

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologe Volker Hermann
aus München

Tag der mündlichen Prüfung:

Etablierung eines infizierbaren Kleintiermodells zur Untersuchung von HIV-Nef

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich
Prof. Dr. Michael Lanzer

Zusammenfassung

Das virale Nef-Protein ist eine wichtige Determinante für die Infektiosität und die Pathogenese des humanen und simianen Immundefizienzvirus. Die Bedeutung des Nef-Proteins wird durch Studien an *nef*-transgenen Mäusen, die eine AIDS-ähnliche Krankheit entwickeln, demonstriert. Um Funktionen von Nef in einem infizierbaren Kleintiermodell zu untersuchen wurden neonatale Mäuse mit replikationskompetentem Moloney Maus Leukämie Virus (MoMuLV) infiziert, das für HIV-*nef* (Mo-NL) oder eine entsprechende Kontrolle (Mo-GFP, Mo) kodierte.

Das Einfügen eines Fremdgens beeinträchtigte die Bildung infektiöser Viren nicht. Die Titer rekombinanter MoMuLV und des Wildtyp-Virus Mo waren *in vitro* vergleichbar. Untersuchungen an primären T-Lymphozyten haben gezeigt, dass Nef die zelluläre Kinase Pak aktiviert und CD4 von der Zelloberfläche herunterreguliert. Somit waren die Voraussetzungen für die Untersuchungen im Mausmodell gegeben.

Die Zahl der GFP-exprimierenden T-Zellen Mo-GFP-infizierter Mäuse wurde in der FACS-Analyse bestimmt. Die Expression von GFP war über mindestens 13 Wochen detektierbar, wobei die Zahl GFP-positiver CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut auf bis zu 60% anstieg. Ab der siebten Woche nach neonataler Infektion mit Mo-NL entwickelten die Tiere eine eitrige Konjunktivitis und Blepharitis, verursacht durch das Bakterium *Pasteurella pneumotropica*. Die Myristilierungsstelle und das PxxP-Motiv von Nef, das in humanen Zellen die Aktivierung der Pak-Kinase und die Herunterregulierung von MHC-I-Molekülen vermittelt, waren notwendig für die Induktion des Phänotyps. Zur Untersuchung der Immunantwort durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Infektion mit rekombinanten Viren wurde ein etabliertes System verwendet, in welchem durch subkutane Infektion mit lymphozytärem Choriomeningitis Virus (LCMV) eine *delayed type hypersensitivity* (DTH) Reaktion in der Fußsohle von Mäusen induziert werden kann. Tiere, die zuvor neonatal mit Mo-NL infiziert worden waren, zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren eine reduzierte CD4-vermittelte T-Zellantwort.

Die opportunistische Infektion mit *P. pneumotropica* deuten in Verbindung mit den Hinweisen auf eine teilweise beeinträchtigte T-Zell-Antwort darauf hin, dass Nef in dem beschriebenen Modellsystem Störungen des Immunsystems verursacht.

Abstract

The viral Nef protein is an important determinant for infectivity and pathogenicity of the human and simian immunodeficiency virus. Its importance is underscored by the phenotype of HIV-*nef*-transgenic mice that develop an AIDS-like disease. To analyze Nef functions in an infectable small animal model, neonatal mice were infected with replication competent Moloney Murine Leukemia Virus encoding HIV-*nef* (Mo-NL) or a corresponding control (Mo-GFP, Mo).

The additional gene did not interfere with the replication of the virus. Titers of recombinant viruses were comparable with wildtype MoMuLV *in vitro*. The analysis of primary mouse T-lymphocytes revealed, that Nef activated the Pak kinase and downregulated the expression of endogenous CD4 from the cell surface. On this account the pre-conditions for the analysis of recombinant MoMuLV in a mouse model system were provided.

Numbers of GFP expressing T-cells in Mo-GFP infected animals were determined by FACS analysis and were detectable for at least 13 weeks. GFP expressing CD4⁺ T-cells reached up to 60% of all cells in the peripheral blood. Starting at week 7 p. i. almost all of the Mo-NL infected animals developed a purulent conjunctivitis and blepharitis caused by *Pasteurella pneumotropica*. The myristoylation site and the PxxP motif of Nef that mediates activation of the cellular PAK kinase and MHC-I downregulation in human cells were essential for the induction of the phenotype. To characterize the immune response of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells after MoMuLV infection, I used a Lymphocytic Choriomeningitis Virus challenge model that induces a delayed type hypersensitivity reaction in the footpad of mice. Animals previously infected with Mo-NL showed a reduced CD4⁺ T-cell mediated response compared to the corresponding controls. The opportunistic infection by *P. pneumotropica* together with evidence for a partially impaired T-cell response suggest a Nef-induced immunological disturbance in this model.

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG.....	1
I.1	Humanes Immundefizienz Virus	1
I.2	Molekulare Eigenschaften von HIV-1	2
I.3	Replikationszyklus von HIV-1.....	3
I.4	Das Nef-Protein	5
I.4.1	Zelluläre Funktionen von Nef	5
I.4.1.1	Internalisierung von CD4 und MHC 1.....	5
I.4.1.2	Einfluss auf die Replikationskinetik und Infektiosität von HIV	7
I.4.1.3	Modulation zellulärer Signalübertragungswege durch Nef.....	8
I.4.2	Tiermodelle zur Untersuchung der Nef-Funktion	12
I.4.2.1	Infektion von Primaten mit SIV.....	13
I.4.2.2	HIV-infizierbare Kleintiermodelle.....	13
I.4.2.3	HIV- und nef-transgene Mausmodelle	14
I.4.2.4	Ein infizierbares Modellsystem zur Untersuchung der Rolle von Nef als Pathogenesefaktor auf der Basis rekombinanter Moloney Maus-Leukämie-Viren	15
I.5	Fragestellungen der Arbeit	17
II.	ERGEBNISSE	18
II.1	Herstellung rekombinanter muriner Leukämieviren	18
II.1.1	Insertion von HIV- <i>nef</i> in das murine Moloney Leukämievirus.....	18
II.1.2	Herstellung infektiöser rekombinanter retroviraler Partikel.....	20
II.2	Eigenschaften rekombinanter muriner Leukämie-Viren <i>in vitro</i>	21
II.2.1	Bestimmung der Titer rekombinanter muriner Leukämie-Viren	21
II.2.2	Nachweis der Expression von Fremdproteinen mit MoMuLV.....	23
II.2.2.1	Expression von Nef und GFP in Mausfibroblasten.....	23
II.2.2.2	Replikations-Kinetik von Mo-NL und Mo-GFP	25
II.2.2.3	Stabilität der Nef und GFP Expression in Mo-NL- und Mo-GFP-infizierten Zellen	27
II.3	Untersuchung MoMuLV-infizierter Mäuse.....	28
II.3.1	Infektion neonataler Mäuse mit murinen Leukämieviren	28
II.3.1.1	Versuchsaufbau	28
II.3.1.2	Expression von Fremdgenen mittels rekombinanter MoMuLV in vivo.....	30

II.3.1.2.1	Stabilität und Quantität der GFP-Expression in Milz und peripheren Blutzellen Mo-GFP-infizierter Mäuse	30
II.3.1.2.2	Nachweis <i>gfp</i> -spezifischer RNA im Gewebe Mo-GFP-infizierter Mäuse	31
II.3.1.2.3	Expression rekombinanter Luciferase in Geweben Mo-Luc infizierter Mäuse ..	33
II.3.2	Phänotyp MoMuLV-infizierter Mäuse	34
II.3.2.1	Überlebensdauer MoMuLV-infizierter Mäuse	34
II.3.2.2	Zahl und Oberflächenexpression MoMuLV-infizierter CD4 ⁺ und CD8 ⁺ peripherer Blut-Lymphozyten	36
II.3.2.2.1	Quantifizierung CD4 ⁺ und CD8 ⁺ peripherer Lymphozyten	36
II.3.2.2.2	Bestimmung der CD4-Expression auf der Oberfläche von CD4 ⁺ peripheren Blut-Lymphozyten	38
II.3.2.3	Vergleich des Krankheitsverlaufs MoMuLV-infizierter Mäuse	39
II.3.2.3.1	Mo-NL-infizierte Mäuse entwickeln spezifische Augeninfektionen	39
II.3.2.3.2	Phänotyp Mo-NL-PA1 und Mo-NL-G2A infizierter Mäuse	42
II.3.2.4	Überinfektion Mo-NL-infizierter Mäuse mit <i>Pasteurella pneumotropica</i> und <i>Listeria monocytogenes</i>	43
II.3.2.4.1	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	43
II.3.2.4.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	44
II.3.2.5	Titer spezifischer Antikörper MoMuLV-infizierter Mäuse gegen das Virus der lymphozytären Choriomeningitis	46
II.3.2.6	Nachweis LCMV spezifischer zytotoxischer T-Zellen	48
II.3.2.7	Die Infektion von Mäusen mit Mo-NL beeinflusst die T-Zellantwort gegen das Virus der lymphozytären Choriomeningitis	49
II.3.2.7.1	Versuchsschema zur Induktion einer <i>delayed type hypersensitivity</i> Reaktion mit lymphozytärem Choriomeningitis-Virus in Mäusen	49
II.3.2.7.2	Mo-NL-infizierte Mäuse zeigen eine reduzierte LCMV-spezifische DTH-Reaktion	52
II.3.3	<i>Ex vivo</i> Charakterisierung von Nef-Funktionen in primären Mauszellen	54
II.3.3.1	Etablierung eines Systems zur Expression von Nef in primären Mauszellen	54
II.3.3.2	Senkung der CD4-Expression auf der Oberfläche primärer Maussplenozyten durch Nef	55
II.3.3.3	Die Expression von Nef assoziiert mit der Phosphorylierung der p21-aktivierten Kinase	57
III.	DISKUSSION	59
III.1	Die Rolle des Nef-Proteins in der HIV-Pathogenese	59
III.2	Nef-spezifische CD4-Herunterregulierung und Assoziation mit Kinase-Aktivität sind in primären Maus-Zellen konserviert	59

III.3	Rekombinante Moloney Maus-Leukämie-Viren exprimierten Fremdgene <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	62
III.4	Spezifische Phänotypen Mo-NL-infizierter Mäuse.....	65
III.4.1	Nef hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der MoMuLV-Infektion.....	65
III.4.2	Mo-NL-infizierte Mäuse zeigen opportunistische Infektionen und Beeinträchtigungen der LCMV-spezifischen zellulären Immunantwort.....	66
III.4.2.1	Entwicklung opportunistischer Augeninfektionen in Mo-NL-infizierten Tieren ..	66
III.4.2.2	Immunantworten MoMuLV-infizierter Mäuse	69
III.4.2.3	LCMV-spezifische delayed type hypersensitivity Reaktion zur qualitativen Funktionsanalyse CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Lymphozyten MoMuLV-infizierter Mäuse	71
III.5	Perspektiven.....	74
IV.	MATERIAL UND METHODEN	76
IV.1	Material	76
IV.1.1	Chemikalien.....	76
IV.1.2	Puffer und Lösungen.....	76
IV.1.3	Lösungen und Puffer für die Proteingelektrophorese	77
IV.1.4	Kits	78
IV.1.5	Enzyme	78
IV.1.6	Oligonukleotide.....	79
IV.1.7	Medien und Reagenzien für die Arbeit mit Bakterien	79
IV.1.8	Materialien für die Zellkultur	80
IV.1.9	Zellen und deren Kultivierung	80
IV.1.9.1	Zelllinien.....	80
IV.1.9.2	Zellkulturmedien	81
IV.1.10	Antikörper	81
IV.2	Molekularbiologische Methoden	82
IV.2.1	Gentechnische Arbeiten	82
IV.2.2	Kultivierung und Konservierung von E. coli Stämmen.....	83
IV.2.3	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	83
IV.2.4	Transformation von Bakterien	83
IV.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	83
IV.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	84
IV.2.7	Alkoholpräzipitation von DNA.....	84
IV.2.8	Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen	84
IV.2.9	Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	85
IV.2.10	Isolierung von DNA-Fragmenten	85
IV.2.11	Extraktion genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen.....	85

IV.2.12	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	85
IV.2.13	Nachweis spezifischer mRNAs durch reverse Transkription und PCR (RT-PCR).....	86
IV.2.14	Ligation von DNA-Fragmenten	86
IV.2.15	Sequenzierung	86
IV.2.16	Computerunterstützte Sequenzanalyse	87
IV.2.17	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	87
IV.2.18	Western Blot und Chemolumineszenz-Nachweis	87
IV.3	Zellbiologische und virologische Methoden	88
IV.3.1	Zellkultur	88
IV.3.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen	88
IV.3.3	Transfektion von Zellen zur Herstellung von Viruspartikeln	89
IV.3.4	Titration von MoMuLV-Überständen	89
IV.3.5	Bestimmung der Aktivität der reversen Transkriptase in Viruspräparationen.....	90
IV.3.6	Transduktion von Zellen	90
IV.3.7	Durchflußzytometrische Zell- und Gewebeanalyse (FACS)	91
IV.3.8	Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz.....	91
IV.3.9	<i>In vitro</i> Bestimmung der Aktivität von Kinasen (IVKA)	91
IV.4	Tierexperimentelle Methoden	92
IV.4.1	MoMuLV-Infektion und Analyse von Mäusen.....	92
IV.4.2	Blutentnahme und Aufarbeitung.....	92
IV.4.3	Nukleinsäure-Aufreinigung aus Gewebe	92
IV.4.4	Kultivierung von Bakterien aus Gewebematerial von Mäusen	93
IV.4.5	Kultivierung primärer Splenozyten der Maus	93
IV.4.6	Der Chromiumfreisetzungstest zur Quantifizierung der Aktivität spezifischer zytotoxischer T-Zellen	93
IV.4.7	Transfektion primärer Maussplenozyten	94
IV.4.8	Induktion einer <i>delayed type hypersensitivity</i> Reaktion mit lymphozytärem Choriomeningitis-Virus in Mäusen	95
IV.4.9	Titration spezifischer Antikörper in LCMV-infizierten Mäusen	95
V.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	96
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	99
VII.	DANKSAGUNG.....	112

I. Einleitung

I.1 Humanes Immundefizienz Virus

In der ersten Hälfte der achtziger Jahre haben Luc Montagnier und Robert Gallo unabhängig voneinander ein neues Retrovirus als wahrscheinlichen Auslöser des erworbenen Immunschwäche-Syndroms (AIDS) beschrieben (20, 78) und nannten dieses Lymphadenopathie assoziiertes Virus (LAV) bzw. humanes T-Zell Leukämie Virus III. Wenig später folgte die Charakterisierung eines AIDS-assoziierten Retrovirus (ARV) (143). Trotz gewisser Ähnlichkeiten zum humanen T-Zell Leukämie Virus (HTLV) unterschieden sich diese neuen Retroviren in einigen Eigenschaften deutlich von HTLV. Sie wurden alle der *Lentivirinae* Familie zugeordnet und bald in humane Immundefizienzviren umbenannt (52).

Die Infektion mit humanen bzw. simianen Immundefizienzviren (HIV und SIV) resultiert in der Regel in einer akuten Virämie, der eine chronische Phase folgt. In der asymptomatischen Periode, die Monate bis mehrere Jahre dauern kann, persistiert das Virus trotz einer starken Immunantwort während der Primärinfektion im infizierten Organismus. Es entsteht ein dynamisches Gleichgewicht aus neu produzierten Viruspartikeln und Zellgenerationen des Immunsystems (190). Im Verlauf der asymptomatischen Phase kommt es zum Absinken der Zahl an CD4⁺ T-Lymphozyten auf weniger als 300 Zellen pro μ l Blut und zu einer Inversion der Ratio von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Lymphozyten. HIV-infizierte Patienten entwickeln im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf fundamentale Defekte des Immunsystems, was in der Folge zur Etablierung opportunistischer Infektionen und einiger Krebsarten führt. Diese in der Regel tödliche Dysfunktion der Immunabwehr wird durch die graduelle Depletion der CD4⁺ T-Zellen verursacht, welche wiederum zu Störungen der Funktion zytotoxischer T-Zellen (CTL) und B-Lymphozyten führt. Die genaue Ursache, die zur Verringerung der Anzahl CD4⁺ T-Zellen führt, ist nur unvollständig geklärt. Einige Studien postulieren, dass die verkürzte Lebensspanne der T-Zellen durch direkte toxische Effekte von HIV ausgelöst wird (28, 79, 101, 110, 164, 184). In HIV-Patienten übersteigt die Zahl apoptotischer T-Zellen jedoch deutlich die Zahl HIV-infizierter Zellen. Ein anderes wichtiges Modell schlägt daher die Induktion der Apoptose nicht-infizierter T-Zellen, sogenannter *bystander*-Zellen, durch HIV vor. Verschiedene virale Proteine wie gp120, Nef und Tat aktivieren dabei Apoptosesignalübertragungswege der uninfizierten T-Zellen. Wahrscheinlich wird die Apoptose durch deren übermäßige Aktivierung induziert (11). Dies ist eigentlich eine Schutzfunktion des Immunsystems um die Stärke von Immunantworten zu begrenzen (105). Die Verringerung der CD4⁺ Zellzahl in infizierten Individuen wird von einer Erhöhung der Viruslast im Blut und dem Auftreten virulenterer Virusstämme begleitet, die vermutlich durch den Kontrollverlust des Immunsystems begründet ist (76, 208, 209).

Trotz der weitreichenden Fortschritte im Verständnis der Molekularbiologie von HIV und der Entwicklung hochaktiver antiretroviraler Therapien (HAART) waren Ende 2003 weltweit mehr als 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert, davon starben rund 3 Millionen (UNAIDS, Stand Dezember 2003). Auch moderne Therapieformen können das Virus nicht vollständig aus dem

Körper eliminieren und müssen vermutlich lebenslang durchgeführt werden. Es besteht dabei das Risiko der Entwicklung resistenter HIV Mutanten. Außerdem sind die Kosten der Therapien hoch und oft mit starken Nebenwirkungen verbunden (33, 57, 221).

1.2 Molekulare Eigenschaften von HIV-1

Lentiviren sind durch ihre komplexe Genomstruktur gekennzeichnet. Das 9600 bis 9700 Basenpaare umfassende HIV Genom kodiert für die drei Leserahmen *gag*, *pol* und *env*, die in allen Retroviren zu finden sind. Zusätzlich kodieren HIV und SIV für sechs weitere, teilweise überlappend organisierte Leserahmen *tat*, *rev*, *vpr*, *vpu* (in HIV-1) bzw. *vpx* (in HIV-2 und SIV) sowie *nef*. Das primäre Transkript von HIV-1 ist die virale Volllänge mRNA, die in Gag- und Pol- Vorläufer-Proteine translatiert wird. Diese Vorläufer-Proteine werden proteolytisch gespalten: Gag in Kapsid- (CA oder p24), Matrix- (MA), p6 und Nukleokapsid- (NC) Proteine, Pol in die viruspezifischen Enzyme Protease (PR), reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Das Glykoprotein Env (gp160) wird in das externe Hüllprotein gp120 und das Transmembranprotein gp41 prozessiert, welches über eine Region von etwa 20 hydrophoben Aminosäuren in der Zellmembran verankert ist. Die regulatorischen Proteine Rev und Tat, sowie die akzessorischen Protein Vpr, Vpu bzw. Vpx, Vif und Nef werden von verschiedenen mehrfach gespleißten mRNAs translatiert.

Reife und unreife HIV-1 Partikel haben einen Durchmesser von rund 145nm (40). Die Struktur eines HIV-1 Virions ist in B schematisch dargestellt. Die äußere Hülle des Virions besteht aus einer Lipid-Doppelmembran, in der die Hüllproteine des Virus verankert sind. Daneben enthält die Hüllmembran auch Membran-Proteine der Wirtszelle (13). An der inneren Oberfläche der Virushülle liegt eine netzähnliche Proteinschicht aus MA-Protein-Trimeren, die dem Virion eine isometrische Struktur verleiht. Innerhalb der MA-Schicht bilden CA-Proteine das für Lentiviren typische konische Kapsid, in das zwei ungespleißte Kopien viraler RNA eingelagert sind. Oligomerisierte NC-Proteine stabilisieren das Genom. Mit diesem Ribonukleoprotein sind die Virus-spezifischen Enzyme RT, IN und PR assoziiert. Die regulatorischen Proteine Vpr, Vif und Nef werden ebenfalls in das Viruspartikel verpackt (45, 146, 148, 249). Die übrigen regulatorischen Proteine Rev, Tat und Vpu sind nicht im Virion enthalten.

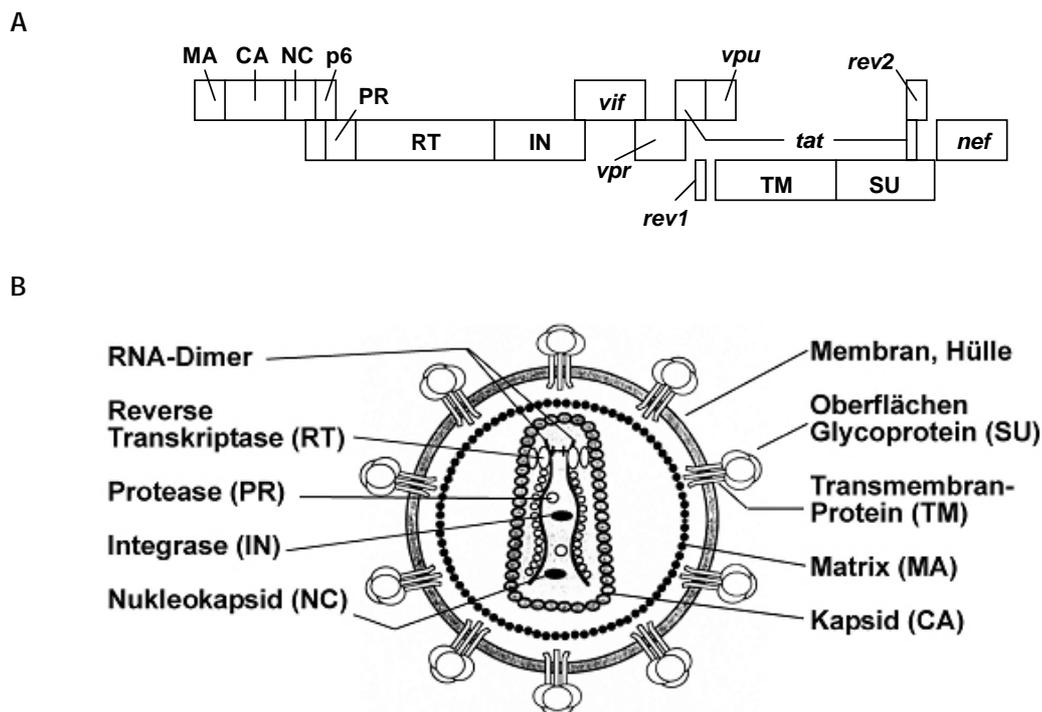


Abbildung I.1: Genomorganisation und Partikelstruktur von HIV.

(A) Leserahmen der viralen Proteine: MA: Matrix; CA: Kapsid; NC: Nukleokapsid; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; IN: Integrase; TM: Transmembran-Glykoprotein (gp41); SU Oberflächen-Glykoprotein (gp120). Die akzessorischen Proteine sind kursiv dargestellt.

(B) Schematische Darstellung der Morphologie eines HIV-1-Virions.

(Nach (149))

1.3 Replikationszyklus von HIV-1

Der Replikationszyklus von HIV-1 ist in Abbildung I.2 schematisch dargestellt. Das virale Hüllprotein bindet zunächst spezifisch an ein CD4-Molekül an der Oberfläche der Zielzelle (127). Für den effizienten Viruseintritt benötigen Lentiviren zusätzlich weitere Oberflächenmoleküle der Zelle, wie die Chemokinrezeptoren CXCR4 oder CCR5, welche als funktionelle Korezeptoren für HIV beschrieben wurden (zusammengefasst in (27)). Eine Reihe von Konformationsänderungen von gp120 durch die Bindung führen zur Exposition des Fusionsproteins gp41 und in der Folge zum Verschmelzen von Virus- und Plasmamembran (27). Nach dem Eindringen des Viruskapsids in das Zytoplasma wird das virale Genom freigesetzt und durch reverse Transkription eine doppelsträngige DNA Kopie (cDNA) des Genoms erzeugt (71, 87, 230). Nach der Dissoziation der Kapsidhülle formiert sich der Präintegrationskomplex (PIC), der vermutlich aus dem viralen Genom in Form von doppelsträngiger DNA, Matrixmolekülen, reverser Transkriptase, Integrase und Vpr besteht. Der PIC wird dann durch KIF-4 entlang an Mikrotubulis in den Zellkern transportiert, wo das virale Enzym Integrase die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom katalysiert (43, 44, 93). Der Integration folgt die Expression der frühen HIV Proteine Tat, Rev und vor allem Nef (92, 123, 202). Tat erhöht durch Bindung an die cis-regulatorische TAR Region des Virus-Genoms die Expressionsrate. Das Rev-Protein

transportiert unvollständig gespleißte und ungespleißte mRNAs aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Vermutlich induziert die Anhäufung von Rev Protein auch einen Wechsel von der Expression der regulatorischen zu Strukturproteinen (119, 155, 174, 203).

Die Knospung neuer HIV-Partikel erfolgt an der Zellmembran. Das Env-Vorläufer-Protein gp160 wird nach der Synthese im endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat an die Zellmembran transportiert. Gag und Gag-Pol-Polyproteine werden im Zytoplasma translatiert und in unprozessierter Form an die Zellmembran angelagert. Zusammen mit jeweils zwei viralen RNA-Genom-Kopien und den in die Zellmembran eingebauten Hüllproteinen knospen unreife Virus-Partikel von der Zelloberfläche. Außerhalb der Zelle werden die Gag und Gag-Pol Polyproteine von der Protease in ihre Bestandteile Matrix, Kapsid, Nukleokapsid, p6, Protease, reverse Transkriptase und Integrase prozessiert, wodurch reife Viruspartikel entstehen (zusammengefasst in (93)).

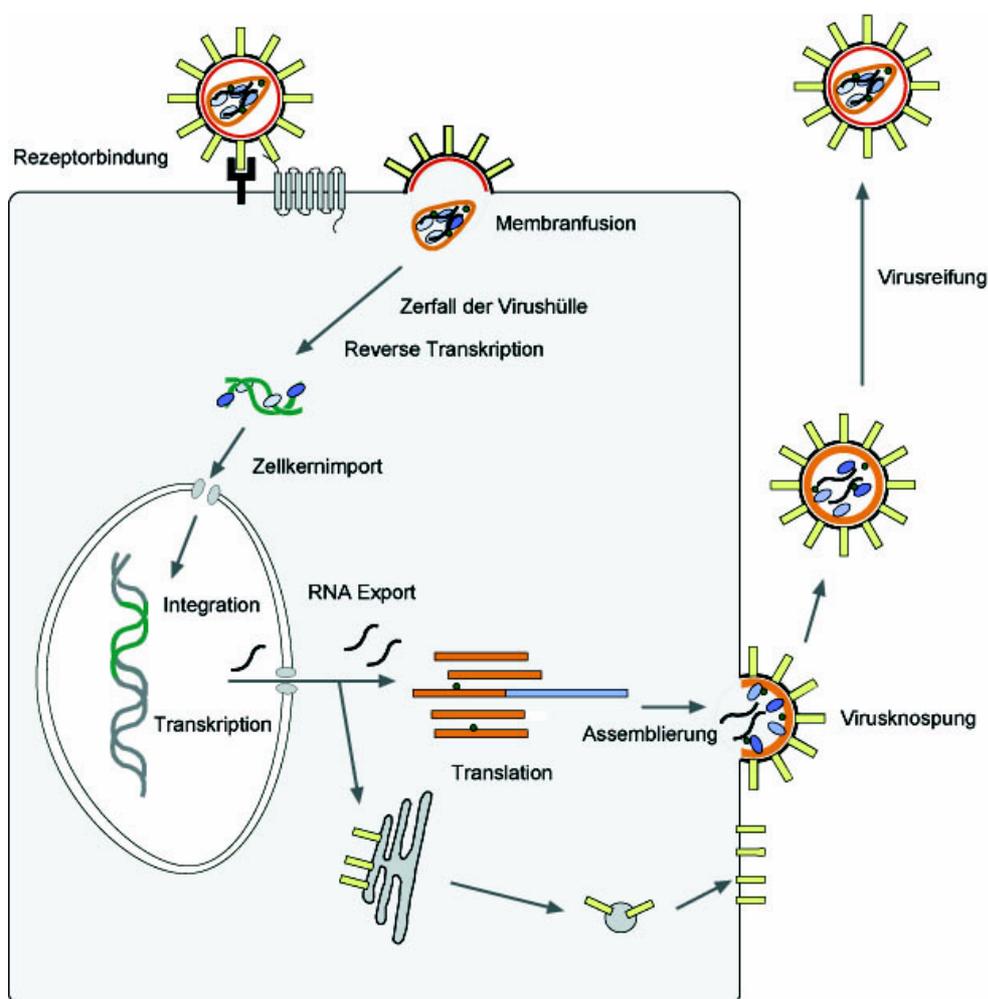


Abbildung I.2: Viraler Lebenszyklus von HIV-1.

Der Replikationszyklus von HIV-1 ist schematisch dargestellt. Die einzelnen Schritte sind im Text der Abbildung angegeben.

(nach B. Müller, unpubliziert)

I.4 Das Nef-Protein

Das 27-35 kD große und myristoylierte Nef-Protein von HIV und SIV ist für die virale Pathogenese von großer Bedeutung. Studien an SIV in Makaken haben gezeigt, dass eine Deletion von Nef zu niedrigen Virustitern und dem Ausbleiben des AIDS Phänotyps für mindestens zwei Jahre führt (121). Mit Nef-defektem SIV infizierte Affen waren zwar vor einer Infektion mit Wildtyp SIV geschützt, jedoch konnte in neugeborenen Makaken ein solcher Schutz nicht erreicht werden. Außerdem verloren erwachsene Tiere teilweise ihre Immunität (15, 16, 62).

Auch beim Menschen wurden in einigen HIV-Langzeit-Überlebenden Virusvarianten mit Deletionen im *nef*-Gen gefunden. Die Patienten zeigten deutlich attenuierte Symptome oder blieben für bis zu 20 Jahre symptomfrei (65, 100, 126, 137, 211).

Diese Erkenntnisse aus Mensch und Affe zeigen die Bedeutung von Nef *in vivo*. Andererseits ist Nef für eine effiziente HIV-Replikation *in vitro* nicht notwendig. In den vergangenen Jahren wurden vor allem in Zellkultur zahlreiche zelluläre Interaktionspartner des Nef-Proteins beschrieben. Einige der daraus resultierenden molekularen Mechanismen sind in Abbildung I.3 schematisch dargestellt. Ein Zusammenhang zwischen zellulären Interaktionen von Nef *in vitro* und dessen Rolle für die HIV-Pathogenese *in vivo* konnte jedoch bisher nicht hergestellt werden. Zur Klärung dieser Diskrepanz wurden in den vergangenen Jahren einige, in Kapitel I.4.2 genauer beschriebene, Tiermodellssysteme etabliert.

I.4.1 Zelluläre Funktionen von Nef

I.4.1.1 Internalisierung von CD4 und MHC 1

CD4 ist ein integrales Membranprotein, welches in Helfer-T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Es dient Primaten-Lentiviren als primärer Rezeptor, der das Anheften und das spätere Eindringen des Virus in die Zelle erlaubt (61, 153, 154). Physiologisch ist das CD4-Molekül für die Reifung und Funktionsfähigkeit der T-Helferzelle notwendig (247). Nef ist eines der HIV-Proteine, die maßgeblich sind für die Internalisierung von CD4 von der Zelloberfläche und die darauf folgenden Degradation des Moleküls (Abbildung I.3). Diese Funktion von Nef wurde bereits 1987 beschrieben (104) und in den Folgejahren von einigen weiteren Arbeitsgruppen bestätigt (81, 104, 151, 193, 228). Es wurde festgestellt, dass die Endozytose von CD4 von der Zelloberfläche eine Konsequenz des Nef-induzierten lysosomalen Transportes und der darauf folgenden Degradation von CD4 ist. Dies kann durch zwei voneinander unabhängige Mechanismen geschehen.

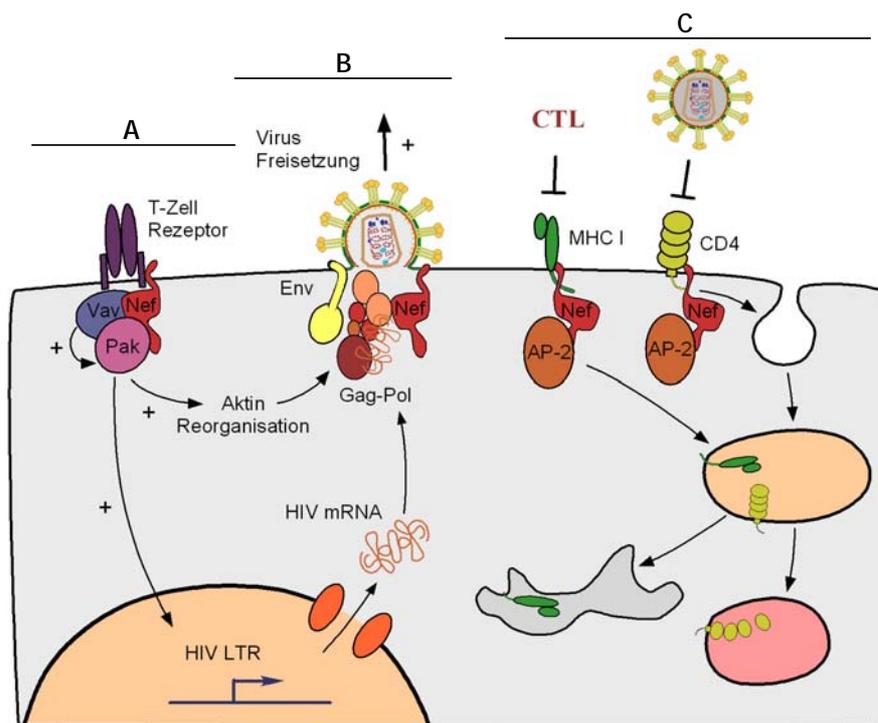


Abbildung 1.3: Übersicht wichtiger Nef-Funktionen in einer HIV-infizierten T-Zelle.

(A) T-Zellaktivierung durch Interaktion mit der T-Zell-Signalübertragungskaskade

(B) Erhöhung der Virus-Infektiosität und Replikationskinetik

(C) Herunterregulierung von CD4 und MHC-I von der Zelloberfläche

(nach Fackler, Biologie in unserer Zeit)

Bei ersterem agiert Nef als Adapter-Protein zwischen CD4 und der Endozytose-Maschinerie. Es bindet an ein Dileucin-Motiv des zytoplasmatischen Teils von CD4, das als universelles Signal-Motiv für die Endozytose beschrieben wurde (89, 135). Die Verbindung von Nef zur Endozytose-Maschinerie erfolgt über eine bisher noch nicht vollständige Interaktion mit der β - oder μ -Kette von Adapter-Komplexen (89, 90, 193, 194). Adapter-Proteine interagieren mit zytoplasmatischem Clathrin und rekrutieren Proteine über deren Internalisierungssignal, gewöhnlich ein Thyrosin- oder Dileucin-Motiv, in Clathrin *coated pits*. Durch diese Nef-vermittelte Verbindung von CD4 mit der Endozytose-Maschinerie wird dieses rasch internalisiert und in die frühen Endosomen geleitet.

Daneben wurde ein weiterer Mechanismus zur Herunterregulierung von CD4 von der Zelloberfläche durch Nef beschrieben, der unabhängig von der direkten Bindung von Nef an Adapterproteine vermittelt wird (124). Nef interagiert dabei mit der Tyrosin-Kinase Lck und blockiert die Interaktion von CD4 mit Lck durch Bindung des Dileucin-Motivs von Nef an die zytoplasmatische Domäne von CD4 (4, 19, 88, 102, 196, 205, 210, 227). Eigentlich ist die Interaktion von CD4 und Lck notwendig, um CD4 an die Zelloberfläche und in proximale Nähe des T-Zell-Rezeptors (TCR) zu rekrutieren (222, 238, 241, 242). Durch die Störung der Interaktion von CD4 und Lck wird aber unter anderem das Internalisierungssignal von CD4 zugänglich und dieses in frühe Endosomen transportiert.

Beide Mechanismen vermitteln die Endozytose von CD4 zunächst ins frühe Endosom. Der weitere Transport zu den späten Endosomen und der darauf folgenden lysosomalen Degradation

wird durch Nef-induzierte Serin-Phosphorylierung von CD4 und die Interaktion von Nef mit β -COP vermittelt (1, 192, 193); (85, 124). Normalerweise kann CD4 in einem Recycling-Prozess von den frühen Endosomen wieder zurück an die Zelloberfläche gelangen, indem die Serin-Phosphorylierung wieder entfernt wird (4, 19, 81, 227).

Neben Nef sind additiv auch Env und Vpu an der Verringerung von CD4 Molekülen auf der Zelloberfläche beteiligt, vermutlich um die Zelle vor Mehrfachinfektionen zu schützen und zur Reduktion zytotoxischer Effekte durch Env (220). Außerdem wird die Akkumulation von CD4 in den Virionen vermindert und damit die Infektiosität der Partikel durch bessere Inkorporation von Env erhöht (133, 215).

Neben der Internalisierung von CD4 wurde als weitere Funktion von Nef die Herunterregulierung von MHC-I-Molekülen von der Zelloberfläche beschrieben (Abbildung 1.3) (91, 195, 219). Der molekulare Mechanismus unterscheidet sich jedoch grundlegend von der CD4-Internalisierung. Die Bindung von MHC-I an die saure Region EEEE₆₅ und das P₇₅XXP₇₈ Motiv von Nef induziert die Endozytose von MHC-I (91, 156, 219). Der genaue Mechanismus ist bislang unbekannt, geschieht aber vermutlich über die Interaktion von Nef mit PACS-1, durch welche die kleine GTPase Arf6 aktiviert und die MHC-I-Moleküle zum *trans*-Golgi Netzwerk umgeleitet werden (31). Die internalisierten MHC-I-Moleküle werden dann in den Vesikeln des *trans*-Golgi Apparates festgehalten und ein Recycling an die Zelloberfläche verhindert (89, 91, 136, 156, 195). Andere Untersuchungen an Arf6-Mutanten widersprechen diesen Ergebnissen und postulieren, dass die Nef-induzierte Arf6-abhängige MHC-I-Herunterregulierung durch unspezifische Interaktionen von Nef mit dem Transportsystem aktiviert wird (134).

Dennoch wird postuliert, dass reduzierte MHC-I-Mengen an der Zelloberfläche infizierte Zellen vor der Apoptose durch zytotoxische T-Lymphozyten oder natürliche Killerzellen schützen (53, 55).

1.4.1.2 Einfluss auf die Replikationskinetik und Infektiosität von HIV

Dem Nef-Protein wurde in frühen Studien eine inhibitorische Rolle im Replikationszyklus von HIV zugeschrieben. Daher die ursprüngliche Bezeichnung *negative factor* (Nef) (3, 49). Bereits wenig später bewiesen jedoch zahlreiche andere Gruppen positive Effekte von Nef auf die Virusreplikation *in vitro* und *in vivo* (Abbildung 1.3) (72, 116, 118, 121, 256). Es gibt zahlreiche Studien, die den Effekt von Nef auf die Infektiosität und Replikationskinetik von HIV belegen. Beispielsweise produzieren mitogenaktivierte periphere Blutzellen (PBMC), die mit Wildtyp-HIV infiziert wurden fünfmal mehr CA-Protein, als entsprechend mit Nef-defekten HIV infizierte PBMC (167). Noch stärker war dieser Effekt in nicht-stimulierten PBMC, die mit geringer Virus-Menge infiziert wurden (167, 231).

Es wurde festgestellt, dass virale Genome aus Wildtyp-HIV einer effizienteren reversen Transkription unterliegen, als solche Nef-defekter Viren (5, 218). Um die Nef-vermittelte Induktion der Synthese proviraler DNA zu erklären, wurden mehrere Mechanismen vorgeschlagen. Nef ist im reifen HIV-Partikel vorhanden und könnte direkt Einfluss auf die

reverse Transkription nehmen (132, 186, 248, 249). Darüber hinaus wird Nef von der HIV-Protease prozessiert, d.h. das verkürzte Protein könnte spezielle Funktionen während der reversen Transkription ausüben (186, 249). Diese Hypothese wird jedoch von einigen Studien widerlegt, die zeigen, dass die reduzierte Infektiosität Nef-defekter Virionen nicht durch die gleichzeitige Expression von Nef-Protein *in trans* beeinflusst oder ausgeglichen werden kann (5, 47, 185). Die biologische Relevanz der proteolytischen Spaltung von Virion-assoziiertem Nef bleibt also bislang ungeklärt.

Da zwar bis zu 80% der neu-synthetisierten mRNAs für Nef kodieren, aber nur etwa 10-100 Nef-Moleküle in ein Virion integriert werden, ist es außerdem wahrscheinlich, dass Nef seine Funktionen nach der Provirus-Integration und nicht im reifen Virion ausübt (132, 186, 248, 249). Als weiteres Modell, wie Nef die Infektiosität von HIV erhöhen könnte, wurde daher die direkte Einflussnahme von Nef auf zelluläre Funktionen in der Wirtszelle vorgeschlagen. Nef induzierte CD4 Internalisierung kann die erhöhte Infektiosität von HIV Partikeln nur teilweise erklären, da Nef die Infektiosität von HIV auch in CD4-negativen Zellen steigert (86, 114, 115, 150, 167, 207, 252). CD4-Internalisierung und Steigerung der Virus-Infektiosität sind also voneinander unabhängige Funktionen von Nef. Vermutlich sind unter anderem Einflüsse von Nef auf das Hüllprotein gp120 verantwortlich für die Steigerung der Infektiosität von HI-Virionen, denn Nef-negative HIV-Partikel inkorporierten das Hüllprotein gp120 schlechter (133, 215). Weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Nef-vermittelter Steigerung der Infektiosität und dem Hüllprotein des Virus zeigen Studien an pseudotypisierten HIV-Partikeln mit unterschiedlichen Hüllproteinen. HIV-Partikel mit Hüllproteinen, die bei neutralem pH-Wert mit der Zellmembran fusionieren, wie HIV- und MLV-Env (46) zeigten eine Nef-abhängige Steigerung der Infektiosität. Im Gegensatz dazu hat Nef keinen Einfluss auf die Infektiosität von HIV-Partikeln, die mit Hüllprotein pseudotypisiert wurden, das bei niedrigem pH fusioniert, z.B. Ebola Virus Glykoprotein oder Vesikuläres Stomatitis Virus Glykoprotein.

