vor der Trans-

fektion wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion 40-60% konfluent. Für die Transfektionslösung wurden zu $13\mu\text{l}$ 2M Calciumchlorid $5\mu\text{g}$ Plasmid-DNA gegeben und mit Wasser auf $100\mu\text{l}$ aufgefüllt. Diese Lösung wurde zu $100\mu\text{l}$ 2x Hepes Buffered Saline (HBS) getropft. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur bildet sich ein milchiges Präzipitat. Die Transfektionslösung wurde auf die Zellen getropft ($200\mu\text{l}$ pro Well) und für 8 bis 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde das Medium erneuert. Um Virusstammlösungen in Gegenwart von CsA zu produzieren, wurde an dieser Stelle Medium mit 1,25 oder 2,5 μM CsA zugegeben. Die Virusstammlösungen wurden nach 48 Stunden abgenommen und 5 Minuten bei 3000rpm abzentrifugiert.

Um die Konzentration der Virusstammlösungen mit und ohne Einfluss von CsA zu vergleichen, wurde ein ELISA auf p24-Kapsidprotein durchgeführt. Durch Lyse der Viruspartikel mit Triton 100-X wird das p24-Kapsidprotein freigesetzt. Dieses bindet an einen monoklonalen Mausantikörper auf der ELISA-Platte. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurde ungebundenes Protein durch Waschen mit Waschpuffer entfernt. Nun wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, der an das Protein p24 bindet zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Um das Protein zu markieren wurde ein anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziegenserum zugegeben, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist. Nach einer Stunde Inkubation wurde Substrat (TMB) für die Peroxidase zugegeben, was zu einer Blaufärbung führt. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit 1N Salzsäure gestoppt und die Farbkonzentration bei den Wellenlängen 450 und 650nm quantitativ gemessen. Die Farbkonzentration ist proportional zur Menge an enthaltenem

p24-Protein in ng/ml.

2.2.6 Westernblot

Der Nachweis von CypA in Viruspartikeln und verwendeten Zelllinien wurde mittels Westernblot geführt. Viruspartikel wurden bei 14000rpm, Zellen bei 1300rpm, pelletiert und in Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA-Puffer) lysiert. Die Proben wurden mit Farbstoff und 10% β -Mercaptoethanol versetzt und bei 95°C denaturiert. Die Gelelektrophorese wurde bei 150V für 1,5 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde bei 0,04A das Protein auf eine Membran geblottet. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit einem Kaninchen-Antikörper gegen CypA inkubiert. Nach dem Auswaschen von überschüssigem Antikörper wurde mit einem zweiten Antikörper inkubiert, der eine Phosphatase gebunden hat. Um die Banden sichtbar zu machen, wurde Phosphatase-Substrat zugegeben. Die Reaktion wurde mit demineralisiertem Wasser gestoppt. Als Ladekontrolle wurde bei Viruspartikeln zusätzlich ein Antikörper gegen das Kapsidprotein p24 zugegeben, bei Zellblots wurde zusätzlich Aktin detektiert.

2.2.7 Messung der Infektiosität mit β -Gal-Assay und Luziferase-Assay

Um die Infektiosität zu überprüfen wurden 293T-Zellen mit der gewonnenen Plasmid-DNA transfiziert und mit den Überständen P4CCR5-, TZMBL- und CEMx174 5.25 M7-Zellen infiziert. Die Zelllinien P4CCR5 und TZMBL enthalten das β -Galactosidasegen unter der Kontrolle des HIV-1 Promotors, die CEMx174 5.25 M7-Zellen enthalten Gene für GFP und Luziferase ebenfalls unter der Kontrolle des HIV-1 Promotors. Diese Enzyme

werden bei Replikation von HIV äquivalent zur Menge des Virus gebildet. Ihre Aktivität kann im Luminometer gemessen werden und ist ein Maß für die Anzahl der infizierten Zellen.

5000 P4CCR5- oder TZMBL-Zellen wurden mit Virusstammlösung infiziert (genormt auf 1-10ng p24-Protein) und bei 37°C und 5% CO₂ für 3 Tage inkubiert. Dann wurde das Medium abgezogen und 40µl Gal-Screen Buffer zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Aktivität der β -Galaktosidase in relativen Lichteinheiten pro 0,1 Millisekunde im Berthold Luminometer bestimmt.

25000 CEMx174 5.25 M7-Zellen wurden mit Virusstammlösung infiziert (genormt auf 0,1-1ng p24-Protein) und bei 37°C und 5% CO₂ für 3 Tage inkubiert. Dann wurden die Zellen in V-shape Platten überführt und bei 1300rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Medium wurde abgezogen und die Zellen in 20µl Lysepuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 50µl Luziferase-Puffer wurde die Luziferaseaktivität in relativen Lichteinheiten pro 0,1 Millisekunde im Berthold Luminometer bestimmt.

Um den Einfluss von CsA während der Infektion der Zielzelle zu untersuchen, wurden P4CCR5- und CEMM7-Zellen 30 Minuten vor Infektion in CsA inkubiert, so dass die Endkonzentrationen 1,25 und 2,5µM waren. P4CCR5-Zellen wurden mit 100µl und CEMx174 5.25 M7-Zellen mit 10µl Virusstammlösung infiziert. Nach drei Tagen wurde ein β -Galactosidase-, respektive Luziferase-Assay durchgeführt.

Für die Bestimmung der viralen Replikation wurden nach 3 Tagen Inkubation 100µl Zellen abgenommen und im Luminometer vermessen. Zu den übrigen Zellen wurde wieder frisches Medium dazu gegeben. Weitere Messungen erfolgten 4, 5, und 6 Tage nach Infektion.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Der Einfluss von CypA auf die Replikation und Infektiosität wurde mit der Durchflusszytometrie in Jurkat-Zellen überprüft. Zur Steigerung der Infektionsrate wurden pseudotypisierte Virusstocks hergestellt. Dazu wurden 293T-Zellen mit dem Expressionsplasmid, der das Hüllprotein G des Vesiculären Stomatitisvirus enthält und einem NL4.3-Provirus, der das Nef-Protein und das Fluoreszenzprotein GFP auf einer bicistronischen RNA exprimiert, kotransfiziert. Mit diesen Virusstocks wurden Jurkatzellen und Jurkatzellen mit einem Defekt im CypA-Gen infiziert. Alle zwei Tage wurde ein Aliquot abgenommen und bei 1300rpm abzentrifugiert, mit 1ml FACS-Puffer gewaschen und mit 200 μ l FACS-Puffer mit 2% Paraformaldehyd für 30 Minuten bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen in der Durchflusszytometrie (FACSCalibur, Becton-Dickinson) auf GFP untersucht. GFP wird äquivalent zur Menge des Nef-Proteins gebildet und zeigt an wie hoch der Anteil der infizierten Zellen ist.

2.3 Graphische und statistische Auswertung

Zur Auswertung der Durchflusszytometrie wurde das Programm CellQuest-Pro von Becton Dickinson verwendet. Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism Version 4.0 verwendet. Die p-Werte wurden mit einem einseitige Mann-Whitney-Test berechnet. Zur Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurde Microsoft Excel (Office XP) verwendet. Die Diagramme wurden mit gnuplot erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von CsA auf den Zellstoffwechsel

Um die Funktion von HIV-1-Nef, SIVmac-Nef und HIV-2-Nef unter CsA zu untersuchen, sollten Konzentrationen ermittelt werden, die nicht toxisch sind. Vor Beginn der Infektionsversuche wurde die Zytotoxizität von CsA in TZMBL-, P4CCR5-, Jurkat-, 293T- und CEMx174 5.25 M7-Zellen (CEMM7) mittels 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid (MTT) überprüft. Die MTT-Tests zeigen, dass CsA-Konzentrationen über $2,5\mu\text{M}$ zytotoxisch sind (siehe Abb. 3.1). Die Stoffwechselaktivität nimmt mit steigender CsA-Konzentration ab. Diese Experimente wurden mit verschiedenen Zelldichten wiederholt. Es zeigte sich ein ähnliches Ergebnis: die Zytotoxizität ist unabhängig von der Zelldichte (nicht gezeigte Daten).

Um zytotoxische Effekte zu vermeiden, wurden in den folgenden Experimenten Konzentrationen bis maximal $2,5\mu\text{M}$ verwendet. Bei Konzentrationen über $2,5\mu\text{M}$ CsA nimmt der Stoffwechsel stark ab, wodurch auch die Virusreplikation beeinträchtigt wäre und somit keine sinnvollen Messungen mehr möglich wären.