1.4.1.3 Modulation zellulärer Signalübertragungswege durch Nef

Neben der CD4-Herunterregulation und der Erhöhung der Infektiosität von HIV durch Nef wurden zahlreiche weitere Interaktionen mit Molekülen der zellulären Signalübertragungswege beschrieben (2, 72, 83, 97, 152, 227). Die komplexe Einbindung von Nef in die Signalübertragung der Zelle und daraus sich ergebende Mechanismen und Funktionen von Nef bleiben trotz zahlreicher Studien bis dato ungeklärt. Durch das mangelnde Verständnis der Interaktionen von Nef mit zellulären Signalübertragungswegen kamen einige Studien zu voneinander abweichenden Ergebnissen. Dafür kann es verschiedene Gründe geben, z.B. die Verwendung unterschiedlicher Nef-Allele, Zelllinien oder Zellkulturbedingungen (200). Daneben interagiert Nef mit einer großen Zahl zellulärer Proteine, die an der Signalübertragung beteiligt sind, so dass wahrscheinlich auch die Menge und Dauer der Nef-Expression Einfluss auf die Interaktionen mit zellulären Signal-Systemen haben. Es wird inzwischen aber allgemein akzeptiert, dass Nef mit der Signalkaskade des T-Zellrezeptors (TCR) (12, 18, 22, 54, 94, 115, 159, 201, 216, 217, 226), des IL2-

Rezeptors (99), der Chemokin-Produktion (64, 237) und mit zahlreichen anti-apoptotischen Signalkaskaden interagiert (98, 253).

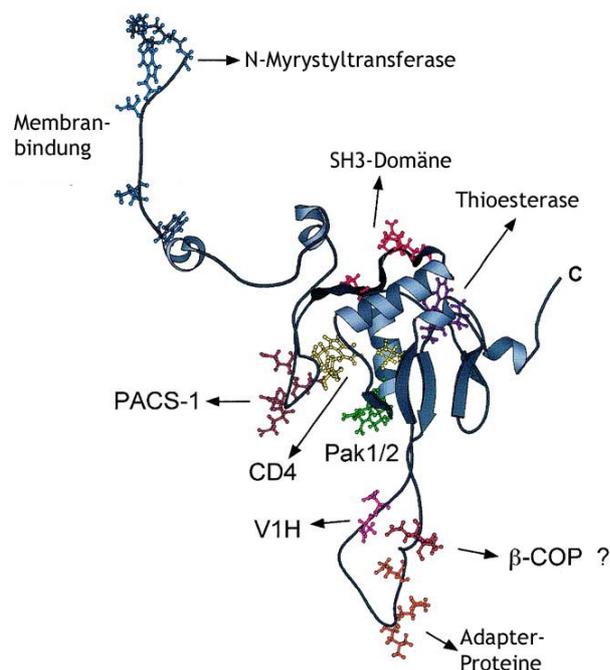


Abbildung I.4: Struktur des Nef-Proteins.

Schematische Darstellung der Molekülstruktur von Nef. Funktionelle Bereiche, die mit entsprechenden Interaktionspartnern assoziieren, sind gekennzeichnet (nach (83)).

Um die molekularen Mechanismen dieser Interaktionen besser zu verstehen wurde zunächst nach den zellulären Interaktionspartnern gesucht. Die Auflösung der Molekülstruktur von Nef und der Vergleich verschiedener HIV und SIV *nef*-Allele geben hier einige Hinweise (83). Ein Strukturmodell (Abbildung I.4) zeigt wichtige bekannte Motive des HIV-1 Nef-Proteins und entsprechende zelluläre Interaktionspartner in T-Lymphozyten. Obwohl HIV und SIV Nef ähnliche zelluläre Funktionen haben, sind sie in ihrer Aminosäuresequenz doch nur zu 50-60% identisch. Die Nef-Proteine haben vermutlich für ihre gemeinsamen Funktionen unterschiedliche molekulare Mechanismen entwickelt (38, 85, 96, 111, 236, 254). Dennoch sind einige Regionen in HIV-1, HIV-2 und SIV hoch konserviert und scheinen daher wichtige Rollen für grundlegende Funktionen des Nef-Proteins zu spielen. Ein Beispiel hierfür ist die Prolin-reiche Sequenz (PxxP) in der Kern-Domäne von Nef. Eine linksgedrehte Polyprolinsequenz (PxxP-Motiv) ist die minimale Consensus-Sequenz die in Liganden der Src homologen Domänen (SH3) gefunden wurde (51, 198). Das PxxP-Motiv wird für die erhöhte Infektiosität und die Steigerung der Replikationsrate von HI-Virionen benötigt, jedoch nicht für die Internalisierung von CD4 von der Zelloberfläche (86, 115, 122, 207, 252).

Einige weitere wichtige Nef-Motive und deren zelluläre Interaktionspartner sind in Tabelle I.1 zusammengefasst. Viele dieser Moleküle wurden als Tyrosin- oder Serin-/Threonin-Kinasen identifiziert, welche eine Schlüsselrolle in Signaltransduktionswegen des Zellwachstums, der

Differenzierung und der Funktionsfähigkeit der reifen Zelle spielen (26, 31, 32, 70, 74, 95, 96, 142, 145, 157, 191, 216).

Nach der Aktivierung des TCR ist beispielsweise Lck einer der ersten Mediatoren in der Signalübertragungskaskade, die zur Proliferation der Zelle und zur Ausschüttung von IL2 führt (1, 242). Lck und auch Fyn werden in T-Zellen zur Regulation der Entwicklung exprimiert und spielen außerdem bei der Induktion des IL2-Rezeptors (IL2-R), sowie bei der Signalübertragung durch IL2-R und TCR eine Rolle (112, 206). Die Expression von Hck und Lyn ist auf Monozyten und Makrophagen beschränkt und ebenso sind sie an der Signalübertragung über den Fc-Rezeptor beteiligt (39).

Ein weiterer Bindungspartner von Nef ist der Guanin-Nukleotid Austauschfaktor Vav (74). Dieser wird vorwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert (189) und vermittelt den Übergang inaktiver Rho-GTPasen in die aktive GTP-gebundene Form (197). Auf diesem Weg beeinflusst Nef die Organisation des Zytoskeletts (74), sowie die Aktivierung p21-aktivierter Kinasen (PAK) (73). Die Aktivierung von PAK könnte durch die Aktivierung der TCR-Signalübertragungskaskade neben der Phosphorylierung von Nef auch zu Steigerung der Virusreplikation durch Aktivierung der infizierten Wirtszelle führen (73).

Interaktionspartner von Nef	Für die Interaktion wichtige Nef-Domäne	Wirkung	Literatur
Hck	PxxP	Aktivierung von Hck, Erhöhung der Replikationsrate	(41, 207)
Lck	PxxP, N-Terminus	Inhibition der Lck-Aktivität (SIV: Aktivierung)	(21, 48, 54)
Fyn	PxxP	Positive Effekte auf Virusreplikation (?)	(12, 48)
Lyn	PxxP	Unbekannt	(48, 207)
PAK	Arg 107 des Di-Arginin-Motivs, PxxP, Leu 112	T-Zell-Aktivierung, Phosphorylierung von Nef	(73, 157, 199)
PKC θ	Nicht bekannt	Inhibition von PKC θ , T-Zell Aktivierung	(158, 229)
Vav	PxxP	Änderung struktureller und physiologischer Parameter in der Zelle	(74)
MAPK/Erk2	PxxP	Nef-Phosphorylierung	(159, 255)
PI3K, PACS-1	C- und N-Terminus	PAK-Aktivierung, MHC-I Herunterregulation	(31, 145)
T-Zell-Rezeptor-zeta-Kette (TCR ζ)	PxxP	Internalisierung des TCR, Block der TCR induzierten IL2-Ausschüttung	(23, 254)

Tabelle I.1: Beschriebene Interaktionspartner und Effekte von Nef.

Aufgeführt sind wichtige beschriebene Interaktionspartner von Nef und die aus der Interaktion resultierende Wirkung auf die T-Zell-Signalübertragungskaskade.

Die Interaktion von Nef mit PACS-1 moduliert über den Signalübertragungsweg der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) den Arf6 vermittelten Endozytose-Weg. Dadurch werden MHC-I Moleküle im *trans*-Golgi-Netzwerk festgehalten, was zu einer Reduktion von MHC-I auf der Zelloberfläche führt (31, 195). Die direkte Bindung von Nef an die p85-Untereinheit von PI3K wiederum ist beteiligt an der Aktivierung der Nef-assoziierten Kinase PAK (145).

Die Protein Kinase C theta (PKC θ) ist ein Bestandteil der Aktivierungs-Komplexe während der TCR-Aktivierung (168) und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der T-Zell-Aktivierung (243, 251). In Nef-exprimierenden Zellen ist die PKC θ -Menge reduziert, wodurch vermutlich die Signalübertragung beeinträchtigt wird (229).

Die Membran-gebundene Form von HIV-1-Nef ist über das PxxP-Motiv mit der zeta-Kette des T-Zellrezeptors (TCR ζ) assoziiert (254). Dies führt neben der Herunterregulierung des TCR von der Zelloberfläche auch zu einer Hochregulierung des proapoptischen Faktors FasL (254).

1.4.2 Tiermodelle zur Untersuchung der Nef-Funktion

Zahlreiche der vorab beschriebenen Funktionen des lentiviralen Nef-Proteins, wie CD4 und MHC-I Herunterregulierung, Interaktion mit T-Zell-Signalübertragungskaskaden, Erhöhung der Infektiosität und Replikationskinetik von HIV sind gut dokumentiert. Es bleibt jedoch bislang unklar, welche dieser Nef-Funktionen *in vivo* relevant sind. Unbestritten ist, dass Nef für eine effiziente Virusreplikation *in vivo* essentiell ist, wogegen in zahlreichen Zelllinien der Infektionsverlauf durch eine Deletion von *nef* nicht beeinträchtigt wird (246). Die Etablierung eines aussagekräftigen Modellsystems für Studien Nef-spezifischer Pathogenese Phänotypen ist notwendig, da Studien am Menschen in der Regel problematisch sind. Die Infektion gesunder Menschen mit mutiertem oder Wildtyp-HIV ist ethisch nicht zu rechtfertigen. Eine Ausnahme stellt eine Gruppe HIV-infizierter Patienten dar, die 1985 in Sydney, Australien, über eine Bluttransfusion eines HIV-positiven Spenders mit dem selben Virus-Stamm infiziert wurden. Der HIV-Stamm des Subtyps B wies Deletionen im *nef*-Gen auf. Die Patientengruppe ist daher besonders bemerkenswert. Es war erstmals möglich, in einer statistisch relevanten Zahl infizierter Individuen einen HIV-Stamm mit einer definierten Mutation über Jahre hinweg zu untersuchen. Der Infektionsverlauf der Patienten war stark attenuiert (138), drei sind inzwischen unabhängig von der HIV-Pathogenese verstorben, einer starb 1987 vermutlich an AIDS. Drei der verbleibenden Patienten zeigen auch ohne antiretrovirale Therapie keine AIDS-Symptome und haben niedrige Virustiter bei weitgehend normalen T-Helferzellzahlen im Blut. Der Spender, sowie zwei Patienten mit höherer Viruslast und weniger als 100 T-Helferzellen pro μ l Blut erhalten inzwischen eine HAART (137).

Die Ergebnisse der australischen Patientengruppe, sowie auch Studien an SIV-infizierten Makaken geben deutliche Hinweise, dass Nef als Pathogenesefaktor eine wichtige Rolle beim Krankheitsverlauf der HIV- bzw. SIV-Infektion spielt. Welche Nef-Funktionen hierfür relevant sind, bleibt aber unklar. Zur Untersuchung dieser Fragestellungen ist daher die Etablierung aussagekräftiger Modellsysteme notwendig. In den letzten Jahren wurden verschiedene

Tiermodelle zur Untersuchung der Pathogenese von HIV und SIV entwickelt, die in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

1.4.2.1 Infektion von Primaten mit SIV

Aufgrund der starken Ähnlichkeit bezüglich Verlauf und Pathogenese mit der HIV-Infektion ist die experimentelle SIV-Infektion und Untersuchung von Makaken ein wertvolles Modellsystem zur Bestimmung wichtiger Determinanten des Krankheitsverlaufs. Mit Hilfe dieses Modells konnten bereits deutliche Fortschritte in Bereichen der Prävention, Vakzine- und Medikamenten-Entwicklung erzielt werden (82). Die Bedeutung von Nef für die Pathogenese und die Virusreplikation wurde erstmals in Makaken beschrieben (62, 82, 121). Erwachsene Makaken, die mit *nef*-deletiertem SIV infiziert wurden, entwickelten keine AIDS-Symptome und waren gegen die Infektion mit Wildtyp-SIV geschützt (15). Ein Einsatz entsprechend attenuierter HIV-Partikel als Vakzine im Menschen kommt dennoch nicht in Frage, da drei von sechzehn infizierten Tieren nach einigen Jahren AIDS entwickelten und starben (16). Außerdem zeigten sechs von acht Makaken, die als Neugeborene mit *nef*-deletiertem SIV infiziert worden waren, AIDS-Symptome (16).

Das Makakenmodell erlaubt neben Studien zur Vakzine- und Medikamentenentwicklung auch Untersuchungen der Funktion viraler Proteine *in vivo*. Nachteile des Systems sind jedoch die schwierige ethische Vertretbarkeit der Arbeit mit Primaten und die hohen Kosten solcher Experimente, unter anderem da die Studien meist mit einem sehr hohen Zeitaufwand verbunden sind. Die Untersuchung funktioneller Mutanten eines viralen Proteins, die mit einer hohen Zahl benötigter Tiere verbunden ist, erweist sich somit als problematisch. Aus diesen Gründen wurden Versuche unternommen, Kleintiermodelle für die HIV-Infektion und Pathogenese zu entwickeln. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die wichtigsten Kleintiermodellensysteme.

1.4.2.2 HIV-infizierbare Kleintiermodelle

Das wesentliche Hindernis bei der Entwicklung von Kleintiermodellen zur Untersuchung von HIV ist, dass Nagerzellen von HIV nicht infiziert werden können. Bereits früh wurde erkannt, dass für das Eindringen in die Zelle humanes CD4 (hCD4), sowie CXCR4 (hCXCR4) bzw. CCR5 (hCCR5) als Korezeptor notwendig sind (170). Doch auch in Zellen, die transgen für hCD4 und hCXCR4 (213) oder hCCR5 waren, wurde nach der Infektion keine, oder nur eine geringe Replikation beobachtet. Ein deutlicher Fortschritt wurde durch die zusätzliche Expression von humanem Cyclin T1 (hCycT1) erzielt. CycT1 bildet mit HIV-Tat ein Heterodimer und bindet mit hoher Affinität an die TAR-Sequenz der viralen mRNA (80). In für hCD4, hCXCR4/hCCR5 und hCycT1 transgenen Nagerzellen finden HIV-Eintritt, reverse Transkription, Integration und Expression der viralen Gene, aber kein vollständiger HIV-Replikationszyklus statt (29, 80, 161). In diesem Zusammenhang wurde ein Block der Virus-Zusammenlagerung an der Zellmembran beschrieben, der teilweise durch Maus-Mensch-Heterokaryonzellen komplementiert werden kann (29, 160, 161).

Im Gegensatz zu den dreifach transgenen Mäusen wurde in hCD4/hCCR5-transgenen Ratten die *de novo* Infektion von Makrophagen und Mikrogliazellen durch HIV beobachtet (120). Eine produktive Replikation in T-Zellen findet jedoch auch in diesem System nicht statt.

Ein anderes *in vivo* System zur Evaluierung der Infektiosität, Replikation und Pathogenese von HIV ist das *severe combined immunodeficient (SCID-) human (hu)* Mausmodell (163). SCID-Mäusen, die kein eigenes Immunsystem besitzen, wurde humanes Thymus- und Lebergewebe unter die Nierenkapsel implantiert (163, 176). Diese beiden Gewebe bilden ein chimäres Organ, das menschlichem Thymus-Gewebe ähnelt und in dem Reifung und Differenzierung humaner Lymphozyten stattfinden kann (177). Die Infektion dieser Tiere mit HIV führt zu Veränderungen des implantierten Organs, die auch im Menschen beobachtet werden, beispielsweise zur Depletion von CD4⁺ T-Lymphozyten (6, 117).

Wie auch im SIV-Makakenmodell ist das Nef-Protein für eine effiziente Virusreplikation im Organimplantat HIV infizierter SCID-hu Mäuse notwendig (116). *nef*-deletierte Viren zeigten eine verringerte Fähigkeit zur Depletion von CD4⁺ T-Zellen. Dieser Phänotyp wurde auch in SCID-Mäusen gefunden, denen humane periphere Blutlymphozyten verabreicht worden waren (103).

Nachteile dieses Systems sind die hohen Kosten für die Zucht und die aufwändige Haltung der empfindlichen SCID-Mäuse. Außerdem muss die Infektion der Tiere mit HIV unter entsprechend hohen Sicherheitsbedingungen durchgeführt werden.

1.4.2.3 HIV- und nef-transgene Mausmodelle

Transgene Mäuse, die Nef des HIV-NL4.3 Stammes exprimieren wurden bereits 1993 in zwei unabhängigen Studien untersucht. Die Arbeitsgruppe von Peter Dickie konstruierte eine transgene Maus, die Nef unter der Kontrolle des HIV-LTR exprimierte (69). Nef-Protein wurde fast ausschließlich in der Haut detektiert und führte zu Haut-Läsionen, Konjunktivitis und Beeinträchtigungen der Entwicklung der Augenlinse (67, 69). Die Insertion vollständiger HIV-Provirus-DNA, bei welcher der Enhancer-Bereich des LTR teilweise durch die MLV-LTR-Enhancer-Sequenz ausgetauscht wurde, führte bei den transgenen Mäusen im Alter von etwa 15 Wochen zur Ausbildung einer Konjunktivitis und der Sekretion eitriger Augenflüssigkeit, induziert durch die Infektion mit *Pasteurella pneumotropica* (68).

Eine andere Arbeitsgruppe exprimierte Nef von HIV-NL4.3 unter der Kontrolle des murinen CD3-Enhancers und Promotors (228). In den transgenen Mäusen war die Differenzierung und Funktionsfähigkeit der T-Zellen gestört. Die Gesamtzahl der T-Zellen nahm im Thymus und in der Peripherie ab (228).

Die Expression von Nef unter der Kontrolle des murinen Enhancers und Promotors der β -Kette des T-Zell-Rezeptors führte in transgenen Mäusen zu einer Beeinträchtigung der Immunantwort, so dass die Tiere eine Infektion mit lymphozytärem Choriomeningitis-Virus (LCMV) nicht kontrollieren konnten (144).

Im Jahr 1998 beschrieben Hanna et al. *nef*-transgene Mäuse, die Nef unter der Kontrolle eines Hybrides aus murinem CD4-Enhancer und humanem CD4-Promotor exprimierten. Die Tiere entwickelten ein AIDS-ähnliches Krankheitsbild, das dem von pädiatrischem AIDS ähnelte (106,

107). Das Krankheitsbild der Tiere war unter anderem durch Thymusatropie, T-Zell-Verlust, Gewichtsverlust, Antriebsschwäche und Durchfall gekennzeichnet (107). Die Rolle von Nef für die Entwicklung AIDS-ähnlicher Symptome konnte in SIV-*nef*-transgenen Mäusen bestätigt werden (225). Für die Ausbildung des AIDS-Phänotyps ist das SH3-Bindungsmotiv des Nef-Proteins essentiell, was dessen Bedeutung für die Funktion von Nef als Pathogenesefaktor unterstreicht (108). Da das Nef-Protein in den transgenen Mäusen bereits in der Keimbahn und nicht in einem Infektionskontext exprimiert wird, weichen Menge und Kinetik der Nef-Expression weit von der einer HIV-Infektion ab. Außerdem sind der sehr hohe Aufwand für die Herstellung, Zucht und Untersuchung der Tiere und die daraus entstehenden Kosten, Nachteile transgener Modellsysteme. Dennoch lassen die gewonnenen Erkenntnisse den Schluss zu, dass sich Mausmodelle prinzipiell zur Untersuchung der HIV-Pathogenese oder des Nef-Proteins eignen.

1.4.2.4 Ein infizierbares Modellsystem zur Untersuchung der Rolle von Nef als Pathogenesefaktor auf der Basis rekombinanter Moloney Maus-Leukämie-Viren

Die wichtige Rolle von Nef als Pathogenesefaktor konnte im Menschen und in den zuvor beschriebenen Tiermodellen eindeutig gezeigt werden. Funktionelle Studien an Nef sind in diesen Systemen jedoch problematisch, da sie entweder ethisch nicht zu rechtfertigen sind, oder hohen zeitlichen und finanziellen Aufwand mit sich bringen. Die Expression von Nef in transgenen Tieren ist außerdem weit vom Kontext einer natürlichen HIV-Infektion entfernt. Dennoch könnte basierend auf den Ergebnissen aus *nef*-transgenen Mäusen ein infizierbares murines Virusmodell zur Aufklärung der Nef-Funktion *in vivo* beitragen.

Das Moloney murine Leukämie-Virus (MoMuLV) gehört zu den einfachen Retroviren, die ausschließlich für *gag*, *pol* und *env* kodieren (224). MoMuLV infiziert hauptsächlich Lymphozyten und deren Vorläuferzellen (14). Die effiziente Replikation in T-Lymphozyten führt in neonatal infizierten Mäusen nach einer Latenzphase von durchschnittlich 125 Tagen (183) zur Ausbildung von T-Zell-Lymphomen. Die Latenzphase ist gekennzeichnet durch eine Hyperplasie hämatopoetischer Zellen, Splenomegalie und durch vergrößerte Lymphknoten (42, 63, 234). Im Infektionsverlauf kommt es mit einer Inzidenz von 100% zur Entwicklung von Lymphomen, die aus verschiedenen Stadien der T-Zellentwicklung entstehen (166, 183). Die Tumorentwicklung wird induziert durch die Aktivierung von Proto-Oncogenen (z.B. *c-myc*) bzw. durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. *p53*) bei der Insertion des Virusgenoms in die DNA der Wirtszelle (166).

Das Einbringen des HIV-1-*nef*-Gens in MoMuLV könnte in diesem System nicht nur zu einem AIDS-ähnlichen Phänotyp führen, wie er für *nef*-transgene Mäuse beschrieben wurde (107), sondern auch den Verlauf der MoMuLV-Infektion verändern. Durch die Nef-Expression erhöhte T-Zell-Aktivierung könnte zu einer beschleunigten MoMuLV-Replikation führen. Die dadurch beschleunigte Insertionsmutagenese könnte die Latenzzeit der MoMuLV-Infektion verkürzen und die Bildung von T-Zell-Lymphomen beschleunigen. Ähnliches ist durch Überexpression von *c-Myc* in MoMuLV-infizierten Mäusen beobachtet worden (239).

Vorteile dieses Systems zur Untersuchung der Nef-Funktionen *in vivo* ist die leichte Verfügbarkeit und Haltung der Mäuse, sowie die geringen Kosten und Sicherheitsvorkehrungen, die getroffen werden müssen. Außerdem könnte mit *nef*-rekombinanten MoMuLV Nef in einem retroviralen Infektionskontext beobachtet werden, d.h. Nef wird nicht bereits in der Keimbahn exprimiert, sondern erst nach Infektion von ähnlichen Zelltypen wie in einer HIV-Infektion.

In einer vorangegangenen Arbeit von D. Paulsen wurden verschiedene *nef*-tragende MoMuLV konstruiert. Das *nef*-Gen des HIV-1 Stammes NL4.3 wurde zunächst entweder ohne eigenen Promotor oder unter Kontrolle des tk-Promotors in die 3'-Region des MoMuLV-Genoms eingeführt. Die Expression von Nef in infizierten Zellen war nur in Partikeln mit tk-Promotor nachweisbar. Nach Infektion neonataler Mäuse mit den *nef*-tragenden Viren konnte im Vergleich zum Wildtyp-Virus (Mo) kein veränderter Krankheitsverlauf festgestellt werden. Histologische Untersuchungen zeigten keine der Expression von Nef zuzuordnenden Besonderheiten. Die Expression von Nef ging in Zellkultur und *in vivo* bereits sehr rasch verloren. Daher wurden weitere MoMuLV-Konstrukte kloniert, die Nef entweder über ein zusätzliches Spleißsignal oder unter der Kontrolle eines IRES-Elementes exprimierten. Nef-Protein konnte in infizierten Zellen jedoch nur im Fall des IRES-Konstruktes (Mo-NL) nachgewiesen werden. Es gab Hinweise, dass die Konstrukte *in vitro* und *in vivo* die Expression von Nef oder GFP (Mo-GFP) über mehrere Wochen erlauben. Die Verteilung der GFP-Expression in den Organen ähnelte der für Mo beschriebenen Gewebeverteilung. Der Infektionsverlauf von Mo-GFP schien sich nicht von Mo zu unterscheiden. Es gab erste Hinweise, dass Mo-NL den Krankheitsverlauf der MoMuLV-Infektion beeinflusst. Ausschließlich Mo-NL-infizierte Mäuse wiesen im Infektionsverlauf Rötungen im Bereich des Auges auf. Basierend auf diesen Erkenntnissen will die vorliegende Arbeit den Infektions- und Krankheitsverlauf von neonatal mit rekombinanten MoMuLV-infizierten Mäusen beschreiben.

I.5 Fragestellungen der Arbeit

Zielsetzung der Arbeit war die Etablierung und Untersuchung eines auf rekombinanten MoMuLV basierenden, infizierbaren Modellsystems zur Untersuchung von Nef *in vivo* in der Maus. Hierzu wurden basierend auf den vorangegangenen Arbeiten von D. Paulsen folgende Fragestellungen untersucht:

- Um ein aussagekräftiges System zur Expression und Untersuchung rekombinanter Proteine mit MoMuLV etablieren zu können, war es zunächst notwendig, die rekombinanten MoMuLV hinsichtlich ihrer Replikation, Stabilität und Genexpression *in vitro* und *in vivo* zu analysieren.
- Für humane Zellen charakteristische Nef-Funktionen wurden in primären Maus-Splenozyten verifiziert.
- Basierend auf den Hinweisen auf einen veränderten Krankheitsverlauf Mo-NL-infizierter Tiere im Vergleich zu Mo-infizierten Tieren, wurden verschiedene rekombinante MoMuLV-infizierte Mäuse hinsichtlich des Infektionsverlaufs untersucht. Dabei lagen die Schwerpunkte der Beobachtungen auf Mortalität, Tumorentwicklung, mögliche opportunistische Infektionen und auf das Auftreten AIDS-ähnlicher Symptome.
- Mögliche Effekte der Expression rekombinanter Proteine mit MoMuLV wurden hinsichtlich ihrer Effekte auf das Immunsystem analysiert. Insbesondere für Nef wurde gezeigt, dass die Expression in *nef*-transgenen Tieren zu deutlichen Beeinträchtigungen des Immunsystems führt. Es wurden dabei durch Co-Verabreichung von anderen Erregern in MoMuLV-infizierten Tieren generelle Immundefizienzen hervorgehoben, aber auch spezifische Veränderungen der Immunantwort CD4- und CD8-positiver T-Zellen und B-Zellen beschrieben.

II. Ergebnisse

II.1 Herstellung rekombinanter muriner Leukämieviren

II.1.1 Insertion von HIV-*nef* in das murine Moloney Leukämievirus

In den folgenden Experimenten wurde aufbauend auf den Ergebnissen der Arbeit von D. Paulsen ein infizierbares System zur Analyse der Funktionen von Nef *in vivo* etabliert. Hierzu wurden replikationskompetente Moloney Maus-Leukämie Viren (MoMuLV) generiert, die zusätzlich das Nef-Protein von HIV-1 exprimieren. Die Hypothese war, dass die Expression von Nef den phänotypischen Verlauf der MoMuLV-Infektion verändern kann. Eine Reihe von Experimenten hat bestätigt, dass Nef seine Funktionen auch in murinen Zellen ausüben kann (144, 228) und im Falle *nef*-transgener Mäuse sogar zu einem AIDS-ähnlichen Phänotyp führt (106). Ein Vorteil eines auf MoMuLV basierenden Untersuchungssystems für Nef gegenüber dem transgenen System ist der natürliche Infektionskontext und die Replikation von MoMuLV in ähnlichen Zielzellen wie HIV. Zur *in vivo* Expression von Nef in Mauszellen wurde bereits in Vorarbeiten von D. Paulsen die Herstellung von rekombinanten MoMuLV beschrieben (187). MoMuLV selbst verursacht nach Infektion neugeborener Mäuse eine T-Zell-Leukämie mit einer Latenzzeit von durchschnittlich 125 Tagen (183). Der zugrundeliegende Mechanismus ist die Aktivierung von zellulären Protoonkogenen, wie *c-myc*, durch den MoMuLV *long terminal repeat* (LTR) nach Insertionsmutagenese (24, 63, 66, 232). Das Nef-Protein beeinflusst die Replikation von HIV, sowie dessen Infektiosität, es aktiviert T-Zellen durch die Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor-Signalübertragungsweg und hat einen signifikanten Einfluß auf die Pathogenese der HIV-Infektion. Eine Insertion von *nef* in MoMuLV könnte damit auch den Krankheitsverlauf in infizierten Mäusen verändern. Um ein *nef* tragendes MoMuLV herzustellen, wurden in den Vorarbeiten von D. Paulsen verschiedene Strategien angewandt, die im folgenden kurz zusammengefasst werden (187). Das *nef*-Gen wurde einerseits ohne eigenen Promotor oder andererseits mit dem Thymidin-Kinase (tk) Promotor von Herpes-Simplex-Virus in den U3 Bereich des 3'LTR von MoMuLV inseriert. Ersteres führte in infizierten Mausfibroblasten nur zu einer minimalen Nef-Expression. Das tk-Konstrukt exprimierte Nef zwar, das inserierte *nef*-Gen ging jedoch durch Rekombinationsereignisse bereits nach ein bis zwei Replikationsrunden des Virus wieder verloren.

In anderen Ansätzen wurde *nef* in die 21 bp umfassende untranslatierte Region (UTR) zwischen dem Ende von *env* und dem Beginn des 3'LTR kloniert. In dieser UTR befinden sich keine für das Virus wichtigen regulatorischen Sequenzen. Die UTR steht daher unter einem geringeren Selektionsdruck als der LTR, der ein für die Replikation essentielles Element darstellt. Weiterhin entspricht die Klonierungsstelle direkt hinter dem Ende des *env*-Gens eher der natürlichen Position von *nef* im HIV-Genom. Um die Insertion der gewünschten Elemente zu ermöglichen, wurde das MoMuLV-Wildtyp-Genom (Mo, siehe Abbildung II-1a) mittels PCR durch Einführung der singulären Schnittstellen Not I und Mlu I verändert (Abbildung II-1, oben). Ein

an diese Stelle kloniertes Gen wird zusammen mit *env* als eine mRNA transkribiert. Die Translation würde jedoch mit dem Stopkodon von *env* enden. Durch das Einführen eines eigenen Spleißakzeptors (SA) sollte eine eigene mRNA für Nef generiert werden (Abbildung II-1c). Eine Expression von Nef konnte jedoch lediglich nach Transfektion, nicht aber nach Infektion von Mausfibroblasten beobachtet werden (187).

In einem weiteren Ansatz wurde *nef* hinter einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES), an der Ribosomen unabhängig von einer *Cap*- („Kappen“-) Struktur binden und die Translation initiieren können, in die UTR von MoMuLV-*env* eingeführt (Abbildung II-1b).

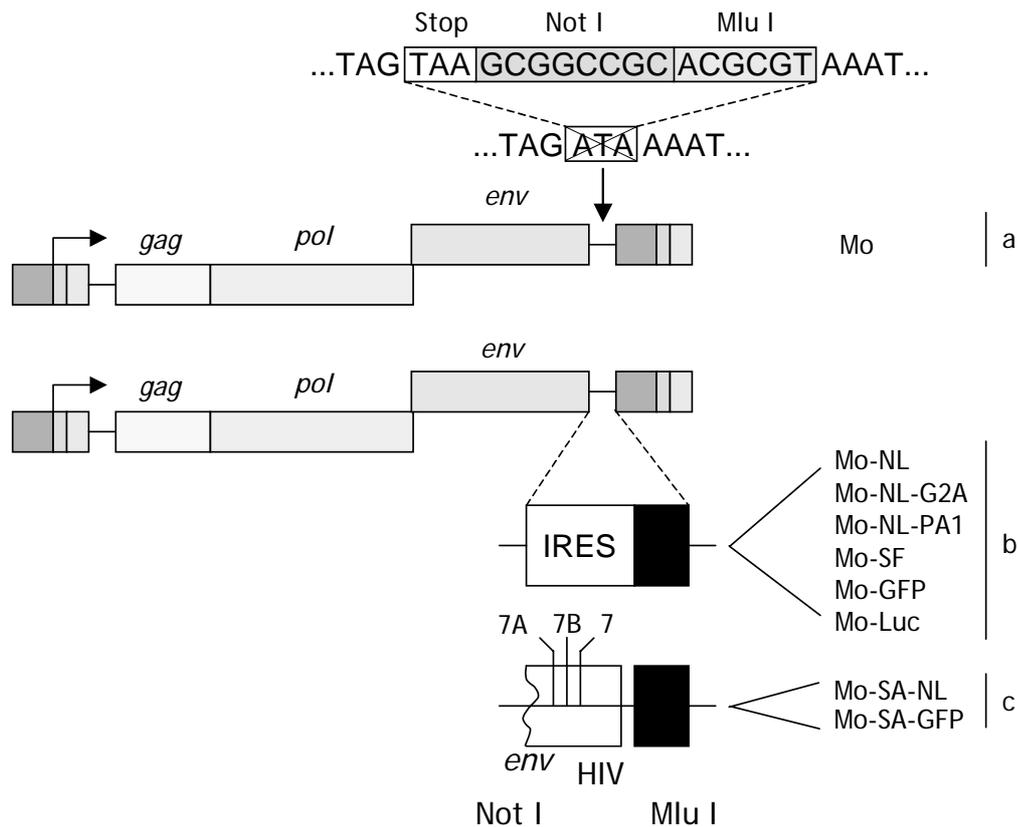


Abbildung II-1: Herstellung rekombinanter MoMuLV, die für HIV-*nef* oder ein Kontrollgen kodieren.

Schematische Darstellung von Wildtyp *Moloney Mäuse-Leukämie Virus* (a) und der rekombinanten Virus-Konstrukte (b, c). Die zusätzlichen Leseraster wurden in den untranslatierten Bereich zwischen *env* und der LTR von Mo kloniert. Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte über eine IRES-Sequenz von einer bicistronischen RNA (b) bzw. mit Hilfe einer zusätzlichen Spleißakzeptorstelle am 3' Ende des *env* Leserasters (c). Im Rahmen dieser Studie wurden HIV-1 NL4.3 *nef* (NL), NL4.3 AxxA-*nef* (NL-PA1), NL4.3 G2A-*nef* (NL-G2A), HIV-1 SF2-*nef* (SF), GFP oder Renilla-Luziferase (Luc) in Mo integriert.

Die Konstrukte enthielten das *nef*-Gen von HIV-1 NL4.3 (NL) oder das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP). In *in vitro* Experimenten konnte die weitgehend stabile Expression des inserierten Gens gezeigt werden. Weiterhin gab es erste Hinweise auf das Auftreten von Nef-spezifischen Phänotypen in neonatal mit Mo-NL infizierten Mäusen (187).

In meiner Arbeit wurden daher ausschließlich die Konstrukte verwendet, die neben dem zusätzlichen Gen eine IRES-Sequenz enthielten. Zur eingehenden Untersuchung von Nef in diesem System wurden außerdem weitere Proviruskonstrukte hergestellt, die für Nef des HIV-1 SF2 Isolates (SF) oder NL4.3-Nef Mutanten kodieren (Abbildung II-1b). Es wurden Mo-NL-G2A mit einer Mutation der Myristilierungs-Stelle in Nef und Mo-NL-PA1 mit einer mutierten Bindungsstelle für SH3-Domänenproteine kloniert. Im *nef*-Gen von Mo-NL-G2A wurde das Kodon für Glycin an Position 2 des N-terminalen Endes von Nef durch Alanin ersetzt. In Mo-NL-PA1 wurden die Proline 72 und 75 durch Alanine ausgetauscht. Durch die Mutation der Myristilierungsstelle (G2A, siehe Einleitung) ist Nef in fast allen bekannten Funktionen vollständig oder nach neueren Erkenntnissen (persönliche Kommunikation, O.T. Fackler) wenigstens teilweise defekt. Eine mutierte SH3-Bindedomäne (A₇₂xxA₇₅) führt zu Defekten in Signalübertragungsfunktionen von Nef (siehe Einleitung). Interaktionen mit der Endozytosemaschinerie sind bei dieser Mutante nicht beeinträchtigt.

Neben den MoMuLV-Konstrukten, die für Nef, Nef-Mutanten oder GFP kodierten wurde im Rahmen dieser Arbeit noch ein weiteres rekombinantes Virus kloniert, das für Renilla-Luciferase kodierte (Mo-Luc). Dieses Virus ermöglichte genaue Untersuchungen des Infektionsverlaufes und vor allem der Mengen an Luciferase-Expression in diversen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Abbildung II-1b).

II.1.2 Herstellung infektiöser rekombinanter retroviraler Partikel

Die Qualität einer Viruspartikel-Präparation ist von einer Reihe von Faktoren abhängig, beispielsweise von einer hohen Transfektionsrate und der effizienten Bildung von Viruspartikeln am besten unter Zuhilfenahme von Verpackungszelllinien. In früheren Experimenten erwies sich die ekotrope Verpackungszelllinie BOSC (188) als geeignet, um hohe Titer ekotroper MoMuLV-Partikel zu produzieren. Diese Zelllinie basiert auf humanen 293T-Zellen. Da humane Zellen mit den rekombinanten MoMuLV nicht infiziert werden können, reduziert dies die Rekombinationswahrscheinlichkeit der Viren und somit die Wahrscheinlichkeit eines Verlustes des inserierten Gens.

Zur Produktion rekombinanter MoMuLV (Abbildung II-1b) wurden je 5×10^6 BOSC Zellen mit pMo-NL, pMo-NL-G2A, pMo-NL-PA1, pMo-SF, pMo-GFP, pMo-Luc oder pMo transient transfiziert und rekombinante MoMuLV-Partikel aus den Überständen gewonnen. Die Transfektionseffizienz für pMo-GFP wurde am Fluoreszenz-Mikroskop mit 50 bis 70% bestimmt.

II.2 Eigenschaften rekombinanter muriner Leukämie-Viren *in vitro*

II.2.1 Bestimmung der Titer rekombinanter muriner Leukämie-Viren

Zur effizienten Infektion neonataler Mäuse mit den rekombinanten MoMuLV war es zum einen notwendig, möglichst hohe Virustiter zu erreichen, da nur ein sehr kleines Volumen von maximal 50-75 µl in eine neonatale Maus injiziert werden kann. Außerdem war die Bestimmung der Titer notwendig, damit die Tiere mit vergleichbaren Virus-Mengen infizieren werden konnten.

Zur Titration wurden je 5×10^3 Sc1-Mausfibroblasten in einer 96-Loch-Platte mit einer Reihe von sechs Verdünnungen der MoMuLV-Präparationen infiziert. Die Zellen wurden fünf Tage nach Infektion mit Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit einem α -Kapsid-Antikörper (α -CA) und konjugiertem *Texas-Red* Sekundärantikörper markiert.

Die Virus-Titer wurden in der indirekten Immunfluoreszenz als cfu pro ml bestimmt. Für Mo wurde in drei unabhängigen Infektionen ein durchschnittlicher Titer von 2×10^7 cfu/ml bestimmt (Abbildung II-2A). Die Bestimmung der Titer von Mo-GFP und Mo-NL (Abbildung II-2A) und den anderen MoMuLV-Varianten (nicht abgebildet) ergab keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Die Insertion der Fremdgene in Mo hatte daher keine Reduktion der Virustiter zur Folge.

Die Analyse der Aktivität der virusassoziierten reversen Transkriptase (RT) führte zum gleichen Ergebnis. Diese ist ein Maß für die Replikation der Viren und wurde als mU pro ml bestimmt. Überstände des Wildtyp Virus Mo zeigten jeweils fünf Tage nach Infektion in drei unabhängigen Experimenten eine durchschnittliche RT-Aktivität von rund 10^5 mU/ml (Abbildung II-2B). Die Werte der Mo-NL- und Mo-GFP-infizierten Zellen war praktisch identisch.

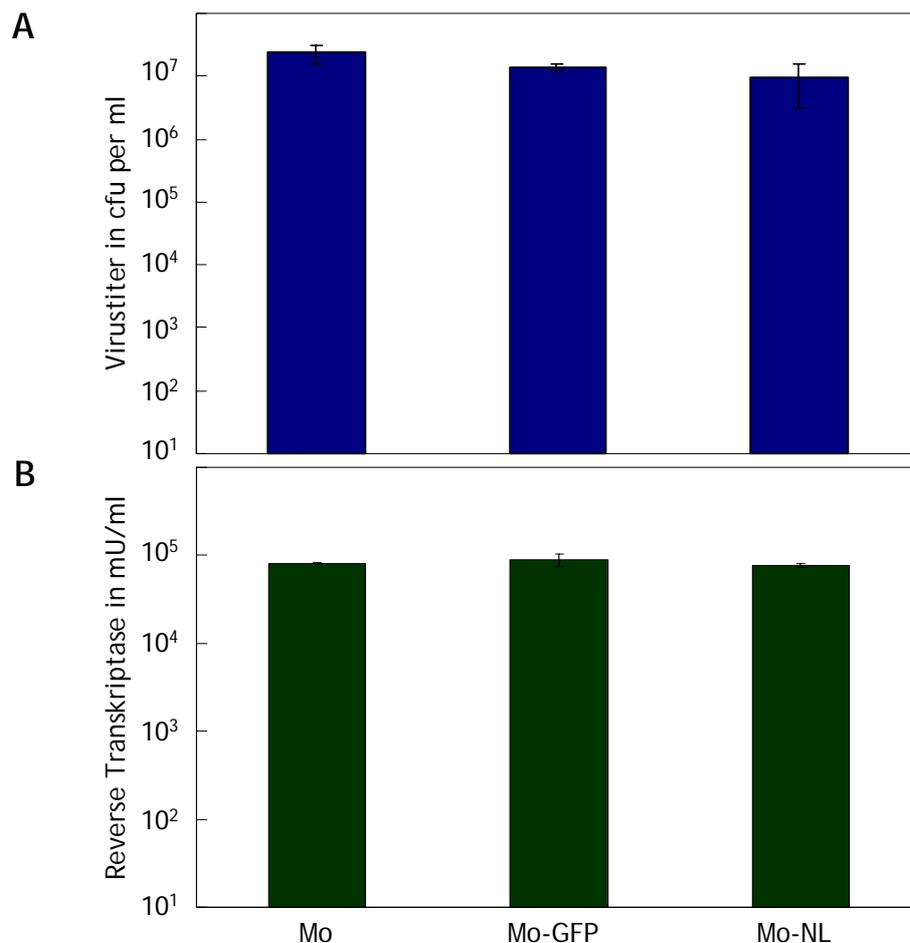


Abbildung II-2: Virustiter und RT-Aktivität in Überständen mit MoMuLV Provirus-DNA transfizierter BOSC Zellen.

(A) Zur Titration rekombinanter Virusüberstände wurden Sc1-Zellen mit einer Verdünnungsreihe der Überstände infiziert und nach fünf Tagen mit einem α -Kapsid (p30) Antikörper und einem α -Kaninchen-*Texas-red* konjugierten Sekundärantikörper markiert und in der Immunfluoreszenz analysiert. Der Virustiter wurde aus der jeweils höchsten noch Virus-positiven Verdünnung errechnet und in infektiösen Einheiten dargestellt (cfu/ml). Die abgebildeten Titer ergeben sich aus dem Mittel von drei unabhängigen Titrations-Experimenten mit dem angegebenen Standardfehler des Durchschnitts.

(B) Aus den selben Virus-Präparationen von Mo, Mo-GFP und Mo-NL wurde die durchschnittliche Menge an Reverser Transkriptase (RT) in mU pro ml sowie deren Abweichung vom Mittelwert bestimmt.

II.2.2 Nachweis der Expression von Fremdproteinen mit MoMuLV

II.2.2.1 Expression von Nef und GFP in Mausfibroblasten

Die Expression von Nef und GFP in MoMuLV-infizierten Zellen sollte gezeigt werden. Hierzu wurden Sc-1 Mausfibroblasten mit Mo-NL, Mo-SF, Mo-PA1, Mo-G2A bzw. Mo-GFP (MOI = 1.0) infiziert. Nach fünf Tagen wurde die Expression von Nef und p30 zunächst im Western-Blot der Mo-NL-infizierten Zellen nachgewiesen (Abbildung II-3A). Dabei konnte in den MoMuLV-infizierten Lysaten p30 und im Lysat Mo-NL infizierter Zellen Nef-Protein nachgewiesen werden. Eine bessere Darstellung der Fremdgen-Expression wurde anhand markierter Zellen in der Immunfluoreszenz erreicht. GFP-Protein konnte in den lebenden Zellen direkt in der Fluoreszenz detektiert (Abbildung II-3B) werden. Anhand der Fluoreszenz war zu sehen, dass die Fibroblastenkultur zu diesem Zeitpunkt fast komplett mit Mo-GFP infiziert war und etwa 99% der Zellen grüne Fluoreszenz emittierten. Die Analyse der Nef-Expression in mit rekombinanten MoMuLV infizierten Fibroblasten erwies sich als schwierig konnte aber durch Markierung mit polyklonalem α -Nef-Serum und einem *Texas-red* Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abbildung II-3B). Nef zeigte eine Lokalisation an der Zellmembran und im Zytoplasma der Sc1-Zellen. Im Zytoplasma befindliches Nef-Protein zeigte ein punktiertes Muster. Die Membranlokalisierung von Nef in Mo-G2A-infizierten Zellen war deutlich reduziert. Hier wurde Nef verstärkt im Zytoplasma detektiert. Die Färbung des Kapsid-Proteins in Mo-NL-infizierten Zellen zeigt eine starke Expression von p30 im perinukleären Bereich, sowie an der Zellmembran (Abbildung II-3B). Auch dies entspricht früher gezeigten Färbungen MoMuLV-infizierter Zellen. Es konnte somit gezeigt werden, dass *nef*-rekombinante MoMuLV und Mo-GFP das jeweilige Fremd-Protein exprimieren. Die Lokalisation von Nef in Maus-Zellen, die mit Nef-exprimierenden MoMuLV-infiziert wurden, war mit der transfizierter Nef.GFP exprimierender humaner Zellen vergleichbar (nicht dargestellt).

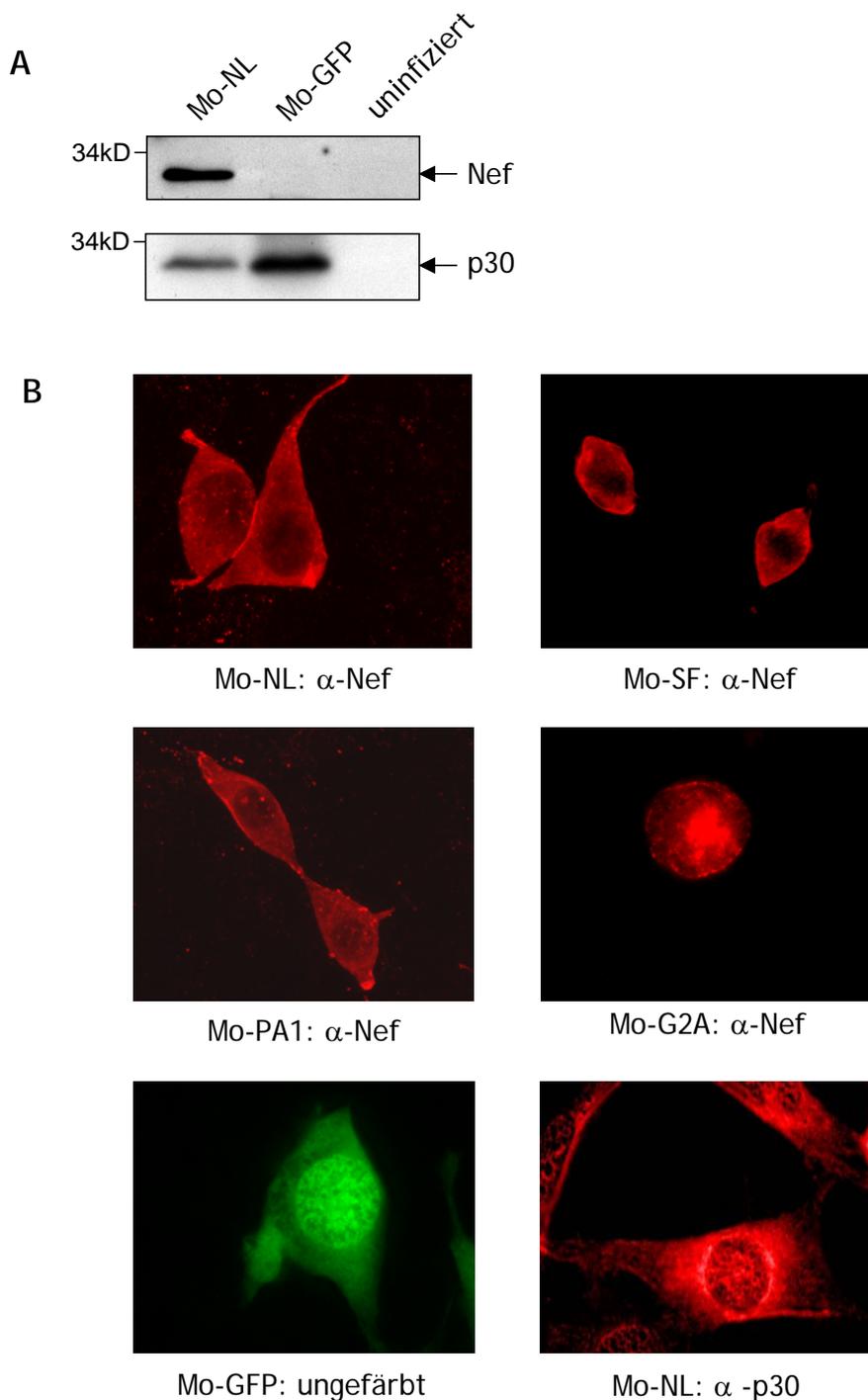


Abbildung II-3: Analyse der Nef und GFP Expression MoMuLV-infizierter Zellen.

Die Nef und GFP Expression MoMuLV-infizierter Zellen wurde im Western-Blot (A) und in der Immunfluoreszenz (B) nachgewiesen.

(A) Western-Blot von 100 μ g Sc1-Zell-Lysat zur Bestimmung der Nef-Expression. Sc1-Zellen wurden mit Mo-NL bzw. Mo-GFP (MOI = 1) infiziert und nach fünf Tagen analysiert. Die Detektion von Nef (oben) erfolgte mit monoklonalen α -Nef Antikörpern. MuLV p30 (unten) wurde mit polyklonalem α -p30 Serum nachgewiesen.

(B) Sc1-Zellen wurden mit Mo-NL, Mo-SF, Mo-PA1, Mo-G2A bzw. Mo-GFP infiziert (MOI = 1) und fünf Tage nach Infektion in der Immunfluoreszenz analysiert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit α -Nef bzw. α -p30 und *Texas-red* konjugierten Sekundär-Antikörpern markiert. Mo-GFP-infizierte Zellen wurden nicht gefärbt.

II.2.2.2 Replikations-Kinetik von Mo-NL und Mo-GFP

Es wurde gezeigt, dass Nef im Vergleich zu Mo-GFP und Mo keinen Einfluss auf den Virustiter hat. Es sollte nun untersucht werden, ob Nef im Vergleich zum Kontrollprotein GFP die Kinetik der MoMuLV-Replikation beeinflusst. Hierzu wurden Sc1-Zellen in 10 cm Schalen, denen einige Glasplättchen (*cover slips*) beigefügt worden waren, ausgesät. Die Fibroblasten wurden dann mit einer MOI von 0.01 infiziert und Proben der Überstände der Zellen täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen entnommen und anschließend im Western-Blot auf p30-Antigen untersucht. Von jeder Probe wurden 15 µl auf einem Polyacryamidgel aufgetrennt. MoMuLV-Kapsid wurde mit polyklonalem α -p30-Serum detektiert (Abbildung II-4A). Als Kontrollen dienten uninfizierte Sc1-Fibroblastenzellen und konstitutiv p30-exprimierende BOSC-Zellen.

In den Überständen der mit Mo-GFP- oder Mo-NL-infizierten Fibroblasten war p30 ab dem dritten Tag nach Infektion gleichermaßen detektierbar. Die p30-Menge stieg in beiden Ansätzen bis zum Tag sechs nach Infektion an und blieb dann auf einem konstanten Niveau. Die Menge an p30 im Überstand Mo-NL-infizierter Zellen war identisch mit den p30 Mengen im Überstand Mo-GFP-infizierter Zellen.

Die Ergebnisse der Western Blot Analyse wurden in der indirekten Immunfluoreszenz bestätigt. Dazu wurde täglich ein Glasplättchen mit Zellen entnommen, mit Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit α -p30 Serum, sowie einem *Texas-red*-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Der prozentuale Anteil p30-exprimierender Zellen jedes Plättchens wurde in der indirekten Immunfluoreszenz ausgezählt. In Abbildung II-4A unten ist die relative Zahl infizierter Zellen angegeben. Ab dem dritten Tag nach Infektion waren die Virionen der ersten Replikationsrunde in den Zellüberständen detektierbar. Die Zahlen p30-positiver Zellen der Mo-NL-infizierten Kultur unterschieden sich nicht von denen der Mo-GFP-infizierten Fibroblastenkultur. Mit rund 10% p30-positiver Mo-NL-infizierter Zellen entsprach diese Zahl den Mo-GFP-infizierten p30-positiven Sc1-Fibroblasten zu diesem Zeitpunkt. Die Zahl der in der Immunfluoreszenz p30 positiven Sc1-Zellen erreichte am Tag fünf nach Infektion in beiden Ansätzen Werte von mehr als 90%. Mit Mo-NL und Mo-GFP-infizierte Mauszellen zeigten somit gleiche Mengen an p30 in den Zellen und im Kulturüberstand. Es konnten somit keine Unterschiede in der Replikationskinetik Mo-NL und Mo-GFP-infizierter Maus-Fibroblastenzellen nachgewiesen werden.

Um festzustellen, ob sich die Zahl freigesetzter MoMuLV-Partikel nach mehreren Replikationsrunden des Virus z.B. durch Verlust des inserierten Gens veränderte, wurde die Aktivität der reversen Transkriptase in mehrfach passagierten Mo-NL und Mo-GFP Überständen verglichen (Abbildung II-4B).

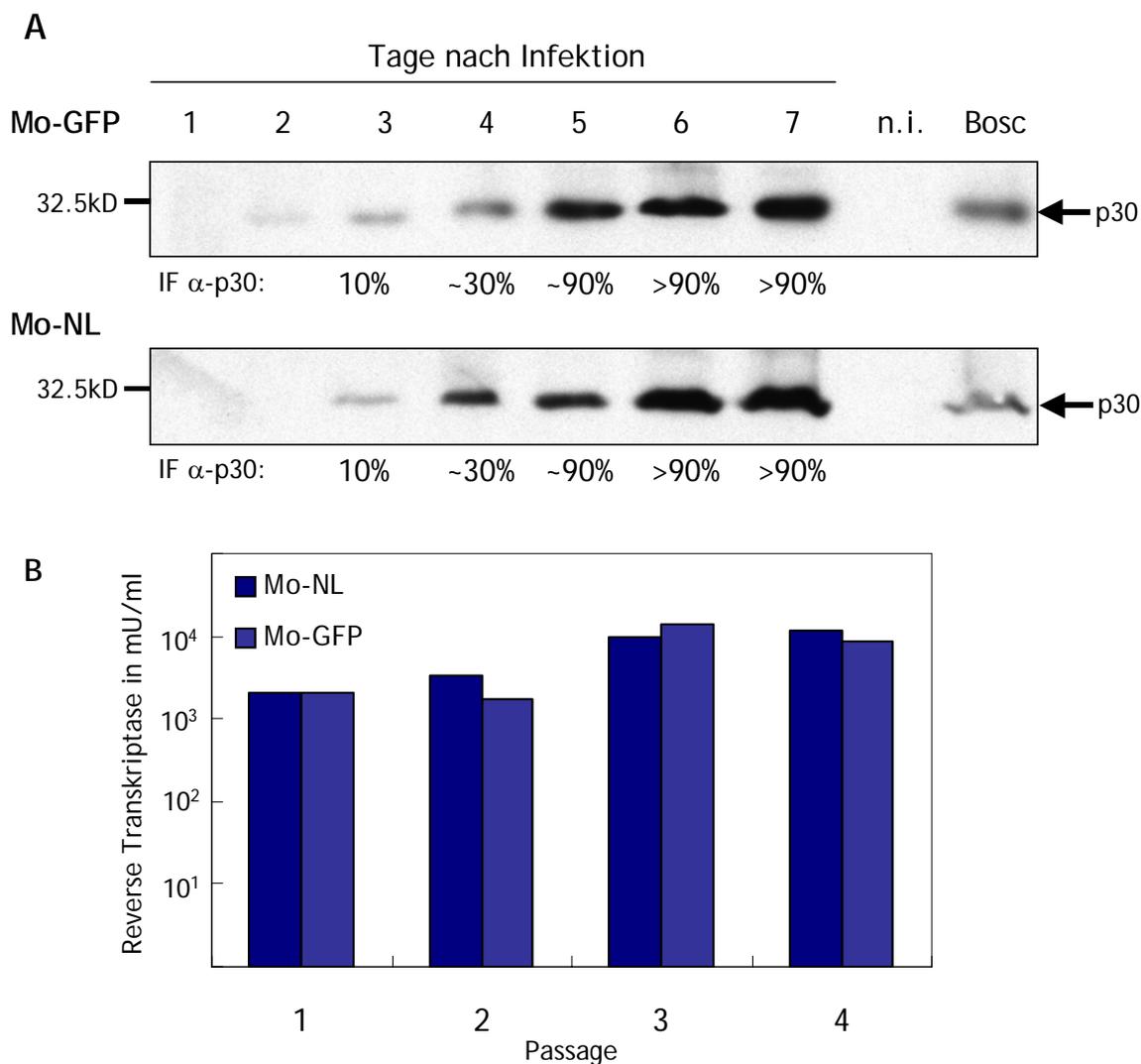


Abbildung II-4: Analyse der Virus-Replikation von Mo-NL und Mo-GFP in Sc1-Zellen.

Zur Untersuchung der Virusreplikation wurden Sc1-Zellen mit Mo-NL oder Mo-GFP (MOI = 0.1) infiziert.

(A) Western-Blot (α -p30) von Sc1-Kulturüberständen, die über den Zeitraum von einer Woche täglich entnommen wurden. Konstitutiv MuLV-Gag exprimierende BOSC Zellen dienten als Positiv-, uninfizierte Sc1-Zellen als Negativkontrolle. Pro Spur wurden 15 μ l Überstand aufgetragen. Unten angegeben ist die relative Zahl infizierter Zellen der Sc1-Kulturen. Diese wurde in der indirekten Immunfluoreszenz (α -p30) bestimmt.

(B) Reverser Transkriptase (RT) Assay von Kulturüberständen MoMuLV-infizierter Sc1-Zellen. Überstände wurden fünf Tage nach Infektion entnommen, titriert und auf frische Sc1-Zellen passagiert (MOI = 0.01). Die RT von vier Viruspassagen wurde quantifiziert und ist in mU/ml dargestellt.

Dazu wurden zuvor ausgesäte Sc1-Fibroblasten mit einer MOI = 0.01 infiziert. Nach fünf Tagen wurden die Überstände entnommen, der Virustiter und die RT-Aktivität bestimmt und frische Sc1-Zellen mit MOI = 0.01 infiziert. Dies wurde bis zur vierten Passage wiederholt. In Abbildung II-4B ist die RT-Aktivität von Mo-NL und Mo-GFP der vier Virus-Passagen dargestellt. Es fällt auf, dass sich die RT-Aktivität von Mo-GFP und Mo-NL jeder einzelnen Passage gleichen. Die Werte jedes einzelnen Virus blieben aber zudem auch über vier Passagen weitgehend konstant. Ein Anstieg, z.B. verursacht durch den Verlust des inserierten Gens war nicht zu beobachten.

II.2.2.3 Stabilität der Nef und GFP Expression in Mo-NL- und Mo-GFP-infizierten Zellen

Die Infektion von Fibroblasten mit Mo-SA-NL und Mo-tk-NL (Abbildung II-1B) hatte einen raschen und völligen Verlust der Expression des Fremdgens zur Folge. Vermutlich gingen *nef* enthaltende Sequenzen der Viren durch Rekombination aus dem unter hohem Selektionsdruck stehenden LTR rasch verloren. In die UTR von Mo inseriertes IRES-*nef* steht zwar unter einem deutlich geringeren Selektionsdruck, bei der Untersuchung der Titer von Mo-GFP fiel dennoch auf, dass der Nachweis GFP exprimierender Zellen in den Verdünnungsreihen infizierter Sc1-Zellen stets um etwa eine log-Stufe weniger sensitiv war, als die p30-spezifische indirekte Immunfluoreszenz. Es war somit möglich, dass in einer steigenden Population der rekombinanten MoMuLV das Fremdgen durch Rekombinationsereignisse verloren geht. Um zu überprüfen, ob die Nef bzw. GFP Expression durch Passagierung der Viren verloren geht, wurden Sc1-Zellen mit einer MOI = 0.01 mit Überständen von Mo-NL und Mo-GFP transfizierten BOSC-Zellen infiziert. Fünf Tage nach Infektion wurden die Überstände abgenommen, titriert und jeweils mit MOI = 0.01 auf eine frische Sc1-Kultur passagiert. Dieser Zyklus wurde noch dreimal bis zur vierten Passage wiederholt. Mo-GFP-infizierte Zellen der vierten Passage wurden indirekt mit α -p30 und einem *Texas-red*-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Etwa 75% der Zellen beider Ansätze waren p30-positiv.

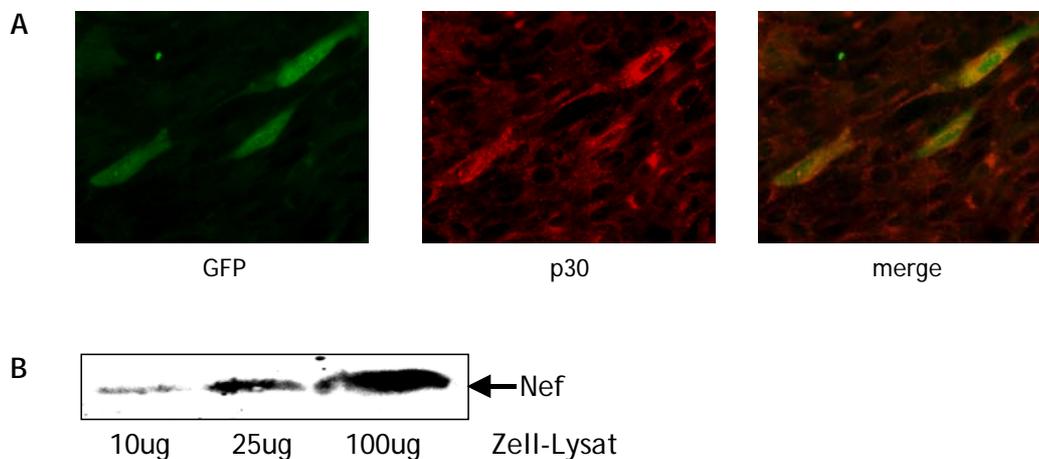


Abbildung II-5: Stabilität der Expression von Nef und GFP *in vitro*.

Zur Bestimmung der Stabilität der Expression von Fremdproteinen aus Mo-NL und Mo-GFP wurden Sc1-Zellen infiziert (MOI = 0.01). Nach einer Woche wurde der Titer der Fibroblastenkultur-Überstände bestimmt und eine Folgekultur mit diesen Überständen infiziert (MOI = 0.01). Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben in der Immunfluoreszenz (A) und im Western-Blot (B) auf die Expression von Nef und GFP untersucht.

Am Fluoreszenzmikroskop wurden GFP und Kapsid-Expression der Sc1-Zellen verglichen (Abbildung II-5A). Es konnte gezeigt werden, dass nach viermaliger Passagierung infizierte Zellen weitgehend auch GFP exprimierten. Einige schwach p30-positive Zellen zeigten keine GFP-Fluoreszenz. Die Expression von Nef-Protein in Mo-NL-infizierten Zellen konnte nach der

vierten Passage im Western-Blot (α -Nef) nachgewiesen werden (Abbildung II-5B). Dies bedeutet, dass das *nef*-Gen geht auch nach mehreren MoMuLV-Replikationszyklen zumindest nicht vollständig verloren ging. Der Verlust von *gfp* durch Rekombination erscheint nach mehrmaligen Viruspassagen *in vitro* sogar nur gering zu sein.

II.3 Untersuchung MoMuLV-infizierter Mäuse

II.3.1 Infektion neonataler Mäuse mit murinen Leukämieviren

II.3.1.1 Versuchsaufbau

Nach der Infektion neugeborener Mäuse mit MoMuLV entwickeln sich nach etwa drei Monaten T-Zell Leukämien. Bei einer Leukämie kommt es zu einer klonalen, malignen Störung, die in der Akkumulation dysfunktionaler Zellen (Hyperplasien) und dem Verlust der Zellteilungsregulation und somit in der unkontrollierten Proliferation von Leukozyten resultiert. Diese exzessive Proliferation leukämischer Zellen führt zu einer verringerten Produktion und Funktion der normalen hämatopoietischen Zellen. Man kann als relatives Maß für die Entwicklung einer Leukämie z.B. die Zahl der Leukozyten oder den relativen Anteil der Erythrozyten im Blut (Hämatokrit) bestimmen. Ein anderer Parameter für den Status der Leukämie ist das Gewicht des Tieres, da Beeinträchtigungen des Stoffwechsels zum Gewichtsverlust führen. In den durchgeführten Arbeiten sollte untersucht werden, inwieweit Nef den Verlauf einer MoMuLV-Infektion verändert. Die Tiere wurden zusätzlich auf das Auftreten opportunistischer Infektionen und auf Beeinträchtigungen der zellulären Immunantwort untersucht, welche u.a. in *nef* transgenen Mäusen beobachtet wurden (106). Ergebnisse einer vorangehenden Arbeit gaben erste Hinweise, dass GFP in Geweben Mo-GFP-infizierter Tiere exprimiert wird (187). Außerdem wurde die Sekretion rot gefärbter Augenflüssigkeit in Mo-NL-infizierten Mäusen beobachtet.

In den folgenden Maus-Studien wurden Mäuse nach dem in Abbildung II-6 dargestellten Schema mit rekombinanten MoMuLV infiziert und der Krankheitsverlauf untersucht. Mäuse des Inzucht-Stammes NIH/Ola wurden spätestens 24 h nach der Geburt mit Wildtyp-MoMuLV oder rekombinanten MoMuLV infiziert. Über einen Zeitraum von etwa drei Monaten bis zum Tod der Tiere durch Folgen MoMuLV induzierter T-Zell Leukämien, sollten die Expression der rekombinanten Proteine und mögliche spezifische Krankheitserscheinungen beobachtet werden. Analysen zum Immunstatus der Tiere wurden nach vollständiger Reifung des Immunsystems im Alter von rund sieben Wochen durchgeführt.

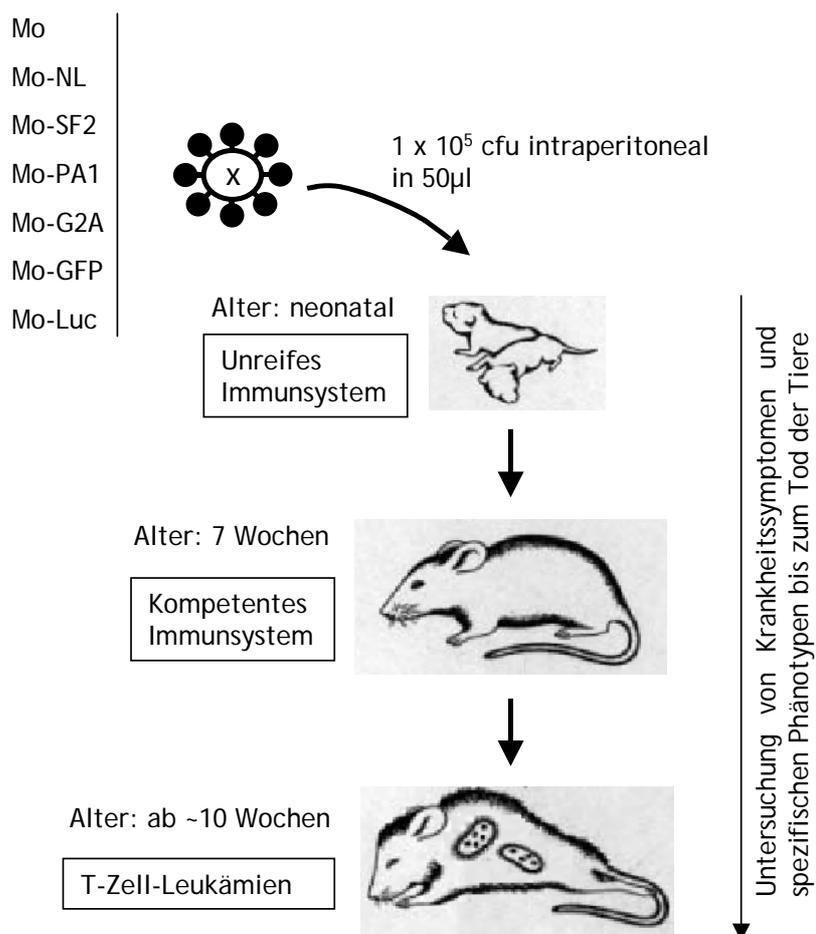


Abbildung II-6: Schema zur Infektion neonataler Mäuse mit rekombinanten MuLV-Überständen.

Überstände der oben genannten rekombinanten Viren wurden titriert und neonatale Mäuse mit 1×10^5 cfu intraperitoneal infiziert. Der Verlauf der Infektion wurde bis zum Tod der Tiere durch MoMuLV-induzierte T-Zell Leukämien im Alter von 10-23 Wochen auf virusspezifische Phänotypen untersucht.

II.3.1.2 Expression von Fremdgenen mittels rekombinanter MoMuLV in vivo

II.3.1.2.1 Stabilität und Quantität der GFP-Expression in Milz und peripheren Blutzellen Mo-GFP-infizierter Mäuse

Der Verlauf und die Stabilität der GFP-Expression nach neonataler Infektion von Mäusen mit Mo-GFP wurde analysiert. Die Untersuchungen erfolgten 1,5, 4 und 6 Wochen nach Infektion an Splenozyten und peripheren Blutzellen der Tiere. Hierzu wurden jeweils fünf Tiere pro Gruppe mit je 1×10^5 cfu Mo-GFP infiziert. Zu jedem Zeitpunkt wurden den Tieren einer Gruppe Milz und Blut entnommen.

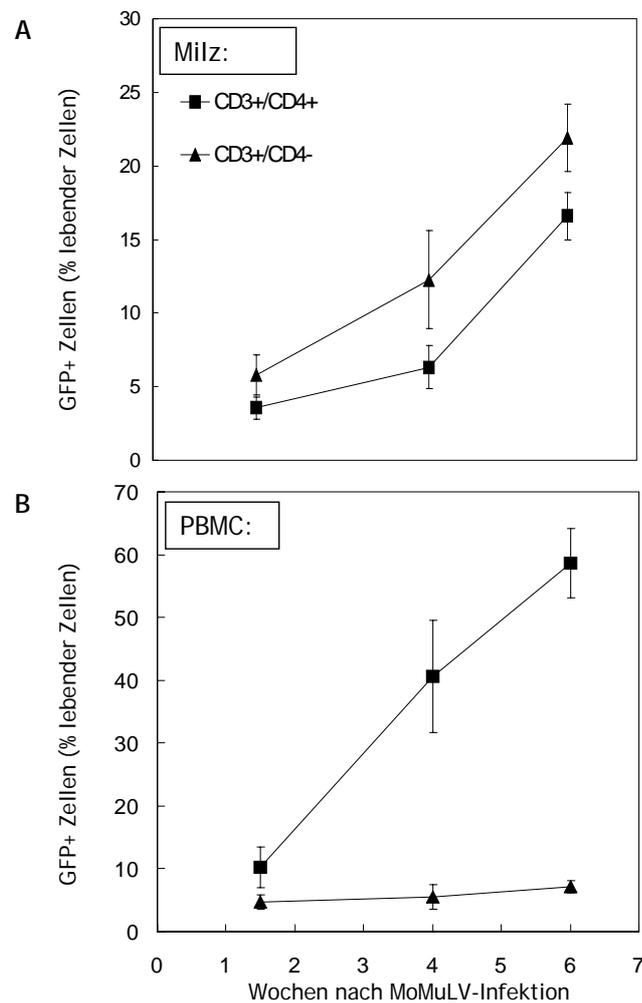


Abbildung II-7: Quantifizierung GFP-positiver Zellen in Mo-GFP-infizierten Mäusen.

Neonatale NIH/Ola Mäuse wurden mit 1×10^5 cfu Mo-NL oder Mo-GFP infiziert.

Die Graphen zeigen eine FACS Analyse GFP-positiver Maus-Splenozyten (A) und peripherer Blutzellen (B) Mo-GFP-infizierter Mäuse 1,5, 4 und 6 Wochen nach Infektion. Die Proben wurden mit α -CD3-CyCr und α -CD4-PE zur FACS Analyse gefärbt. Die Prozentzahl GFP exprimierender Zellen ist für CD3+/CD4- (Dreiecke) und CD3+/CD4+ (Quadrate) Zellpopulationen dargestellt. Jeder Datenpunkt zeigt den Durchschnitt aus 5 Tieren sowie den Standardfehler des Mittelwertes.

Die Analyse GFP-exprimierender Zellen erfolgte im FACS nach Färbung mit α -CD3-CyCr und α -CD4-PE Antikörpern. Die Abbildung II-7A und B zeigen die im FACS ermittelte GFP-Expression lebender CD3⁺/CD4⁺ bzw. CD3⁺/CD4⁻ T-Lymphozyten in der Milz bzw. im Blut der Tiere. In beiden Geweben wurde sowohl unter den CD4⁻ als auch unter den CD4⁺ Lymphozyten eine ansteigende Zahl GFP-positiver Zellen beobachtet. In der Milz waren bereits 1.5 Wochen nach der Geburt der Tiere im Schnitt 9.4% der Lymphozyten GFP positiv. Rund 3.6% der Lymphozyten waren GFP⁺/CD4⁺ T-Lymphozyten, die restlichen 5.8% waren GFP⁺/CD4⁻ Lymphozyten der Milz (Abbildung II-7A). Im peripheren Blut exprimierten zu diesem Zeitpunkt bereits 15.1% aller lebenden CD3⁺ T-Zellen GFP, davon 10.3% CD4⁺ T-Zellen und 4.8% CD4⁻ Lymphozyten (Abbildung II-7B). Zum Zeitpunkt 6 Wochen nach Mo-GFP Infektion waren in der Milz 38.5% aller lebenden CD3⁺ Zellen mit Mo-GFP infiziert, davon 16.6% CD4⁺ T-Zellen und 21.9% CD4⁻ Lymphozyten. Im peripheren Blut stieg der Anteil GFP exprimierender CD3⁺ Zellen auf 65.7%. Auffällig war, dass in der Peripherie die Zahl GFP⁺/CD4⁺ T-Lymphozyten auf bis zu 58.6% anstieg. Im Gegensatz dazu exprimierten nur 7.1% der peripheren CD4-negativen T-Lymphozyten GFP. Die in der Milz relativ hohe Zahl CD4⁻ T-Lymphozyten, die GFP exprimierten könnte möglicherweise auf eine Akkumulation CD8⁺ T-Lymphozyten hindeuten, die von MoMuLV ebenfalls infiziert werden können.

II.3.1.2.2 Nachweis *gfp*-spezifischer RNA im Gewebe Mo-GFP-infizierter Mäuse

Im vorangehenden Abschnitt wurde nachgewiesen, dass GFP in Mo-GFP-infizierten Zellen über einen Zeitraum von sechs Wochen in einer ansteigenden Zahl von bis zu 60% aller T-Lymphozyten des peripheren Blutes exprimiert wird. Um zu untersuchen, ob die Zellen in der Regel die komplette *env*-IRES-*gfp* RNA exprimieren oder Deletionsmutanten selektioniert werden, wurden *gfp*-spezifische RNAs durch RT-PCR-Experimente nachgewiesen. Das Einbringen von nicht essentiellen Genen in ein Retrovirus führt häufig zur Selektion von Varianten, welche die Sequenz durch Rekombination verloren haben, da kürzere Genome besser replizieren.

Mit den RT-PCR-Experimenten sollte gezeigt werden, ob in Mo-GFP-infizierten Tieren 12 Wochen nach der Infektion sowohl vollständiges IRES-*gfp*, als auch teilweise oder vollständig verloren gegangenes IRES-*gfp* in den *env*-IRES-*gfp* RNAs nachweisbar war. Zwei neonatale NIH/Ola Mäuse wurden mit 1×10^5 cfu Mo-GFP infiziert. Ein Tier wurde mit Mo infiziert, eines blieb unbehandelt. Im Alter von 12 Wochen wurden die Milzen der Tiere entnommen. Um replizierende Virusvarianten detektieren zu können, wurden die RNAs der Zellen aufgereinigt und cDNA mit Oligo-dT Primern über eine RT-PCR hergestellt. Um die Mengenverhältnisse der Proben untereinander vergleichen zu können, wurde für jede RT-PCR die gleiche Menge (1 μ g) RNA eingesetzt.

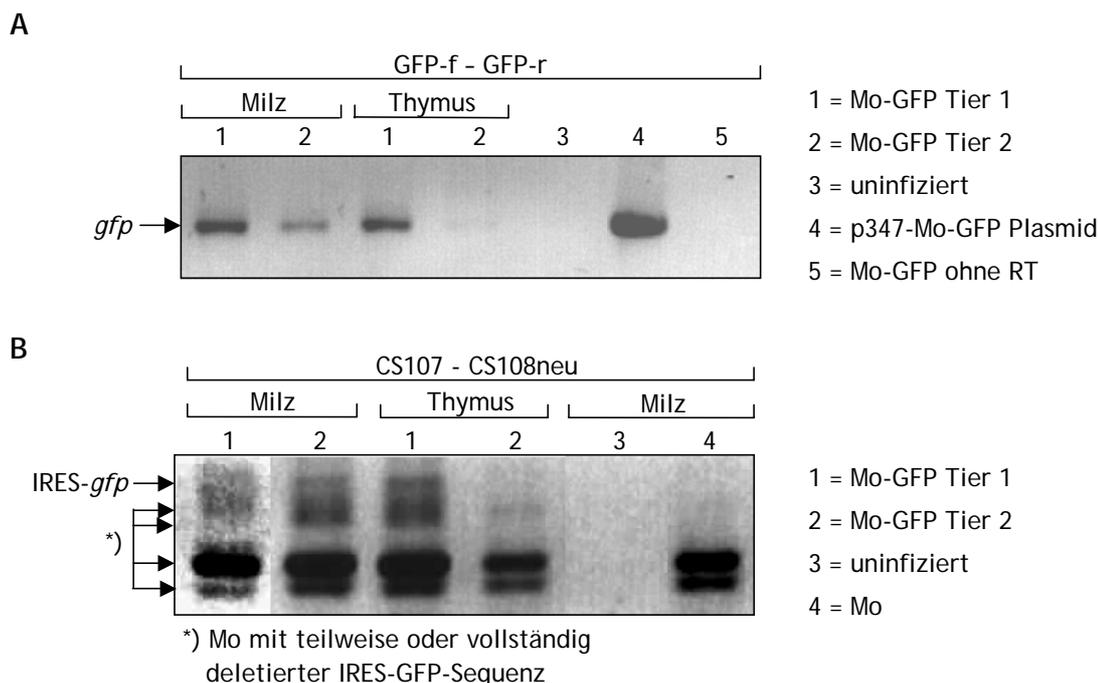


Abbildung II-8: RT-PCR aus Milz und Thymus Mo-GFP-infizierter Mäuse

Neonatale NIH/Ola Mäuse wurden mit 1×10^5 cfu Mo-NL oder Mo-GFP infiziert. 12 Wochen nach Infektion wurden Milz und Thymus entnommen. cDNA von Organproben wurde mit oligo-dT Primern in einer RT-PCR aus gesamt RNA hergestellt. Die in den PCRs verwendeten DNAs sind durch Zahlen gekennzeichnet. Die cDNAs stammten von Mo-GFP-infizierten Tieren (1 und 2), einem unbehandelten (3) oder einem Mo infizierten Tier (6). Die Positivkontrolle war R347-Mo-GFP Plasmid DNA (4), als Negativkontrolle wurde die RT-PCR mit RNA einer Mo-GFP-infizierten Maus ohne Zugabe der reversen Transkriptase durchgeführt (5).

(A) Volllängen *gfp* wurde in einer PCR mit *gfp* spezifischen Primern nachgewiesen. *gfp* ist durch einen Pfeil markiert.

(B) Volllängen IRES-*gfp* (siehe Pfeil) wurde in der PCR mit einem Vorwärtsprimer vom Ende des Mo-*env* Leserahmens und einem Rückwärtsprimer vom 5' Ende des LTR detektiert. Teilweise oder vollständig rekombinierte Varianten (Δ IRES-*gfp*) sind durch Pfeile markiert.

Virusvarianten mit vollständigem *gfp* Gen wurden mit einer PCR nachgewiesen (Abbildung II-8A). Die verwendeten Primer GFP-f und GFP-r banden intern am 5' und am 3' Ende von *gfp*. In den cDNAs der Milz Mo-GFP-infizierter Mäuse (Abbildung II-8A: Probe 1 und 2) war vollständiges *gfp* (839bp) detektierbar, ebenso im Thymus von Tier 1. Im Thymus von Tier 2 war nur eine geringe Menge des *gfp* PCR Produktes vorhanden. Um die Amplifikation von DNA-Verunreinigungen, welche in der RNA Präparation der Organe vorhanden sein könnten, ausschließen zu können, wurde das RT-PCR Protokoll mit RNA eines Mo-GFP-infizierten Tieres ohne Zugabe der reversen Transkriptase durchgeführt. Danach wurde eine PCR mit *gfp*-spezifischen Primern durchgeführt (8A, Probe 5), die zeigt, dass die RNA-Präparation keine DNA-Verunreinigungen enthielt. Dies schloss falsch positive Signale aus. Unspezifische PCR-Produkte wurden durch eine *gfp*-spezifische PCR mit cDNA eines uninferierten Tieres (8A, Probe 3) nachgewiesen. Als Positivkontrolle der PCR wurde pR347-Mo-GFP Plasmid (8A, Probe 4) verwendet.