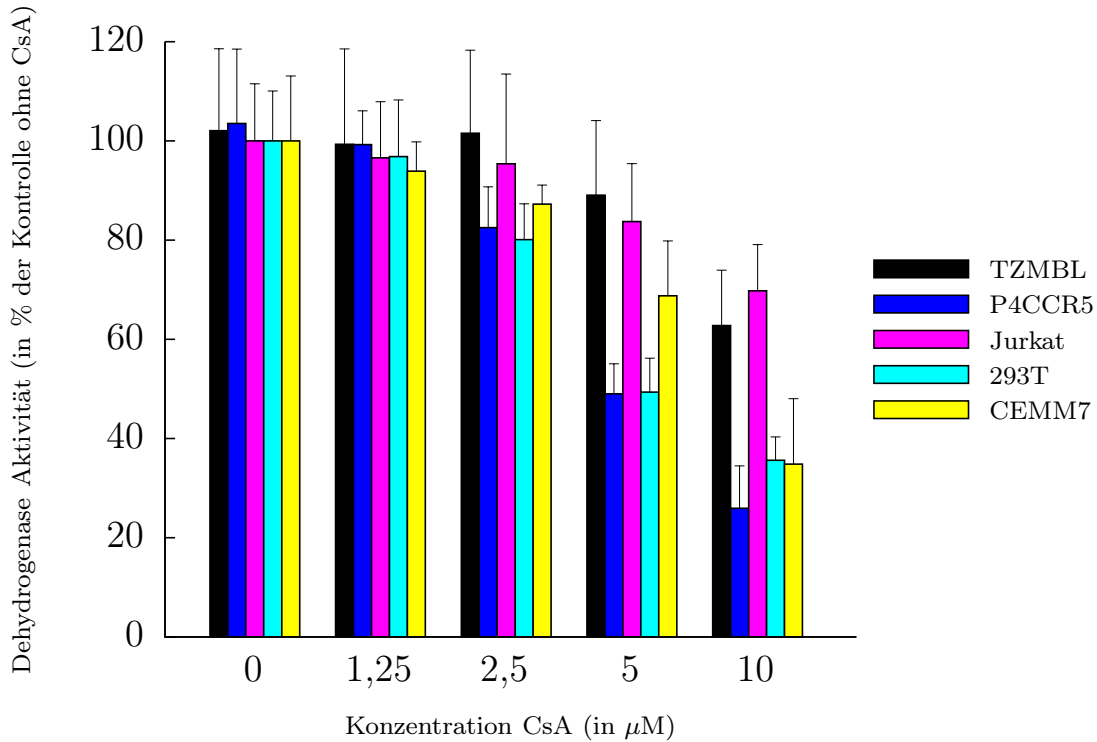


Abbildung 3.1: **Zytotoxizität von CsA:** Die Zellen wurden drei Tage in CsA-haltigem Medium inkubiert. Für die Stoffwechselaktivität wurde die Dehydrogenase-Aktivität mit MTT gemessen. Die Werte sind in Prozent der Kontrollen ohne CsA mit Standardabweichung angegeben. CsA: Cyclosporin A

3.2 Bindung von zellulärem CypA an HIV-1 unter Einfluss von CsA

CypA wird in unterschiedlichen Mengen in jeder humanen Zelle exprimiert. Um sicher zustellen, dass mögliche Effekte nicht nur auf unterschiedlichen Mengen an CypA in der jeweiligen Zelle basieren, wurden TZMBL-, P4CCR5-, Jurkat-, 293T- und CEMM7-Zellen auf die Expression von CypA mittels eines Westernblot semiquantitativ überprüft. Abbildung 3.2 zeigt, dass bis auf CEMM7 alle verwendeten Zelllinien etwa gleiche Men-

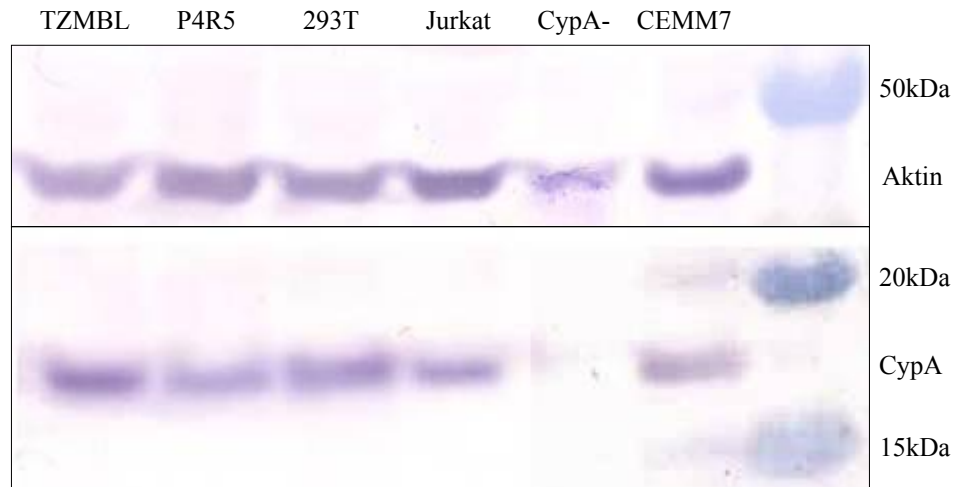


Abbildung 3.2: **Nachweis von zellulärem CypA:** Je eine Million Zellen wurden lysiert und ein Westernblot mit einem CypA-Antikörper durchgeführt. Die Bande von CypA befindet sich bei 18 kDa. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet (Bande bei 45kDa). CypA: Cyclophylin A

gen an CypA exprimieren, also im Folgenden bezüglich der Fragestellung vergleichbar sind. CEMM7 sollten gesondert betrachtet werden. Jurkatzellen mit Defekt im CypA-Gen exprimieren kein CypA, wie zu erwarten. Der Vorteil von CypA-defekten Jurkats ist es, dass mit diesen Experimente ohne toxische Nebenwirkungen von CsA durchgeführt werden können.

Da mit niedrigen nicht zytotoxischen CsA-Konzentrationen gearbeitet werden sollte, musste überprüft werden, ob $2,5\mu\text{M}$ CsA den Einbau von CypA in das Viruspartikel effektiv hemmen. In 293T-Zellen wurden Virusstammlösungen ohne oder mit $2,5\mu\text{M}$ CsA produziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen und ein ELISA zur Konzentrationsbestimmung der Virusstammlösungen durchgeführt. Aus den Virusstammlösungen wurden gleiche Mengen Virus pelletiert und CypA mit

einem Westernblot nachgewiesen. Bei den mit CsA behandelten Viren war

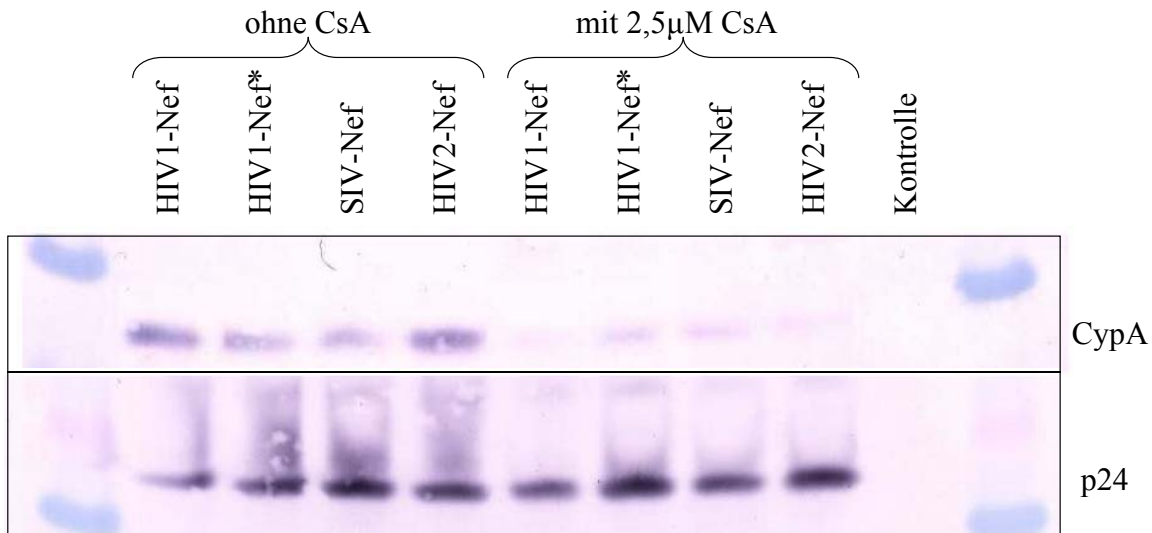


Abbildung 3.3: **Einbau von zellulärem CypA in HIV-1:** Es wurden je 200ng Virus lysiert und ein Westernblot mit einem CypA-Antikörper (Bande bei 18kDa) durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde ein p24-Antikörper (Bande bei 24kDa) verwendet. CypA: Cyclophylin A

nur eine sehr schwache Bande für CypA nachweisbar, während sie bei den Kontrollen ohne CsA deutlich zu sehen ist (Abb. 3.3). Es liessen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen HIV-1-Nef, SIVmac-Nef und HIV-2-Nef bei der CypA-Einlagerung in das Virus feststellen. CsA reduziert somit bei einer Konzentration von $2,5\mu\text{M}$ zuverlässig den CypA-Einbau in HIV-1 Partikel unabhängig vom exprimierten Nef-Protein.