Mit den *gfp*-spezifischen Primern wurde gezeigt, dass 12 Wochen nach Infektion vollständige *gfp*- RNA in Mo-GFP-infizierten Splenozyten und Thymuszellen vorhanden war. Sie gaben aber

keine Informationen über den Anteil an teilweise oder vollständig rekombinierten Mo-GFP Varianten. Diese wurden durch eine PCR von cDNAs Mo-GFP-infizierter Tiere mit Primern, die vor bzw. nach dem *gfp* Leserahmen lagen, nachgewiesen (Abbildung II-8B). Die Primer CS107 und CS108neu waren spezifisch für das 3' Ende von *env* bzw. das 5' Ende des LTR. Eine mit diesen Primern amplifizierte IRES-*gfp* DNA-Sequenz hat eine Länge von 1841 bp. IRES-*gfp* hat hierbei eine Größe von 1440 bp, die restlichen Basenpaare gehören zu *env* und dem LTR. MoMuLV ohne IRES-*gfp* ergaben ein kürzeres PCR-Produkt von 401 bp. In Abbildung II-8B sind die PCR Produkte von cDNAs der oben beschriebenen Mo-GFP-infizierten Mäuse dargestellt. IRES-*gfp* und verkürzte PCR-Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet. In den Mo-GFP-infizierten Tieren wurden geringe Mengen IRES-*gfp*, mindestens zwei teilweise verkürzte Fragmente und ein großer Anteil vollständig verkürzter DNA (Δ IRES-*gfp*) amplifiziert. cDNA einer uninfizierten Maus (8B, Probe 3) ergab kein PCR Produkt. Aus cDNA einer Mo infizierten Maus (8B, Probe 4.) wurde erwartungsgemäß das kurze 401 bp Fragment amplifiziert.

Zusammengefasst zeigen die Abbildung II-8A und B, dass 12 Wochen nach Infektion zwar noch replizierendes Mo-GFP mit vollständigem Transgen detektierbar ist, ein signifikanter Teil der Viren jedoch IRES-*gfp* teilweise oder vollständig verloren hat.

II.3.1.2.3 Expression rekombinanter Luciferase in Geweben Mo-Luc infizierter Mäuse

Das Renilla-Luziferase Gen in MoMuLV (Mo-Luc, siehe Abbildung II-1B) sollte als alternatives Reportersystem in infizierten Mäusen die Quantifizierung der Fremdgen-Expression in verschiedenen Gewebearten zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermöglichen. Dies kann Hinweise auf den Infektionsverlauf, infizierte Zelltypen und auch auf die Expressionsstärke des zusätzlichen Proteins liefern.

Die Luziferase-Aktivität in Milz, Thymus und Leber neonatal mit Mo-Luc infizierten Mäusen wurde 3.5, 9 und 12 Wochen nach Infektion bestimmt (Abbildung II-9). Die Tiere wurden wie in Abbildung II-6 beschrieben mit Mo-Luc infiziert, die Organe zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommen und die Aktivität der Luziferase pro Milligramm Organgewicht bestimmt. Die Hintergrundaktivität wurde aus Organen uninfizierter Tiere bestimmt und von den jeweiligen Werten abgezogen. Sie lag in allen Tieren bei maximal 1 RLU/mg Organgewicht.

Im Thymus stieg die Luziferase-Expression von <10RLU/mg, 3.5 Wochen nach Infektion, auf 100 bis 200 RLU/mg nach 9 bzw. 12 Wochen an, d.h. es wurde kein Verlust der Luziferase-Expression beobachtet. In der Milz fiel die Luziferase-Expression deutlich von rund 125 RLU/mg, 3.5 Wochen nach Infektion, auf unter 10 RLU/mg ab. In der immunologisch weniger exponierten Leber wurden zu allen Zeitpunkten niedrige Luciferase-Aktivitäten von 10-20 RLU/mg gemessen.

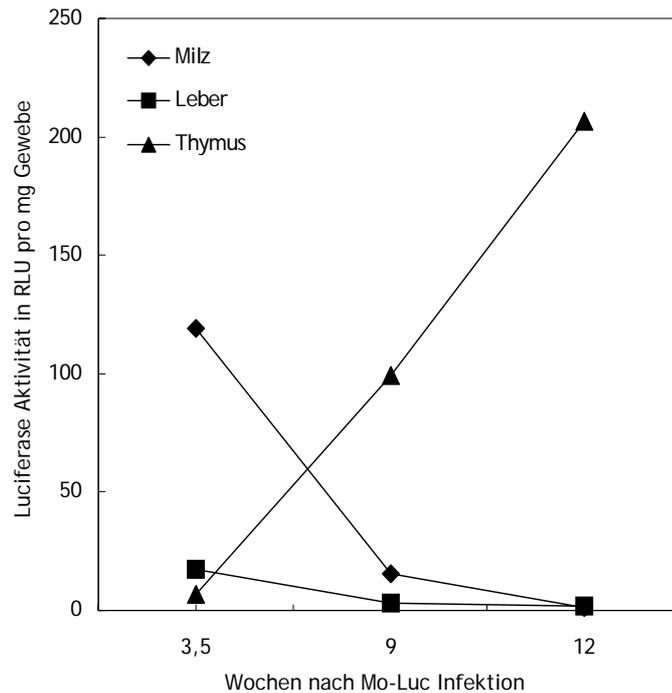


Abbildung II-9: Luziferase Aktivität in Organen Mo-Luc infizierter Mäuse.

Milz, Thymus und Leber neonatal mit Mo-Luc infizierter Mäuse wurden 3,5, 9 und 12 Wochen nach Infektion auf die Expression von Renilla-Luziferase untersucht. Dargestellt ist die relative Luziferase-Aktivität (RLU) pro mg Gewebe zu den entsprechenden Zeitpunkten nach Mo-Luc Infektion.

II.3.2 Phänotyp MoMuLV-infizierter Mäuse

II.3.2.1 Überlebensdauer MoMuLV-infizierter Mäuse

Nef-Protein war in Mo-NL-infizierten Mäusen nach etwa 12 Wochen nach Infektion detektierbar. Im Modellsystem *nef*-transgener Mäuse wurde das Immunsystem der Tiere stark beeinträchtigt. Es sollte daher untersucht werden, welche Einflüsse die Nef Expression mit Mo-NL zu auf das Immunsystem infizierter Mäuse und den Krankheitsverlauf der MoMuLV-Infektion hat. Zunächst wurde die Überlebensdauer Mo-NL-infizierter Tiere im Vergleich zu Mo-GFP oder Mo infizierten Tieren bestimmt (Abbildung II-10A). Die durchschnittliche Latenzzeit zwischen Infektion und Ausbruch der Krankheit von Mo infizierten Tieren lag bei 120 Tagen (80 bis 160 Tage), was dem in der Literatur beschriebenen Wert von 125 Tagen (75 bis 175 Tage) entspricht (183). Die durchschnittliche Latenzzeit lag im Vergleich zu Mo bei Mo-NL-infizierten Tieren mit 115 Tagen etwas niedriger, in Mo-GFP-infizierten Tieren mit 125 Tagen leicht höher als bei Mo. Im graphischen Verlauf der Sterberaten über die Zeit (Abbildung II-10A) wird deutlich, dass der Kurvenverlauf der Sterberate Mo-NL-infizierter Tiere fast deckungsgleich mit Mo- und Mo-GFP-infizierten Tieren verläuft. Es war somit kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Überlebensdauer Mo-NL, Mo-GFP und Mo infizierter Tiere zu erkennen.

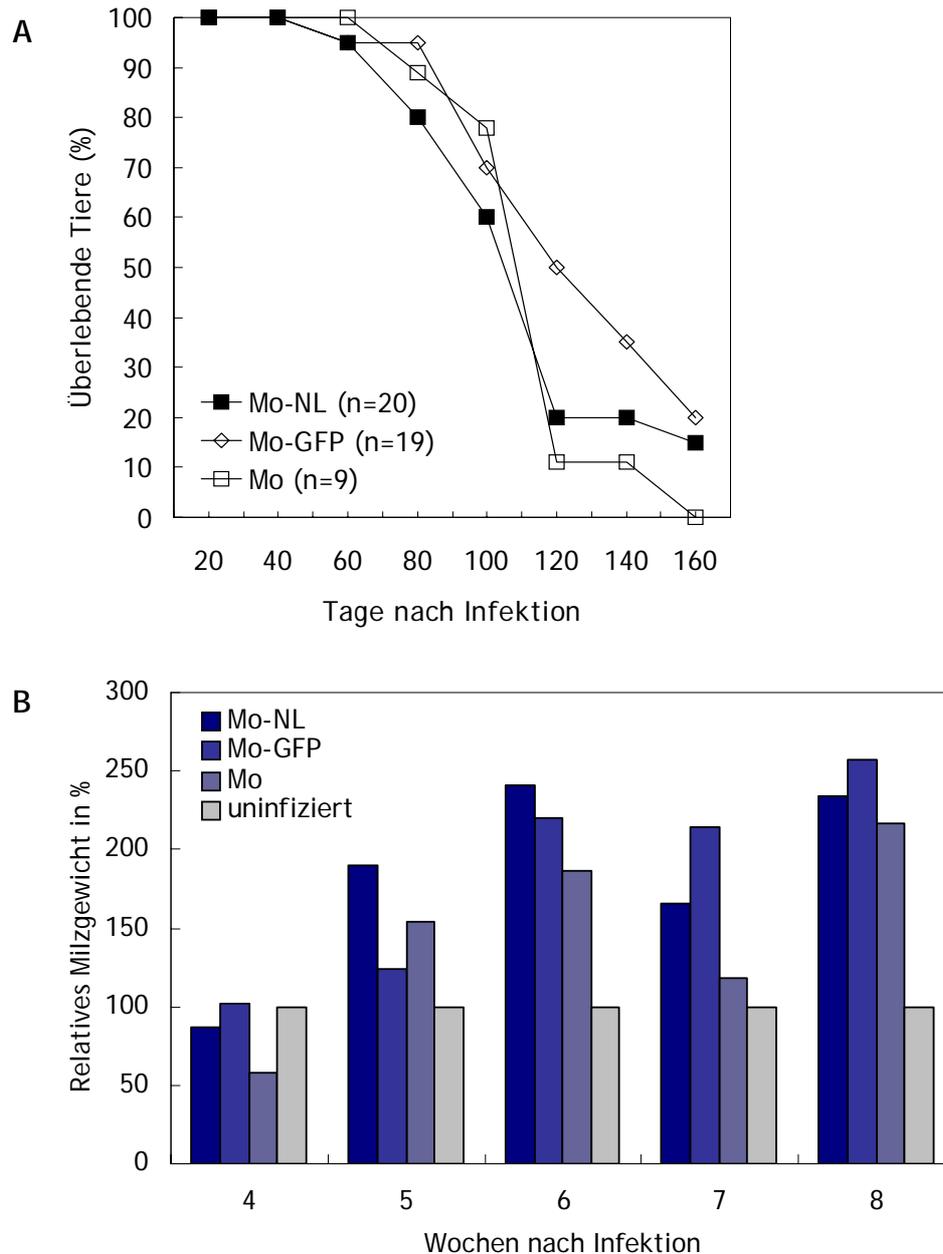


Abbildung II-10: Mortalität und Infektionsverlauf MoMuLV-infizierter Tiere.

(A) Die Überlebensrate Mo-NL-infizierter Tiere im Vergleich zu Mo-GFP und Mo infizierten Tieren. Die Tiere wurden mit 1×10^5 cfu infiziert und unter SPF Bedingungen gehalten. Die relative Zahl an Überlebenden wurde über einen Zeitraum von 160 Tagen verfolgt. n ist die Tierzahl pro Gruppe.

(B) Analyse der MoMuLV induzierten Splenomegalie Mo-NL, Mo-GFP und Mo infizierter Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Die Organe wurden 4, 5, 6, 7 und 8 Wochen nach Infektion entnommen. Das Milz-Gewicht un behandelter Mäuse wurde auf 100% gesetzt und mit Milzen infizierter Tiere verglichen.

Ein charakteristischer Phänotyp der MoMuLV-Infektion ist das Auftreten von Hyperplasien der Milz bereits zu frühen Zeitpunkten nach Infektion. Daraus resultiert eine Gewichtszunahme des Organs. Dies kann zum einen als Nachweis für die Qualität einer Viruspräparation bzw. eine erfolgreiche Infektion des jeweiligen Tieres gewertet werden. Zum anderen können sich eventuelle Unterschiede im Krankheitsverlauf Mo-NL-infizierter Tiere im Vergleich zu

Kontrolltieren in einem veränderten Phänotyp, d.h. verändertem Milzgewicht, manifestieren. Daher wurden die Gewichte der Milzen einzelner Tiere in einem Zeitraum von vier bis acht Wochen nach Infektion bestimmt (Abbildung II-10B). Das Gewicht der Milz uninfizierter Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt wurde auf 100% gesetzt und in Relation zu Mo-NL, Mo-GFP und Mo infizierten Tieren betrachtet. Ab einem Alter von fünf Wochen entwickelten infizierte Tiere eine um das 1.5 bis 2.5-fache vergrößerte Milz (Hyperplasie). Es konnte also ein charakteristischer Verlauf der MoMuLV-Infektion in allen Gruppen nachgewiesen, jedoch kein Unterschied im Krankheitsverlauf Mo-NL-infizierter und Mo-GFP oder Mo infizierter Tiere festgestellt werden.

II.3.2.2 Zahl und Oberflächenexpression MoMuLV-infizierter CD4⁺ und CD8⁺ peripherer Blut-Lymphozyten

II.3.2.2.1 Quantifizierung CD4⁺ und CD8⁺ peripherer Lymphozyten

Die Zahl CD4⁺ T-Lymphozyten im Blut ist für den Gesundheitszustand eines HIV infizierten Patienten entscheidend. Die Depletion von T-Helferzellen führt außerdem zu einem reduzierten Stimulus CD8⁺ zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL). Dies schränkt die Funktion der Immunantwort von T-Helferzellen und CTL bei der Bekämpfung opportunistischer Infektionen entscheidend ein, so dass es zum Auftreten opportunistischer Infektionen kommen kann.

Es wurde überprüft, ob die Nef Expression Mo-NL-infizierter Tiere zu einer Veränderung der Zahl an CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten im Blut führt. Es wurden je zwei Tiere mit Mo-NL, Mo-GFP oder Mo infiziert. Eine Gruppe Tiere wurde nicht infiziert. Nach fünf, sechs und sieben Wochen wurde den Tieren jeweils eine Blutprobe entnommen. Die Zeitpunkte wurden so gewählt, da fünf Wochen nach Infektion das Immunsystem der Maus gereift ist. Andererseits treten T-Zell Leukämien in der Regel erst später als sieben Wochen nach Infektion mit MoMuLV auf.

Zur Quantifizierung CD4⁺ und CD8⁺ peripherer Blut-Lymphozyten wurden je 50 µl Blut mit einer definierten Anzahl von fluoreszenten Partikeln (*TruCount beads*) vermischt. Die Zellen wurden mit α -CD3-CyCr, α -CD4-PE und α -CD8-FITC markiert und im FACS analysiert. Die fluoreszenzmarkierten TruCount beads bildeten in der FACS Analyse aufgrund ihrer Struktur und Größe eine leicht von den Zellen abtrennbare Population (Abbildung II-11A). Da die Zahl an TruCount beads pro µl jeder Probe bekannt war, konnten die in der FACS Analyse gezählten Ereignisse in Relation zu den gemessenen CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen gesetzt und die absolute Zahl dieser Zellen pro µl errechnet werden. In Abbildung II-11B und C ist die Zahl CD4⁺ bzw. CD8⁺ peripherer Blut-Lymphozyten pro µl Blut für jedes Tier dargestellt. Die Mo-NL-infizierten Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung der Zahl an CD4- oder CD8-positiven Zellen.

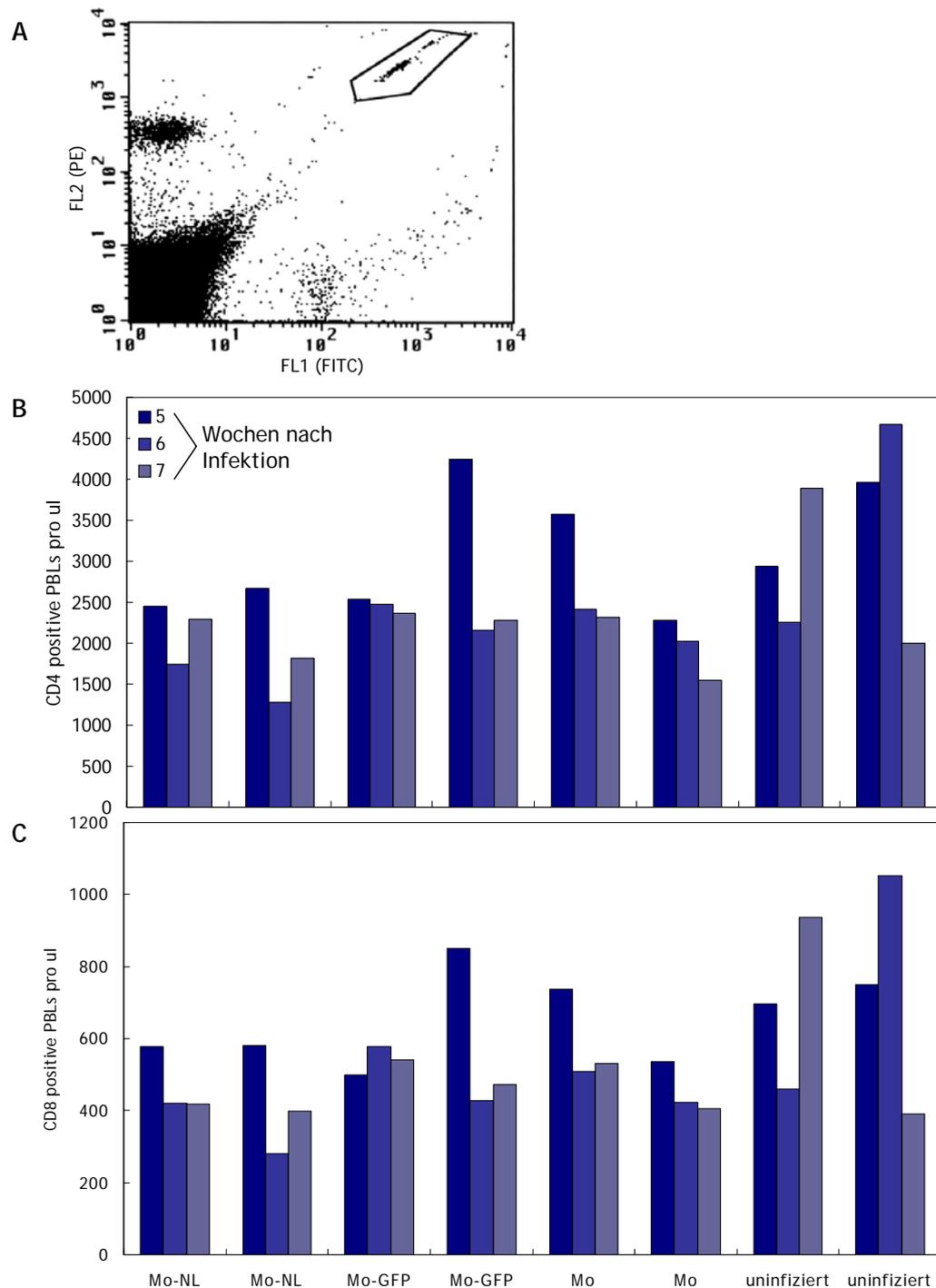


Abbildung II-11: Quantifizierung CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten aus MuLV-infizierten Tieren.

Jeweils zwei NIH/Ola Mäuse wurden mit 1×10^5 cfu Mo-NL, Mo-GFP oder Mo infiziert. Zum Zeitpunkt fünf, sechs und sieben Wochen nach Infektion wurden die Zellen mit α -CD3-CyCr, α -CD4-FITC und α -CD8-PE gefärbt. Nach Zugabe einer definierten Menge TruCount Partikel, die in der FACS-Analyse als definierte Population detektierbar waren (A), wurden die Zellzahlen CD4⁺ (B) und CD8⁺ (C) Lymphozyten im Blut der Tiere in der Durchflußzytometrie quantifiziert.

(A) Dot Plot eines repräsentativen Experimentes zur Identifizierung von TruCount Partikeln in der FACS-Analyse. Die Fluoreszenzintensität von FITC ist gegen PE dargestellt. TruCount Partikel emittieren sehr stark auf beiden Fluoreszenzkanälen. Anhand ihrer Fluoreszenz, Partikel-Größe und Oberflächen-Struktur konnten sie im FACS (siehe FACS-gate) identifiziert und quantifiziert werden.

(B und C) Darstellung der Zahl CD4⁺ (B) und CD8⁺ peripherer Blutzellen (PBL) pro μ l Blut. Das Virus, mit welchem die Tiere infiziert worden waren ist auf der X-Achse (unten) angegeben. Für jedes Tier sind die Zellzahlen der Blutproben der fünften, sechsten und siebten Woche nach Infektion abgebildet.

II.3.2.2.2 Bestimmung der CD4-Expression auf der Oberfläche von CD4⁺ peripheren Blut-Lymphozyten

Eine in den letzten Jahren sehr detailliert beschriebene Funktion von lentiviralem Nef-Protein ist die Internalisierung von CD4 von der Zelloberfläche infizierter Zellen (4, 35, 83). Die Herunterregulierung von CD4 verhindert die Überinfektion einer bereits mit HIV infizierten Zelle.

Es sollte daher untersucht werden, ob die CD4 Level auf der Zelloberfläche durch die Infektion mit Mo-NL beeinflusst werden. Als Kontrolle wurden Mo-G2A infizierte Mäuse verwendet. Zum Zeitpunkt 1,5, 4 und 6 Wochen nach Infektion wurden jeweils 5 Tiere pro Gruppe getötet und Blut und Milz entnommen. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen mit CD3-CyCr und CD4-PE spezifischen Antikörpern markiert und in der Durchflußcytometrie analysiert. Abbildung II-12 zeigt die durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von CD4-PE lebender CD3⁺ Zellen aus Blut und Milz. In beiden Organen war zu keinem Zeitpunkt nach MuLV-Infektion eine Nef-spezifische Veränderung der CD4-Oberflächenexpression erkennbar. Die Stärke der Fluoreszenzintensität war in den getesteten Blutproben geringer, als in den entsprechenden Analysen der Milzzellen. Dies war auf die Fixierung und Erythrozyten-Lyse mit FACS-Lyse-Puffer zurückzuführen.

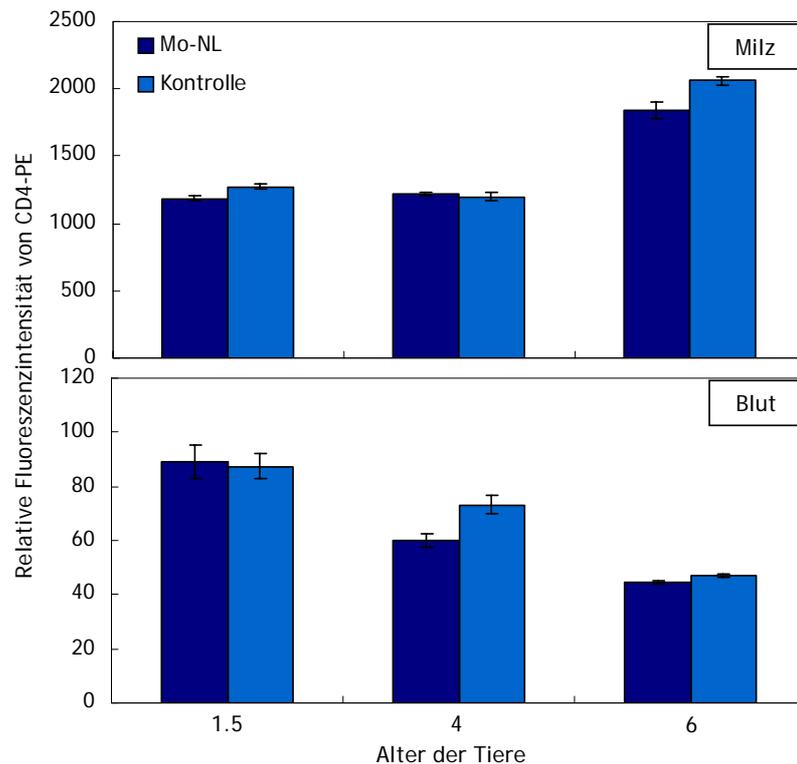


Abbildung II-12: Bestimmung der CD4-Level auf der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen in Milz und Blut Mo-NL-infizierter Tiere 1,5, 4 und 6 Wochen nach Infektion.

Blut- und Milz-Zellen Mo-NL-infizierter und uninfizierter Kontrolltiere wurden 1,5, 4 und 6 Wochen nach Infektion entnommen und mit α -CD3-CyCr, α -CD4-PE markiert. In der FACS-Analyse wurde die relative Fluoreszenzintensität von CD4-PE auf der Oberfläche lebender CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Sie ist für Splenozyten (Abbildung oben) und Blutzellen (unten) dargestellt. Jeder Balken zeigt den Durchschnitt von fünf untersuchten Tieren, sowie den Standardfehler des Mittelwertes.

Milzzellen, die nach der Färbung mit Lyse-Puffer behandelt wurden zeigten ebenfalls eine schwächere Fluoreszenzintensität in der FACS-Analyse (nicht abgebildet). Leichte Unterschiede in den CD4-Mengen auf der Zelloberfläche waren mit dieser Methode nicht zu identifizieren, da es nicht möglich war, spezifisch MoMuLV-infizierte T-Lymphozyten zu analysieren. Ein für die FACS-Analyse tauglicher MoMuLV-spezifischer Antikörper war nicht verfügbar.

II.3.2.3 Vergleich des Krankheitsverlaufs MoMuLV-infizierter Mäuse

II.3.2.3.1 Mo-NL-infizierte Mäuse entwickeln spezifische Augeninfektionen

Basierend auf Hinweisen der Arbeit von D. Paulsen, dass Mo-NL-infizierte Mäuse spezifisch Rötungen im Bereich des Auges entwickeln, sollte der Krankheitsverlauf Mo-NL-infizierter Mäuse mit besonderem Augenmerk auf das Auftreten von Augeninfektionen verfolgt werden. Hierzu wurden in mehreren Versuchsreihen insgesamt 56 Mäuse mit Mo-NL, 43 Mäuse mit Mo-GFP und 12 Mäuse mit Mo infiziert. 13 Tiere wurden nicht infiziert (siehe Schema Abbildung II-6).

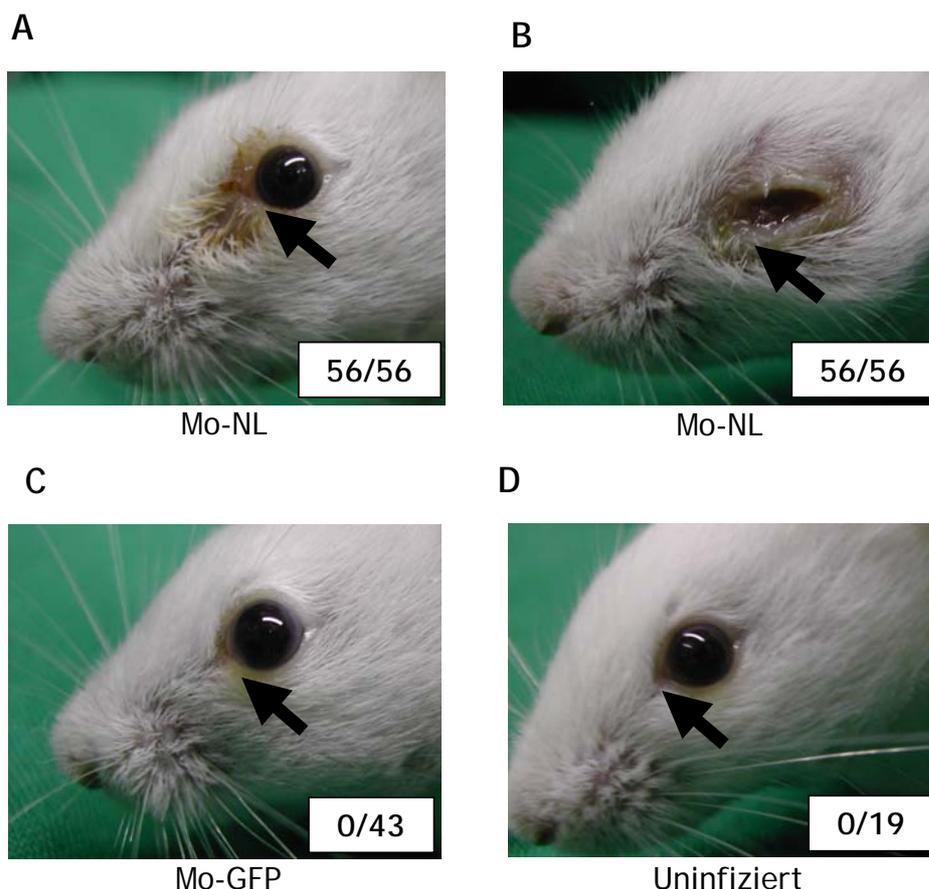


Abbildung II-13: Augeninfektionen bei Mo-NL-infizierten Mäusen.

Vergleich von NIH/Ola Mäusen, die neonatal mit 1×10^5 cfu Mo-NL (A, B) bzw. Mo-GFP (C) infiziert waren oder uninfiziert blieben (D). Ab der sechsten Woche p.i. entwickelten Mo-NL-infizierte Tiere eine eitrige Blepharitis und Konjunktivitis verursacht durch *Pasteurella pneumotropica* (siehe Pfeil), die sich im Verlauf drastisch verschlechterte. Der Krankheitsverlauf ist exemplarisch zum Zeitpunkt 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) nach Mo-NL Infektion dargestellt. Die Zahl an Mäusen mit Augeninfektion ist im Vergleich zur Gesamtzahl der Tiere auf jedem Bild angegeben.

Bis zu einem Alter von 6 Wochen nach Infektion waren in keiner Gruppe äußerliche Symptome der Krankheit zu beobachten. Auch das Verhalten der infizierten Tiere entsprach dem der unbehandelten Tiere. Im Verlauf der siebten Woche entwickelten alle 56 Mo-NL-infizierten Tiere Schwellungen und rötliche Verkrustungen im peripheren Augenbereich (Abbildung II-13A). In den folgenden Wochen entwickelte sich eine eitrig-blepharische und Konjunktivitis (Abbildung II-13B), die in einigen Fällen zum Verlust des Auges führte. Keines der mit Mo-GFP oder Mo infizierten Tiere entwickelte diese Infektion (Abbildung II-13C, D).

Zur Charakterisierung der Infektion wurde die Augenflüssigkeit von 21 Mo-NL-infizierten Tieren und 18 Mo-GFP-infizierten Tieren abgenommen und eine Verdünnungsreihe in PBS auf Blutagar-Platten ausgestrichen (Abbildung II-14A). Auf den Platten mit Material aus Mo-NL-infizierten Mäusen wuchsen nach etwa zwei Tagen ein bis zwei unterschiedliche Bakterien-Populationen. In der mikrobiologischen Diagnostik der Universität Köln wurde das ubiquitäre Bakterium *Pasteurella pneumotropica* in der Augenflüssigkeit Mo-NL-infizierter Tiere identifiziert. Die Titer der Pasteurellen lagen zwischen 10^6 und 10^7 cfu pro μl Augenflüssigkeit. In drei Tieren wurden zudem einzelne Kolonien Coagulase-negativer Staphylokokken (CNS) identifiziert. Im Material von Kontrolltieren wurden keine Pasteurellen, sondern einzelne Kolonien gängiger Kommensalen des Fell-Augenbereichs, wie *Enterokokkus*, CNS, vergrünende Streptokokken detektiert. Das Blut von je 5 Tieren der Mo-NL, Mo-GFP und Mo infizierten Gruppen, sowie unbehandelter Tiere wurden in einer representative Analyse auf spezifische Antikörper gegen Bakterien der „specific pathogen free“ (SPF) Liste der GV-SOLAS/FELASA untersucht. Nicht nur in Mo-NL-infizierten, sondern in allen Tieren wurde im ELISA eine hohe Reaktivität des Serums gegen *Pasteurella ssp.* festgestellt (Abbildung II-14B). Das Auftreten *Pasteurella*-spezifischer Antikörper in den Tieren war zu erwarten, da Pasteurellen ubiquitär in der Atemluft vorkommen. Es kam jedoch ausschließlich in Mo-NL-infizierten Tieren zur Ausbildung von eitrig-blepharischen Infektionen des Augenbereichs.



Abbildung II-14: Augenabstriche MoNL-infizierter Mäuse.

Abstrich der eitrig-blepharischen Augenflüssigkeit Mo-NL-infizierter Tiere auf Blutagar-Platten. Die mikrobiologische Analyse der Platten zeigte Titer von 10^6 - 10^7 cfu pro μl Augenflüssigkeit des Bakteriums *P. pneumotropica* (1), sowie einzelne Kolonien Coagulase-negativer Staphylokokken (2).

Um zu klären, ob die opportunistische Infektion des Auges mit eitrig-blepharischer Konjunktivitis auch bei anderen Mausstämmen vorkommt, wurden neben Mäusen des Stammes NIH/Ola auch Tiere der Stämme Balb/c und J57/B6 mit Mo-NL oder Mo-GFP infiziert. Rund sechs Wochen nach Infektion entwickelte sich in 67% der J57/B6 und in 20% der Balb/c Mäuse eine Pasteurellen-Infektion des

Auges. Die Ausprägung des Krankheitsbildes war in Balb/c Mäusen etwas schwächer als in NIH/Ola oder J57/B6 Tieren.

Im Verlauf der MoMuLV-Infektion von Mäusen aller Stämme traten neben der auffälligen Nef spezifischen Augeninfektion weitere Krankheitsbilder auf, welche jedoch dem generellen Verlauf einer MoMuLV-Infektion entsprachen. Es konnten keine für die Mo-NL Gruppe spezifischen Phänotypen beobachtet werden. MoMuLV-spezifische Symptome, die im Krankheitsverlauf infizierter Tiere auftraten waren reduzierter Allgemeinzustand, struppiges Fell, Kachexien, Ascitis und Anämien.

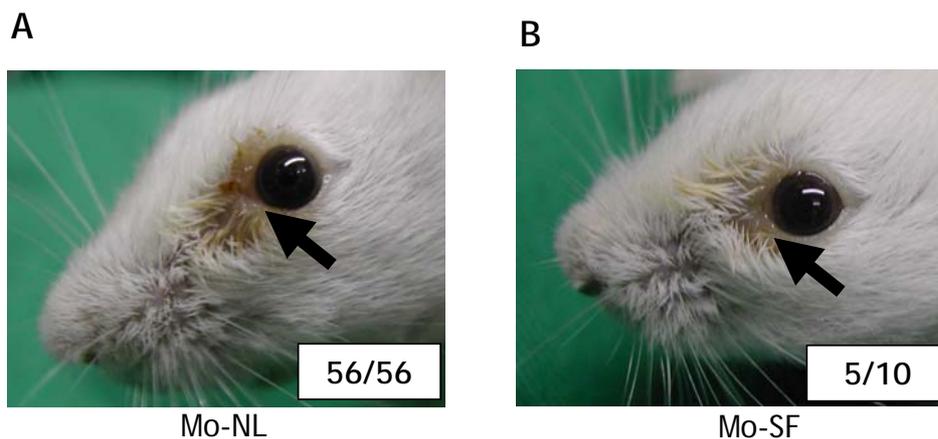


Abbildung II-15: Entwicklung von Augeninfektionen Mo-NL und Mo-SF infizierter Mäuse.

Vergleich von NIH/Ola Mäusen, die neonatal mit 1×10^5 cfu Mo-NL (A) und Mo-SF (B). Ab der sechsten Woche nach Infektion entwickelten Tiere beider Gruppen eine eitrige Blepharitis und Konjunktivitis verursacht durch *Pasteurella pneumotropica* (siehe Pfeil). Die Photos zeigen repräsentative Tiere, 12 Wochen nach Infektion mit rekombinanten MoMuLV. Die Zahl an Mäusen mit Augeninfektion ist im Vergleich zur Gesamtzahl der Tiere auf jedem Bild angegeben.

Um zu zeigen, dass Nef-spezifische Augeninfektionen nicht nur in verschiedenen Mausstämmen auftreten, sondern auch durch Nef-Proteine anderer HIV-Isolate, als NL4.3 ausgelöst werden können, sollte beispielhaft MoMuLV mit dem *nef*-Gen des HIV-Stammes SF2 untersucht werden. Das *nef*-Allel von SF2 wurde gewählt, da viele Funktionen, wie T-Zellaktivierung, Erhöhung der Infektiosität, CD4 und MHC-I Internalisierung durch Nef dieses HIV-Stammes gut dokumentiert sind. Es wurden entsprechend Abbildung II-6 zehn neonatale Mäuse mit Mo-SF infiziert und der Verlauf der Infektion beobachtet. Rund sechs Wochen nach Infektion entwickelten fünf der Tiere eine durch *P. pneumotropica* verursachte Blepharitis und Konjunktivitis (Abbildung II-15). Der in Mo-NL-infizierten Mäusen beschriebene Phänotyp ist also auch mit dem Nef-Protein eines anderen HIV-Stammes induzierbar, jedoch ist dieser für SF2-Nef weniger stark ausgeprägt. Neben der Nef-spezifischen Infektion am Auge, zeigten Mo-SF infizierte Tiere für die MoMuLV-Infektion charakteristische Symptome.

II.3.2.3.2 Phänotyp Mo-NL-PA1 und Mo-NL-G2A infizierter Mäuse

Zwei wichtige Aminosäure-Motive des HIV Nef-Proteins sind die Myristilierungsstelle (Glycin 2), und Proline, die eine Bindungsstelle (PxxP-Motiv) für SH3-Domänenproteine bilden. Myristiliertes Nef ist an der Zellmembran, sowie an vesikulären Membranen lokalisiert (4). Es wurde gezeigt, dass dies für nahezu alle Aktivitäten von Nef essentiell ist.

Anhand Mo-NL-G2A bzw. Mo-NL-PA1 (siehe 1.1) infizierter NIH/Ola Mäuse sollte untersucht werden, ob diese Domänen *in vivo* für den in II.3.2.3.1 beschriebenen Phänotyp von Bedeutung sind. Es wurden jeweils 24 Mäuse nach dem in Abbildung II-6 beschriebenen Schema mit Mo-NL-G2A und Mo-NL-PA1 infiziert und der Krankheitsverlauf analysiert. Bis etwa zehn Wochen nach Infektion zeigten die Tiere äußerlich keinerlei Symptome, d.h. der in Mo-NL-infizierten Tieren induzierte Phänotyp einer opportunistischen Augeninfektion durch *P. pneumotropica* blieb aus. Drei der Mo-NL-G2A infizierten Tiere zeigten ab der achten Woche nach Infektion ein schwache Rötung jeweils eines Auges. Im Vergleich zu Mo-NL-infizierten Tieren war der weitere Verlauf der Augeninfektion dieser Mäuse jedoch stark attenuiert. Ab der zwölften Woche nach Infektion entwickelten alle Tiere die zuvor beschriebenen typischen Krankheitsbilder einer MoMuLV-Infektion und wurden daraufhin getötet.

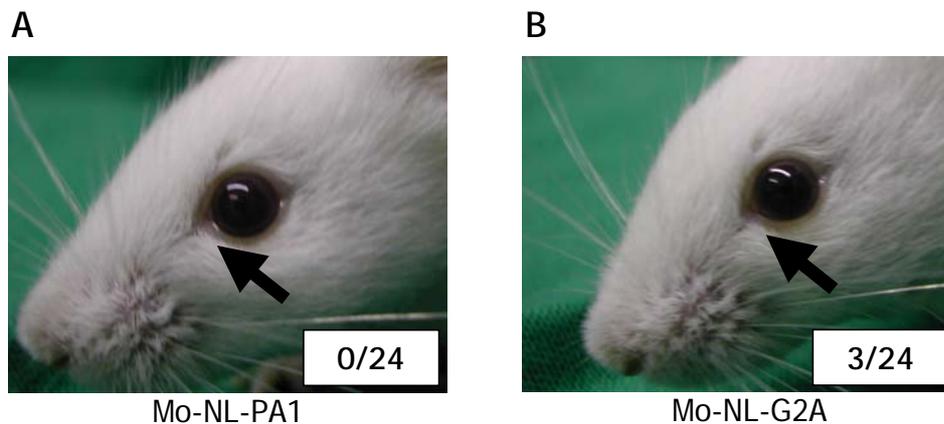


Abbildung II-16: Entwicklung von Augeninfektionen Mo-NL-G2A und Mo-NL-PA1 infizierter Mäuse.

NIH/Ola Mäuse wurden mit 1×10^5 cfu Mo-NL-PA1 (A) oder Mo-NL-G2A (B) oder infiziert. Mo-NL-PA1 infizierte Tiere entwickelten keine Augeninfektion. Andere Nef-spezifische Symptome waren ebenfalls nicht erkennbar. Bei den Mo-G2A-Nef infizierten Tieren entwickelten drei Tiere etwa ab der achten Woche nach Infektion eine leichte Infektion jeweils eines Auges, die anderen zeigten keine erkennbaren Symptome. Die Photos zeigen repräsentative Tiere, 12 Wochen nach Infektion mit rekombinanten MoMuLV. Die Zahl an Mäusen mit Augeninfektion ist im Vergleich zur Gesamtzahl der Tiere auf jedem Bild angegeben.

II.3.2.4 Überinfektion Mo-NL-infizierter Mäuse mit *Pasteurella pneumotropica* und *Listeria monocytogenes*

II.3.2.4.1 *Pasteurella pneumotropica*

In Kapitel II.3.2.3 wurde gezeigt, dass Mo-NL-infizierte Mäuse im Alter von rund sieben Wochen eine opportunistische Infektion des Augenbereichs durch *Pasteurella pneumotropica* entwickeln. Das gram-negative Bakterium ist ein gängiger Kommensale in Barrierehaltungen von Kleintieren. Infektionen mit *Pasteurella* wurden hauptsächlich im oberen respiratorischen Trakt, dem intestinalen und vaginalen Bereich, sowie in Ausscheidungen beobachtet (165). Im immunkompetenten Tier verläuft die Infektion latent. Serokonversion tritt in der dritten Woche nach Infektion der Tiere auf. In immunsupprimierten Individuen, wie AIDS Patienten kann das fakultativ pathogene Bakterium entzündliche Infektionen des respiratorischen Traktes hervorrufen (58). In immunsupprimierten und in *nef*-transgenen Mäusen wurden auch opportunistische Infektionen des Augenbereichs durch *P. pneumotropica* beobachtet (68, 178).

Es wurde nun untersucht, ob eine systemische Infektion von neonatal mit rekombinanten MoMuLV-infizierten Mäusen mit *P. pneumotropica* oder mit dem mauspathogenen Erreger im Alter von sieben Wochen zu Unterschieden im Infektionsverlauf führt. Hierzu wurden je drei Versuchsgruppen NIH/Ola Mäuse mit je acht bis 12 Tieren mit Mo-NL oder Mo-GFP infiziert. Drei Gruppen blieben uninfiziert. Im Alter von sieben Wochen wurde jeweils eine Gruppe der Mo-NL- oder Mo-GFP-infizierten bzw. uninfizierten Tiere nach dem in Abbildung II-17 dargestellten Schema entweder intraperitoneal, intravenös oder intranasal mit *Pasteurella* infiziert. Um die intranasale Infektion zu erleichtern wurden die Tiere mit Kohlendioxid leicht betäubt. Nach erfolgter Infektion wurde der Gesundheitszustand aller Tiere täglich überprüft. Im Zeitraum von 24 Tagen konnte in keinem der Tiere eine Infektions-Symptomatik festgestellt werden. Nach 24 Tagen wurden Milz und Leber der Tiere entnommen. Die Organe wurden gewogen und in je 1ml H₂O_{bidest} in einem Mörser mit Sand lysiert. 100 µl von je vier Verdünnungsstufen von 10⁻¹ bis 10⁻⁴ der Lysate wurden auf Blutagarplatten ausgestrichen, um den Titer reisolierter Pasteurellen oder anderer invasiver Bakterien in Milz und Leber der Tiere zu bestimmen.

Nach Intravenöser wie auch nach intranasaler Infektion wurde in keinem Organ der infizierten Tiere aller Gruppen *Pasteurella* reisoliert. Die intraperitoneale Infektion führte zu niedrigen Titern von <100 cfu pro mg Organ in 22 Tieren. Bei zwei Tieren wurden 2-5 x 10⁴ cfu pro mg Organ in der Milz gefunden. Der Infektionsverlauf neonatal mit Mo-NL infizierten Tieren glich vollständig dem der Mo-GFP-infizierten und unbehandelten Gruppen. In allen Tieren der Mo-NL Gruppe wurde die zuvor bereits beschriebene Infektion des Augenbereichs mit *P. pneumotropica* beobachtet. Diese trat jedoch auch ohne gezielte Infektion der Tiere mit dem Bakterium auf. Die gezielte Überinfektion mit Pasteurellen hatte keine Veränderung des Krankheitsverlaufs der Mo-NL Infektion zur Folge.

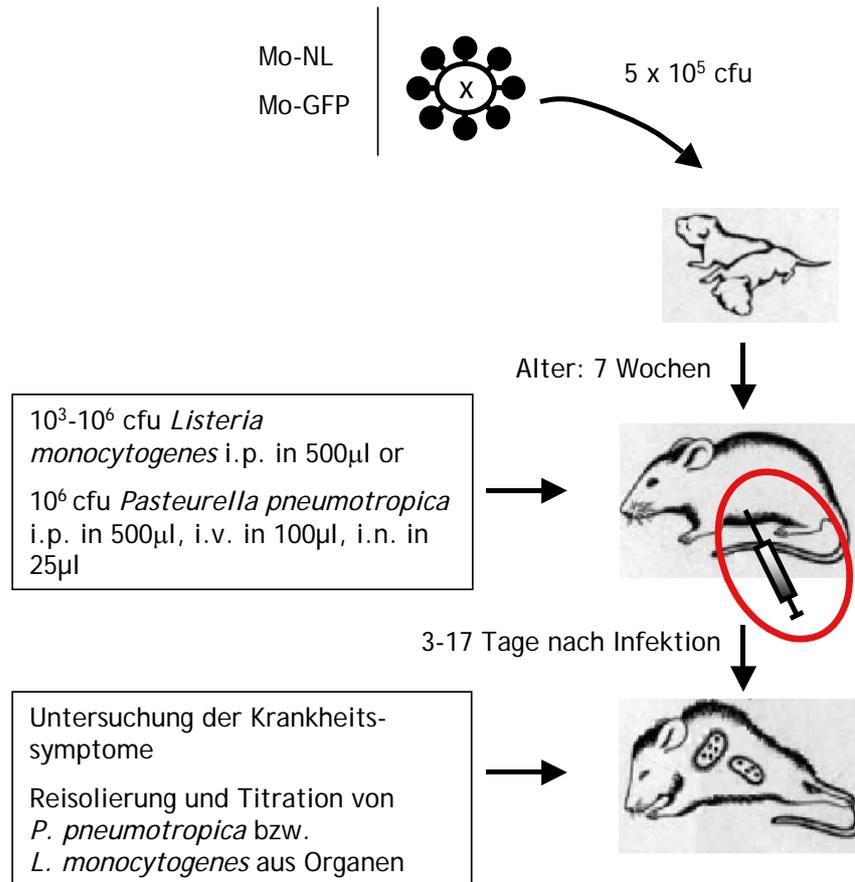


Abbildung II-17: Schematische Darstellung einer intraperitonealen Überinfektion MoLV-infizierter Tiere mit *Pasteurella pneumotropica* bzw. *Listeria monocytogenes*.

Neonatal mit Mo, Mo-NL oder Mo-GFP-infizierte NIH/Ola Mäuse wurden nach 6 Wochen mit 10^6 cfu *Pasteurella pneumotropica* bzw. mit 10^3 bis 10^6 cfu *Listeria monocytogenes* intraperitoneal infiziert. In einem Zeitraum von 3-21 Tagen wurden der Phänotyp untersucht, sowie *P. pneumotropica* bzw. *L. monocytogenes* aus Milz und Leber reisoliert und titriert.

II.3.2.4.2 *Listeria monocytogenes*

Für die Kontrolle und Eliminierung einer Infektion mit dem mauspathogenen Erreger *Listeria monocytogenes* sind $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten essentiell (60, 212). Durch die Aktivität von T-Zellen werden Makrophagen aktiviert und die Ausschüttung von Zytokinen, vor allem Interferon- γ induziert. Die selektive Depletion bestimmter T-Zellen führt zum letalen Verlauf der Infektion. Listerien infiltrieren besonders Milz und Leber. Dort kommt es durch die Aktivität zytotoxischer T-Zellen zu Nekrosen. $CD4^+$ T-Zellen kontrollieren die spezifische T-Zellantwort und reduzieren so das Auftreten von Nekrosen in der Leber der Tiere (212).

Es sollte gezeigt werden, ob die Infektion mit rekombinanten MoMuLV die T-Zellantwort von Mäusen in einer Weise verändert, dass es zu Veränderungen im Krankheitsverlauf einer systemischen Infektion mit *Listeria monocytogenes* kommt. Hierzu sollten die Überlebensrate der Tiere, die Bakterientiter in Milz und Leber und das Auftreten von Nekrosen verglichen werden

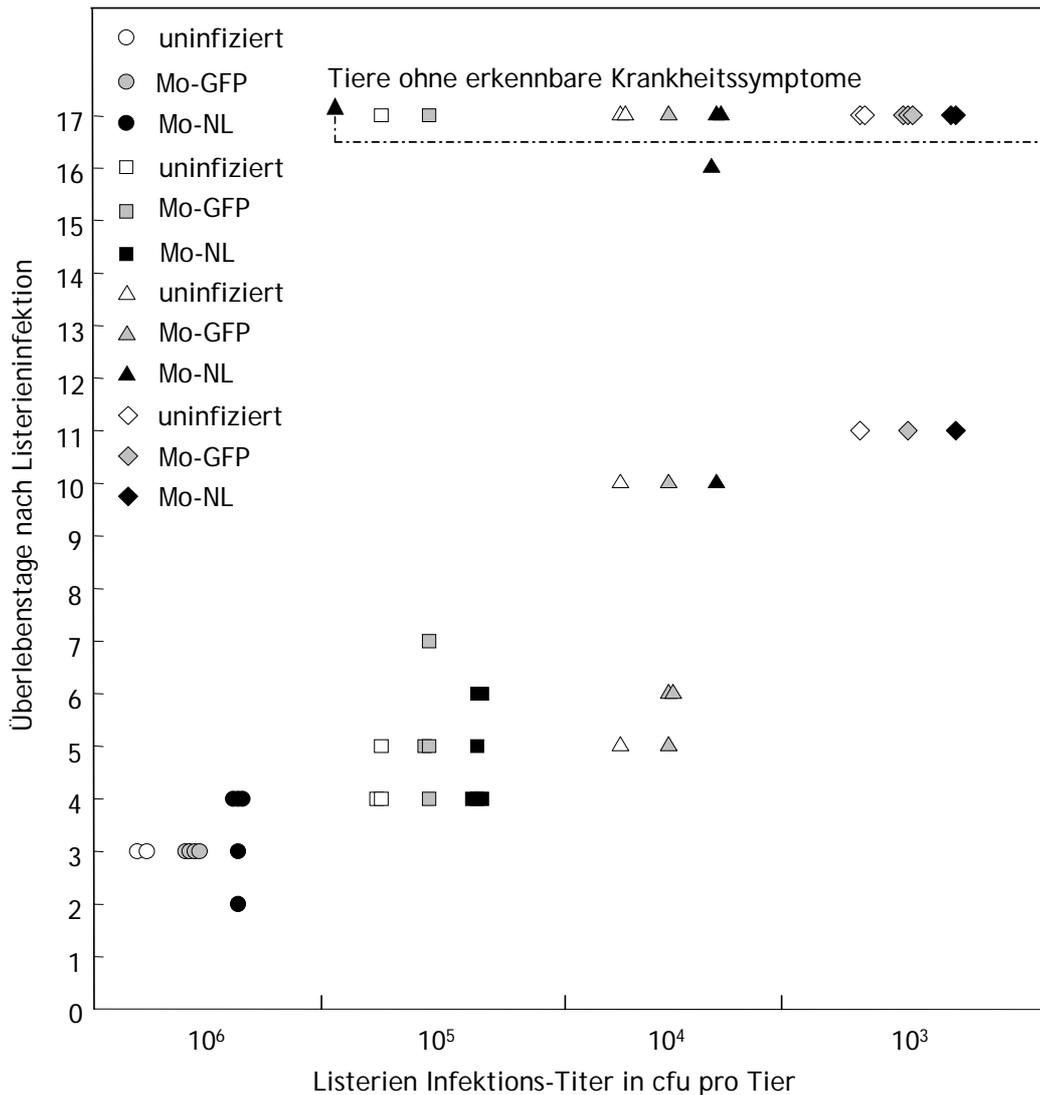


Abbildung II-18: Überlebensdauer MuLV-infizierter Tiere nach Infektion mit *L. monocytogenes*.

Mo-NL- und Mo-GFP-infizierte und uninflammierte Tiere wurden mit 10^3 bis 10^6 cfu *L. monocytogenes* infiziert. Die Darstellung zeigt die Überlebenszeit in Tagen nach *Listeria*-Infektion im Verhältnis zum Bakterientiter, mit dem die Tiere infiziert worden waren. Das Experiment wurde am Tag 17 nach *Listeria*-Infektion beendet. Tiere, die keine erkennbaren Krankheitssymptome zeigten, wurden getötet.

Neonatale NIH/Ola Mäuse wurden wie zuvor beschrieben (siehe Abbildung II-17) in jeweils vier Gruppen mit Mo-NL oder Mo-GFP infiziert. Vier Gruppen erhielten keine MoMuLV-Infektion. Im Alter von sieben Wochen wurden die Tiere mit 10^3 , 10^4 , 10^5 oder 10^6 cfu des pathogenen Erregers *Listeria monocytogenes* intraperitoneal infiziert. Symptome und Krankheitsverlauf der Tiere wurde täglich beobachtet. Der LD_{50} in immunkompetenten NIH/Ola Mäusen für *L. monocytogenes* wurde zunächst bestimmt und lag bei einer Infektionsdosis von ca. 10^4 cfu *Listeria* pro Tier. Die Infektion mit mehr als 10^4 cfu *L. monocytogenes* hatte meist einen letalen Verlauf. Die erst nach einigen Tagen einsetzende zelluläre Immunantwort ist dann nicht mehr in der Lage die hohen Titer des Bakteriums zu kontrollieren.

Die fortschreitende *Listeria*-Infektion war gekennzeichnet durch eine Verlangsamung der Tiere, struppiges Fell, reduzierte Nahrungsaufnahme und Gewichtsabnahme. Moribunde Tiere

wurden getötet, Milz und Leber auf Veränderungen untersucht und *Listeria* aus Organmaterial reisoliert, sowie die Bakterien-Titer bestimmt. Da die Organe von moribunden Tieren entnommen wurden, kann angenommen werden, dass die Tiere von selbst innerhalb weniger Stunden an den Folgen der Listerien-Infektion gestorben wären. Daher wurde der Tötungstag als Todestag angenommen und die Mortalität in Überlebenstagen nach Listerieninfektion der einzelnen Tiere in Abbildung II-18 graphisch dargestellt. Bei keinem der auf der x-Achse angegebenen Listerieninfektionstiter war eine Veränderung der Mortalität Mo-NL-infizierter Tiere (schwarze Symbole) im Vergleich zu den anderen Gruppen festzustellen. Die Expression von Nef schien die Immunantwort der Mo-NL-infizierten Tiere nicht soweit zu beeinträchtigen, dass sie zu einem beschleunigten Verlauf der Listeriose geführt hätte. Um eine möglicherweise veränderte Vermehrung der Listerien in Organen Mo-NL-infizierter Tiere zu untersuchen wurden die Bakterientiter in der Milz und in der Leber bestimmt. Die den moribunden Tieren entnommenen Organe wurden gewogen und in einem Mörser lysiert. Für jedes Organ wurden sechs Verdünnungsstufen von 10^{-2} bis 10^{-8} hergestellt, auf Blutagarplatten ausgestrichen und drei Tage inkubiert. Aus der Zahl der gewachsenen Kolonien konnten die Listerientiter pro mg Organ errechnet werden. Mit niedrigen Listerienzahlen infizierte Tiere waren auch nach 17 Tagen noch ohne Krankheitssymptome. Das Experiment wurde daher zu diesem Zeitpunkt abgebrochen. Milz und Leber der verbliebenen Tiere wurden ebenfalls entnommen und titriert. In mit 10^3 Listerien infizierten Mäusen wurden niedrige Titer von $<5 \times 10^3$ pro mg Organ reisoliert. Bei einer um das zehnfache höheren Infektionsdosis wurde in zwei Tieren mehr als 10^6 Listerien in Milz und Leber gefunden, was zum Tod der Tiere nach zehn Tagen führte. Tiere, die mit höheren Bakterienzahlen infiziert wurden erlagen bereits nach 3-5 Tagen der Infektion und hatten hohe Listerientiter von 10^6 bis $>10^8$ in Milz und Leber. Eine durch Nef-Expression ermöglichte verstärkte Vermehrung der Listerien in Mo-NL-infizierten Tieren konnte nicht beobachtet werden.

II.3.2.5 Titer spezifischer Antikörper MoMuLV-infizierter Mäuse gegen das Virus der lymphozytären Choriomeningitis

Werden Mäuse intraperitoneal mit 10^3 cfu des Virus der lymphozytären Choriomeningitis (LCMV) infiziert, so verläuft die Infektion in der Regel asymptomatisch, obwohl Virusreplikation in zahlreichen Gewebearten stattfindet und hohe LCMV-Titer in der Milz gefunden werden. Die Infektion wird rasch kontrolliert und meist nach einigen Wochen eliminiert. Der zelluläre Arm der Immunantwort, insbesondere durch T-Helferzellen stimulierte zytotoxische T-Zellen spielten dabei eine wesentliche Rolle (140). Auch in Tieren, in denen T-Zellen selektiv depletiert wurden, konnte eine Kontrolle der LCMV-Infektion beobachtet werden. Diese wird vermutlich in der akuten Phase der Infektion durch natürliche Killerzellen und IgM produzierende B-Zellen und im späteren Verlauf unter anderem durch die Ausschüttung von IgG Antikörpern vermittelt.

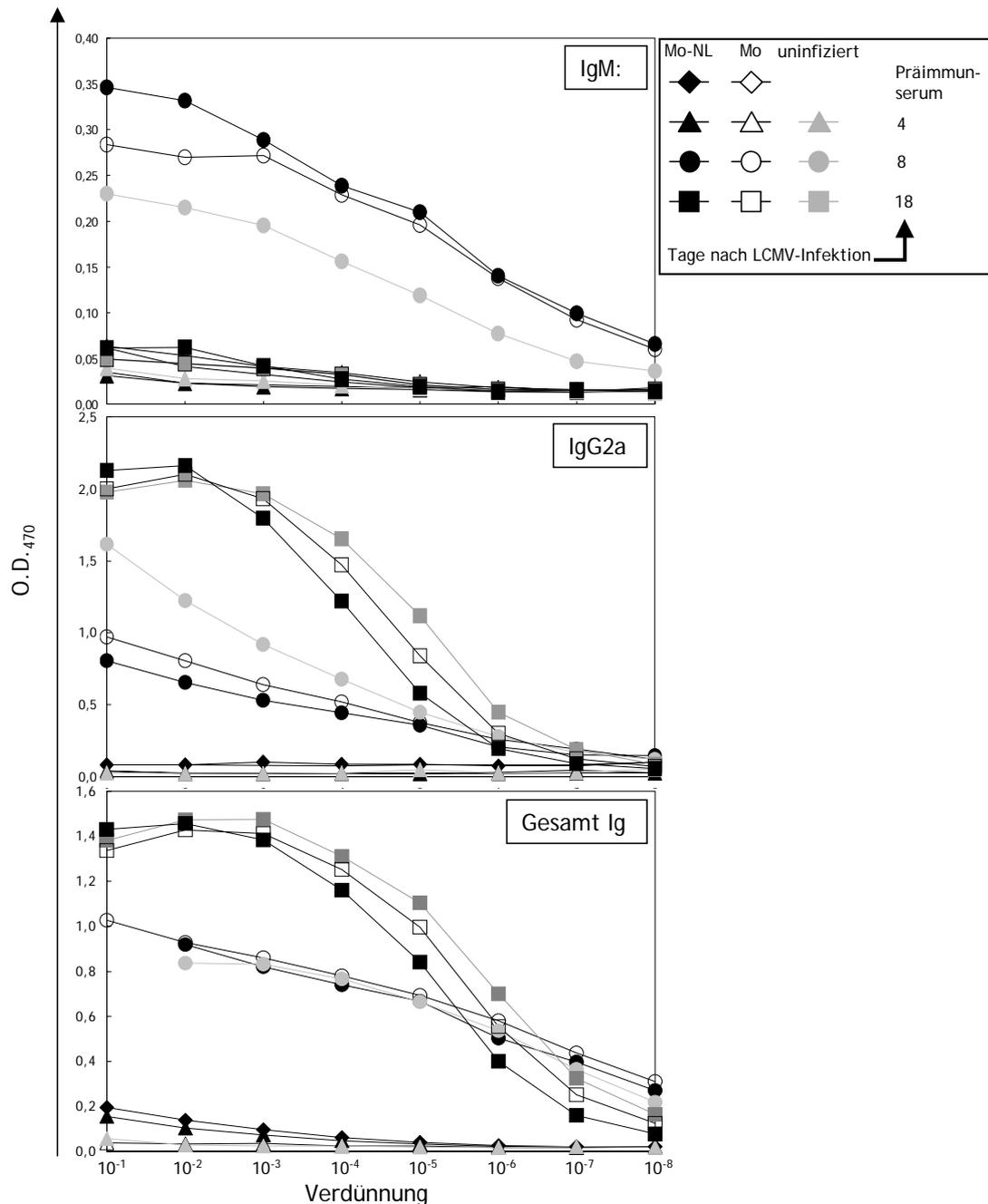


Abbildung II-19: Titration LCMV spezifischer Antikörper im Serum von MoMuLV-infizierten Mäusen.

Mit Mo-NL, Mo-GFP und Mo infizierte Mäuse wurden im Alter von sieben Wochen mit LCMV infiziert. Dargestellt sind Antikörpertiter von IgM, IgG2a und Gesamt Ig im Blut der Tiere vier, acht und 18 Tage nach LCMV Infektion. Die gezeigten Titer ergeben sich aus der O.D.₄₇₀ im ELISA serieller Proben-Verdünnungen, die gegen die Verdünnungsstufe graphisch aufgetragen sind.

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Immunantwort und die Kontrolle einer systemischen Infektion mit LCMV in MoMuLV-infizierten Mäusen verändert ist. Es wurden 12 Tiere mit Mo-NL, Mo-GFP und Mo infiziert. Sieben Wochen nach Infektion wurde den Tieren jeweils 10^3 cfu LCMV intraperitoneal verabreicht. Nach vier, acht und 18 Tagen wurden die Titer LCMV-spezifischer IgM, IgG2a und der Gesamt Ig Titer bestimmt. Zur Titration wurden

serielle Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-8} der Blutproben auf mit LCMV Antigen beschichtete ELISA Platten gegeben. Gebundene LCMV-spezifische IgM, IgG2a oder Gesamt-Ig wurden mit entsprechenden Sekundärantikörpern und einer folgenden Farbreaktion markiert. Die im Photometer bestimmten O.D.₄₇₀ spiegeln die Menge der im Blut enthaltenen LCMV-spezifischen Antikörper wieder und sind in Abbildung II-19 graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass die Kurven der Mo-NL-infizierten Mäuse zu den Zeitpunkten vier, acht und 18 Tage nach Infektion jeweils deckungsgleich mit den Kurven der Kontrolltiere verlaufen. Dies konnte bei den IgM, IgG2a und auch bei den Gesamt-Ig beobachtet werden (siehe Abbildung II-19). Zusammengefasst konnte in Mo-NL-infizierten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren kein Unterschied in den Titern LCMV spezifischer Antikörper festgestellt werden.

II.3.2.6 Nachweis LCMV spezifischer zytotoxischer T-Zellen

Mögliche Veränderungen LCMV spezifischer zytotoxischer T-Zellen (CTL) durch Mo-NL wurden in Zusammenarbeit mit Dr. O. Utermöhlen, Universität Köln, im ^{51}Cr -Freisetzungstest bestimmt. Es wurden mit rekombinanten MoMuLV infizierte Mäuse im Alter von sieben Wochen mit 3×10^5 cfu LCM Virus intraperitoneal infiziert. Nach acht Tagen wurden die Milzen der Tiere entnommen und kultiviert (Effektorzellen). Die Stimulation der Zellen erfolgte mit LCMV Antigen beladenen A20-Mauslymphoblastomzellen. Je eine Probe pro Tier wurde nicht stimuliert. Für den ^{51}Cr -Freisetzungstest wurden 3T3-Mausfibroblasten mit radioaktivem Natriumchromat markiert und mit LCMV Antigen beladen (Targetzellen). 3T3 Zellen besitzen ebenso wie Zellen des NIH/Ola Maus-Stammes MHC-I Moleküle vom Haplotyp 1q. Ein Übereinstimmen des MHC-I Haplotyps ist essentiell für eine effiziente Erkennung der beladenen Zielzellen durch spezifische CTLs der Milzzellkulturen. Im ^{51}Cr -Freisetzungstest wurden jeweils stimulierte und nicht stimulierte Effektorzellen mit Targetzellen in verschiedenen Zellzahlverhältnissen (50:1 bis 6.25:1) inkubiert. Zusätzlich wurde die spontane Freisetzung von ^{51}Cr ohne Effektorzellen, sowie die maximale Freisetzung durch gezielte Lyse aller Targetzellen gemessen. Die Bestimmung der spezifischen Lyse erfolgte durch Messung der γ -Strahlungen, wobei sich die spezifische Lyse aus dem Verhältnis zur maximalen ^{51}Cr -Freisetzung unter Berücksichtigung der spontanen ^{51}Cr -Freisetzung berechnet.

In Abbildung II-20 ist die spezifische Lyse der Targetzellen, durch Effektorzellen aus Mo-NL, Mo-GFP und Mo infizierten, sowie unbehandelten Tieren nach Aktivierung mit LCMV Antigen dargestellt. Jeder Balken repräsentiert eine unabhängige Tiergruppe. Die Mittelabweichung für die in Klammern angegebene Tierzahl der jeweiligen Gruppe ist durch Fehlerbalken dargestellt. Die spezifische Lyse aller Gruppen betrug zwischen ein und zwei Prozent der Targetzellen. Es konnten keine gruppenspezifischen Unterschiede festgestellt werden, Mo-NL hat also keinen Einfluß auf die Aktivität LCMV spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten.

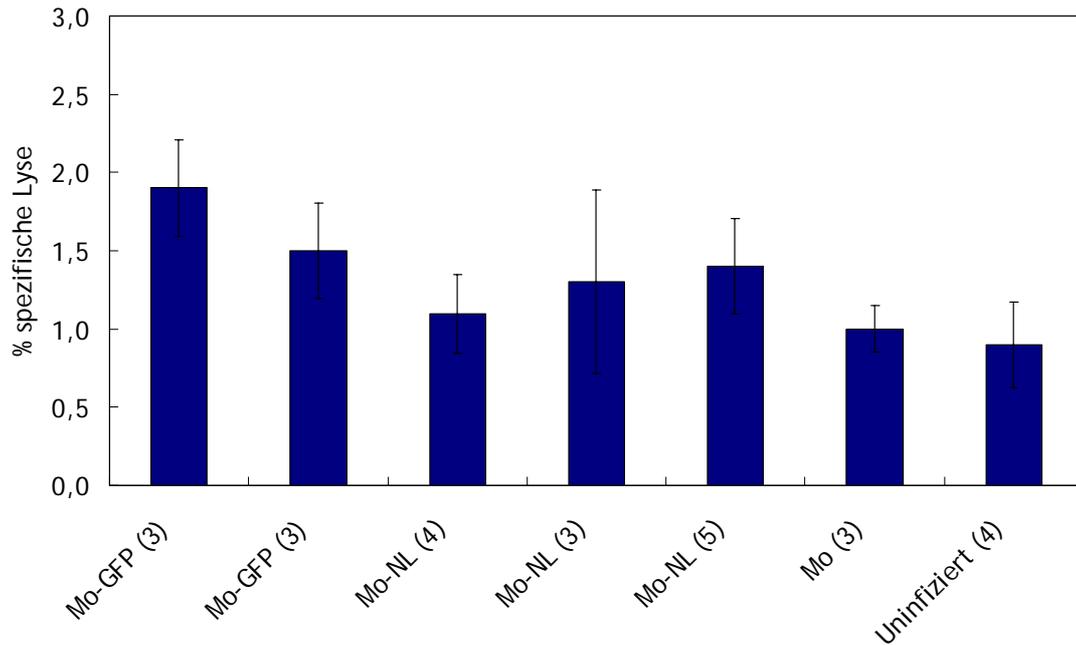


Abbildung II-20: ^{51}Cr -Freisetzungstest zum Nachweis LCMV spezifischer zytotoxischer T-Zellen aus mit rekombinanten MoMuLV infizierten Mäusen.

Im Alter von sieben Wochen wurden Mo-NL, Mo-GFP und Mo infizierte bzw. unbehandelte Mäuse mit 3×10^5 cfu LCMV intraperitoneal infiziert. Nach 8 Tagen wurden die Milzen entnommen und zytotoxische T-Zellen in Kultur mit LCMV Antigen stimuliert. Die Aktivität LCMV spezifischer CTLs wurde in Zusammenarbeit mit Dr. O. Utermöhlen, Köln, mit Hilfe von LCMV Antigen beladenen und mit radioaktivem Natriumchromat markierten 3T3 Mausfibroblasten im Cr^{51} -Freisetzungstest bestimmt. Die dargestellte spezifische Lyse errechnete sich aus freigesetzter Strahlung in Bezug auf die maximale ^{51}Cr -Freisetzung unter Berücksichtigung der spontanen ^{51}Cr -Freisetzung. Jeder Balken repräsentiert eine unabhängige Gruppe Tiere. Die Gruppengröße ist jeweils in Klammern angegeben.

II.3.2.7 Die Infektion von Mäusen mit Mo-NL beeinflusst die T-Zellantwort gegen das Virus der lymphozytären Choriomeningitis

II.3.2.7.1 Versuchsschema zur Induktion einer *delayed type hypersensitivity* Reaktion mit lymphozytärem Choriomeningitis-Virus in Mäusen

In den vorangegangenen Experimenten wurde beschrieben, dass in Mo-NL-infizierten Mäusen weder die Zahl an CD4^+ und CD8^+ T-Zellen reduziert ist, noch die Expressionslevel an CD4 auf der Oberfläche von T-Zellen durch Mo-NL reduziert wird. Das Auftreten von opportunistischen Augeninfektionen legt jedoch einen immunologischen Defekt nahe.

Um die Funktionalität CD4^+ und CD8^+ T-Lymphozyten zu analysieren wurden neonatal mit MoMuLV infizierte Mäuse im Alter von sieben Wochen mit lymphozytärem Choriomeningitisvirus (LCMV) infiziert (siehe Schema Abbildung II-21). Der Zeitpunkt der LCMV-Infektion wurde gewählt, da sich im Alter von sieben Wochen bereits ein kompetentes Immunsystem etabliert hat, die Immunreaktion aber noch nicht durch das Auftreten von T-Zell-Leukämien beeinflusst wird. Die Injektion von 3×10^5 cfu LCMV in jeweils eine Hinterpfote MoMuLV-infizierter Mäuse führte zur Ausbildung eines lokalen Entzündungsherds, genannt *delayed type hypersensitivity* (DTH) Reaktion.

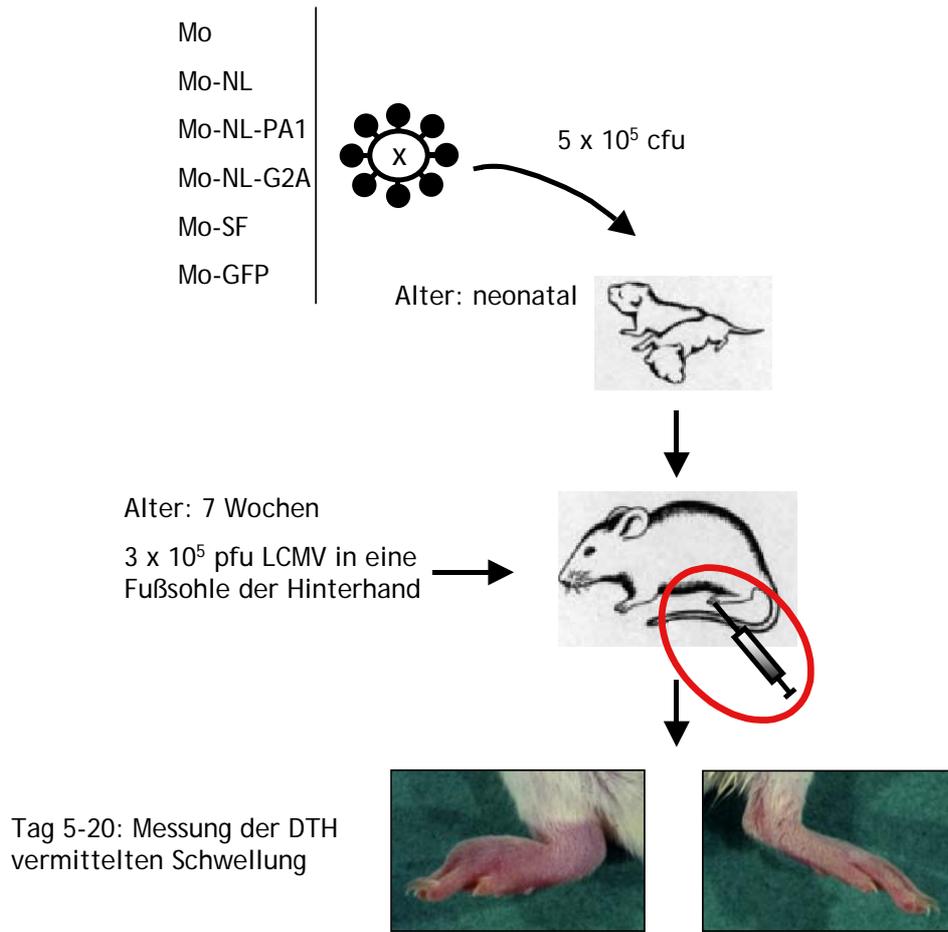


Abbildung II-21: Schematische Darstellung zur Induktion einer LCMV spezifischen *delayed type hypersensitivity* (DTH) Reaktion in der Fußsohle MuLV-infizierter Mäuse.

Neonatale Mäuse wurden mit 1×10^5 cfu rekombinanter MoMuLV infiziert. Im Alter von sieben Wochen erfolgte eine Infektion mit 3×10^5 pfu LCMV in je eine Fußsohle der Hinterhand der Tiere. Die Infektion induzierte ab Tag 5 eine lokale auf rund 14 Tage begrenzte Entzündung und löste eine Immunantwort $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen aus, welche zu einer Schwellung der Fußsohle führte. Diese wurde gemessen und in Relation zum Durchmesser der nicht-infizierten Hinterhand des selben Tieres gesetzt.

Die durch LCMV induzierte DTH-Reaktion in Mäusen wurde in zahlreichen Studien als System zur funktionellen Analyse von T-Zellantworten etabliert und beschrieben (128, 141, 171, 173). Sie ist gekennzeichnet durch eine am fünften Tag nach der LCMV-Infektion einsetzende starke Schwellung, die nach etwa 20 Tagen wieder abklingt. Die Schwellungsreaktion wird bedingt durch die massive Zytokin-Ausschüttung einwandernder T-Zellen und setzt sich aus zwei überlagerten, aber voneinander unabhängigen Phasen zusammen. Aus Studien, in welchen bestimmte T-Zell-Spezies von Mäusen selektiv depletiert wurden, konnte geschlossen werden, dass die erste initiale Phase der DTH durch $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (CTL), die zweite Phase durch $CD4^+$ T-Zellen vermittelt wird. Die $CD4$ -abhängige Phase der DTH benötigt die Anwesenheit von Monozyten oder anderen mononukleären Zellen. Im Gegensatz dazu ist die CTL-vermittelte Entzündungsreaktion unabhängig von Monozyten, benötigt jedoch einen Stimulus z.B. durch T-Helferzellen, oder die Ausschüttung von IL2. Der Verlauf der LCMV induzierten DTH in nach dem Schema der Abbildung II-21 mit rekombinanten MoMuLV-infizierten Mäusen, wurde in den folgenden Experimenten gemessen und verglichen. Eine

Reduktion der DTH, d.h. eine im Vergleich zu den Kontrollen niedriger verlaufende Schwellungsreaktion in Mo-NL-infizierten Tiere würde also eine Beeinträchtigung der CD4 oder CD8 vermittelten Immunantwort in diesen Tieren zeigen.

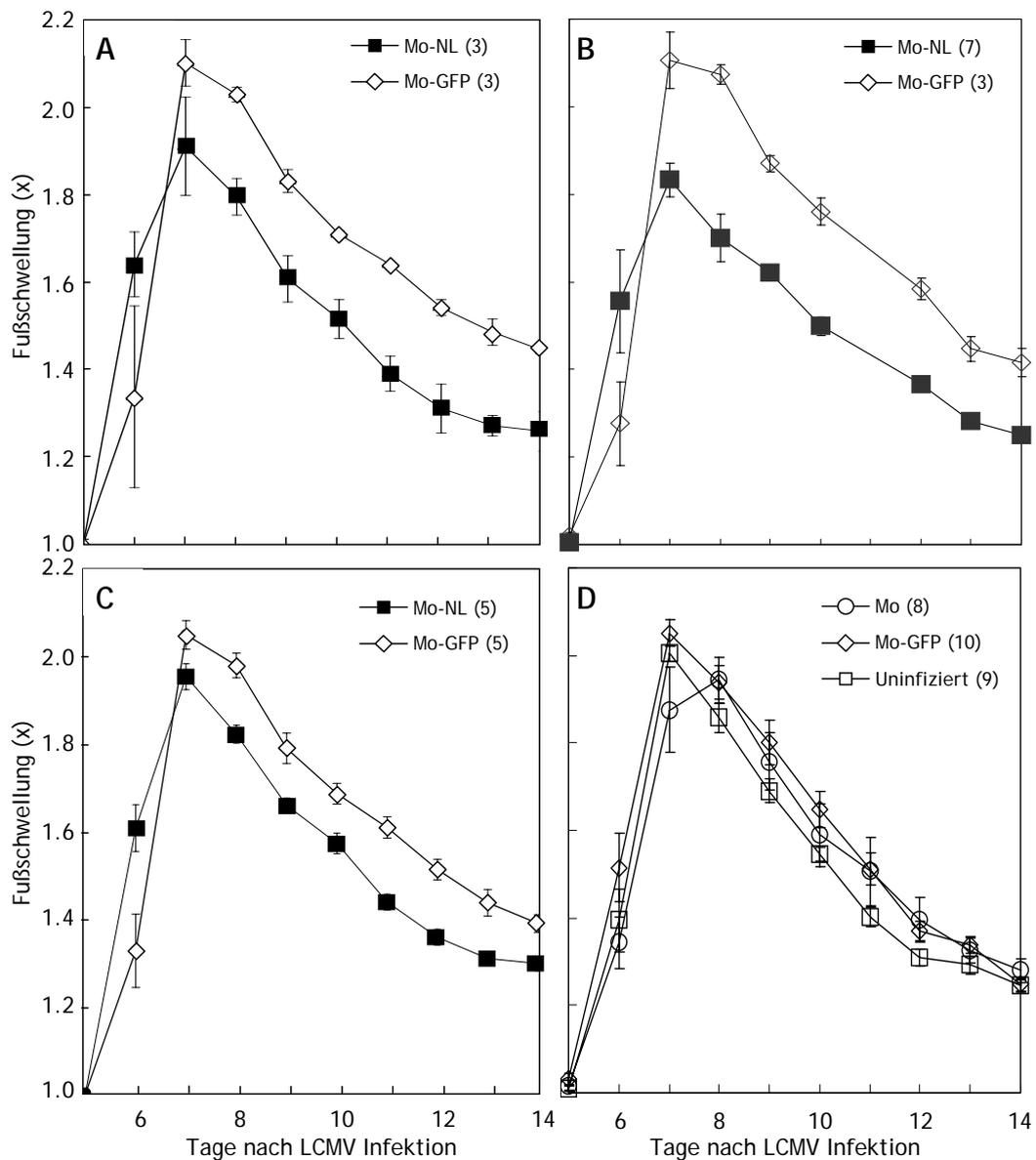


Abbildung II-22: Vergleich LCMV induzierter DTH Reaktionen der Fußsohle MoMuLV-infizierter Mäuse.

NIH/Ola Mäuse wurden wie in Abbildung II-21 beschrieben neonatal mit rekombinanten MoMuLV infiziert. Nach sieben Wochen wurden die Tiere mit LCMV infiziert und der Verlauf der DTH-Reaktion gemessen. Die Darstellungen zeigen den Schwellungsfaktor des gesunden im Vergleich zum LCMV infizierten Fußballen über die Zeit. Die Gruppengrößen sind jeweils in Klammern angegeben. Jeder Datenpunkt zeigt den durchschnittlichen Schwellungsfaktor der für jede Gruppe angegebenen Tierzahl, sowie den Standardfehler des Mittelwertes.

(A-C) DTH-Reaktion aus drei unabhängigen Experimenten für von Mo-NL-infizierte Tiere im Vergleich zur Mo-GFP Kontroll-Gruppe.

(D) Darstellung der DTH Reaktion Mo-GFP oder Mo infizierter Tiere im Vergleich zu uninfizierten Tieren.

II.3.2.7.2 Mo-NL-infizierte Mäuse zeigen eine reduzierte LCMV-spezifische DTH-Reaktion

Zur Bestimmung der LCMV-spezifischen DTH-Reaktion wurden neonatale Mäuse mit rekombinanten MoMuLV infiziert (siehe Abbildung II-21). Sieben Wochen nach Infektion wurde je eine Hinterhand der Tiere mit LCMV infiziert. Die nach rund fünf Tagen einsetzende DTH vermittelte Schwellung des infizierten Fußes aller Tiere wurde gemessen und in Relation zum uninfizierten Fuß gesetzt. Die Messungen an Mo-NL- und Mo-GFP-infizierten Tieren von Tag 5 bis 15 nach LCMV Infektion wurden in Abbildung II-22A-C für drei voneinander unabhängige Experimente graphisch dargestellt. Die Tierzahl jeder Gruppe ist jeweils in Klammern angegeben. Die durch die Entzündung hervorgerufene Schwellung der Hinterhände begann in allen Tieren erwartungsgemäß rund fünf Tage nach LCMV Infektion und stieg zunächst auf ein Maximum vom zweifachen des jeweiligen gesunden Fußes an. Danach gingen die Schwellungen graduell zurück. Es fiel auf, dass Mo-NL-infizierte Tiere im Vergleich zu Mo-GFP-infizierten Mäusen eine verminderte Schwellungsreaktion zeigten. Dieser Unterschied war von Tag 7 bis Tag 14 nach LCMV-Infektion besonders deutlich. Die Signifikanz dieses Phänotyps konnte in drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden (Abbildung II-22A-C). Die reduzierte Schwellungsreaktion im späten Verlauf der DTH-Reaktion deutet auf eine Beeinträchtigung der Immunreaktion CD4⁺-T-Zellen hin.