3.3 Nef-Effekt auf die Replikation unter CsA

Nach diesen Vorarbeiten sollten die Virus-Varianten NL4.3-NL4.3nef (HIV-1-Nef), NL4.3-NL4.3nef* (HIV-1-Nef*), NL4.3-SIVmac239nef (SIVmac-Nef) und NL4.3-HIV-2Bennef (HIV-2-Nef) auf ihre Replikationsfähigkeit unter

CsA überprüft werden. Es zeigten sich kaum Unterschiede in der Virusproduktion nach Transfektion (siehe Abb. 3.4). Die Stoffwechselaktivität bei einer Konzentration von $2,5\mu\text{M}$ war ausreichend, um noch effektiv Virus zu produzieren. Diese Ergebnisse sind unabhängig von den verwendeten

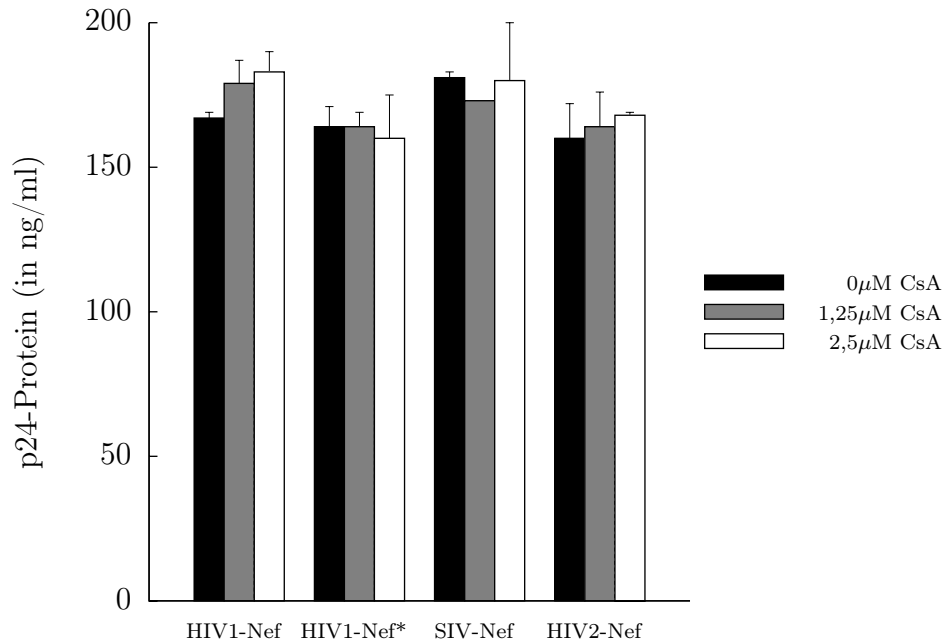


Abbildung 3.4: **Nef-Effekte auf die Replikation unter CsA:** Die Virusstammlösungen wurden in 293T-Zellen durch Transfektion hergestellt und nach 48 Stunden ein ELISA auf p24-Protein durchgeführt. Die Doppelansätze wurden unabhängig transfiziert. Die Angaben sind in ng/ml mit Standardabweichung angegeben. CsA: Cyclosporin A

Nef-Varianten (siehe Abb. 3.4). Wenn das Virusplasmid mittels Transfektion in die Zelle eingebracht wird, ist die unter CsA produzierte Menge an p24-Protein nicht reduziert.

3.4 Infektiosität 3 verschiedener Nef-Varianten unter CsA

Da CsA keinen Einfluss auf die Virusproduktion hat, stellte sich als nächstes die Frage, ob die Infektiosität von unter CsA produzierten Viren reduziert ist. Insbesondere sollte geklärt werden, ob die Infektiosität unter CsA vom Nef-Protein abhängig ist.

Abbildung 3.4 zeigt, dass Viren, die in Gegenwart von CsA produziert wurden, eine geringere Infektiosität aufweisen als Viren ohne Einflüsse durch CsA. Die Infektiosität ist dosisabhängig reduziert. Diese Ergebnisse wurden in drei Experimenten mit jeweils zwei unabhängig transfizierten Virusstocks bestätigt.

Die Infektiosität ist in Prozent von den Werten der ohne CsA kultivierten Zellen angegeben (siehe Abb. 3.4). Damit sind die Werte für die Infektiosität vergleichbar unabhängig von der unterschiedlichen Aktivität der einzelnen Plasmide.

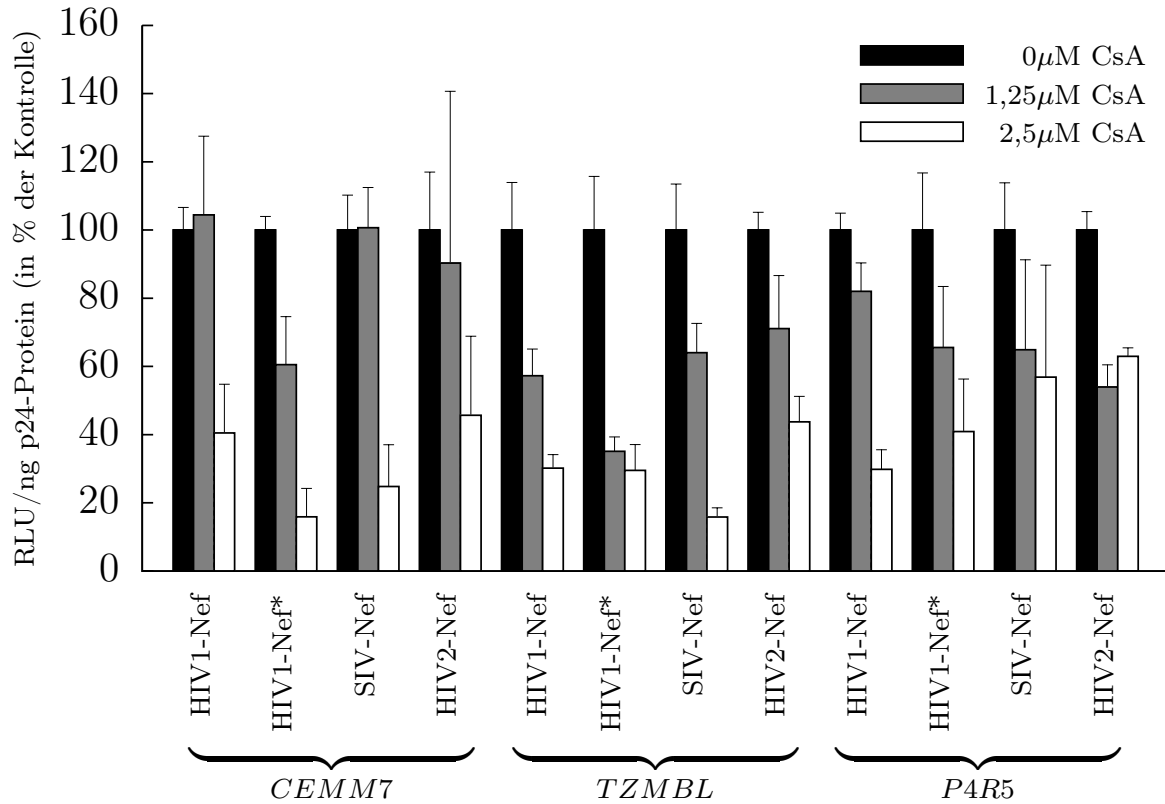


Abbildung 3.5: **Einfluss von CsA während der Virusproduktion:** CEMM7 und TZMBL wurden mit $10\mu\text{l}$ und P4R5-Zellen mit $100\mu\text{l}$ Virusstammlösung infiziert. Die Virusstammlösungen wurden in 0, 1,25 oder $2,5\mu\text{M}$ CsA produziert. Nach drei Tagen wurde die Infektiosität mit β -Galactosidase- oder Luziferase-Assay gemessen. Die Aktivitätswerte sind in relativen Lichteinheiten/Sek pro 1ng p24-Protein und in Prozent der nicht mit CsA behandelten Viren mit Standardabweichung angegeben. CsA: Cyclosporin A

Da sich bei Zugabe von CsA während der Virusproduktion nicht die erwartete CsA-Resistenz von HIV-2-Nef und SIVmac-Nef zeigte, sollte die Infektiosität bei Zugabe von CsA während des Vorgangs der Infektion der Zielzellen überprüft werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass CsA in der Zielzelle die Infektiosität reduziert (siehe Abb. 3.6). Dies war unabhängig vom Nef-Protein. In CEMM7-Zellen