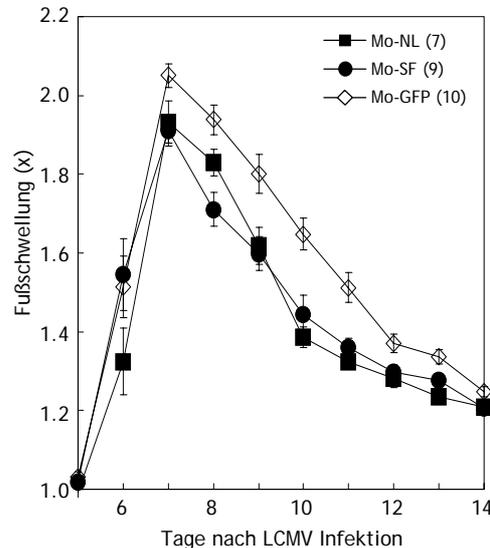


Abbildung II-23: DTH-Reaktion Mo-NL-infizierter Tiere im Vergleich zu Mo-SF infizierten Tieren.

NIH/Ola Mäuse wurden wie in Abbildung II-21 beschrieben neonatal mit Mo-NL, Mo-SF, Mo-GFP infiziert. Nach sieben Wochen wurden die Tiere mit LCMV infiziert und der Verlauf der DTH-Reaktion gemessen. Gezeigt ist ein Vergleich der DTH-Reaktion der Nef Allele von HIV NL4.3 und HIV SF2 im Vergleich zur GFP Kontrolle. Die Darstellungen zeigen den Schwellungsfaktor des gesunden im Vergleich zum LCMV infizierten Fußballen über die Zeit. Die Gruppengrößen sind jeweils in Klammern angegeben. Jeder Datenpunkt zeigt den durchschnittlichen Schwellungsfaktor der für jede Gruppe angegebenen Tierzahl, sowie den Standardfehler des Mittelwertes.

In Kontrollexperimenten wurde die LCMV-vermittelte DTH-Reaktion Mo-GFP und Mo infizierter bzw. uninfizierter Mäuse verglichen (Abbildung II-22D). Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Schwellungsverlauf der einzelnen Gruppen festgestellt werden. Der Verlauf der Schwellungsprofile war von Tag 5 bis 15 nach LCMV-Infektion nahezu identisch. Die Infektion mit Mo und die Expression von GFP beeinflussten den Verlauf der DTH nicht.

Die Gültigkeit dieses Nef spezifischen Phänotyps wurde auch für das Nef-Protein des HIV-1 SF2 Stammes untersucht. Wie im Schema der Abbildung II-21 dargestellt wurden NIH/Ola Mäuse mit Mo-NL, Mo-SF und Mo-GFP infiziert und durch die Injektion von 3×10^5 cfu LCMV eine DTH Reaktion in der Fußsohle der Tiere induziert. Der Verlauf der Fußschwellungen von Tag 5 bis 15 ist in Abbildung II-23 dargestellt. Die Gruppengröße ist jeweils in Klammern angegeben. Der Verlauf der DTH Mo-SF infizierter Mäuse entspricht weitgehend deckungsgleich dem der Mo-NL-infizierten Mäuse. Nef-Protein beider Allele beeinträchtigt somit gleichermaßen die lokale Immunreaktion CD4 und CD8 positiver T-Zellen.

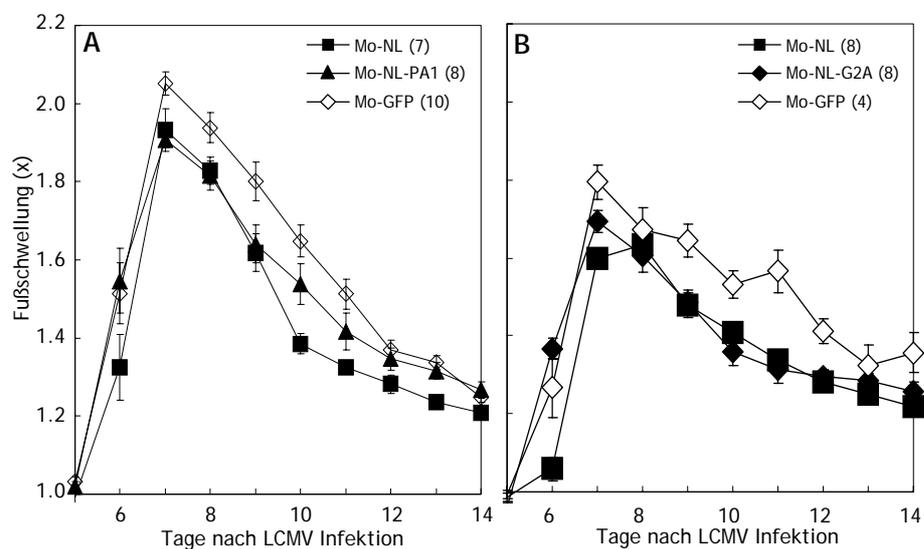


Abbildung II-24: Vergleich des DTH-Verlaufs von Mo-NL mit den Nef-Mutanten Mo-NL-G2A und Mo-NL-PA1.

NIH/Ola Mäuse wurden wie in Abbildung II-21 beschrieben neonatal mit Mo-NL, Mo-NL-PA1, Mo-NL-G2A, Mo-GFP infiziert. Nach sieben Wochen wurden die Tiere mit LCMV infiziert und der Verlauf der DTH-Reaktion gemessen. Der Verlauf der DTH von Mo-NL und Mo-GFP wurde jeweils mit Mo-NL-PA1 (A) und Mo-NL-G2A (B) verglichen. Die Darstellungen zeigen den Schwellungsfaktor des gesunden im Vergleich zum LCMV infizierten Fußballen über die Zeit. Die Gruppengrößen sind jeweils in Klammern angegeben.

Um auch die funktionellen Nef Mutanten Mo-NL-PA1 und Mo-NL-G2A auf Veränderungen im Verlauf der DTH zu untersuchen wurde jeweils eine Gruppe Mäuse mit den rekombinanten MoMuLV infiziert. Als Kontrolle dienten Wildtyp Nef (Mo-NL) und Mo-GFP-infizierte Tiere. Im Alter von sieben Wochen wurden je eine Hinterhand der Tiere mit LCMV infiziert und die DTH Reaktion gemessen. Gruppengrößen und Verlauf der DTH sind in Abbildung II-24 dargestellt. Das in der SH3-Bindungsstelle von Nef defekte Mo-NL-PA1 (Abbildung II-24A) zeigte bis zum Tag 9 nach LCMV Infektion einen mit Mo-NL deckungsgleichen Verlauf der DTH. Ab Tag neun ebte die Schwellung jedoch langsamer ab, als bei Mo-NL. Die DTH zeigte einen intermediären Verlauf zwischen Mo-NL und der Mo-GFP Kontrolle. Der DTH-Verlauf des myristilierungsdefekten

Nef-Proteins Mo-NL-G2A (Abbildung II-24B) entsprach völlig dem von Mo-NL. Trotz fehlender Membranlokalisation und reduzierter Signalübertragungsaktivität dieser Nef Mutante konnte keine Veränderung im DTH-Verlauf festgestellt werden, d.h. Mo-NL-G2A zeigte in diesem Experiment volle Aktivität.

II.3.3 *Ex vivo* Charakterisierung von Nef-Funktionen in primären Mauszellen

II.3.3.1 *Etablierung eines Systems zur Expression von Nef in primären Mauszellen*

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob Nef in primären Splenozyten des NIH/Ola Mausstammes funktionell ist. Studien an Nef-transgenen Mäusen, die ein AIDS-ähnliches Krankheitsbild entwickeln deuten zumindest darauf hin, dass Nef in Mauszellen funktionell ist (107). Es sollten zwei in Zellkultur und humanen Primärzellen gut dokumentierten Funktionen von Nef - Herunterregulierung von CD4 von der Zelloberfläche und Assoziation von Nef-Expression und Kinase-Aktivierung - untersucht werden, um zu zeigen, dass das gewählte Mauszellensystem zur Untersuchung der Rolle von Nef als Pathogenesefaktor geeignet ist. Weiterhin sollte die Signifikanz der zuvor beschriebenen Daten des Infektionsmodells Mo-NL-infizierter Mäuse, überprüft werden. Da die Untersuchung von Nef-Funktionen in Mo-NL-infizierten Mauszellen problematisch ist, wurde ein System zur Transfektion primärer Mauszellen etabliert. Nef sollte dabei als Nef.GFP-Fusionsprotein exprimiert werden. Hierzu wurden primäre Splenozyten von fünf NIH/Ola Mäusen entnommen, mit einem Zellsieb vereinzelt und mit IL2 und Concavalin A für 24h stimuliert, danach unter IL2 allein gehalten. Nach 72h wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden für Nef.GFP, G2Anef.GFP, EDAANef.GFP, AxxANef.GFP oder GFP nach einem optimierten Protokoll mit Amaxa-Lösung elektroporiert. Die Plasmide kodierten für Nef.GFP Fusionsproteine, die von *nef* des HIV-SF2 Stammes abgeleitet worden waren. Die Expression erfolgte unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Ein Schema zur Durchführung des Elektroporationsexperimentes ist in Abbildung II-25 gezeigt. Nach 24h wurden die Zellen für die FACS-Analyse (siehe II.3.3.2) und den *in vitro* Kinase Assay (IVKA) verwendet. In einem Vorexperiment wurden zunächst die Expressionslevel von Nef.GFP im FACS überprüft. Die Zytotoxizität der Elektroporation unter anderem durch die verwendete Amaxa-Lösung war mit etwa 60-70% lysierten Splenozyten zwar hoch, in den lebenden Zellen exprimierten aber rund 20 bis 30% das Nef.GFP Fusionsprotein mit einer relativen Fluoreszenzintensität bis zu $>10^3$. Nef.GFP wurde also trotz der zytotoxischen Wirkung der Elektroporation in deutlich mehr Zellen und in wesentlich größerer Menge exprimiert, als beispielsweise in Splenozyten, die mit pseudotypisierten, für *nef.gfp* kodierenden lentiviralen Partikeln transduziert worden waren (Daten nicht abgebildet).

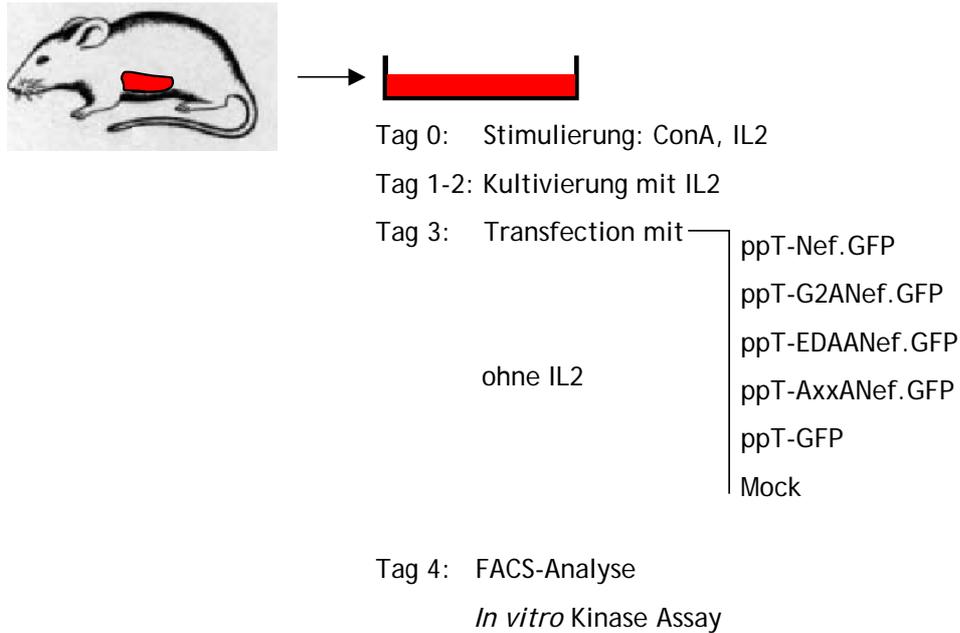


Abbildung II-25: Experimentelles System zur Analyse charakteristischer Nef-Funktionen in primären Mauszellen.

Splenozyten unbehandelter 8-12 Wochen Alter NIH/Ola Mäuse wurden vereinzelt, mit ConA und IL2 24h stimuliert und unter IL2 weiter gehalten. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten elektroporiert und ohne IL2 kultiviert. Die Analyse der Zellen im FACS und im *in vitro* Kinase Assay erfolgte einen Tag nach Transfektion.

II.3.3.2 Senkung der CD4-Expression auf der Oberfläche primärer Maussplenozyten durch Nef

Das Nef-Protein von HIV interagiert über Adapterkomplexe mit der endozytotischen Transportmaschinerie infizierter Zellen. Die Herunterregulierung von CD4 verhindert vermutlich eine Überinfektion der Zelle und reduziert Interaktionen der Virus-Hülle knospender Partikel mit der virusproduzierenden Zelle (133, 204). Diese Funktion ist in *nef*-Allelen aller bekannten Lentiviren konserviert.

Um die Funktionalität des Nef-Proteins in primären Mauszellen zu untersuchen, wurde die CD4-Herunterregulation in Splenozyten analysiert, die ein vom HIV NL4.3 Stamm abgeleitetes Nef.GFP Fusionsprotein exprimieren. Hierzu wurden je 5×10^6 Splenozyten mit Nef.GFP oder den in Abbildung II-25 angegebenen Nef-Mutanten transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit α -CD3-CyCr, α -CD4-APC und α -CD8-PE markiert und in Zusammenarbeit mit Dr. O.T. Keppler in einer vier Farben FACS Analyse untersucht. Zur Darstellung und Analyse der markierten Oberflächenmoleküle wurden zunächst lebende Zellen anhand von Erfahrungswerten über ihre Größe und Granularität (*forward scatter* und *side scatter*) im FACS identifiziert. Innerhalb dieser Population konnten durch die Analyse der Fluoreszenzkanäle für Cychrome™ (CyCr) und Phytoerythrin (PE) CD3- bzw. CD8-positive und negative Zellen voneinander unterschieden werden. Durch das Setzen von FACS-gates konnte auf diese Weise die Population CD3-positiver Lymphozyten, die nicht zu den CD8⁺ T-Zellen gehörte, analysiert

und auf ihre CD4-Expression untersucht werden. Da die Anregungswellenlängen und die Emissionsmaxima der Fluoreszenz von GFP und α -CD4-APC sich nicht überschneiden, wurden durch Streustrahlung erzeugte, falsch positive Messungen vermieden. Ein repräsentatives Experiment ist in Abbildung II-26A dargestellt. Die Dot Plots zeigen die relative Fluoreszenzintensität der CD4-Expression in Abhängigkeit zur Expression des entsprechenden Nef.GFP Konstruktes von lebenden $CD3^+/CD8^-$ Zellen, die GFP exprimieren. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von CD4 ist angegeben. In Abbildung II-26B wurden die Durchschnittswerte der relativen CD4 Expression von jeweils fünf Tieren graphisch dargestellt. Die GFP-Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Der arithmetische Mittelwert und Standardfehler sind gezeigt.

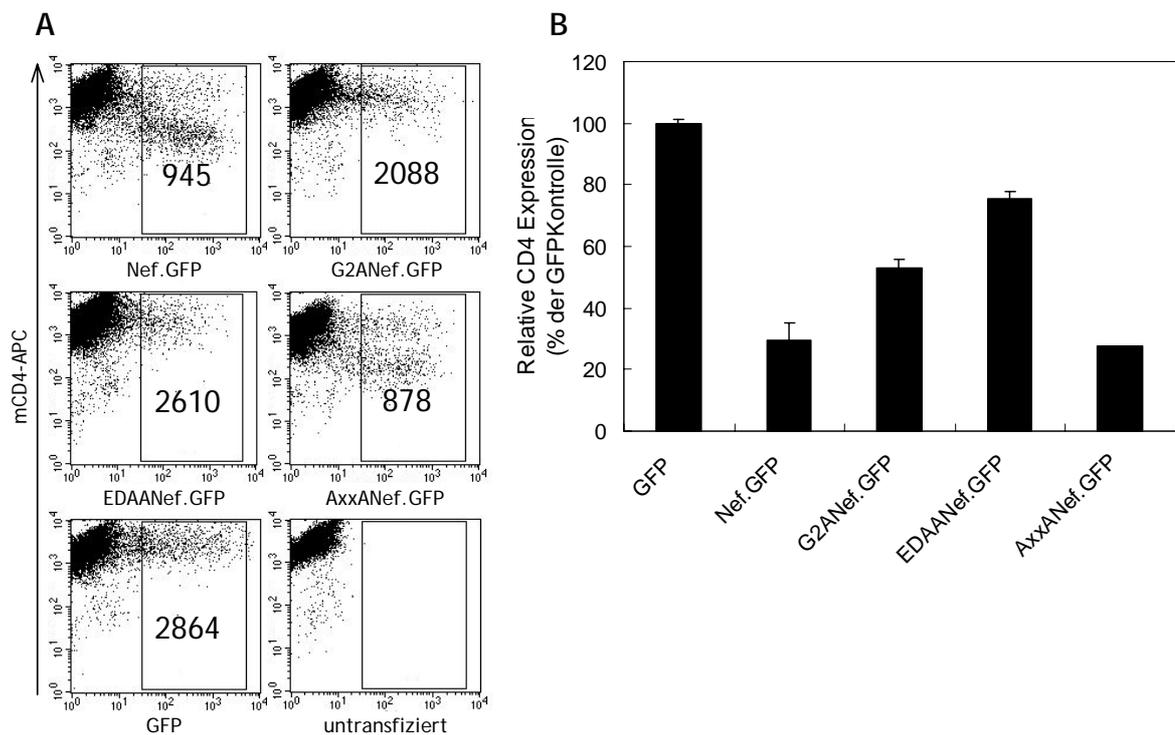


Abbildung II-26: Nef spezifische CD4-Internalisierung von der Oberfläche CD4 positiver T-Lymphozyten.

Nach dem Schema in Abbildung II-25 transfizierte Splenozyten wurden einen Tag nach Transfektion α -CD3-CyCr, α -CD4-APC und α -CD8-PE markiert und im FACS analysiert.

(A) Im FACS wurden lebende GFP-positive $CD3^+/CD8^-$ Milzzellen identifiziert und auf ihre durchschnittliche relative CD4-Expression untersucht. Die repräsentativ dargestellten Dot Plots zeigen die Fluoreszenzintensität α -CD4-APC markierter GFP-positiver, CD8-negativer T-Lymphozyten, die mit den angegebenen Nef.GFP Expressionsplasmiden transfiziert worden waren. Der Wert der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität für CD4-APC ist jeweils angegeben.

(B) Die relative CD4-Expression auf der Oberfläche von Milzzellen, die mit den angegebenen Nef.GFP Fusions-Konstrukten transfiziert wurden und GFP exprimieren, wurde wie in (A) beschrieben ermittelt. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität für CD4-APC ppT-GFP transfizierter Zellen wurden auf 100% gesetzt. Die Werte mit den angegebenen Standardfehlern entsprechen dem Durchschnitt aus drei unabhängigen Experimenten.

Nef.GFP Expression führte zur einer Reduktion der CD4 Expression auf etwa 30% der GFP Kontrolle. Die Myristilierungsmutante lag in der CD4 Herunterregulation bei etwa 50%, die EDAANef.GFP Mutante bei 80% der GFP Kontrolle. Die Mutation der SH3-Bindungsstelle (AxxANef.GFP) hatte im Vergleich zu Nef.GFP erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Reduktion der CD4-Menge an der Zelloberfläche.

Es konnte also gezeigt werden, dass Nef zur Senkung der CD4-Expression von der Oberfläche primärer Maus-Splenozyten führt. Nef-Mutanten, von denen in humanen Zellen eine reduzierte Fähigkeit zur CD4 Herunterregulation gezeigt wurde (G2ANef.GFP, EDAANef.GFP) zeigten in Mauszellen den erwarteten Phänotyp. Daher kann angenommen werden, dass die Nef vermittelte Oberflächenreduktion von CD4 in Mauszellen spezifisch ist und in der Funktionalität mit dem humanen System übereinstimmt.

II.3.3.3 Die Expression von Nef assoziiert mit der Phosphorylierung der p21-aktivierten Kinase

Durch die Assoziation von HIV-1 Nef mit der p21-aktivierten Kinase (Pak) wird die Phosphorylierung von Bad und damit anti-apoptotische Signale der Zelle induziert (253). Zudem führt die Aktivierung von Pak durch Nef zu Umstrukturierungen des Zytoskeletts und zur Zell-Aktivierung (73). Diese Effekte von Nef sind möglicherweise relevant für die effiziente Replikation und Pathogenese von HIV. Die Induktion von Pak erfolgt über die Interaktion von Nef mit dem Protoonkongen und Guanin Austauschfaktor Vav und die kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42 (74). Die Assoziation von Nef mit Pak und deren Aktivität erfordern das Prolin- reiche Motiv, sowie ein Diarginin-Motiv im Kernbereich von Nef. Die Expression einer 62 kD großen p21-aktivierten Kinase wurde auch in der Maus beschrieben (17).

Es sollte im folgenden in einem *in vitro* Kinase Assay (IVKA) untersucht werden, ob die Expression von Nef auch in murinen Primärzellen zu einer Phosphorylierung des Nef-assozierten Kinase Komplexes führt. Hierzu wurden primäre Splenozyten einer NIH/Ola Maus wie in II.3.3.1 präpariert, stimuliert und kultiviert. Zur Expression von Nef.GFP, G2ANef.GFP, EDAANef.GFP, AxxANef.GFP Fusionsproteinen und GFP (Abbildung II-25) wurden die Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmide (siehe II.3.3.1) transfiziert. Als Kontrolle wurden humane Jurkat-T Zellen mit den verschiedenen Nef.GFP-Plasmiden transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und analysiert. Nef.GFP Fusionsprotein wurde mit einem polyklonalen α -GFP Antikörper gebunden und mit Protein-A-Sepharose präzipitiert. Mit Nef.GFP assoziierte Proteine wurden hierbei kopräzipitiert. Nach der Bindung wurde ein *in vitro* Kinase Assay (IVKA) durchgeführt und mit dem Nef.GFP Protein assoziierte Kinasen radioaktiv mit ^{32}P markiert. Nach der Phosphorylierungsreaktion wurden die Proben auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und radioaktiv markierte Nef.GFP assoziierte Proteine auf einem Röntgenfilm dargestellt. Der IVKA mit Nef.GFP Protein transfizierter Splenozyten bzw. Jurkat-T Zellen ist in Abbildung II-27 dargestellt. Im verwendeten Zell-Lysat enthaltenes Nef.GFP Protein wurde im Western-Blot mit monoklonalen α -Nef Antikörpern nachgewiesen. Dieser ist für Maus-Splenozyten und Jurkat-T Zellen jeweils unter dem IVKA dargestellt. Der IVKA zeigt eine

charakteristische Bande bei etwa 62 kD in Nef.GFP transfizierten Zellen. Die Mutanten G2ANef.GFP und AxxANef.GFP zeigten die entsprechende Bande nicht, während die EDAA.Nef.GFP Mutante eine dem Nef.GFP entsprechende Phosphorylierungsbande zeigt. In allen Proben wurde im Western-Blot Nef.GFP Protein bei rund 62 kD detektiert. Die Größen der Banden im IVKA der Splenozyten entsprechen denen der humanen Jurkat-T Zellen, ebenso wie das Ausbleiben der radioaktiven Bande in den mit den entsprechenden Mutanten transfizierten Zellen. Bei der 62 kD großen radioaktiv markierten Bande handelt es sich sehr wahrscheinlich um die in der Literatur beschriebenen durch Assoziation mit Nef phosphorylierten Serin/Threonin Kinase Pak.

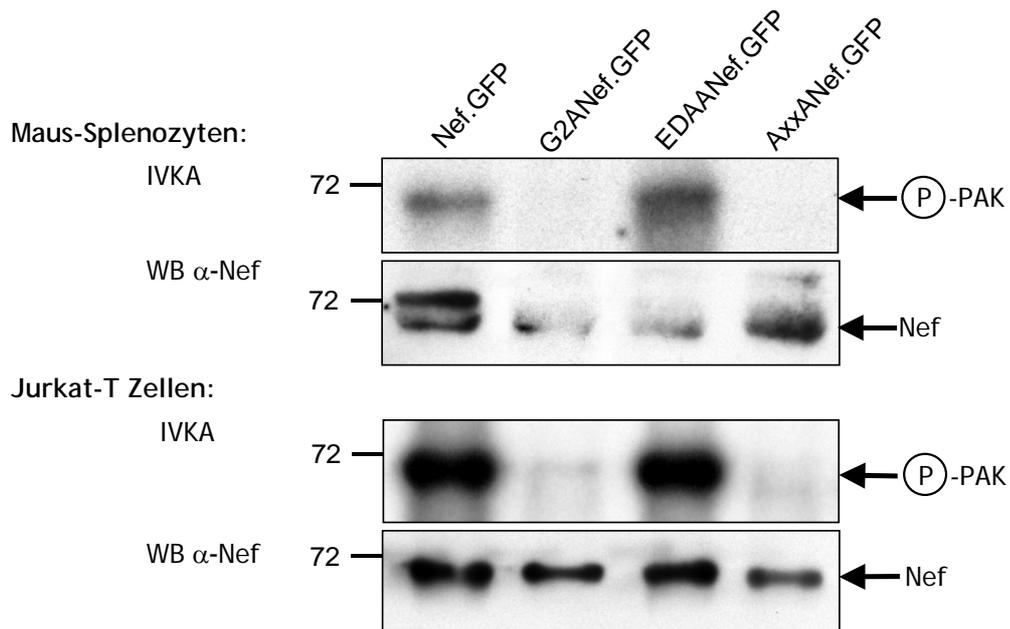


Abbildung II-27: Nef-Expression korreliert mit der Phosphorylierung einer Kinase in primären Maus-Splenozyten.

Maus-Splenozyten wurden nach Abbildung II-25 mit den angegebenen Nef.GFP Konstrukten transfiziert.

Die Abbildung zeigt die Assoziation von Nef.GFP Expression und Kinase Aktivität in transfizierten Maus Splenozyten (obere Blots) oder Jurkat-T Zellen (untere Blots). Die primären Zellen wurden nach der Entnahme 24h mit ConA und IL2 stimuliert. Gezeigt sind Autoradiogramme von *in vitro* Kinase Assays (IVKA) aus α -GFP Immunpräzipitaten der Lysate von Zellen, die das jeweils angegebene Nef.GFP Fusionsprotein exprimierten. Die Nef assoziierte Kinase ist charakterisiert durch ein spezifisch bei 62 kD auftretendes Phosphoprotein, wahrscheinlich autophosphorylierte Pak. Die jeweils unteren Blots (WB α -125Nef) zeigen Western-Blots der Zell-Lysate, die für den IVKA verwendet wurden.

III. Diskussion

III.1 Die Rolle des Nef-Proteins in der HIV-Pathogenese

Zelluläre Rezeptoren und Signalübertragungswege sind Werkzeuge der Zelle um mit ihrer Umwelt zu interagieren, bzw. diese zu kontrollieren. Oberflächenrezeptoren CD4-positiver T-Lymphozyten sind wichtige Faktoren bei der Signalübertragung und Aktivierung der Zelle. Sie induzieren die Ausschüttung von Zytokinen. Diese sind wichtig für die Aktivierung verschiedener Mechanismen der Zelle, wodurch diese sich selbst vor Angriffen pathogener Erreger schützen kann (97). Für ein Virus wie HIV ist es daher vorteilhaft ein Protein, wie Nef zu kodieren, welches Immunreaktionen durch direkte Manipulation der entsprechenden Signal- oder Rezeptormoleküle beeinträchtigen kann.

Nef ist ein wichtiger Pathogenese-Faktor von HIV (72, 97, 233, 246) für den vor allem *in vitro* zahlreiche Funktionen beschrieben wurden. Studien verschiedener Nef-Allele, teils exprimiert als Nef-Fusionsproteine in diversen Zelllinien mit meist unterschiedlichem Aktivierungsstatus, führten bisher allerdings zu einigen widersprüchlichen Daten in Bezug auf die Funktionen des Proteins (162). Es wurden negative (3, 123, 180, 181) und positive (73, 215, 216, 233, 244) Einflüsse von Nef auf Virusreplikation und T-Zell-Signalübertragung beschrieben. Vermutlich kann Nef sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken (22). Die komplexe Einbindung von Nef in die unterschiedlichen Schritte der T-Zell-Signalübertragung machen die Beurteilung dieser Phänotypen schwierig. Untersuchungen im Tiermodell könnten Aufschluss geben welcher Mechanismus und welche Funktion für die Rolle des Nef-Proteins *in vivo* bedeutsam ist. Daher wurde in dieser Arbeit *nef* in MoMuLV kloniert und dieses *in vitro* sowie *in vivo* studiert.

III.2 Nef-spezifische CD4-Herunterregulierung und Assoziation mit Kinase-Aktivität sind in primären Maus-Zellen konserviert

Nagerzellen sind nicht mit HIV oder SIV infizierbar. Obwohl keine Virusreplikation stattfindet, entwickeln aber HIV-transgene Mäuse AIDS-ähnliche Symptome (106). Studien an *nef*-transgenen Mäusen haben gezeigt, dass die Expression von Nef allein ausreicht um die Entwicklung eines AIDS-ähnlichen Krankheitsbildes zu induzieren (107). Diese Studien deuten darauf hin, dass das Nef-Protein in Mauszellen funktionsfähig ist und diese somit geeignet zur Untersuchung von Nef sind. Nef-spezifische Phänotypen wie die Verminderung der CD4-Expression auf der Zelloberfläche, Verlust CD4⁺ T-Zellen oder Tyrosinkinase-Phosphorylierung, wie sie *in vitro* oder in humanen Zellen beschrieben wurden, konnten auch in Zellen *nef*-transgener Mäuse gezeigt werden (107, 250). Um zu verifizieren, dass Nef primäre NIH/Ola-Mauszellen ein geeignetes System zur Untersuchung Nef-spezifischer Funktionen sind, wurden periphere Blutlymphozyten und Splenozyten mit Nef-exprimierenden Konstrukten transfiziert und untersucht. Hierzu

wurden Konstrukte verwendet, die ein Nef.GFP-Fusionsprotein kodierten. Das Nef.GFP-Fusionsprotein wurde verwendet, um transfizierte von den übrigen Zellen in der FACS-Analyse unterscheiden zu können. Die direkte Markierung von Nef für die Durchflußzytometrie ist bislang nicht möglich.

Region in NL4.3-Nef	Interagierendes Protein	Literaturstellen
Protein Modifikation:		
MGxxxS	N-myristyl Transferase	(84, 109)
Signalübertagung :		
P ₇₂ XXP ₇₅	SH3-Domänen von Src-Kinasen, Vav, TCR-ζ	(74, 139, 207, 254)
RR ₁₀₅	Pak1 bzw. 2	(73, 199)
Proteintransport :		
WL ₅₇ ,L ₁₁₀	Zytoplasmatischer Teil von CD4	(102)
EEEE ₆₂	PACS-1	(195)
EE ₁₅₄	β-COP	(25)
ExxxLL ₁₆₀	Adapter-Proteine (AP-1)	(37, 56, 89)

Tabelle III-1: Wichtige Sequenzmotive von HIV-1 Nef

Es wurde gezeigt, dass Nef.GFP in den transfizierten Maussplenozyten eine deutliche Reduktion der CD4-Moleküle auf der Zelloberfläche bewirkt. Der Grad der CD4-Herunterregulierung entsprach mit durchschnittlich 70% dem *nef*-transgener Mäuse (107) und dem humaner T-Zellen. Um zu zeigen, dass vergleichbare Mechanismen wie in menschlichen Zellen für diesen Phänotyp verantwortlich sind, wurden die Nef-Mutanten G2A, EDAA und AxxA untersucht. Diese Konstrukte wurden gewählt, da sie klassische funktionelle Motive in Nef beinhalten. Beispielsweise wird das Glycin 2 des Nef-Proteins von der N-myristoyl-Transferase myristyliert, wodurch die Lokalisation an Zellmembranen vermittelt wird. Die Relevanz dieses Motivs bzw. der daraus resultierenden Lokalisation des Proteins für den viralen Replikationszyklus wird deutlich aus den 186 bislang analysierten Nef-Allelen in welchen dieses durchweg konserviert ist (109). Einige Beispiele für wichtige funktionelle Strukturen von Nef sind in Tabelle III-1 aufgeführt.

Die CD4-Herunterregulation wurde durch eine Mutation der SH3-Bindungsstelle PxxP nicht beeinflusst. Dies widerspricht Daten von Studien an transgenen Mäusen, bei welchen die Expression von Nef mit mutierter SH3-Bindungsstelle nur zu einer CD4-Herunterregulierung von 30% führte (108). Allerdings entsprechen die Ergebnisse von Wildtyp-Nef.GFP-transfizierten Maussplenozyten, wie auch von den verwendeten Nef-Mutanten, den Daten von CD4-Oberflächenanalysen an humanen T-Zellen und humanen primären Blutlymphozyten (O. Keppler, O. Fackler, nicht publiziert). Da die CD4-Herunterregulierung von Nef.GFP und den untersuchten funktionellen Mutanten in Maus-Splenozyten und humanen Primärzellen vergleichbar ist, kann angenommen werden, dass Maussplenozyten hinsichtlich dieser Nef-

Funktion mit Humanzellen vergleichbar und damit für funktionelle Studien am Nef-Protein geeignet sind. Die Nef-induzierte Herunterregulation von CD4 von der Zelloberfläche in primären Mauszellen wird vermutlich über einen Mechanismus vermittelt, der dem in humanen Zellen sehr ähnlich ist.

Neben dem Einfluss von Nef auf den Proteintransport von der Zelloberfläche wurde überprüft, ob Nef in Mauszellen auch die Signalübertragung auf eine Weise beeinflusst, die mit humanen Zellen vergleichbar ist. Die Aktivierung der Nef-assoziierten Kinase (NAK) durch lentivirales Nef ist essentiell für effiziente Virusreplikation und Pathogenese. Die Induktion geschieht über den Guaninaustauschfaktor Vav und die kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42. Die p21-aktivierte Kinase 1/2 (Pak1/2) wurde als Nef-assoziierte Kinase identifiziert (73). Wie auch in der Durchflußzytometrie wurde für die Analyse der Pak-Aktivität Nef als Nef.GFP-Fusionsprotein exprimiert. Ein Grund dafür war, dass Nef allein im *in vitro* Kinase Assay (IVKA) nur unzureichend immunpräzipitiert werden konnte. Die mit Nef.GFP assoziierte Kinase-Aktivität wurde in transfizierten Splenozyten im IVKA dargestellt und mit entsprechend transfizierten humanen T-Zellen verglichen. Pak war in beiden Zelltypen als radioaktiv markiertes Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 62kD erkennbar. Nef-Protein mit mutierter Myristilierungsstelle oder SH3-Bindungsstelle war nicht in der Lage Pak-Phosphorylierung zu vermitteln. Nach Durchführung des IVKA konnte die Expression und Menge der Nef.GFP Fusionsproteine im Western Blot der Immunpräzipitate nachgewiesen werden. In den Proben aller Konstrukte, sowohl in Splenozyten, als auch in Jurkat-T Zellen, konnten vergleichbare Nef-Mengen nachgewiesen werden.

Die in diesem Experiment gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass Nef auch in murinen Primärzellen in der Lage ist mit einem Kinase-Komplex zu assoziieren. Die hierfür notwendigen Bindungen und Aktivierungsschritte scheinen denen humaner Zellen zu entsprechen. Pak-Kinasen wurden auch in murinen Zellen beschrieben (245). Zumindest sind gleiche funktionelle Motive des Nef-Proteins für die Assoziation mit Pak-Aktivität notwendig. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass Nef in murinen Zellen ähnliche Funktionen wie in humanen Zellen ausübt.

Sowohl der Effekt von Nef auf den Proteintransport der Zelle, als auch auf die Signalübertragung konnte demnach in murinen Primärzellen reproduziert werden. Alle erwarteten Phänotypen der jeweiligen Mutanten korrelieren mit entsprechenden Ergebnissen aus Untersuchungen an humanen Primärzellen und Zelllinien. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass die verwendeten Mauszellen auch zur Untersuchung von Nef in einem infizierbaren System geeignet sind.

III.3 Rekombinante Moloney Maus-Leukämie-Viren exprimierten Fremdgene *in vitro* und *in vivo*

Ausgehend von Ergebnissen von Hanna et al. in Nef-transgenen Mäusen, die eine AIDS-ähnliche Symptomatik entwickelten (107), sollte ein Modellsystem etabliert werden, in welchem das Nef-Protein in einem Kontext untersucht werden kann, der der natürlichen HIV-Infektion entspricht. Die Idee war, mit einem System rekombinanter Moloney Maus-Leukämie-Viren (MoMuLV) Nef in einem infektiösen System in Zielzellen zu exprimieren, die aufgrund des Tropismus von MoMuLV weitgehend denen einer HIV-Infektion im Menschen entsprechen. Daneben ist die Erzeugung rekombinanter MoMuLV-Partikel und die Haltung infizierter Mäuse einfacher und kostengünstiger als die Generierung transgener Tiere.

In einer vorangehenden Arbeit wurden verschiedene rekombinante MoMuLV-Konstrukte hergestellt, die Nef direkt als zusätzliches Produkt der *env*-mRNA, unter der Kontrolle eines Thymidin-Kinase-Promotors oder mit Hilfe eines zusätzlichen Spleißakzeptors exprimieren sollten (187). Diese Konstrukte erlaubten jedoch entweder keine Nef-Expression, oder sie ging bereits nach wenigen Replikationsrunden verloren. Das Einbringen eines zusätzlichen IRES-Elementes am 3'-Ende des *env*-Leserahmens (IRES-*nef*, Mo-NL) führte dagegen zur Expression von Nef. Für alle Studien dieser Arbeit wurde daher dieses Konstrukt bzw. die davon abgeleiteten Varianten verwendet. Da Nef und GFP mit Mo-NL und Mo-GFP zwar über mehrere Replikationsrunden exprimiert werden konnte (187), es aber auch Hinweise auf einen graduellen Verlust des eingefügten Gens gab, wurden Mo-NL, Mo-GFP und Mo zunächst in Sc1 Mausfibroblasten und dann in neonatal infizierten Mäusen untersucht. Dabei wurden Virustiter, Replikationskinetik und Expression des zusätzlichen Gens analysiert.

Es wurden ekotrope replikationsfähige Mo-NL, Mo-GFP und Mo Partikel erzeugt und deren Titer bestimmt, um in den folgenden Infektionsexperimenten vergleichbare Bedingungen schaffen zu können. Dabei zeigte sich, dass die Virustiter von Mo-NL und Mo-GFP praktisch nicht von Mo unterscheidbar waren, obwohl sie ein zusätzliches Gen von rund 1500 bp enthielten. Dies war überraschend, da man vermutet hätte, dass das Einbringen der zusätzlichen Gene oder pathogene Effekte des Nef-Proteins zu reduzierten Partikel-Konzentrationen in den Kulturüberständen transfizierter Zellen führen würde. Untersuchungen an MoMuLV über den Einfluss von Fremdgenen auf die Verpackungseffizienz viraler mRNA und die Titer der rekombinanten Viren zeigte eine Abhängigkeit der Verpackungseffizienz und der Virustiter von der Größe der eingefügten Gene (223). Die eingefügten Gensequenzen waren mit mindestens 4 kB jedoch deutlich länger als die im Rahmen dieser Arbeit in MoMuLV inserierten Sequenzen. Eine andere Studie untersuchte die Replikationskinetik von MoMuLV, in das 1.15 bis 1.6 kB große Fragmente eingefügt wurden (147). Das *gfp*-Gen wurde zusammen mit einem IRES-Element des Enzephalomyokarditis-Virus an das 3'-Ende von *env* kloniert. Das 1.3 kB große Insert beeinträchtigte die Virusreplikation nur leicht. Allerdings waren entsprechende Konstrukte mit einer 1.6 kB langen zusätzlichen Sequenz deutlich in ihrer Replikation beeinträchtigt. Warum die rund 1.5 kB langen zusätzlichen Sequenzen von Mo-NL und Mo-GFP

keinen Einfluss auf die Virustiter haben, kann anhand dieser Studien nicht geklärt werden. Auch bei HIV führt das Einbringen zusätzlicher Gene zu Beeinträchtigungen des Replikationszyklus. HIV-Partikel, in die ein *gfp*-Gen eingefügt wurde, zeigten signifikante Beeinträchtigungen in ihrem Replikationszyklus (B. Müller, nicht publiziert), wobei hier *gfp* durch Fusion mit dem Matrix-Gen in den Bereich des Hauptstrukturproteins p55^{gag} eingefügt wurde. Auch auf die Replikationskinetik hatte das eingefügte Fremdgen keinen ersichtlichen Einfluss. In den Kulturüberständen Mo-NL- und Mo-GFP-infizierter Mausfibroblasten war p30 ab dem dritten Tag nach Infektion detektierbar. In der Immunfluoreszenz Mo infizierter Zellen war p30-Expression ebenfalls ab dem dritten Tag nach Infektion erkennbar. Anscheinend werden der Titer und die Replikationskinetik durch die Fremdgene nicht beeinflusst.

Es ist aber möglich, dass das Fremdgen während der Replikation verloren ging, da es für die Virusreplikation nicht essentiell ist und Rekombinationsereignisse bei Retroviren mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit auftreten (113, 240). Eine hohe Mutationsrate ist für Retroviren von Vorteil, denn sie können sich so selektiv an einen optimalen Translationskontext und dadurch rasch an ihre Umgebung anpassen, dem Immunsystem ausweichen oder sich auf antiretrovirale Medikamente einstellen (8, 9).

In Studien von Alexander et al. wurde das *gfp*-Gen in den *nef*-Leserahmen von SIV kloniert. Die Expression von Nef wurde durch ein HIV-*nef*-Gen unter der Kontrolle einer IRES-Sequenz ersetzt (10). Acht Wochen nach Infektion war nicht nur das *gfp*-Gen deletiert, sondern auch das IRES-Element. Die Expression des *nef*-Gens wurde durch Mutation des Virus selektiv in einem optimalen Translationskontext erhalten (10). Bei der Analyse der Fremdgenexpression Mo-Luc-infizierter Mäuse deutete der deutliche Rückgang der Luziferase-Expression darauf hin, dass das Luziferase-Gen 12 Wochen nach Infektion praktisch völlig verloren gegangen ist. Experimente an zwei Mo-GFP-infizierten Mäusen in einer vorangegangenen Arbeit zeigten aber, dass GFP in der FACS-Analyse acht Wochen nach Infektion detektierbar war (187). Der Verlust des *gfp*-Gens war geringer als man aufgrund der Ergebnisse von Alexander et al. und Mo-Luc-infizierten Tieren erwarten würde. Im Thymus stieg die Luziferase-Expression sogar deutlich an. Dies war überraschend, da gezeigt wurde, dass im Thymus zehn Tage nach Infektion nur 0.6-10% der Thymozyten, in der Milz hingegen 50% der Splenozyten, p30 produzierten (14). Außerdem induziert MoMuLV in der Latenzphase Thymusatropien und Apoptose von Thymozyten (34). Dies hätte in der Mo-Luc infizierten Maus ein Absinken der Luziferase-Expression erwarten lassen. Möglicherweise verursachten eingewanderte Mo-Luc-infizierte Tumorzellen die steigende Luziferase-Expression. Neben der Luziferase-Expression mit Mo-Luc wurde in dieser Arbeit die GFP-Expression in Milz und peripheren Blutzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit Mo-GFP untersucht. Bei der Analyse der Splenozyten fiel auf, dass bis zu 18% der CD4⁺ T-Lymphozyten GFP exprimierten und daneben auch eine Population von bis zu 22% der CD4⁻/CD3⁺ Zellen GFP-positiv war. Dies korreliert mit Daten, die zeigten, dass neben CD4⁺ T-Zellen auch CD8⁺ T-Zellen, aber auch B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen von MoMuLV infiziert werden (75). Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse aus Mo-GFP-infizierten PBMC. Sechs Wochen nach Infektion exprimierten rund 60% aller CD4⁺ T-Zellen GFP. Dagegen war nur ein geringer Anteil von unter 10% der CD4⁻ Lymphozyten mit Mo-GFP infiziert. Da bis zu sechs

Wochen nach Mo-GFP-Infektion ein kontinuierlicher Anstieg der GFP-positiven Zellen zu beobachten war, müssen *de novo* Infektionen mit GFP-positiven Viren erfolgen. Die Anzahl GFP-exprimierender Zellen läßt sich durch Zellen, die zu frühen Zeitpunkten infiziert wurden und GFP konstant exprimieren, nicht erklären. Diese Ergebnisse zeigen, dass GFP und Luziferase über mehrere Passagen *in vivo* relativ stabil exprimiert werden können. Für Nef war ein vergleichbarer Nachweis in dieser Form nicht möglich, da Nef in der FACS-Analyse nicht nachgewiesen werden kann. Allerdings wurde die Expression im Tumorgewebe moribunder Mo-NL-infizierter Tiere nachgewiesen. Dies zeigt, dass Nef zumindest in gewissem Umfang stabil exprimiert wird (D. Paulsen, nicht publiziert).

Es konnte gezeigt werden, dass Nef und GFP mit Mo-NL und Mo-GFP über einen Zeitraum von mehreren Wochen *in vitro* und *in vivo* exprimiert werden können. Ebenso sind Mo-NL und Mo-GFP in ihrem Virustiter und der Replikation nicht beeinträchtigt. Jedoch erlauben diese Experimente keine Aussage über den Anteil an Viren, der das Fremdgen durch Rekombination verloren hat. Hinweise auf einen teilweisen Verlust des *gfp*-Gens gibt der Vergleich des GFP-Titers Mo-GFP-infizierter Mausfibroblasten mit dem entsprechenden p30-Titer. Nach mehrmaliger Passagierung von Mo-GFP sank der GFP-Titer bei weitgehend gleichbleibendem p30-Titer ab (187). Dies lässt erwarten, dass eine steigende Viruspopulation *gfp* verloren hat. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass in infizierten Mausfibroblasten nach viermaliger Passagierung von Mo-GFP in praktisch allen p30-positiven Zellen auch GFP-Expression detektierbar war. Die relativ hohe Stabilität der GFP-Expression in Mo-GFP-infizierten Mäusen im Vergleich zu SIV-*gfp*-infizierten Affen kann nicht eindeutig erklärt werden. Möglicherweise basiert sie auf der immunologischen Toleranz neonatal mit Mo-GFP infizierter Mäuse. Tiere, die neonatal mit MoMuLV infiziert werden, zeigen keine oder nur sehr geringe humorale und zelluläre Immunantworten (50). Dadurch wird vermutlich der selektive Druck auf einen optimalen Translationskontext verringert und die Stabilität von Mo-GFP erhöht. In cDNA von Milz und Thymus Mo-GFP-infizierter Mäuse konnte 12 Wochen nach Infektion in der PCR mit internen und flankierenden Primern sowohl vollständiges IRES-*gfp*, als auch der teilweise oder völlige Verlust der eingefügten Gensequenz nachgewiesen werden. IRES-*gfp* geht also graduell mit der Zeit verloren. Eine Teilpopulation vollständiger Mo-GFP war aber vorhanden. Eine Aussage über die Verhältnisse zwischen vollständigen und verkürzten Virusvarianten kann nicht getroffen werden, da kürzere Fragmente in der PCR effizienter amplifiziert werden als längere und daher möglicherweise überschätzt werden.

Anscheinend ist GFP über eine relativ große Passagenzahl stabil. Ob die Stabilität von Nef etwas geringer ist, kann abschließend nicht beurteilt werden. Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das *in vivo*-Infektionssystem auf der Basis rekombinanter MoMuLV geeignet ist um funktionelle Studien am HIV-Nef-Protein durchführen zu können.

III.4 Spezifische Phänotypen Mo-NL-infizierter Mäuse

III.4.1 Nef hat keinen Einfluss auf die Pathogenese der MoMuLV-Infektion

Eine Hypothese zu Beginn dieses Projektes war, dass die Expression von Nef ähnlich wie in Nef-transgenen Mäusen zu AIDS-ähnlichen Krankheitserscheinungen führt oder den phänotypischen Verlauf der MoMuLV-Infektion signifikant beeinflussen kann. Dass Nef seine Funktionen auch in murinen Zellen ausüben kann, wurde in mehreren Studien gezeigt (107, 144, 228) und für den verwendeten Maus-Stamm verifiziert (siehe III.2).

Eine Infektionsstudie sollte zunächst klären, ob Nef die Pathogenese der MoMuLV-Infektion verändert. Da die Expression von Nef in transgenen Tieren ausreicht um die Lebensdauer der Tiere zu verkürzen, war es wahrscheinlich, dass die Nef-Expression zu einer Reduktion der Überlebensdauer Mo-NL-infizierter Tiere führt. Außerdem wurde vermutet, dass Nef in infizierten Tieren zu einer Depletion CD4-positiver T-Zellen führt, wie sie auch in *nef*-transgenen Tieren beobachtet wurde (107). Eine signifikant reduzierte Zahl CD4-positiver Zellen hätte voraussichtlich nicht nur zur Beeinflussung der Immunkompetenz führen können, sondern vermutlich auch zu Veränderungen im Verlauf der MoMuLV-Infektion. Daher wurde die Überlebensdauer Mo-NL-infizierter Tiere mit Mo-GFP und dem Wildtyp Mo verglichen. Die mittlere Überlebenszeit Mo-infizierter Tiere liegt bei rund 125 Tagen (183). In diesem Experiment lag sie bei Mo-infizierten Mäusen bei 120 Tagen, die von Mo-NL mit 115 Tagen leicht darunter, Mo-GFP mit 125 Tagen leicht darüber. Der Verlauf der Sterbekurven war jedoch praktisch deckungsgleich. Milzen infizierter Tiere zeigten in allen Fällen charakteristische Hyperplasien, beginnend in der fünften Woche nach der Infektion. Ein Unterschied der Splenomegalien zwischen Mo-NL und Mo-GFP-infizierten Tieren war über die Dauer des Experimentes nicht erkennbar. Es konnte also grundsätzlich zwischen gesunden und kranken Tieren, jedoch nicht zwischen Mo-NL, Mo-GFP und Mo-infizierten Tieren hinsichtlich des Verlaufes der MoMuLV-Infektion unterschieden werden. Entgegen den Erwartungen wurde kein Nef-spezifischer Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der MoMuLV-Pathogenese festgestellt. Möglicherweise reicht die Nef-Expression nicht aus um infizierte Zellen bzw. Tiere soweit zu beeinflussen, dass es zu Veränderungen des MoMuLV-Krankheitsverlaufes kommt. In *nef*-transgenen Tieren wird das Protein in großer Menge in allen T-Zellen und bereits in Keimbahnzellen früher Entwicklungsstadien exprimiert, wogegen Nef-Protein in Geweben Mo-NL-infizierter Tiere schwer detektierbar war (Daten nicht gezeigt und D. Paulsen, nicht publiziert). Grund hierfür könnte eine Selektion gegen Nef-exprimierende Zellen sein, denn Nef ist beteiligt an der Depletion von T-Zellen und Thymozyten (235), d.h. Mo-NL-infizierte Zellen, die wenig oder gar kein Nef-Protein exprimieren, haben selektive Vorteile. Obwohl keine Nef-spezifische Veränderung der Pathogenese der MoMuLV-Infektion beobachtet werden konnte, entwickelten Mo-NL-infizierte Tiere Beeinträchtigungen der Immunantwort, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird.

III.4.2 Mo-NL-infizierte Mäuse zeigen opportunistische Infektionen und Beeinträchtigungen der LCMV-spezifischen zellulären Immunantwort

III.4.2.1 *Entwicklung opportunistischer Augeninfektionen in Mo-NL-infizierten Tieren*

In den vorangehenden Abschnitten wurden diverse Funktionen des Nef-Proteins angeführt, die eine Nef-exprimierende Zelle maßgeblich in ihrer Funktion beeinflussen können. Die Expression von Nef in Mo-NL-infizierten Zellen, die einer HIV-Infektion beim Menschen weitgehend entsprechen, ließen die Vermutung zu, dass sie in ihrer Funktion gestört sein könnten. Zwar wurde die Pathogenese von MoMuLV durch Nef nicht verändert, in einem Pilotexperiment gab es dagegen erste Hinweise auf eine Infektion des Augenbereiches in Mo-NL-infizierten Tieren (D. Paulsen, nicht publiziert). Basierend auf dieser Entdeckung wurde eine vergleichende Studie an 56 Mo-NL und 43 Mo-GFP neonatal infizierten Mäusen, sowie einer unbehandelten Gruppe mit 19 Tieren, durchgeführt. Auffällig war, dass in den ersten fünf Wochen während der Maturationsphase des Immunsystems die Tiere aller Gruppen phänotypisch gesund waren und keinerlei Krankheitssymptome zeigten. Erst ab der sechsten Woche nach Infektion entwickelten Mo-NL-infizierte Tiere eine Rötung des peripheren Augenbereiches. Diese nahm mit der Zeit zunahm und ging mit der Sekretion eitriger Augenflüssigkeit einher. Die Symptome verstärkten sich im Verlauf der Infektion und führten bei einigen Tieren sogar zum Verlust des Auges. Keines der Mo-GFP-infizierten oder unbehandelten Tiere zeigte diesen Phänotyp. Der Auslöser der Augeninfektion war das gram-negative Bakterium *Pasteurella pneumotropica*. Dieser Befund war überraschend, da Hanna et al. diesen Phänotyp in *nef*-transgenen Mäusen nicht beschrieben hatten (107). Eventuell kann dies auf einen unterschiedlichen Hygienestatus der Tierhaltungen zurückgeführt werden. Außerdem erlagen die transgenen Tiere bereits nach einer Latenz von 30-150 Tagen opportunistischen Infektionen, die durch massive Immundefekte ermöglicht wurden. Deren Erreger wurden aber nicht näher dokumentiert, d.h. es bleibt offen, ob unter anderem *P. pneumotropica* an den Infektionen beteiligt war. Gleichwohl die für eine HIV-Infektion untypischen Augeninfektionen bei *nef*-transgenen Tieren nicht beschrieben werden, wäre das Auftreten von Pasteurellen-Infektionen in diesen Tieren zumindest nicht unwahrscheinlich, denn das Bakterium ist ein gängiger Kommensale, der sich oft auch in keimfrei gehaltenen Versuchstierkolonien finden lässt (36). In Nacktmäusen oder immunsupprimierten Nagetieren kann dieses fakultativ pathogene Bakterium durchaus ein Problem darstellen. Bei Nagern wurden häufige Infektionsherde am Auge der Tiere beschrieben, die ähnlich wie bei den Mo-NL-infizierten Mäusen durch den Ausfluss eines eitrigem Augensekretes gekennzeichnet waren (169, 179, 214). Auch eine frühere Studie an HIV-transgenen Mäusen beschrieb einen vergleichbaren Phänotyp (68). Des weiteren wurden in immunsupprimierten AIDS-Patienten opportunistische Infektionen mit *P. pneumotropica*

beobachtet (59). Dennoch gilt *P. pneumotropica* nicht als gängiger Auslöser von opportunistischen Infektionen in AIDS-Patienten.

Auffällig war, dass ausschließlich im Augensekret Mo-NL-infizierter Mäuse Pasteurellen in sehr großen Zahlen von bis zu $>10^6$ pro μl Augenflüssigkeit gefunden wurden, die in den Kontrolltieren nur in geringer Zahl oder gar nicht zu finden waren. In allen Tieren wurden wenige Kolonien ubiquitärer Bakterien detektiert, wie etwa vergrünende Streptokokken oder Koagulase-negative Staphylokokken. Diese lösten aber in keiner Maus-Gruppe Infektionen aus. Daher kann angenommen werden, dass die Expression von Nef das Immunsystem der Mo-NL-infizierten Tiere in einer Weise beeinträchtigt, die das Auftreten der Augeninfektion durch *P. pneumotropica* ermöglicht. Zur Kontrolle wurden Stichproben auf *Pasteurella*-spezifische Antikörper analysiert. Serumproben sämtlicher getesteten Tiere aus allen Gruppen zeigten hohe Reaktivität gegen *Pasteurella*-Antigen. Offensichtlich waren Tiere der Kontrollgruppen aber in der Lage Infektionen mit dem Bakterium zu kontrollieren. Dennoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dieser überraschende Phänotyp Mo-NL-infizierter Mäuse ein Artefakt unspezifischer Interaktionen des Nef-Proteins war.

Um die Spezifität des Phänotyps zu untersuchen wurden rekombinante MoMuLV kloniert, die *nef*-Gene mit beschriebenen funktionellen Mutationen enthielten. Diese Konstrukte sollten außerdem ermöglichen funktionelle Motive von Nef *in vivo* mit dessen Rolle als Pathogenesefaktor zu korrelieren. Es gibt Hinweise aus Studien an Nef-transgenen Mäusen, dass das SH3-Bindungsmotiv von Nef essentiell ist, für die Funktion von Nef *in vivo* ist (108). Der Austausch des Prolin-reichen $P_{72}\text{xx}P_{75}\text{xx}P_{78}$ Motivs gegen $A_{72}\text{xx}A_{75}\text{xx}Q_{78}$ (AxxA) in Nef-transgenen Mäusen führte zum Ausbleiben des AIDS-ähnlichen Krankheitsbildes (108). Diese Ergebnisse wurden im retroviralen Infektionskontext analysiert. In einer Gruppe Mo-PA1-infizierter Mäuse mit 24 Tieren entwickelte keines der Tiere eine opportunistische Infektion des Auges durch *P. pneumotropica*. Die Tiere blieben bis zum Auftreten MoMuLV-spezifischer Krankheitssymptome gesund. Diese Ergebnisse und die an Nef-transgenen Mäusen (108) widersprechen anderen Studien an SCID-hu Thy/Liv Mäusen, bei denen ein intaktes SH3-Bindungsmotiv für die HIV-Pathogenese nicht notwendig war (7).

Die Myristilierungsstelle des Nef-Proteins am Glycin 2 ist eine wichtige Determinante für dessen Einfluss auf Signalübertragungswege der Zelle. In Thymozyten-Kulturen konnte gezeigt werden, dass nicht Nef-induzierte Beeinträchtigungen von Transportwegen, sondern Interaktionen mit der Signalübertragung für Veränderungen in der Entwicklung von Thymozyten wichtig sind (235). Die Lokalisation von Nef war hierbei entscheidend. Myristilierungsdefektes Nef-Protein ist nicht an der Zytoplasmamembran lokalisiert und beeinträchtigt nicht die Entwicklung der Thymozyten (235). Vor diesem Hintergrund wurde eine rekombinante MoMuLV-Variante mit myristilierungsdefektem Nef kloniert (Mo-G2A) und 24 Mäuse mit dem Virus infiziert. Die Phänotypen der Tiere wurden mit besonderem Augenmerk auf das Auftreten opportunistischer Infektionen im Augenbereich über die gesamte Lebensspanne der Tiere beobachtet. Lediglich drei der Tiere entwickelten leichte Augenentzündungen. Eine intakte Myristilierungsstelle und damit eine Lokalisation des Nef-Proteins an der Zellmembran ist also wichtig für die Induktion einer opportunistischen Infektion Mo-G2A-infizierter Mäuse. Aktuelle Erkenntnisse deuten

darauf hin, dass G2A-Nef in der Interaktion mit der Signalübertragung der Zelle und der Herunterregulierung von CD4 von der Zelloberfläche nicht völlig defekt ist (O. Fackler, O. Keppler, unpubliziert). Dies könnte erklären, warum drei der 24 Mo-G2A-infizierten Tiere die für Mo-NL beschriebene Augeninfektion entwickeln.

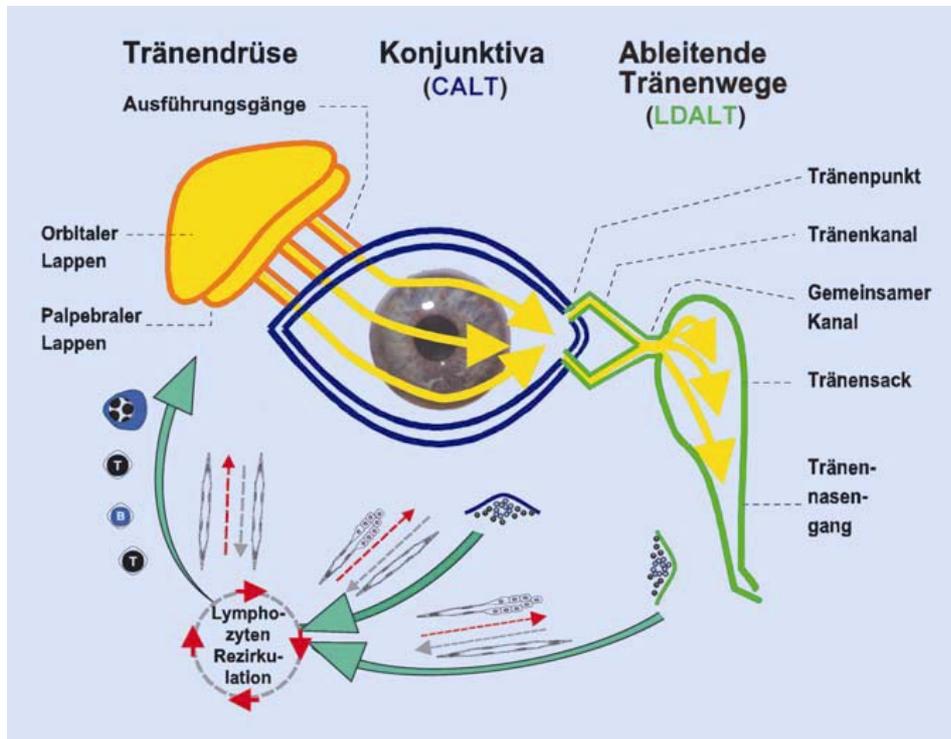


Abbildung III-1: Augenassoziiertes lymphatisches Gewebe (EALT).

Schleimhautassoziiertes lymphatisches Gewebe kommt an der normalen menschlichen Augenoberfläche kontinuierlich von der Tränendrüse über die Konjunktiva (wo es als CALT bezeichnet wird) bis in die ableitenden Tränenwege (als LDALT) vor. Diese Organe sind über spezialisierte Gefäße angeschlossen an die Rezirkulation lymphatischer Zellen und mit den anderen Organen des Schleimhautimmunsystems. Im CALT und LDALT können Antigene der Augenoberfläche über Lymphfollikel erkannt werden und spezifische Effektorzellen gebildet werden, die dann dieselben Organe und die Tränendrüse oder andere Schleimhautorgane des Körpers besiedeln können. (nach (129))

Die Erkenntnisse aus Mo-G2A- und Mo-PA1-infizierten Mäusen zeigen, dass die Entstehung von Augeninfektionen infizierter Tiere spezifisch durch Funktionen des Nef-Proteins ermöglicht werden. Die Infektion von Mäusen mit Mo-SF zeigte, dass dieser Phänotyp für das Nef-Allel des HIV-Isolates SF2 konserviert ist. Auch in Mo-SF-infizierten Tieren konnte ab der sechsten Woche nach Infektion die zuvor beschriebene Infektion des Augenbereiches, verursacht durch *P. pneumotropica*, beobachtet werden. Die Ausprägung des Phänotyps war im Vergleich zu Mo-NL leicht reduziert. Außerdem wird die Signifikanz des Phänotyps durch Experimente an MoMuLV-infizierten Tieren verschiedener Maus-Stämme verdeutlicht. Neben den zumeist verwendeten NIH/Ola-Mäusen entwickelten auch Tiere der Stämme C57BL/6 und Balb/c nach Infektion mit Mo-NL Augeninfektionen.

Eine Erklärung, warum der Phänotyp speziell am Auge auftritt, liegt möglicherweise in der speziellen Organisation des Immunsystems im Augenbereich. Neben den in der Augenflüssigkeit

enthaltenen Enzymen und IgA-Antikörpern wird das Auge durch mukosales lymphatisches Gewebe (EALT) geschützt (Abbildung III-1), welches das Auge kontinuierlich von der Tränendrüse bis in die ableitenden Tränenwege durchzieht (129, 130). EALT kann über CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten in den Lymphfollikeln Antigene der Augenoberfläche erkennen und über die regulierte Rezirkulation der lymphatischen Zellen andere Organe sowie die Augenoberfläche einschließlich der Tränendrüse mit spezifischen Effektorzellen versorgen.

Durch die Aktivierung von T-Lymphozyten beginnen diese mit der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine. Das hierdurch gestörte Gleichgewicht von Zelldifferenzierung und Gewebeabbau führt zu pathologischen Veränderungen des Epithelgewebes des Auges. Diese Verletzungen machen das Epithel durchlässiger für Keime und ermöglichen so die Etablierung von entzündlichen Infektionsherden am Auge. Die Expression von Nef in Mo-NL-infizierten T-Lymphozyten könnte so das augenassoziierte mukosale Immunsystem beeinträchtigen, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des in Nagerkolonien ubiquitären Bakteriums *Pasteurella pneumotropica* deutlich erhöht wird. Ein weiterer Schritt zur Aufklärung dieses Mo-NL-induzierten Phänotyps wäre also die Untersuchung der infizierten T-Zellen der Augen-Mukosa. Die Zellzahlen sind allerdings sehr gering, was die Analyse stark erschweren würde. Eventuell könnten histologische Färbungen Aufschluss über veränderte T-Zell-Zahlen in diesen Geweben geben.

Um potentielle Nef-spezifische Beeinträchtigungen der Immunantwort hervorzuheben wurden neonatal mit Mo-NL infizierte Mäuse im Alter von sieben Wochen systemisch mit *Pasteurella pneumotropica* oder *Listeria monocytogenes* infiziert. Diese Erreger wurden gewählt, da für die Kontrolle der Infektion eine CD4-vermittelte Immunantwort wichtig ist. Außerdem wurden die Augeninfektionen Mo-NL-infizierter Tiere ausschließlich durch Pasteurellen hervorgerufen. Die Überlegung war, dass der Einfluss von Nef auf das Immunsystem den Infektionsverlauf der bakteriellen Infekte verändert. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Mo-NL-infizierten Mäusen und den Kontrolltieren beobachtet werden.

III.4.2.2 Immunantworten MoMuLV-infizierter Mäuse

Um weitere Hinweise auf immunologische Beeinträchtigungen Mo-NL- und Mo-SF-infizierter Tiere zu bekommen wurde untersucht, ob die Tiere Defekte in ihrer zellulären und humoralen Immunantwort aufwiesen. Die systemische Infektion der Maus mit dem Virus der lymphozytären Choriomeningitis (LCMV) kann bei Tieren mit supprimierter zytotoxischer T-Zell-Antwort von anderen Armen des Immunsystems eliminiert werden (77). Effektoren der angeborenen Immunantwort, vor allem natürliche Killer-(NK)-Zellen, spielen bei der Eliminierung der LCMV-Infektion eine wichtige Rolle und können zytotoxische T-Lymphozyten ersetzen (30). Die Analyse der NK-Zell-Aktivität in MoMuLV-infizierten Tieren ergab im Rahmen dieser Studie keine Hinweise auf Nef-spezifische Veränderungen. Die NK-Lyse von Antigen-beladenen Zielzellen war zu gering, so dass keine zuverlässigen Aussagen getroffen werden konnten. Neben der NK-Lyse wurde die LCMV-spezifische Lyse von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten sowie die Ausschüttung LCMV-spezifischer Antikörper untersucht. Die spezifische Aktivität CD8⁺

zytotoxischer T-Lymphozyten wurde, ähnlich wie die NK-Zell-Lyse und die Antikörper-Titer, in MoMuLV-infizierten Tieren nach systemischer Überinfektion mit LCMV im Alter von rund sieben Wochen bestimmt. Auch hier zeigten Mo-NL-infizierte Mäuse in gleichem Maße eine LCMV spezifische Lyseaktivität der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen wie die Kontrollgruppen, die mit Mo-GFP oder Mo infiziert wurden, bzw. unbehandelt blieben.

MoMuLV repliziert in geringem Maße auch in B-Zellen, d.h. diese könnten durch Expression von Nef die Immunkompetenz des CALT-Gewebes soweit beeinträchtigen, dass opportunistische Augeninfektionen auftreten könnten. Im Auge kann die Beeinträchtigung oder der Wegfall eines Teils der Immunantwort nicht so effizient ausgeglichen werden, wie in anderen Geweben. So führen allein Veränderungen der T-Zell-Antwort in EALT Geweben zu pathologischen Veränderungen und Infektionen des Auges (131). Hohe LCMV-spezifische IgM sind gewöhnlich bereits ab dem vierten Tag nach Infektion detektierbar, IgG-Antikörper etwa zwei Tage später (125, 172). Ein ähnliches Muster wurde auch bei der Analyse MoMuLV/LCMV-infizierter Mäuse beobachtet. Unterschiede in Antikörper-Titern Mo-NL, Mo-GFP und Mo-infizierter, sowie nicht-MoMuLV-infizierter Tiere waren nicht erkennbar. Die Expression von Nef in B-Zellen Mo-NL-infizierter Tiere führt demzufolge nicht zu einer Beeinträchtigung der LCMV-spezifischen humoralen Immunantwort. Da nur geringe Zahlen an B-Lymphozyten mit MoMuLV infiziert werden, war dies nicht zu erwarten.

In transgenen Mäusen wurde gezeigt, dass Nef sowohl die CD4-Mengen auf der Oberfläche CD4⁺ T-Lymphozyten reduziert, als auch die Zahl der CD4⁺ Thymozyten vermindert (35, 107, 144). Auch dramatische Veränderungen der Zahl CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen (CTL) wurden beobachtet (107), wobei bei gleichzeitiger Depletion CD4⁺ T-Zellen durch Nef in frühen Krankheitsstadien ein Anstieg der CTL-Zahl beschrieben wurde. Diese ging im Krankheitsverlauf in einen deutlichen Verlust der CTL-Population überging (107). Veränderungen der Funktion und Zahl CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind ein charakteristisches Merkmal für den Fortschritt einer HIV-Infektion und damit verbundener Immuninsuffizienzen. Daher wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten Mo-NL-infizierter Tiere mit Kontrolltieren verglichen.

Die Analyse der T-Zellzahlen erfolgte jeweils fünf, sechs und sieben Wochen nach Infektion. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, weil das Immunsystem der Tiere etwa ab der fünften Woche vollständig ausgebildet ist. Nach der siebten Woche wären andererseits Störeffekte durch das Auftreten von T-Zell-Lymphomen zu erwarten gewesen, die vergleichende Aussagen über T-Zellen unmöglich gemacht hätten. Zur Quantifizierung der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen wurde eine für die Humandiagnostik entwickelte Technik umgesetzt und für Mauszellen etabliert. Die entnommenen Blutproben wurden mit α -CD3-CyCr, α -CD4-PE und α -CD8-FITC gefärbt und mit einer definierten Zahl von Partikeln versetzt, die auf allen Fluoreszenzkanälen anregbar sind. Der Anteil lebender CD3⁺ Lymphozyten wurde auf die Anteile an CD4⁺ und CD8⁺ Zellen ausgewertet. Gleichzeitig wurden die entsprechenden Fluoreszenzereignisse der Partikel gezählt. Diese konnten durch ihre Struktur, Größe und Fluoreszenzintensität leicht als eigenständige Population in der FACS-Analyse identifiziert werden. Da die Partikelzahl pro Volumen Blut bekannt war, konnten durch das Verhältnis zu den Fluoreszenzereignissen der

gefärbten Zellen die Zahlen an CD4⁺ und CD8⁺ Zellen pro ml Blut errechnet werden. Die Zellzahlen der Mo-NL-infizierten Tiere wichen zu keinem Zeitpunkt nach Infektion von denen der Kontrollgruppen ab. Eine Reduktion, wie sie in Nef-transgenen Tieren beobachtet wurde, war nicht zu erkennen.

Analysiert man in der Durchflußzytometrie die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der entsprechenden Kanäle, so erhält man eine Aussage zur Expressionsstärke auf der Zelloberfläche der Zellen. Da Nef CD4 von der Zelloberfläche herunterreguliert, war eine Reduktion der CD4-Level Mo-NL-infizierter Zellen zu erwarten. Es konnten jedoch weder für CD4 noch für CD8 Unterschiede zwischen Mo-NL-infizierten Tieren und den Kontrollgruppen beobachtet werden. Diese Ergebnisse weichen von denen aus *nef*-transgenen Mäusen deutlich ab, in denen sowohl die Zahl CD4⁺ T-Zellen, als auch die CD4-Expression an der Zelloberfläche stark beeinträchtigt ist (107). In den transgenen Tieren ist jedoch für die Entwicklung einer AIDS-ähnlichen Krankheit vermutlich nicht die Depletion CD4-positiver T-Zellen, sondern deren chronische Aktivierung entscheidend (250). Dies könnte erklären, warum in Mo-NL-infizierten Tieren opportunistische Augeninfektionen, obwohl keine Depletion CD4⁺ T-Lymphozyten zu beobachten war.

Möglicherweise wurden leicht reduzierte CD4-Zellzahlen oder CD4-Oberflächenexpression in der FACS-Analyse aber auch nicht erkannt. Das Problem sowohl bei der Quantifizierung der T-Zellzahlen, als auch bei der Bestimmung der Oberflächenexpression von CD4 und CD8 war, dass sich infizierte Zellen nicht durch eine entsprechende Markierung von uninfizierten Zellen unterscheiden ließen. Es wären daher nur sehr große Unterschiede in den Zellzahlen und im Expressionslevel auf der Zelloberfläche überhaupt erkennbar gewesen. Infizierte Zellen durch Markierung mit MoMuLV-Kapsid- oder Hüllprotein-spezifischen Antikörpern zu identifizieren war nicht möglich. Daneben war vermutlich die Nef-Expression in Mo-NL-infizierten Zellen zu gering um erkennbare Effekte auszulösen, wie sie beispielsweise in *nef*-transgenen Mäusen oder auch in CMV-Nef.GFP-transfizierten Zellen zu beobachten sind. Letztere erlauben aber zusätzlich durch den GFP-Fusionsanteil die gezielte Analyse Nef-exprimierender Zellen. Die Etablierung einer FACS-Analyse für die entsprechende Markierung MoMuLV-infizierter Zellen wäre eine Möglichkeit wesentlich Unterschiede in den CD4- und CD8-Proteinmengen an der Zelloberfläche der infizierten Zellen sensitiver nachzuweisen. Mit einer Reihe MoMuLV-spezifischer Antikörper war dies aber bislang nicht möglich.

III.4.2.3 LCMV-spezifische delayed type hypersensitivity Reaktion zur qualitativen Funktionsanalyse CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten MoMuLV-infizierter Mäuse

Veränderungen der Zellzahl oder reduzierte CD4- und CD8-Expression von T-Lymphozyten waren in Mo-NL-infizierten Mäusen nicht zu beobachten und erklären das Auftreten der opportunistischen Augeninfektionen nicht. Es bestand jedoch die Möglichkeit, dass die opportunistischen Infektionen aufgrund qualitativer Beeinträchtigungen des zellulären Immunsystems entstehen können.

Delayed type hypersensitivity (DTH) Reaktionen gehören zu den ältesten bekannten immunologischen Phänomenen, die bereits im 18. und 19. Jahrhundert von R. Koch und E. Jenner beschrieben wurden, wobei die biologische Funktion einer DTH-Reaktion bis heute unklar ist. Man fand heraus, dass $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten wesentlich an der Ausbildung einer DTH-Reaktion beteiligt sind. Aus diesen Erkenntnissen wurden Modellsysteme entwickelt mit welchen durch die Induktion einer DTH-Reaktion die Aktivität $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten quantifiziert werden konnte. Ein etabliertes DTH-System beruht auf der subkutanen Injektion von Lymphozytärem Choriomeningitis Virus (141, 171, 173). Nach Injektion von LCMV in den Hinterfuß einer Maus vermehrt sich das Virus lokal auf 10^7 bis 10^8 infektiöse Einheiten pro mg Mausegewebe. Die T-Zell-vermittelte Eliminierung des Virus beginnt etwa am siebten Tag nach Infektion. Bereits einen Tag früher tritt die als DTH bezeichnete Schwellungsreaktion ein. Spezifisch aktivierte $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen induzieren dabei eine Entzündungsreaktion durch die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen (141, 171, 173). Durch gezielte Depletion der $CD4^+$ oder der $CD8^+$ Zellen konnte klar gezeigt werden, dass der DTH-Schwellungsverlauf aus der Überlagerung der Aktivität von zunächst $CD8^+$ -T-Lymphozyten entsteht (Abbildung III-2). Zeitlich verzögert induzieren dann $CD4^+$ T-Zellen die DTH-Reaktion (173). Ab dem achten Tag nach LCMV-Infektion wird die Schwellungsreaktion im Wesentlichen durch die $CD4^+$ T-Lymphozyten bestimmt. Im immunkompetenten Tier wird die Infektion nach etwa zwei Wochen vollständig eliminiert. Die Fußschwellung geht dabei vollständig zurück.

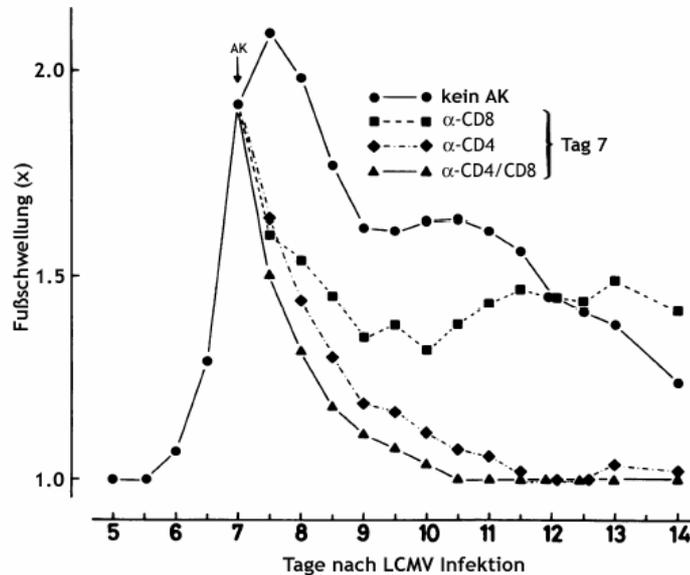


Abbildung III-2: Effekte der Behandlung von Mäusen mit monoklonalen Antikörpern (AK) gegen Lymphozyten-Subpopulationen auf eine LCMV-spezifische DTH-Reaktion, gemessen als Fußschwellung. Die dorsoventrale Dicke des inokulierten und des contralateralen uninfizierten Fußes wurden gemessen. Die Fußschwellung ist als Verhältnis des infizierten Fußes zum uninfizierten Fuß dargestellt (nach (173)).

In mit rekombinanten MoMuLV-infizierten Mäusen wurde die Fußschwellung als Maßstab für die Aktivität der LCMV-spezifischen Lymphozyten quantifiziert. In drei voneinander unabhängigen Experimenten wurden Mäuse neonatal mit Mo-NL oder Mo-GFP infiziert. Der DTH-Verlauf wurde nach subkutaner Infektion der Fußsohle mit LCMV nach sieben Wochen untersucht. Die Fußschwellung der infizierten Tiere nahm in allen Experimenten am sechsten Tag nach LCMV-Infektion sehr rasch zu. In allen Experimenten verlief die Schwellungskurve Mo-NL-infizierter Tiere ab dem siebten Tag nach LCMV-Infektion niedriger, als die der Kontrolltiere. Dies deutet auf eine Nef-spezifische Beeinträchtigung der DTH-Reaktion hin. Der Effekt von Nef war zwar relativ diskret, die niedrigen Fehlerbalken unterstreichen aber die hohe Genauigkeit der Schwellungsmessungen. Es bestand jedoch die Möglichkeit, dass Mo-GFP stimulierend auf die Aktivität der Lymphozyten wirkt. In diesem Fall müsste eine DTH-Kurve Mo-GFP-infizierter Tiere höher verlaufen, als die von Mo-infizierten oder unbehandelten Tieren. Um dies auszuschließen wurden in einer Studie Mäuse mit Mo-GFP oder Mo infiziert. Eine Gruppe blieb unbehandelt. Der Verlauf der LCMV-spezifischen DTH-Reaktion wurde gemessen und zeigte eindeutig, dass die DTH-Kurve der Mo-GFP-infizierten Tiere deckungsgleich mit der von Mo-infizierten und unbehandelten Tieren verläuft. Folglich wird die DTH-Reaktion durch Mo-NL reduziert und nicht etwa durch Mo oder Mo-GFP verstärkt.

In Untersuchungen Mo-SF-infizierter Tiere konnte gezeigt werden, dass dieser Phänotyp auch für ein anderes Nef-Allel konserviert ist. Die DTH-Kurve Mo-SF-infizierter Mäuse verläuft weitgehend deckungsgleich mit der Mo-NL-infizierter Tiere. Die Expression von Nef in mit rekombinanten MoMuLV infizierten Lymphozyten führt also zu Beeinträchtigungen in deren Aktivität. Ab dem achten Tag nach LCMV-Infektion wird der Gesamt-Verlauf der DTH wesentlich durch die Aktivität CD4⁺ T-Lymphozyten bestimmt. Die Differenzen bei den Fußschwellungen zwischen Mo-NL- und Mo-GFP-infizierten Mäusen bleiben auch im späteren Verlauf der DTH-Kurve deutlich sichtbar. Dies deutet darauf hin, dass vor allem CD4⁺ T-Zellen in ihrer Aktivität beeinträchtigt sind. Worin die Nef-spezifische Beeinträchtigung der T-Zellen begründet liegt, kann durch die DTH-Studien nicht geklärt werden. Experimente an den Nef-Mutanten Mo-PA1 und Mo-G2A lassen keine eindeutigen Schlüsse zu, welches funktionelle Motiv des Nef-Proteins an der reduzierten DTH-Reaktion beteiligt ist. Bis zum neunten Tag nach LCMV-Infektion verläuft die DTH-Reaktion Mo-PA1-infizierter Tiere deckungsgleich mit Mo-NL. Ab dem zehnten Tag scheint die Stärke der DTH-Reaktion zwar im Vergleich zur Mo-GFP-Kontroll-Gruppe noch vermindert zu sein, die Kurve verläuft aber höher als die der Mo-NL-Gruppe. Eine Mutation der SH3-Bindungsstelle des Nef-Proteins vermindert dessen Funktion im DTH-Experiment also nur teilweise. In Mo-G2A-infizierten Tieren entspricht der DTH-Verlauf über die gesamte Messzeit dem der Mo-NL-infizierten Gruppe. Die Myristylierung von Nef und damit die Lokalisation an der Zellmembran scheint also nicht notwendig zu sein. Dies ist insofern überraschend, als dass *in vitro* und auch *in vivo* Experimente zeigten, dass myristylierungsdefektes Nef in Funktionen wie CD4-Internalisierung und Interaktion mit der Signalübertragung defekt ist (97, 235).

Es kann zumindest angenommen werden, dass Mo-NL das zelluläre Immunsystem der infizierten Tiere in einer Weise beeinträchtigt, die opportunistische Infektionen des Auges durch *Pasteurella pneumotropica* ermöglicht. Inwieweit die Mechanismen des Augenphänotyps und

der DTH-Reaktion zusammenhängen ist unklar, da sich Mo-PA1- und Mo-G2A-infizierte Tiere im Vergleich von Augen- und DTH-Phänotyp inkonsistent verhalten. Möglicherweise handelt es sich um zwei unabhängige Mechanismen und die opportunistischen Infektionen in Mo-NL-infizierten Mäusen treten unabhängig von der Zahl und Funktionstüchtigkeit von CD4⁺ T-Lymphozyten auf, wie es auch in *nef*-transgenen Mäusen der Fall ist (250).