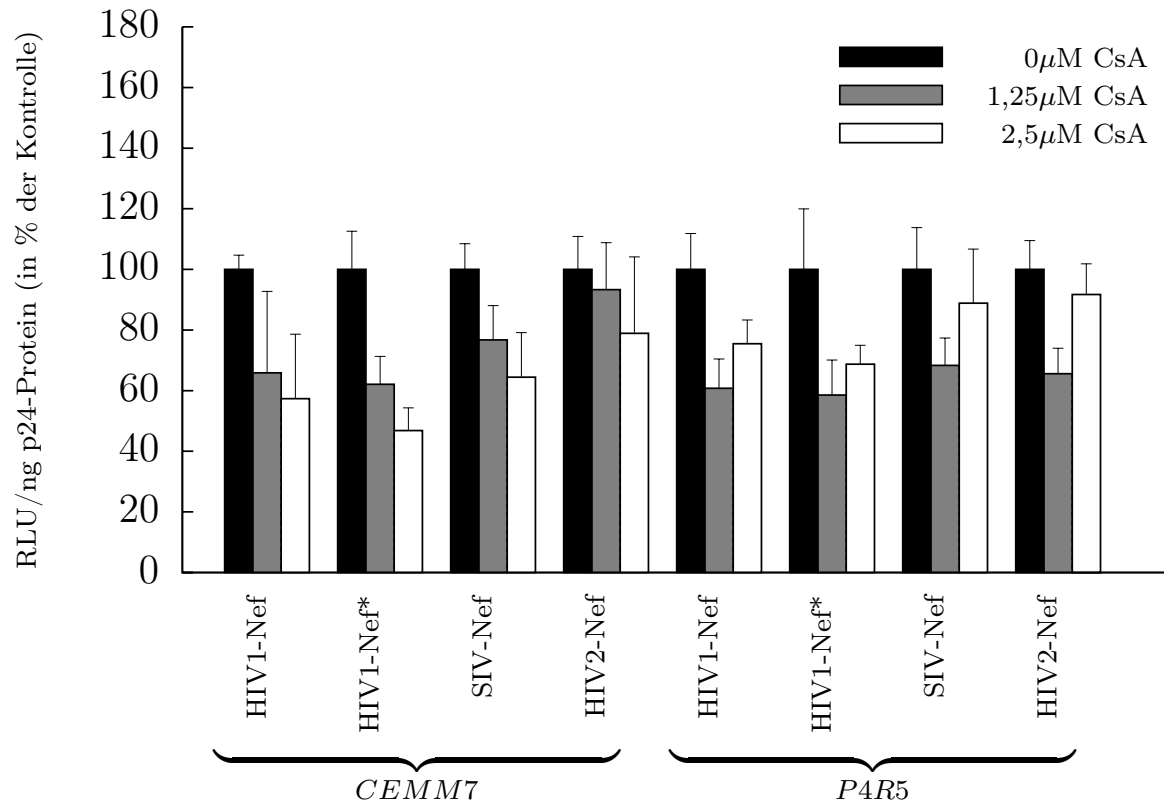
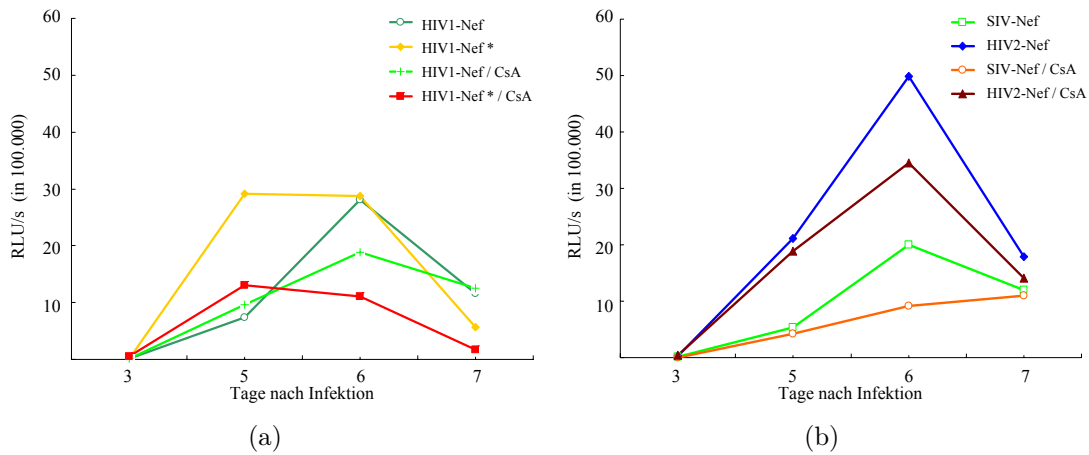


Abbildung 3.6: **Einfluss von CsA auf die Infektiosität:** CEMM7- und P4R5-Zellen wurden in Gegenwart von CsA mit 10 bzw. 100 μ l Viruslösung infiziert. Nach drei Tagen wurde die Infektiosität mit β -Galactosidase- oder Luziferase-Assay gemessen. Die Aktivitätswerte sind in relativen Lichteinheiten/Sek pro 1ng p24-Protein und in Prozent der nicht mit CsA behandelten Zellen mit Standardabweichung angegeben. CsA: Cyclosporin A

war die Verminderung der Infektiosität abhängig von der CsA-Dosis. In P4CCR5-Zellen waren die Effekte nicht dosisabhängig.



Abbildungung 3.7: **Wirkung von CsA auf die Replikation in CEMM7-Zellen:** CEMM7-Zellen wurden in 96-Well-Platten in CsA-haltigem Medium ausgesät und mit $10\mu\text{l}$ Viruslösung infiziert. Alle zwei Tage wurde ein Aliquot abgenommen und ein Luziferase-Assay durchgeführt. Die Aktivitätswerte sind in relativen Lichteinheiten pro Sekunde angegeben. CsA: Cyclosporin A

Die CEMM7-Zellen wurden weiter kultiviert und eine Replikationskinetik unter CsA durchgeführt. In der Replikationskinetik zeigte sich eine Hemmung der Infektiosität durch CsA unabhängig vom Nef-Protein (siehe Abb. 3.7). Die Infektiosität war bei beiden verwendeten Konzentrationen geringer als die Kontrolle. Der Übersichtlichkeit wegen, ist hier nur eine Konzentration dargestellt.

Weder bei Produktion der Viren unter CsA, noch bei Infektion der Zellen in Gegenwart von CsA zeigte sich der vorhergesagte Effekt der Nef-Proteine von SIVmac und HIV-2 auf die Infektiosität. Die Reduktion der Infektiosität unter CsA war unabhängig von Nef. Zur weiteren Klärung wurde CsA sowohl bei Produktion der Viren als auch bei Infektion neuer Zellen zugegeben. Hierbei zeigte sich eine starke Reduktion der Infektiosität aller verwendeten Nef-Varianten. Der Effekt der zweimaligen Zugabe von CsA war also additiv.

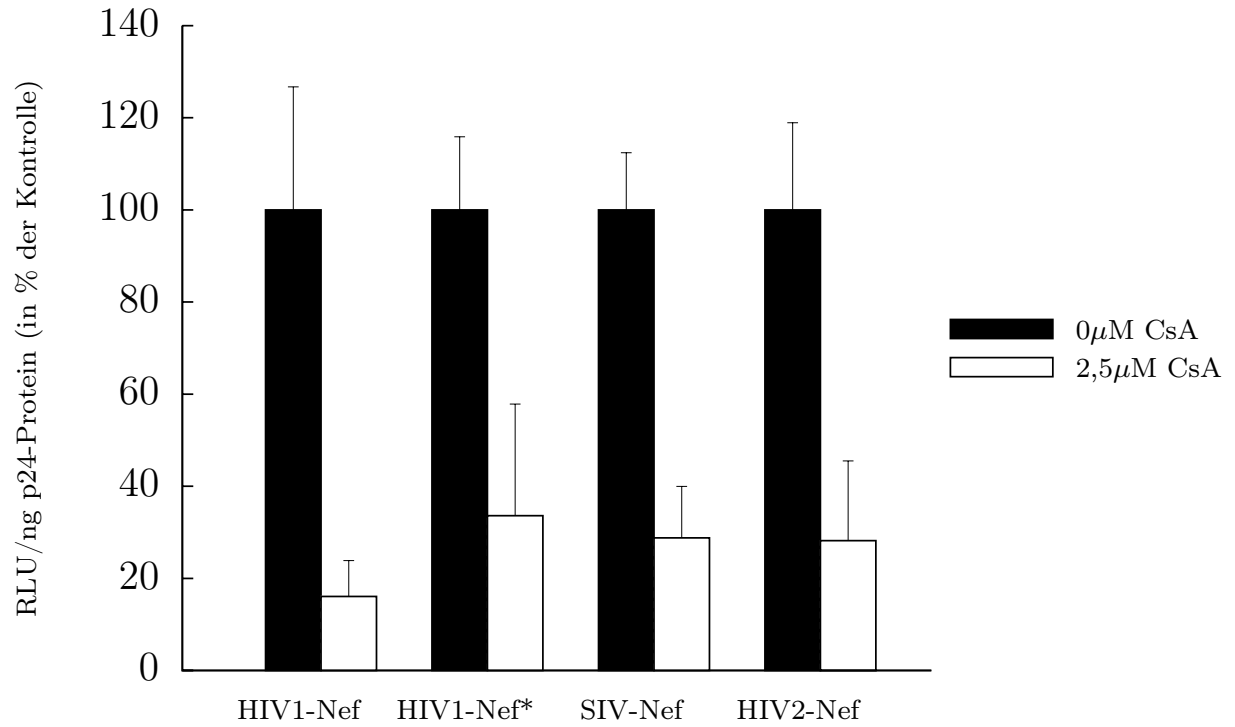


Abbildung 3.8: **Infektiosität unter CsA:** CEMM7 wurden in Gegenwart von CsA mit 10 μ l Viruslösung, die unter CsA produziert wurde, infiziert. Nach drei Tagen wurde die Infektiosität mit dem Luziferase-Assay gemessen. Die Aktivitätswerte sind in relativen Lichteinheiten/Sekunde pro 1ng p24-Protein und in Prozent der nicht mit CsA behandelten Zellen mit Standardabweichung angegeben. CsA: Cyclosporin A

3.5 Infektiosität in CypA-defekten Jurkatzellen

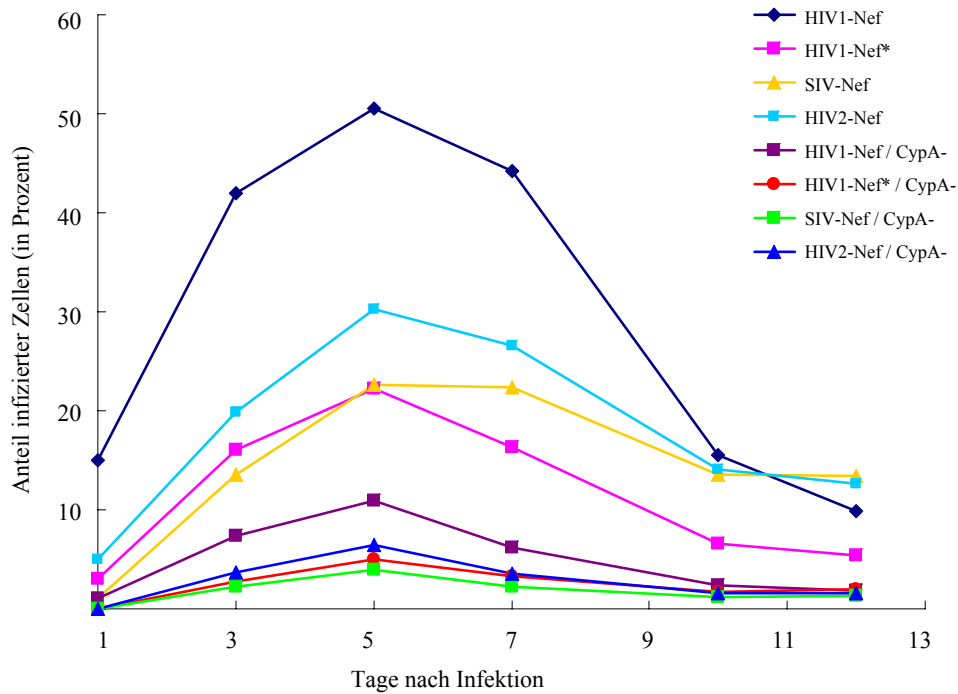


Abbildung 3.9: **Infektiosität in CypA-defekten Jurkatzellen:** Je eine Million Jurkats und CypA-defekte Jurkatzellen wurden mit 500 μ l VSV-G-pseudotypisierten Viren infiziert. Alle zwei Tage wurde eine FACS-Analyse auf GFP gemacht. Die Werte sind in Prozent der infizierten Zellen angegeben. CypA: Cyclophilin A, VSV: Vesicular stomatitis virus, FACS: Fluorescence assorted cell sorter, GFP: Green fluorescence protein

Zuletzt wurde noch die Infektiosität der verschiedenen Nef Proteine in gänzlich CypA depletierten Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind eindeutig: CypA-defekte Jurkatzellen sind nur wenig suszeptibel für die Infektion mit HIV-1-Varianten, während in normalen Jurkatzellen 10 bis 40 Prozent Infektiosität erreicht werden (siehe Abb. 3.9).

Gleichzeitig wurden 180 μ l Überstand in Triton lysiert und ein ELISA auf p24-Protein durchgeführt. Die Vermehrung der Viren ist deutlich vermindert in den Jurkatzellen, die kein CypA exprimieren. Dies ist durch die verminderte Infektiosität in CypA-defekten Zellen zu erklären. Im Gegen-

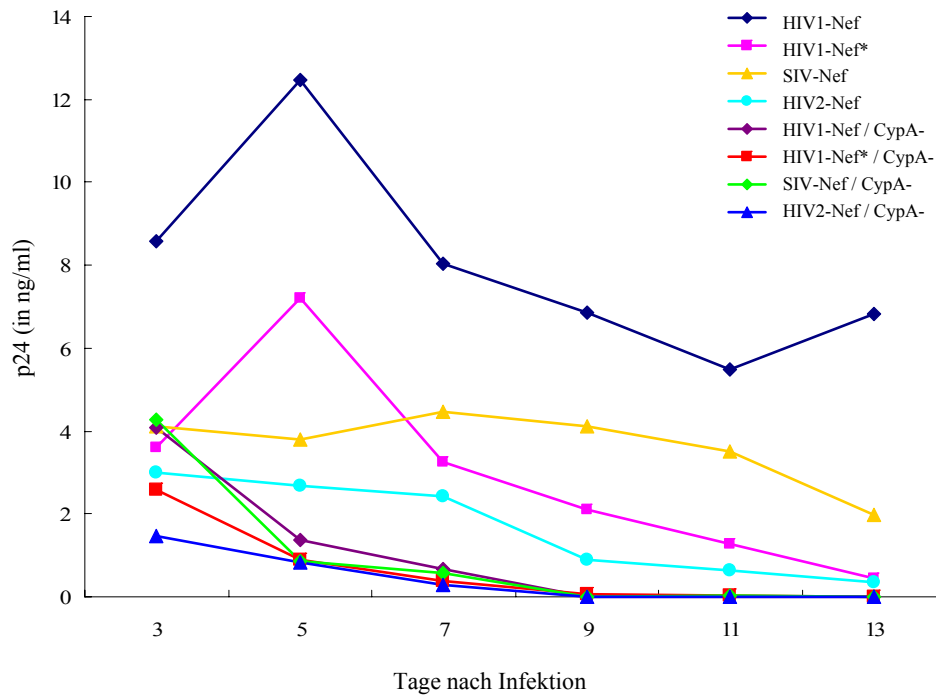


Abbildung 3.10: **Replikation in CypA-defekten Jurkatzellen:** Je eine Million Jurkats und CypA-defekte Jurkatzellen wurden mit 500 μ l VSV-G-pseudotypisierten Viren infiziert. Alle zwei Tage wurde ein Aliquot für einen p24-Elisa abgenommen und in Triton lysiert. Die Werte sind in ng/ml angegeben. CypA: Cyclophilin A, VSV: Vesicular stomatitis virus

satz dazu war die Replikation nach Transfektion nicht vermindert (siehe Abb. 3.4). Da wesentlich weniger Zellen infiziert sind, ist insgesamt die Virusproduktion reduziert. Diese Beobachtungen waren unabhängig vom Nef-Protein bei allen Varianten zu machen.

4 Diskussion

Folgende Aussagen können festgehalten werden: (1) CsA-Konzentrationen über $2,5\mu\text{M}$ sind toxisch und machen Infektiositätsmessungen schwer vergleichbar. (2) $2,5\mu\text{M}$ CsA sind ausreichend um den Einbau von CypA in das Viruspartikel stark zu reduzieren (siehe Abb. 3.3). Dabei wird die Virusproduktion nicht reduziert. (3) Die Infektiosität der HIV-1-Varianten, die das SIVmac- bzw. das HIV-2-Nef exprimieren, ist unter Einfluss von $2,5\mu\text{M}$ CsA reduziert (siehe Abb. 3.4 und 3.6). (4) In CypA-defekten Jurkatzellen zeigte sich eine stark reduzierte Infektiosität für alle Varianten. Somit gibt es keine Anhaltspunkte dafür, dass Nef-Proteine aus SIVmac239 und HIV-2 das HIV-1-Virus CypA-unabhängig und gegenüber CsA resistent machen.

Zu Beginn dieser Studie wurde postuliert, dass das enthaltene Nef-Protein bestimmt, ob CypA für die volle Infektiosität benötigt wird oder nicht. Dies wurde unter CsA, einem Hemmer von CypA, und in CypA-depletierten Zellen näher untersucht werden. CypA wird von HIV-1 und einigen SIV in das Kapsid eingebaut, jedoch von HIV-2 und den meisten SIV nicht benötigt. Im ersten Teil der Arbeit wurden die optimalen Versuchsbedingungen ermittelt und überprüft. Als Referenz dienten die Veröffentlichungen anderer Autoren, was im Folgenden diskutiert wird.

4.1 Einfluss von CsA auf den Zellstoffwechsel und den Einbau von CypA in HIV-Partikel

Um die Funktion von HIV-1-Nef, SIVmac-Nef und HIV-2-Nef unter CsA zu untersuchen, sollten Konzentrationen ermittelt werden, die nicht toxisch sind. Beeinträchtigungen des Zellstoffwechsels würden zu Effekten führen, die nicht auf CypA oder die Nef-Proteine zurück zu führen sein würden. Die Analyse ergab, dass CsA-Konzentrationen über $2,5\mu\text{M}$ toxisch sind. Dieses Ergebnis fand sich bei allen fünf verwendeten Zelllinien und bei verschiedenen Zelldichten. Der Zytotoxizitäts-Assay mit MTT zeigt die Stoffwechselaktivität der Zelle an, welche für die Virusvermehrung von Bedeutung ist. Damit ist der Test in diesem Kontext besser geeignet als zum Beispiel Apoptosemarker auf der Zelloberfläche.

Khan et al. [30] haben laut ihrer Veröffentlichung keinen Zytotoxizitätstest durchgeführt. Sie verwendeten in ihren Experimenten zum Teil Konzentrationen bis $10\mu\text{M}$ CsA. Zuverlässige Messungen der Infektiosität sind unter diesen Bedingungen nicht möglich, denn geschädigte Zellen produzieren weniger Virus. In der Literatur werden meistens Konzentrationen bis $5\mu\text{M}$ CsA verwendet [5, 57, 39].

Da andere Autoren unterschiedliche Konzentrationen verwendeten, stellt sich die Frage, ob niedrige CsA-Konzentrationen von $2,5\mu\text{M}$ die Menge an CypA im Virus ausreichend reduzieren. Aus diesem Grund wurde in einem zweiten Schritt ein Westernblot aus Viruslysaten auf CypA gemacht. Dieser zeigt, dass niedrige CsA-Konzentrationen ausreichen, um den CypA-Einbau in das Viruspartikel effektiv zu reduzieren (siehe Abb. 3.3). Desweiteren sind die Ergebnisse der Infektiositätsversuche mit HIV-1 unter CsA im Einklang mit den Beobachtungen anderer Autoren. Die Resultate

zeigen, wie zu erwarten, eine reduzierte Infektiosität, was im Folgenden noch näher erläutert wird. Damit ist belegt, dass nicht-zytotoxische CsA-Konzentrationen ausreichen um CypA im Viruspartikel deutlich zu reduzieren und CsA-Effekte messbar zu machen.

Der Westernblot ist kein quantitativer Test. Er weist qualitativ Proteine nach.

In einem zweiten Schritt wurden 293T-Zellen mit den Varianten NL4.3-NL4.3nef (HIV-1-Nef), NL4.3-NL4.3nef* (HIV-1-Nef*), NL4.3-SIVmac239nef (SIVmac-Nef) und NL4.3-HIV-2Bennef (HIV-2-Nef) transfiziert. Dabei wurden dem Nährmedium 0 oder 1,25 oder 2,5 μ M CsA zugegeben. Um sicher zu stellen, dass die Virusstocks von ähnlicher Qualität sind, wurde die Menge an p24, einem Kapsidprotein, mittels ELISA gemessen. Die Varianten HIV-1-Nef, HIV-1-Nef*, SIVmac-Nef und HIV-2-Nef zeigten nach Transfektion unter CsA unabhängig vom Nef-Protein keine Unterschiede in der Menge der Virusproduktion (Abb. 3.4). Bei einer CsA-Konzentration von 2,5 μ M konnte das Virus wie erwartet noch effektiv replizieren. Somit ist die Virusproduktion und -freisetzung nicht durch CsA betroffen.

Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Studien über ein [52, 5], die besagen, dass CsA die virusgebundenen Glykoproteine gp120 und gp41 reduziert und die Infektion von neuen Zellen erschwert. Da in diesem Fall das Provirus durch Transfektion in die Zelle eingebracht wird, werden die Rezeptorbindung, die Fusion der Membranen und das Uncoating umgangen. Diese Messung sagt also nichts über die ersten drei Schritte des Replikationszyklus aus. Ebenso kann hier noch keine Aussage über die Infektiosität gemacht werden. Der p24-ELISA ist eine gut etablierte Methode zur Be-

stimmung der Menge an Virusprotein und wird auch in der Diagnostik eingesetzt.

4.2 Der Einfluss von Nef auf die Sensitivität gegenüber CsA und die Abhängigkeit von CypA

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Experimente von Khan et al. [31] reproduziert werden und weiter führende Experimente in CypA-defekten Jurkatzellen durchgeführt werden. Dazu wurden mit den Virusstocks verschiedene Zellen infiziert. Die Varianten mit exprimiertem SIVmac-Nef und HIV-2-Nef reagierten ebenso wie HIV-1-Nef mit einer reduzierten Infektiosität auf CsA (siehe Abb. 3.4 und 3.6). Die Hypothese, dass SIVmac-Nef und HIV-2-Nef, exprimiert im HIV-1, das Virus resistent gegen CsA machen, muss verworfen werden. Die Resultate stehen im Gegensatz zu den Veröffentlichungen von Khan et al. [30], der gezeigt hat, dass Nefs aus SIVmac und HIV-2 das Virus CsA-resistent machten.

Die verwendeten Virusvarianten wurden in anderen Studien erprobt [44, 45] und sind voll funktionsfähig. Die verwendeten Zelllinien sind in Laboratorien weit verbreitet und verwandte Linien wurden auch von Khan et al. [31] genutzt. Die hier präsentierten Ergebnisse sind konsistent mit Veröffentlichungen von Braaten et al. [5], Hatzioannou et al. [26], Sokolskaja et al. [50], Yang und Aiken [57], die zeigen, dass CsA während der Virusproduktion oder in der Zielzelle die Infektiosität von HIV-1 reduziert. Allerdings gibt es von anderen Arbeitsgruppen keine Veröffentlichungen zu der Frage welchen Einfluss Nef auf die CsA-Resistenz hat.

Die Zugabe von CsA sowohl bei Virusproduktion als auch bei Infektion neuer Zellen konnte den Effekt der CsA-Resistenz von SIVmac-Nef und HIV-2-Nef ebenfalls nicht provozieren. Die Reduktion der Infektiosität war hierbei additiv, was auf zwei unterschiedliche Mechanismen während Virusproduktion und Infektion hinweist.

Eine neue Arbeit von Sokolskaja et al. [52] zeigt, dass CsA während der Virusproduktion die Glykoproteine 120 und 41 reduziert. Da diese Rezeptoren für die Infektion einer neuen Zelle benötigt werden, ist die Infektiosität vermindert. Dieser Mechanismus ist unabhängig von Nef und stützt die Ergebnisse dieser Arbeit.

Im letzten Schritt wurden die gewonnenen Erkenntnisse in CypA-defekten Jurkatzellen überprüft. Denn CsA beeinflusst auch in niedrigen Konzentrationen mehr als nur die Aktivität von CypA. Diese Zellen haben zwei Vorteile: Sie exprimieren gar kein CypA und es muss kein CsA verwendet werden. Mit dieser Methode sollte der reine Effekt von CypA mit verschiedenen Nefs untersucht werden. Unter der Annahme, dass CypA und Nef zur Steigerung der viralen Infektiosität miteinander interagieren, ist dieser Versuchsaufbau gut geeignet einen Unterschied der Nef Proteine nachzuweisen. Es gibt weitere Autoren, die CypA-defekte Jurkatzellen verwendeten [7]. Verschiedene Nefs wurden bisher noch nicht in diesen Zellen untersucht.

CypA-defekte Jurkatzellen zeigen bei Infektion mit HIV-1 niedrige Infektionsraten. Die Virusvermehrung ist stark eingeschränkt (siehe Abb. 3.9). In unveränderten Jurkatzellen zeigt sich bei allen Plasmiden eine regelrechte Infektionsrate und Replikation. Dies belegt, dass die Virusstammlösungen infektiös waren und die Reduktion der Infektiosität auf einen Mangel an

CypA zurückzuführen ist. Es bestätigt sich, dass CypA bei der Infektion neuer Zellen essentiell ist [26, 50]. Dieses Ergebnis ist unabhängig vom verwendeten Nef und belegt, dass SIVmac- und HIV-2-Nef keine Auswirkung auf die CypA-Abhängigkeit haben. Somit muss die diese Hypothese verworfen werden.

Bei der Infektion neuer Zellen scheint die Interaktion von CypA mit dem Kapsid eine Rolle zu spielen. Die Region der CypA-Bindestelle ist konserviert. Es liegt nahe, dass diese Muster nur wenig und extrem selten mutieren und wichtig für das Virus sind und einen Selektionsvorteil bilden. Es wäre möglich, dass die Wirtszelle einen Verteidigungsmechanismus entwickelt hat, der genau an dieser Stelle ansetzt, wie schon von anderen Autoren vermutet wurde [55, 51, 26]. Die betroffenen Viren mussten sich anpassen und versteckten die Erkennungssequenz hinter einem Wirtsprotein. Eine Beteiligung von Nef konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden.

4.3 Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen dem exprimierten Nef und der CsA-Resistenz und CypA-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Dabei konnte zunächst eine Reduktion der Infektiosität von HIV-1 unter CsA und in CypA-defekten Jurkatzellen reproduziert werden. Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten lässt sich jedoch eine Abhängigkeit der CsA-Resistenz vom jeweiligen Nef nicht bestätigen [30].

Die hier verwendeten Zellen stammen von immortalisierten Zelllinien, die den CD4-Rezeptor tragen und mit HIV-1 gut infiziert werden können. Wei-

terführend sollten auch periphere Blutlymphozyten untersucht werden, da diese besser die Situation in vivo zeigen. Die Beobachtung, dass es bei HIV-infizierten organtransplantierten Patienten, die mit CsA behandelt wurden, seltener zur Progression zu AIDS kam [46], zeigt wie wichtig dieser Forschungszweig ist und weckt Hoffnungen auf ein neues Medikament. Allerdings muss vor einer breiten Anwendung dieses Medikaments die Wirkung und der Nutzen sehr genau geklärt werden, da die Nebenwirkungen beträchtlich sind. Bei der Wirkung von CsA könnten sowohl der immunsuppressive Effekt mit einer gemäßigteren Antwort anstatt einem Overkill des Immunsystems als auch direkte Auswirkungen auf das Virus eine Rolle spielen.

5 Zusammenfassung

Bei Infektion mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) sind Einflüsse von zellulären und viralen Faktoren auf Replikationsfähigkeit und Infektiosität des Virus von Bedeutung für eine effektive Virusvermehrung und -ausbreitung. Dabei spielt das zelluläre Protein Cyclophilin A (CypA) eine wichtige Rolle. Es wird von HIV-1 und einigen SIV (simianen Immundefizienzviren) in das Kapsid eingebaut und für die volle Infektiosität benötigt. Durch Bindung an Cyclosporin A (CsA) kann CypA blockiert werden. Unter CsA oder in CypA-defekten Jurkatzellen könnte die Infektion neuer Zellen mit HIV-1 durch unbekannte humane Restriktionsfaktoren gehemmt werden. Wenn die CypA-Bindungsstelle am Virus frei bleibt, könnten Restriktionsfaktoren an dieser Stelle angreifen. Ein weiterer wichtiger Faktor ist das virale Protein Nef, welches zahlreiche Funktionen zur Erhaltung des Virus hat. *nef*-deletierte Viren sind wesentlich weniger infektiös. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es Varianten von Nef gibt, die die Ausbreitung von HIV-1 unabhängig von CypA machen.

Zur Reduzierung der CypA-Aktivität wurde CsA verwendet. Da Beeinträchtigungen des Zellstoffwechsels auch die Virusreplikation vermindern, wurden CsA-Konzentrationen ermittelt, die wenig toxisch waren. Nachdem im zweiten Schritt die Replikation der Viren unter CsA erfolgreich war, war das dritte Ziel dieser Studie die Untersuchung einiger Virus-Varianten hinsichtlich ihrer Infektiosität unter CsA. Um Nebenwirkungen von CsA zu

vermeiden, wurde in einem vierten Schritt die Virusausbreitung und Vermehrung in CypA-defekten Jurkatzellen untersucht.

Die Untersuchungen wurden mit NL4-3-Proviren durchgeführt, die die *nef*-Gene HIV-1-, SIVmac239- und HIV-2-*nef* oder ein deletiertes HIV-1-*nef* enthalten. Infiziert wurden P4CCR5-Zellen, TZMBL und CEMx174 5.25 M7-Zellen. Sowohl Produktion als auch Infektion erfolgten mit 1,25 und 2,5 μ M und ohne CsA im Nährmedium. Desweiteren wurden Jurkatzellen und CypA-defekte Jurkatzellen infiziert.

Die Zytotoxizitätsmessungen ergaben, dass CsA-Konzentrationen über 2,5 μ M toxisch sind. Da niedrige CsA-Konzentrationen ausreichten, den CypA Einbau in das Viruspartikel effektiv zu reduzieren, wurde auf höhere Konzentrationen verzichtet. Die verwendeten Viren zeigten nach Transfektion unter CsA keine Unterschiede der produzierten Virusmenge. In den Infektiositätsversuchen reagierten alle Viren sensibel auf CsA mit einer Reduktion der Infektiosität. Diese Beobachtungen waren unabhängig davon, ob CsA bei Virusproduktion oder bei Infektion den Zielzellen zugegeben wurde. Die Untersuchungen mit CypA-defekten Jurkatzellen zeigten eine starke Beeinträchtigung der Infektiosität bei allen verwendeten Nef-Varianten. In dieser Arbeit konnten keine spezifischen Wechselwirkungen zwischen Nef und CypA offen gelegt werden. Denn die vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass der Austausch der *nef*-Gene weder einen Einfluss auf die Abhängigkeit der Infektiosität von CypA noch auf die Sensitivität gegenüber CsA hat. Da längst nicht alle Immundefizienzviren CypA einbauen, aber alle ein Nef exprimieren, wäre dies ein interessanter Ansatz gewesen, der sich nicht bestätigt hat. Somit muss weiter untersucht werden, auf welchem Weg CypA die Infektiosität steigert und warum es von HIV-1 benötigt wird.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Aiken C., Konner J., Landau N.R., Lenburg M.E. and Trono D. (1994)
Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain.
Cell 76: 853-864
- [2] Alkhatib G., Combadiere C., Broder C.C., Feng, Y., Kennedy P.E., Murphy P.M. and Berger E.A. (1996)
CC CKR5: a RNATES, MIP-1a, MIP-1b Receptor as a Fusion Co-factor for Macrophage-Tropic HIV-1.
Science 272: 1955-1958
- [3] Barré-Sinoussi, F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dautet C., Axler-Blin C., Vezinét-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W. and Montagnier L. (1983)
Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS.
Science 220: 868-871
- [4] Bosco D.A., Eisenmesser E.Z., Pochapsky S., Sundquist W.I., Kern D. (2002)
Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human

cyclophylin A.

P Natl Acad Sci USA 99: 5247-52

- [5] Braaten D., Franke E.K., Luban J. (1996)
Cyclophylin A is required for an early step in the life cycle of HIV-1 before the initiation of reverse transcription.
J Virol 70: 3551-3560
- [6] Braaten D., Franke E.K., Luban J. (1996)
Cyclophylin A is required for the replication of group M human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and simian immunodeficiency virus (CPZ)GAB but not group O HIV-1 or other primate immunodeficiency viruses.
J Virol 70(7): 4220-4227
- [7] Braaten D. and Luban J. (2001)
Cyclophylin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells.
EMBO J 20: 1300-1309
- [8] Bukovsky A.A., Weimann A., Accola M.A., Göttlinger H.G. (1997)
Transfer of the HIV-1 cyclophilin-binding site to simian immunodeficiency virus from *Macaca mulatta* can confer both cyclosporin sensitivity and cyclosporin dependence.
P Natl Acad Sci USA 94: 10943-10948
- [9] Carl S., Greenough T.C., Krumbiegel M., Greenberg M., Skowronski J., Sullivan J. and Kirchhoff F. (2001)
Modulation of different Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef

functions during progression to AIDS.

J Virol 75(8): 3657-3665

- [10] Clavel F., Guyader M., Guetard D., Salle M., Montagnier L., Alizon M. (1986)

Molecular cloning and polymorphism of the human immunodeficiency virus type 2.

Nature 324(6098): 691-705

- [11] Coffin J., Haase A., Levy J.A., Montagnier L., Oroszlan S., Teich N., Temin H., Toyoshima K., Varmus H. and Vogt P.L. (1986)

What to call the AIDS virus?

Nature 321: 10

- [12] Cohen G.B., Gandhi R.T., Davis D.M. (1999)

The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells.

Immunity 10: 661-671

- [13] 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., Lawson V.A., Crowe S., Maerz A., Sonza S., Learmont J., Sullivan J. S., Cunningham A., Dwyer D., Dowton D. and Mills J. (1995)

Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients.

Science 270: 988-991

- [14] De Ronde A., Klaver B., Keulen W., Smit L., Goudsmit J. (1992)

Natural HIV-1 nef accelerates virus replication in primary human

lymphocytes.

Virology 188(1): 391-405

- [15] De Vita V.T., Hellman S. and Rosenberg S. (1997)
AIDS. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York
- [16] Feng H., Rong L., Ellmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhart M., DiMarzio P., Marmon S., Sutton R.E., Hill C.M., Davis C.B., Peiper S.C., Schall T.J., Littman D.R. and Landau N.R. (1996)
Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1.
Nature 381: 661-666
- [17] Fischer G. and Schmid F.X. (1990)
The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for the de novo protein folding and translocation in the cell.
Biochemistry 29: 2205-2212
- [18] Franke E.A., Yuan H.E.H. and Luban J. (1994)
Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions.
Nature 372: 359-362
- [19] Frankel A.D. and Young J.A.T. (1998)
HIV-1: Fifteen proteins and an RNA.
Annu Rev Biochem 67: 1-25
- [20] Fujita M., Yoshida A., Miyaura M., Sakurai A., Akari H., Koyama A.H., Adachi A. (2001)
Cyclophylin A-independent replication of a human immunodeficiency virus type 1 isolate carrying a small portion of the simian immuno-

- deficiency virus SIVmac gag capsid region.
J Virol 75(21): 10527-10531
- [21] Gao F., Bailes E., Robertson D.L., Chen Y., Rodenburg C.M., Michael S.F., Cummins L.B., Arthur L.O., Peeters M., Shaw G.M., Sharp P.M., Hahn B.H. (1994)
Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*.
Nature 397(6718): 436-441
- [22] Garcia J.V. and Miller A.D. (1991)
Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef.
Nature 350: 508-511
- [23] Gottlieb M.S., Schroff R., Schanker H.M., Weisman J.D., Fan P.T., Wolf R.A. and Saxton A. (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
- [24] Greenberg M.E., Bronson S., Lock M., Neumann M., Pavlakis G.N. and 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
- [25] 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(5453): 607-14

- [26] Hatziioannou T., Perez-Caballero D., Cowan S., Bieniasz P.D. (2004)
Cyclophylin interactions with incoming HIV-1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells.
J Virol 79: 176-183
- [27] Hirsch V.M., Olmsted R.A., Murphey-Corb M., Purcell R.H., Johnson P.R. (1989)
An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2.
Nature 339(6223): 389-392
- [28] Ho D.D., Neumann A.U., Perelson A.S., Chen W., Leonard J.M. und Markowitz M. (1995)
Rapid turnover of plasmid virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.
Nature 373: 123-126
- [29] 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 gen for maintenance of high virus loads and for development of AIDS.
Cell 65(4): 651-662
- [30] Khan M., Jin L., Huang M., Miles L., Bond V.C., Powell M.D. (2004)
Chimeric human immunodeficiency virus type 1 virions containing HIV-2 or simian immunodeficiency virus nef are resistant to cyclosporin treatment.
J Virol 78: 1843-1850
- [31] Khan M., Jin L., Huang M., Miles L., Bond V.C., Powell M.D. (2005)
Chimeric human immunodeficiency virus type 1 virions that contain

the simian immunodeficiency virus nef gene are cyclosporin A resistant.

J Virol 79: 3211-3216

- [32] Kirchhoff F., Greenough T.C., Brettler D.B., Sullivan and Desrosiers R.C. (1995)

Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with non-progressive HIV infection.

N Engl J Med 332: 228-232

- [33] Kirchhoff F., Schindler M., Specht A., Arhel N., Münch J. (2008)

Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis.

Cell Mol Life Sci 65: 2621-2636

- [34] Lama J., Mangasarian A. and 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

- [35] Li Y., Kar A.K. and Sodrosky J. (2009)

Target cell type-dependent modulation of human immunodeficiency virus type 1 capsid disassembly by CyclophilinA

J Virol 83: 10951-10962

- [36] Maddon P.J., Dalgleish A. G., McDougal J.S., Clapham P.R., Weiss R.A. and Axel R. (1986)

The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain.

Cell 47: 333-348.

- [37] Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E.F. (1989)
Molecular Cloning.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- [38] Markovitz D.M. (1993)
Infection with the Human Immunodeficiency Virus Type 2.
Ann Intern Med 118, 211-218
- [39] Matsuoka S., Dam E., Lecossier D., Clavel F., Hance A.J. (2009)
Modulation of HIV-1 infectivity and cyclophilin A-dependence by
Gag sequence and target cell type.
Retrovirology 2009, 6:21
- [40] Miller M.D., Wamerdam M.T., Gaston I., Greene W.C., Feinberg
M.B. (1994)
The HIV-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and
replication in primary lymphocytes and macrophages.
J Exp Med 179(1): 101-113
- [41] Münch J., Schindler M., Wildum S., Rucker R., Bailer N., Knoop V.,
Novembre F.J., and Kirchhoff F. (2005)
Primary SIVsm and HIV-2 Nef alleles modulate cell surface expression
of various human receptors and enhance viral infectivity and replica-
tion.
J Virol 79: 10547-10560
- [42] 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

- [43] Saini M. and Potash M.J. (2006)
Novel activities of Cyclophylin A and Cyclosporin A during HIV-1 infection of primary lymphocytes and Macrophages.
J Immunol 177: 443-449

- [44] Schindler M., Würfl S., Benaroch P., Greenough T.C., Daniels R., Easterbrook P., Brenner M., Münch 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

- [45] Schindler M., Münch J., Wildum S., Rücker E., Bailer N., Knoop V., Novembre F.J., Kirchhoff F. (2005)
Primary sooty mangabey simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 2 *nef* alleles modulate cell surface expression of various human receptors and enhance viral infectivity and replication.
J Virol 79: 10547-10560

- [46] Schwarz A., Offermann G., Keller F., Bennhold I., L'age-Stehr J., Krause P.H., Mihatsch M.J. (1993)
The effect of cyclosporine on the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection transmitted by transplantation - data

on four cases and review of the literature.

Transplantation 55 (1): 95-103

- [47] Sharp M.P., Shaw G.M. and Hahn B.H. (2005)
Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees.
J Virol 79: 3891-3902

- [48] Shaw G.M., Harper M.E., Hahn B.H., Epstein L.G., Gaydusek 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

- [49] Sinclair E., Barbosa P., Feinberg M.B. (1997)
The nef gene products of both simian and human immunodeficiency
viruses enhance virus infectivity and are functionally interchangeable.
J Virol 71: 3641-3651

- [50] Sokolskaja E., Sayah D.M., Luban J. (2004)
Target cell cyclophylin A modulates human immunodeficiency virus
type 1 infectivity.
J Virol 78: 12800-12808

- [51] Sokolskaja E., Berthoux L., Luban J. (2005)
Cyclophylin A and TRIM5alpha independently regulate HIV-1 infectivity in human cells.
J Virol 80: 2855-2862

- [52] Sokolskaja E., Olivari S., Zufferey M., Strambio-De-Castillia C., Pizzato M., Luban J. (2010)
Cyclosporine blocks incorporation of HIV-1 envelope glycoprotein into virions.
J Virol 84: 4851-4855
- [53] Song C. and Aiken C. (2007)
Analysis of human cell heterokaryons demonstrates that target cell restriction of cyclosporin-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants is genetically dominant.
J Virol 81: 11946-11956
- [54] Swigut T., Shohdy N., Skowronski J. (2001)
Mechanism for downregulation of CD28 by Nef.
EMBO J 20: 1593-604
- [55] Towers G.J., Hatzioannou T., Cowan S., Goff S.P., Luban J., Bieniasz P.D. (2003)
Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors.
Nat Med 9: 1138-1143
- [56] Welker R., Kottler H., Kalbitzer H.R. and Kräusslich H.G. (1996)
Human immunodeficiency virus type 1 Nef is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase.
J Virol 219: 228-236
- [57] Yang R. and Aiken C. (2007)
A Mutation in Alpha Helix 3 of CA Renders Human Immunodeficiency Virus Type 1 Cyclosporin A Resistant and Dependent: Rescue

by a Second-Site Substitution in a Distal Region of CA.

J Virol 81: 3749–3756

- [58] Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York City and California.

Morbidity and Mortality Weekly Report 1981 Jul 3; 30(25): 305-308

- [59] Unaided report on the global AIDS epidemic, 2010

<http://www.unaids.org>

7 Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich dabei unterstützt haben:

Prof. Dr. Frank Kirchhoff danke ich für die Überlassung des Themas.

Frau Prof. Dr. Barbara Spellerberg danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Jan, Nathalie und Socrates danke ich für die geduldige Anleitung eines Laborneulings wie mir und die hilfreichen Diskussionen und Ideen; Kerstin, Martha und Daniela für die Durchführung zahlreicher Versuche.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Elias für die TeXnische Unterstützung beim Layout und manches Telefonat zu später Stunde.

Ein großes Dankeschön geht an Ursula für das Korrekturlesen und die kritischen Fragen, die mir sehr weiter geholfen haben.

Danke an Kathrina, Andi, Judith, Regina, Christian und Miriam für ihre freundschaftliche Unterstützung.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich immer wieder ermutigt haben, nicht den Kopf in den Sand zu stecken und auch nach Misserfolgen nach vorne zu schauen.

Mein größter Dank gilt meinem Schatz Thommy für seine liebende Unterstützung in allen Lebenslagen.