III.5 Perspektiven

In mit rekombinanten MoMuLV infizierten Mäusen wurde abhängig von der Expression des HIV-Nef-Proteins das Auftreten einer eitrigen Pasteurellose im Augenbereich beobachtet. Veränderungen in der Aktivität CD8⁺ T-Zellen und natürlicher Killerzellen waren jedoch nicht nachweisbar. CD4⁺ T-Lymphozyten wurden in ihrer Quantität und CD4-Expression auf der Zelloberfläche durch Mo-NL nicht beeinflusst. Sie zeigten aber eine reduzierte spezifische Aktivität auf coverabreichtes LCM-Virus in der Fußsohle der Tiere. Ein funktionsfähiges SH3-Bindungsmotiv von Nef sowie die Lokalisierung an der Plasmamembran waren notwendig für die Induktion der Augenentzündungen. Der Einfluss auf eine LCMV-spezifische DTH-Reaktion war jedoch begrenzt. Die Beeinträchtigung des Immunsystems ist dezent, aber eindeutig vorhanden. Das Nef-spezifische Auftreten der Augeninfektionen kann vermutlich durch den andauernden Kontakt mit *P. pneumotropica* erklärt werden, wobei sich die Nef-spezifischen Beeinträchtigungen der Immunantwort und damit das Auftreten einer akuten Infektion möglicherweise dadurch beschreiben lassen, dass das sensible EALT-Gewebe des Auges durch dezente aber anhaltende Beeinträchtigungen soweit in seiner Funktion gestört wird, dass sich *Pasteurella*-Infektionen manifestieren können. Histologische Schnitte des Augengewebes zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion könnten hier unter Umständen zur weiteren Aufklärung dieses Nef-Phänotyps beitragen. Ob hierdurch allerdings aussagekräftige Erkenntnisse für die Funktion des Nef-Proteins im natürlichen Kontext einer HIV-Infektion gewonnen werden können, ist unklar. Es könnten zumindest Hinweise auf Nef-Motive und Funktionen gefunden werden, die für die Pathogenese in primären Zellen notwendig sind.

Daneben bieten Mo-Luc und Mo-GFP ein geeignetes Infektions-System, mit welchem Proteine inserierter Gene *in vivo* untersucht werden können. Mit diesen Konstrukten wird es ermöglicht, detaillierte Untersuchungen des Verlaufes einer MoMuLV-Infektion über einen Zeitraum von mindestens 12 Wochen durchzuführen. Die Virus-Konstrukte bieten sich daher für Studien des bislang unvollständig beschriebenen Infektionsverlaufes der MoMuLV-Infektion an. Studien an diesem einfachen Retrovirus könnten auch zur Aufklärung lentiviraler Infektionsprozesse dienen.

Das in dieser Arbeit konstruierte und getestete ekotrope Mo-GFP könnte beispielsweise zur Identifizierung der früh in der Infektion im Knochenmark der Maus infizierten Zellen verwendet werden, um die frühen Infektionsereignisse, die zur Entstehung der T-Zell-Leukämie führen, zu untersuchen. Bisherige Experimente sind mit einem gut detektierbaren nicht replikationskompetenten Vektor, dem ekotropen MoMuLV Wildtyp, durchgeführt worden (182). Da sich Mo-GFP in seinen Replikationseigenschaften nicht von Mo unterscheidet, aber leicht

detektierbar ist, stellt es für diese Art der Versuche ein ideales Werkzeug dar. Des Weiteren kann der Verlauf der Infektionsereignisse verfolgt werden, da Mo-GFP im Gegensatz zum einem retroviralen Vektor replikationskompetent ist.

IV. Material und Methoden

IV.1 Material

IV.1.1 Chemikalien

Die meisten der verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“ und wurden von folgenden Lieferanten bezogen: Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg i.Br.), Roth (Karlsruhe), Riedel de Haen (Seelze) und Roche (Mannheim).

IV.1.2 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung von Puffern und anderen Lösungen wurde destilliertes Wasser aus einer Millipore Filtrationsanlage verwendet (MilliQ). Die pH-Werte der Lösungen wurden bei Raumtemperatur eingestellt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Tris-HCl	1 M Tris, pH 8.0 mit HCl
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.5 mM EDTA
DNA-Präparationslösungen	Lösung I: 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, 50 mM Glucose Lösung II: 1% SDS, 0.2 M NaOH Lösung III: 3 M Kalium Acetat, pH 5.0
TE/RNase	TE-Puffer mit 50 µg/ml RnaseA
50 x TAE-Puffer	2 M Tris-Base, 0.25 M Essigsäure, 0.05 M EDTA
5 x DNA-Ladepuffer für Agarosegele	50% Glycerin, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM EDTA, 0.01% Brom-Phenolblau
PBS	120 mM NaCl, 17 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.2
PBST	PBS, 0.5% Tween
HeBS	280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 12 mM Dextrose, 50 mM HEPES, pH7

Tabelle IV-1: Häufig verwendete Puffer und Medien

IV.1.3 Lösungen und Puffer für die Proteingelektrophorese

Laufpuffer:	25 mM Tris HCl pH 8,3 1.45% Glycin 0.1% SDS
6x Protein-Ladepuffer:	350 mM Tris HCl pH 7.5 10% SDS (w/v) 36% Glycerin (v/v) 0.03% Bromphenolblau 5% β -Mercaptoethanol
Tris-Puffer pH 6.8/7.5/8.8 :	1 M Tris mit HCl auf pH 6.8/7.5/8.8 eingestellt

Sammelgel:	<u>3%</u>
Acrylamidlösung	1 ml
1 M Tris-Puffer pH 6,8	1.25 ml
10% SDS	300 μ l
H ₂ O	7.5 ml
10% APS	100 μ l
TEMED	15 μ l

Trenngel:	<u>10%</u>	<u>12.5%</u>	<u>15%</u>
Acrylamidlösung	10 ml	12.5 ml	15 ml
1 M Tris-Puffer pH 8.8	11.25 ml	11.25 ml	11.25 ml
10% SDS	300 μ l	300 μ l	300 μ l
H ₂ O	8.15 ml	5.65 ml	3.15 ml
10% APS	300 μ l	300 μ l	300 μ l
TEMED	15 μ l	15 μ l	15 μ l

Molekulargewichtstandardmarker für Proteingele:

Niedermolekularer Größenmarker	Bio-Rad, München
Molekulargewichts-Standardmarker	Life Technologies, Karlsruhe
Vorgefärbter Proteinmarker	Life Technologies, Karlsruhe

Western Blot Transfer-Puffer: 0,3 M Tris, 20 % MeOH

Ponceau-S Lösung: Ponceau-S Rot: 0,1 % Lösung in 5 % Essigsäure

IV.1.4 Kits

In der vorliegenden Arbeit wurden Kits von folgenden Firmen eingesetzt:

Bezeichnung	Hersteller
QIAquick	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QiaShredder	Qiagen, Hilden
QIAamp - Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy - Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden
NucleoBond PC 100/500	Macherey-Nagel
TRI-Reagent	Gibco, BRL
C-type RT-Assay	Innovagen, Lund, Schweden
RT-PCR Kit	
FACS-Lysis Lösung	Becton Dickinson, Heidelberg
1kb DNA-Molekulargewichtsmarker	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus

Tabelle IV-2: verwendete Kits

IV.1.5 Enzyme

Restriktionsenzyme, T4-DNA Ligase, T4-DNA Polymerase, Klenow Enzym, thermostabile DNA-Polymerasen, alkalische Phosphatase und RNase A wurden von folgenden Firmen bezogen: New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Roche Mannheim (Mannheim), Pharmacia (Freiburg i.Br.), Stratagene (Heidelberg), MBI-Fermentas (St.Leon-Roth) und Sigma (Deisenhofen). Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

IV.1.6 Oligonukleotide

Für PCR-Reaktionen und Sequenzierungen wurden folgende Oligonukleotide (Primer) eingesetzt:

Name	Sequenz (5' → 3')
<u>nef</u>	
Nef 6	AAC TGC AGA <u>ATC/GAT</u> ¹ AGC <u>AC/C</u> <i>ATG</i> ² GGT GGC AAG TGG TC
Nef 7	CGG AAT TCT <u>ATC/GAT</u> TAG CAG TTC TTG AAG TAC TCC G
G2A-nef	AAC TGC AGA <u>ATC/GAT</u> ¹ AGC <u>AC/C</u> <i>ATG</i> ² GAT GGC AAG TGG TC
<u>MoMuLV</u>	
CS107neu	AAG CCT ATA GAG TAC GAG CCA TAG
CS108neu	CAG GGT CAT TTC AGG TCC TTG G
MoEnde	AGA CAG CAT GGC CAA ATT GAG

IV.1.7 Medien und Reagenzien für die Arbeit mit Bakterien

Die Medien (Sambrook *et al.*, 1989) und alle Lösungen für die Arbeit mit Bakterien oder rekombinanter DNA wurden direkt nach der Herstellung durch Autoklavieren sterilisiert oder sterilfiltriert. Nach Bedarf wurde dem LB-Medium für Flüssigkulturen oder Agarplatten nach Erkalten 100 µg/ml Ampicillin (LB_{Amp}) zugefügt.

Für alle Klonierungsarbeiten wurden Escherichia coli (E. coli) der Stämme XL-1 Blue (Stratagene, Heidelberg) mit den Genotyp-Merkmalen *hsdR17, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F⁻, proAB, lacI^qΔM15, Tn10,(Tet^r)]* und STBL2 (Invitrogen, Karlsruhe) mit dem Genotyp *F⁻ mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 lon gyrA96 thi supE44 relA1 λ⁻ Δ(lac-proAB)* verwendet.

¹ unterstrichen dargestellt: Schnittstelle relevanter Restriktionsenzyme mit Angabe der Trennungsstelle (/).

² kursiv dargestellt: Startkodon.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 5 g/l NaCl.
LB-Agar	LB-Medium mit 1.5% Agar wurde nach dem Abkühlen in sterile 10 cm Kunststoff-Petrischalen gegossen und bei 4°C aufbewahrt.
LB-Amp-Platten	LB-Agar-Platten versetzt mit 100µg/µl Ampicillin
SOB-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl. Vor Gebrauch Zugabe von je 10 mM MgCl ₂ und MgSO ₄
TB-Puffer	10 mM Pipes, 55 mM MnCl ₂ , 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl, pH 6.7, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.
Ampicillin	100 mg/ml in Wasser, sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt

Tabelle IV-3: Medien für die Arbeit mit Bakterien

IV.1.8 Materialien für die Zellkultur

Plastikwaren für die Zellkultur stammten von den Firmen Nunc (Wiesbaden-Biebrich), TPP (Trasachingen, Schweiz), Corning (New York, USA). Netwell-Einsätze wurden von der Firma Corning (New York, USA) bezogen. Für die Organkultur wurden Nitrozellulose-Filter der Firma Millipore und Nucleopore-Filter der Firma Schleicher und Schull (Dassel) eingesetzt.

IV.1.9 Zellen und deren Kultivierung

IV.1.9.1 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung / Art	Besonderheiten
293T	humane Zervixkarzinomzellen	gut transfizierbar
BOSC	humane Leberzellkarzinomzellen, abgeleitet von 293T	ekotropes Hüllprotein von MLV
Sc-1	murine Fibroblasten	
3T3	murine Fibroblasten	
Jurkat-T	humane T-Zelllymphomlinie	trägt T-Antigen, gut geeignet für IVKA
SupT1	Humane T-Zelllymphomlinie	starke und homogene Expression von CD4

IV.1.9.2 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
RPMI 1640	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640 (Gibco BRL, Gaithersberg USA), versetzt mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium (Gibco BRL) versetzt mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin
Primärzellmedium	RPMI 1640 versetzt mit 15% (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 50µM Mercaptoethanol, nicht-essentiellen Aminosäuren (Gibco BRL) und Vitaminen (Gibco BRL)
Einfriermedium	50% RPMI 1640, 40% FCS, 10% DMSO

IV.1.10 Antikörper**Spezifische Erstantikörper:**

Die Verdünnungen der einzelnen Antikörper für Western Blot (WB) (Nachweis mittels AP), indirekter Immunfluoreszenz (IF) sowie in der indirekten Immunfluoreszenz nach Titration sind angegeben.

Spezifität	Herkunft / Spezies	Bezugsquelle	Western Blot	IF
α -Nef (HIV) ARF444	Ziege	Harris, Leeds	1:2000	1:100
α -Nef (HIV) ARP3026 & ARP3108	Monoclonal, Maus	Harris, Leeds	1:1000	--
α - CA _{p30} (MoMuLV)	Kaninchen	Stocking, Hamburg	1:2000	1:150
α - CA _{p30} (MoMuLV)	Kaninchen	NIH, USA	1:500000	1:200
α -GFP	Kaninchen	Welker, Hamburg	-	1:150

Spezifische Zweitantikörper:

Spezifität	Herkunft / Spezies	Marker	Western Blot	IF
α -Kaninchen	Ziege	HRP	1:10000	-
α -Ziege	Kaninchen	HRP	1:10000	-
α -Kaninchen	Ziege	Alexa-Fluor 568 oder 594 (Molecular Probes, Leiden Niederlande)	-	1:2000
α -Ziege	Esel	Alexa-Fluor 568 oder 594	-	1:2000

Antikörper für die FACS-Analyse:

Spezifität	Herkunft/Spezies	Marker
Humanspezifische Antikörper:		
α -CD3	Armenian Hamster IgG	Cy-chrome™
α -CD4	Ratte IgG _{2A} κ	PE
α -CD4	Ratte IgG _{2A} κ	APC
α -CD8	Ratte IgG _{2A} κ	PE
Mauspezifische Antikörper:		
α -CD3	Armenian Hamster IgG	Cy-crome™
α -CD4	Ratte IgG _{2A} κ	PE
α -CD8	Ratte IgG _{2A} κ	FITC
α -CD8	Ratte IgG _{2A} κ	PE

IV.2 Molekularbiologische Methoden

IV.2.1 Gentechnische Arbeiten

Alle Arbeiten mit DNA wurden nach allgemein üblichen Verfahren (Sambrook *et al.*, 1989) in entsprechend zugelassenen Labors durchgeführt. Bei der Kultivierung von Bakterien und bei gentechnischen Methoden wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Zur besseren Standardisierung einiger Arbeitsschritte wurden kommerziell erhältliche, gebrauchsfertige Kits verwendet.

IV.2.2 Kultivierung und Konservierung von *E. coli* Stämmen

Bakterien wurden entweder auf LB-Platten oder in LB-Flüssigmedium gehalten. Die Kultivierung transformierter Bakterien erfolgte immer in Gegenwart von 100 µg/ml Ampicillin. Für kleine DNA Präparationen („Mini-Preps“) wurden Röhrchen mit 5 ml LB-Amp aus einer Glycerinkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Zur Grob­aufarbeitung von DNA wurden 200 ml LB-Amp in einem Erlenmeyerkolben inokuliert und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert.

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen wurden 700 µl einer stationären Kultur mit 300 µl sterilem Glycerin (50%) versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

IV.2.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien erfolgte nach der Methode von Inoue et al. (1990) Dazu wurden 250 ml SOB-Medium mit 2 ml einer *E. coli* XL-1 Übernachtskultur inokuliert und für ungefähr 24 Stunden bei 20°C in einem 2 l Erlenmeyerkolben kultiviert, bis eine OD₆₀₀ (optische Dichte) von 0.5 erreicht war. Danach wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, zentrifugiert und nach Waschen mit eiskaltem TB Puffer in 25 ml TB resuspendiert. Nach zehninütiger Inkubation der Bakterien auf Eis wurde Dimethylsulfoxid in einer Endkonzentration von 7% zugesetzt. Nach Aliquotieren in 100 - 500 µl wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Bakterien hatten eine Transformationskompetenz von bis zu 10⁷ Kolonien pro µg Plasmid-DNA.

IV.2.4 Transformation von Bakterien

Nach dem Auftauen transformationskompetenter *E.coli* auf Eis wurden 50 µl Bakteriensuspension mit 15 µl DNA eines Ligationsansatzes oder mit 1 µl reiner Plasmid DNA vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 40 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt, mit 250 µl LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert, um die Expression der Beta-Laktamase zu ermöglichen. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde der gesamte Ansatz auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

IV.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli* erfolgte nach dem Verfahren der alkalischen Lyse. Für die Gewinnung kleiner Mengen von Plasmid DNA („Mini-Preps“) wurden ca. 2 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in 2 ml Eppendorf-Gefäßen für 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl eiskalter Lösung I resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 200 µl Lösung II durch Invertieren gemischt. Anschließend wurden 150 µl Lösung III hinzugegeben, abermals invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Der Niederschlag wurde für

15 min in einer Mikrozentrifuge bei voller Drehzahl pelletiert, der Überstand in ein neues 1.5 ml Röhrchen transferiert, die DNA mit 1 ml absolutem Ethanol präzipitiert und anschließend für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE/Rnase A gelöst und konnte dann direkt für Restriktionsverdau (zur Analyse je 2-8 µl, zur Präparation 10-40 µl), oder zum Sequenzieren (16 µl bzw. 3 µl) eingesetzt werden.

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 200 ml einer stationären Übernachtskultur von E.coli ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgearbeitet. Anschließend wurde die gelöste DNA über Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) beziehungsweise der Firma Macherey-Nagel (Düren) gebunden und gemäß den Angaben des Herstellers gewaschen und eluiert. Diese Vorgehensweise ergab bei „high copy“ Plasmiden 500-800 µg Plasmid DNA.

IV.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Nukleinsäuren haben eine maximale Extinktion (optische Dichte, OD) bei 260 nm. Bei einer Konzentration von 50 µg / ml hat doppelsträngige DNA eine OD₂₆₀ von 1.0. Damit lässt sich die DNA-Konzentration berechnen. Proteine haben eine höhere Extinktion bei 280 nm und der Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt eine Auskunft über den Reinheitsgrad der DNA. Bei einer sauberen DNA Präparation sollte der Quotient einen Wert zwischen 1.8 und 2.0 ergeben.

IV.2.7 Alkoholpräzipitation von DNA

Zur Konzentrierung oder zum Pufferwechsel kann DNA mit Alkohol quantitativ präzipitiert und in einem neuen Puffer wieder aufgenommen werden. Dazu wird ein gegebenes Volumen DNA-Lösung mit 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 4.8) und drei Volumina absolutem Ethanol versetzt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge für 15 bis 30 min bei voller Drehzahl und 4 °C pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE gelöst.

IV.2.8 Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Spaltungen von Plasmid DNA mit Restriktionsenzymen wurden nach Angaben der Hersteller unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Das Volumen des zugesetzten Enzyms darf dabei 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Teilweise wurden die Restriktionsenzyme anschließend bei 65 oder 75 °C für 20 min thermisch inaktiviert.

Ein diagnostischer Verdau wurde in der Regel mit 1-2 µg DNA (oder 4 µl Mini-Prep DNA) in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Für präparative Zwecke wurden zwischen 2 und 20 µg DNA (oder 10 - 40 µl Mini-Prep DNA) in einem Volumen von 50 bis maximal 100 µl verdaut.

IV.2.9 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Eine nicht-denaturierende elektrophoretische Größenauftrennung von DNA Fragmenten erfolgte über 0.7-2% Agarose-Horizontal-Gele (w/v) mit 2 µg/ml Ethidiumbromid in TAE Puffer bei einer Spannung von 6 bis 8 Volt/cm. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 0.2 Volumen Ladepuffer vermischt. Als Größenmarker wurde in der Regel mit *HindIII* und *EcoRI* verdaute Lambda-Phagen DNA oder kommerziell erhältliche Längenstandards verwendet. Die DNA Fragmente wurden durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator (254 nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis über eine Videokamera mit angeschlossenem Drucker (Intas, Göttingen) dokumentiert.

IV.2.10 Isolierung von DNA-Fragmenten

Nach elektrophoretischer Trennung im Agarosegel wurden Gelstückchen mit den benötigten DNA Fragmenten bei langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten. Zur anschließenden Extraktion der DNA Fragmente aus dem Gelmaterial wurde die Kits "Jet-Sorb" der Firma Genomed oder „Qiaquick“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers benutzt. Prinzip: die Agarose wird in Gegenwart hoher Konzentrationen von chaotropen Salzen bei 50°C geschmolzen. Unter diesen Bedingungen bindet die DNA an eine Silikatmatrix, welche von der Agarose abzentrifugiert werden kann. Anschließend wird die DNA in einem Puffer mit niedrigem Salzgehalt (TE) von der Matrix eluiert.

IV.2.11 Extraktion genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Extraktion genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wurden 1×10^7 Zellen in 1 ml TRI-Reagent (Gibco BRL) lysiert und nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die Qualität der gewonnenen DNA wurde im Agarosegel überprüft. Die Ausbeute wurde im Photometer ermittelt (2.2.6).

IV.2.12 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion („polymerase chain reaction“; PCR) dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Sequenzen unter Verwendung von hitzestabilen DNA-Polymerasen sowie zweier Oligonukleotide als Startermoleküle („Primer“), die zu je einem kurzen Abschnitt der beiden Ursprungs-DNA-Stränge komplementär sind (175).

Die PCR wurde in einem 20-50 µl Ansatz unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 250 nM dNTP`s, 25 - 50 ng Template DNA, je 1 pM/µl Primer, 1 Einheit Polymerase (Taq-Polymerase oder Pfu- Polymerase). Puffer: 20 mM Tris HCl pH 8,2, 5 mM KCl, 4 mM MgCl₂.

PCR-Produkte, welche zur Klonierung vorgesehen waren, wurden mit Pfu-Polymerase amplifiziert, um die Wahrscheinlichkeit PCR bedingter Mutationen zu minimieren. Für die Klonierung sowie für die Einführung von Mutationen in DNA Fragmente wurden die Primer

entsprechend mit Restriktionsschnittstellen bzw. mit Nukleotidaustauschen versehen, wobei darauf geachtet wurde, dass der an der Template DNA hybridisierende Teil groß genug war (je nach GC-Gehalt > 18 nt.). Die Reaktion wurde je nach Primerkombination und Fragmentlänge in einem Thermocycler (Perkin Elmer, Rodgau) über 35 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurde das jeweils amplifizierte Fragment über ein Agarosegel gereinigt, nach Schneiden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in einen Vektor kloniert und durch Sequenzieren überprüft. Die Amplifikation von DNA Fragmenten aus Zelllysaten erfolgten mit Taq-Polymerase.

IV.2.13 Nachweis spezifischer mRNAs durch reverse Transkription und PCR (RT-PCR)

Zum Nachweis spezifischer mRNAs in Zellen wurde aus Gesamt-RNA wurde mit RNeasy-Säulen (Qiagen) aufgereinigt. Die reverse Transkription in cDNA erfolgte mit dem RETROscript Kit (Ambion, Huntington, UK) nach den Angaben des Herstellers. Die cDNAs wurden direkt in spezifischen PCR-Analysen mit den angegebenen Primern auf rekombinante MoMuLV bzw. die Vollständigkeit der in MoMuLV eingefügten Gene untersucht.

IV.2.14 Ligation von DNA-Fragmenten

Vor jeder Ligationsreaktion wurden die isolierten DNA Fragmente, die entweder kohäsive oder stumpfe Enden trugen, zur groben Quantifizierung nebeneinander im Agarosegel aufgetrennt. 5 bis 50 ng Vektor DNA wurden mit einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuss des DNA Fragments in einem Gesamtansatz von 15 µl mit 3 Einheiten T4 DNA Ligase versetzt und mindestens 4 h bei 16°C inkubiert. Als Kontrolle wurde immer eine zweite Ligation ohne Fragment angesetzt. Zur Transformation von kompetenten Bakterien wurden 10-15 µl des Ligationsansatzes verwendet.

IV.2.15 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden mit dem Kapillarsequencer CEQ-2000 (Beckman-Coulter, Krefeld) unter Verwendung des DCTS-Kits (Beckman-Coulter, Krefeld) mit 1,6 pmol Primer durchgeführt. Das Protokoll für die PCR-Reaktion war: 20s 96°C, 20 s 50°C, 4 min 60°C. Die Reaktion wurde mit 3 M NaAcetat, 100 mM EDTA und Glycogen abgestoppt und die DNA mit Ethanol präzipitiert. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 35-40µl deionisiertem Formamid resuspendiert, in eine 96-Loch-Platte gegeben, mit je einem Tropfen Mineralöl bedeckt und in die Kapillaren des Sequenziergerätes geladen.

IV.2.16 Computerunterstützte Sequenzanalyse

Zur Bearbeitung von Sequenzen wurde die Software „Vector NTI Suite“ der Firma InforMax (Oxford, UK) verwendet. Automatische Sequenzvergleiche erfolgten unter Verwendung von CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997).

IV.2.17 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können mittels denaturierender Gelelektrophorese annähernd nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Verschiedene Färbetechniken können die aufgetrennten Proteine im Gel sichtbar machen, wodurch Aussagen über den Proteingehalt und die Proteinzusammensetzung einer Lösung ermöglicht werden. Die aufgetrennten Proteine können weiterhin auf geeignete Membranen übertragen werden, wo sie dann für spezifisch immunochemischen Nachweisverfahren zugänglich sind. Durch die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen (Primärstruktur) haben Proteine verschiedene Ladungen, sowie Sekundär- und Tertiärstrukturen, weshalb zwischen Größe, Ladung und Laufweite eines nativen Proteins im elektrischen Feld kein einfacher Zusammenhang besteht. Wird das Protein jedoch durch β -Mercaptoethanol oder DTT reduziert und durch Detergenzien wie SDS denaturiert, ergibt sich eine annähernde Korrelation zwischen Molekulargewicht und Laufweite des Proteins. Das amphipathische SDS lagert sich mit seinem hydrophoben Bereich an Proteine und verleiht ihnen durch die hydrophile Sulfat-Gruppe eine von der Größe abhängige negative Ladung (1.4 g SDS/g Protein in 1% SDS-Lösungen). Je nach Größe, wandern die denaturierten Proteine unterschiedlich schnell in Richtung Anode durch die Gelmatrix.

In der SDS-PAGE wurden zweiphasige Gele eingesetzt, die zu $\frac{1}{4}$ aus einem Sammelgel (3 % Acrylamid) und zu $\frac{3}{4}$ aus einem Trenngel (10 bis 15 % Acrylamid) mit unterschiedlichem pH-Wert bestanden. Die Gele wurden in Elektrophoreskammern mit TGS-Laufpuffer eingesetzt und anschließend mit Proteinlösungen beladen, die mit SDS-Proteinladepuffer versetzt und 10 min auf 95°C erhitzt worden waren. Zusätzlich wurde in mindestens einer Spur ein Molekulargewichtsstandardmarker aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bis zur ausreichenden Auftrennung der Proteine bei 100-150 V.

IV.2.18 Western Blot und Chemolumineszenz-Nachweis

Beim Western Blot werden die Proteine eines Polyacrylamidgels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, wodurch sie angefärbt und immunochemisch nachgewiesen werden können. Für den Western Blot wurden Halbtrocken-Blotkammern verwendet. Drei Lagen in Transfer-Puffer getränktes Filterpapier (Whatman, Kent, England) wurden auf die Anodenplatte gelegt, und dann eine mit Transfer-Puffer angefeuchtete Nitrozellulosemembran, gefolgt vom Polyacrylamidgel und drei weiteren Lagen in Transfer-Puffer getränktem Filterpapier aufgelegt. Nachdem die Kathodenplatte aufgesetzt war, erfolgte der Elektro-transfer für 1 h bei 0.8 mA

pro cm² Gelfläche. Anschließend wurden die auf die Membran übertragenen Proteine in Ponceau-S Lösung für 4 min gefärbt, um die Effizienz des Elektrotransfers zu überprüfen. Dabei wurden stärkere Proteinbanden nach kurzem Entfärben der Membran in Wasser sichtbar. Unspezifische Antikörperbindungsstellen auf den Membran wurden durch Inkubation in Blocklösung (5% Magermilch in PBS) für zwei Stunden bei Raumtemperatur, oder bei 4 °C über Nacht abgesättigt. Im Anschluss wurden die Membranen kurz in Waschlösung gewaschen und mit dem in Blocklösung verdünnten Primär-Antikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 5-30 min in PBST gewaschen. Anschließend wurde ein gegen den ersten Antikörper gerichteter Sekundär-Antikörper, der mit dem Enzym HRP (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt ist, 1:10000 in Blockierlösung verdünnt und mit der Membran für 2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimal 10-30 min Waschen in PBST-1 oder PBST-2 entfernt.

Das Enzym HRP am Sekundär-Antikörper ermöglichte indirekt die Detektion des Proteins durch Chemilumineszenz (ECL). Dazu wurde ein Chemilumineszenz Detektions Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die HRP katalysierte Oxidation des Luminols führt über einen angeregten Zustand des Substrats zur Chemilumineszenz die durch Exposition (5 s bis 30 min) eines Röntgenfilms abgelichtet werden konnte.

IV.3 Zellbiologische und virologische Methoden

IV.3.1 Zellkultur

Die adhären wachsenden Zellen wurden in DMEM, versetzt mit FCS, Glutamin und Antibiotika, bei 37 °C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Passagierung wurden die adhären Zellen nach Waschen mit PBS vom Boden des Gefäßes trypsinisiert und je nach Bedarf auf neue Kulturgefäße in frischem Medium verdünnt.

IV.3.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Von den kultivierten und frisch isolierten Zellen wurden regelmäßig Portionen eingefroren. Dazu wurden die Zellen fünf Minuten bei 275 x g zentrifugiert, das Zellpellet in FCS mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden-Biebrich) überführt. Proben für kurze Aufbewahrungsdauer, wurden bei -80°C aufbewahrt, für langfristige Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

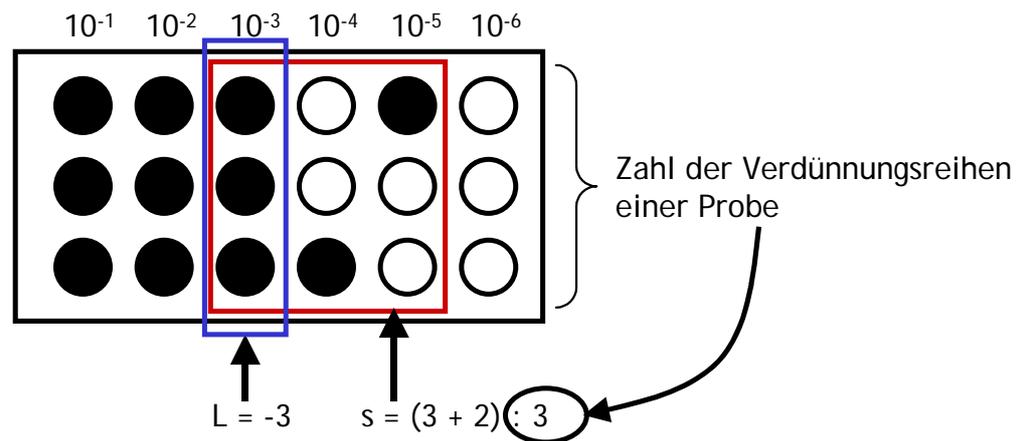
Bei Bedarf wurden die eingefrorenen Zellportionen schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit Medium gewaschen, um das toxische DMSO auszudünnen und dann in Kulturmedium aufgenommen.

IV.3.3 Transfektion von Zellen zur Herstellung von Viruspartikeln

Die Transfektion von Zellen erfolgte nach der Kalzium-Phosphat-Methode. Für die Transfektion wurden 5×10^6 BOSC-Zellen in eine 10cm Schale ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch genau 9 ml frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 2 bis 4 Stunden wieder in den Inkubator gestellt. 20 µg provirales Plasmid wurden in 500 µl 0,25 M CaCl_2 Lösung suspendiert und danach wurde diese Lösung sofort mit 500 µl 2 x HBS sorgfältig gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde dann unter Schwenken der Zellkulturschale ins Medium getropft. Die Zellen wurden über Nacht bei 35°C in einer Atmosphäre von 3 % CO_2 und gesättigtem Wasserdampf inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium verworfen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit frischem Medium für zwei weitere Tage bei 37°C in einer Atmosphäre mit gesättigtem Wasserdampf und 5% CO_2 inkubiert. Am Tag 2 nach Transfektion wurde morgens abermals das Medium erneuert (4 ml) und 6 - 8 Stunden später eingesammelt, durch eine 0.45 µm Membran filtriert und bis zur weiteren Verwendung am folgenden Tag bei 4°C gelagert. Mit 10 ml frischen Medium wurden die Zellen bis zum darauffolgenden Tag gehalten. Morgens wurde nochmals das Medium abgenommen, filtriert und mit dem am Vortag geernteten Medium vereinigt. 4 ml Medium wurden wiederum 6 - 8 Stunden später geerntet, filtriert und mit dem schon geernteten Medium vereinigt. Die Überstände wurden portionsweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Virusmenge wurde durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt.

IV.3.4 Titration von MoMuLV-Überständen

Virushaltige Überstände wurden in 10er Schritten bis 10^{-6} in Medium verdünnt. Die Verdünnungen wurden mit 8 µg / ml Polybren versetzt und auf die am Vortag ausgesäten Zellen (2×10^4 pro Loch einer 24 Loch Platte) gegeben. 24 h später wurde der Überstand abgenommen und durch frisches Medium mit 400 ng / ml G418 (HeLa und Sc-1) ersetzt. Der Titer wurde nach 5 - 7 Tagen in der indirekten Immunfluoreszenz bestimmt. Kapsid-Protein in infizierten Zellen wurden wie in IV.3.8 beschrieben markiert. Das letzte Loch in der Verdünnungsreihe mit Zellen, die Kapsid exprimierten wurde als Endpunkt angesehen. Anhand folgender Formel wurde daraus der Virus-Titer berechnet:



$$\text{Titer in cfu/ml} = L - d (s - 0.5)$$

L = höchste Verdünnungsstufe eines Virus, die in allen Immunfluoreszenzen positiv ist

d = Verdünnungsfaktor

s = Summe der Proben der höchsten in allen Parallelproben p30-positiven Verdünnungsstufe

+ alle übrigen positiven Proben höherer

Verdünnungen : Zahl der

Verdünnungsreihen

IV.3.5 Bestimmung der Aktivität der reversen Transkriptase in Viruspräparationen

Die Aktivität der reversen Transkriptase in Viruspräparationen wurde mit Hilfe des RETROsys C-type RT activity Kits (Innovagen, Lund, Schweden) nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls bestimmt. Der colorimetrische Assay erlaubte neben der Bestimmung der RT-Aktivität auch die Quantifizierung des RT-Enzyms in U/ml.

IV.3.6 Transduktion von Zellen

Am Vortag ausgesäte Zellen wurden mit der gewünschten Menge Überstand der transfizierten BOSC-Zellen und 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybren transduziert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C gehalten. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium erneuert und die Zellen für weitere drei bis fünf Tage, bis zur weiteren Verarbeitung der transduzierten Zellen, inkubiert.

IV.3.7 Durchflußzytometrische Zell- und Gewebeanalyse (FACS)

Für die FACS-Analyse wurden Zellen (0.5×10^5 - 1×10^6) zunächst durch zweimaliges Waschen in PBS mit 0.5% FCS vorbereitet. Die Zellen wurden anschließend in 100µl PBS mit 0.5% FCS resuspendiert. Die verschiedenen Antikörper wurden nach Angaben der Hersteller zu der Zellsuspension gegeben und das Gemisch für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Markierung wurden die Zellen erneut zweimal in PBS mit 5% FCS gewaschen und in FACS-Röhrchen (Bekton-Dickinson, Heidelberg) überführt. Die Analyse erfolgte im FACScan bzw. FACS-Calibur (Bekton-Dickinson, Heidelberg).

IV.3.8 Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz

Durch indirekte Immunfluoreszenz (IF) können Proteine in Zellen über spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Zur IF wurden die Zellen auf sterilen Deckgläschen wachsend kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 10 min bei RT in 3.7% Paraformaldehyd fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgt für 5 min in 0.5% Triton X-100 bei RT. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit in 1% BSA-Lösung verdünnten Erstantikörpern für 1-2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in PBST gewaschen und mit den in 1% BSA-Lösung verdünnten Zweitantikörpern für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBST wurden die Zellen auf Objektträgern in 50% Glycerin oder Mowiol Einbettlösung eingebettet und bei 4 °C aufbewahrt.

IV.3.9 *In vitro* Bestimmung der Aktivität von Kinasen (IVKA)

Primärzellen wurden mit Amaxa, Zelllinien entsprechend mit der CaCl_2 -Methode mit den gewünschten Plasmiden transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und in KEB-Puffer lysiert. Unlösliche Komponenten wurden anschließend abzentrifugiert. Nef.GFP Fusionsprotein wurde mit einem polyklonalen α -GFP Antikörper gebunden und mit Protein-A-Sepharose-beads präzipitiert. Mit Nef.GFP assoziierte Proteine wurden hierbei kopräzipitiert. Nach der Bindung wurden die mit KEB-Puffer gewaschenen Protein-A-Sepharose-beads in KAB-Puffer aufgenommen. Dieser enthielt je 1 µl $^{32}\gamma$ -ATP pro Reaktion. Die bei Raumtemperatur durchgeführte *in vitro* Kinase Reaktion führte zur einer Bindung des radioaktiven ^{32}P an mit dem Nef.GFP Protein assoziierte Kinasen. Nach der Phosphorylierungsreaktion wurden die Proben auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und radioaktiv markierte Nef.GFP assoziierte Proteine auf einem Röntgenfilm dargestellt. Die Belichtung erfolgte für 24h bei -80°C .

IV.4 Tierexperimentelle Methoden

Alle tierexperimentellen Studien wurden an Mäusen der Stämme NIH/Ola, Balb/c oder C57BL/6 durchgeführt. Die Tiere wurden in der hauseigenen Tierversuchanlage unter SPF-Bedingungen gehalten. Nach der Tötung von Tieren durch Cervixdislokation wurden entnommene Organe gewogen und sofort weiterverarbeitet.

IV.4.1 MoMuLV-Infektion und Analyse von Mäusen

Die Virusinokulation erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von je 50-100 μ l virushaltigem Zellkulturüberstand. Die Virustiter lagen für bei infektiösen Partikelzahlen von 3.7×10^4 bis 1×10^5 pro Tier. Die Infektionen wurden spätestens 24h nach der Geburt durchgeführt.

Alle infizierten Tiere sowie die nichtinfizierten Kontrolltiere wurden regelmäßig auf Krankheitszeichen untersucht. Die Überlebensdauer der einzelnen Tiere wurde dokumentiert und war die Grundlage für die Berechnung der Mortalitätsrate. Blut und Organproben wurden entnommen und zur weiteren Analyse entsprechend verarbeitet.

IV.4.2 Blutentnahme und Aufarbeitung

Den Mäusen wurde retrobulbär mit Hilfe EDTA-beschichteter Glasröhrchen Blut abgenommen. Für die Isolierung genomischer DNA (gDNA) wurden zuvor die Erythrozyten mit 500 μ l Lyse-Puffer lysiert. gDNA wurde mit dem „QIAamp - Blood and Tissue Kit“ aufgereinigt. Zur FACS-Analyse wurden die Erythrozyten erst nach der Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern mit „FACS-Lysis“-Lösung lysiert und die gefärbten Zellen gleichzeitig fixiert.

IV.4.3 Nukleinsäure-Aufreinigung aus Gewebe

Für die DNA Gewinnung aus Gewebe wurde der „QIAamp .Blood and Tissue“ Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. 25 mg Gewebe (Milz: nur 10 mg) wurden in kleine Stückchen zerlegt und in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß mit 180 μ l ATL Lysepuffer versetzt. Nach Zugabe von Proteinase K Lösung (20 mg/ml) wurde das Gemisch bei 55°C unter Schütteln inkubiert, bis das Gewebe komplett lysiert war (etwa 3h). 20 μ l Rnase (20 mg/ml) wurde zugegeben und die Lösung 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben entsprechend den Vorgaben des Herstellers weiter verarbeitet und die gewonnenen gDNA-Proben auf ihre DANN-Konzentration überprüft und bei -20°C gelagert.

Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen) ebenfalls aus 10 bis 25mg Gewebe entsprechend des Herstellerprotokolls isoliert. Die RNA-Konzentration wurde bestimmt und die Proben schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

IV.4.4 Kultivierung von Bakterien aus Gewebematerial von Mäusen

Zur Kultivierung von Bakterien aus Gewebematerial von Mäusen wurden die entsprechenden Organe gewogen. Unter Zugabe von 1 ml destilliertem Wasser und einer Spatelspitze Seesand wurden die Organe in einem Mörser aufgeschlossen und humane Zellen, wie beispielsweise Erxthrozyten lysiert. Die Lysate wurden mit PBS in einer Verdünnungsreihe verdünnt. Jeweils 100 µl wurden auf Blutagarplatten aufgetragen und bei 37°C drei bis vier Tage kultiviert. Aus der Anzahl der Kolonien wurden die Bakterientiter pro mg Gewebe errechnet. Die Identifizierung der Kolonien erfolgte durch das mikrobiologische Institut der Universität Köln.

IV.4.5 Kultivierung primärer Splenozyten der Maus

Die Milz einer getöteten Maus wurde steril entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in 5 ml PBS auf Eis gehalten. Mit einem Spritzenstempel wurde die Milz durch einengmaschiges Drahtnetz gedrückt und die entstandene Zellsuspension mit 10 ml PBS in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen der Suspension wurden bei 4°C und 1500 UPM für 5 min abzentrifugiert, durch die Erythrozyten in der Zellsuspension bildete sich ein rosa Zellsediment. Mit 5 ml ACT-Puffer wurden die Zellen resuspendiert und anschließend für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Erythrozyten in der Suspension wurden hierbei durch osmotischen Schock lysiert, bei ausreichender Lyse erschien das Zellsediment dadurch nach erneuter Zentrifugation unter den obigen Bedingungen weiß. Die Milzzellen wurden anschließend in 4 ml Primärzellmedium aufgenommen und über Nacht mit 10µl/ml Concavalin A (1.5 mg/ml in PBS) und 2.5U/ml IL2 (20U/µl) stimuliert. Die weitere Kultivierung erfolgte in Primärzellmedium mit 2.5U/ml IL2.

IV.4.6 Der Chromiumfreisetzungstest zur Quantifizierung der Aktivität spezifischer zytotoxischer T-Zellen

Der Chromiumfreisetzungstest wurde mit Maussplenozyten und 3T3 Zellen (LCMV-Kapsid-Peptid-beladen und unbeladen) als Zielzellen durchgeführt. Subkonfluent wachsende Zielzellen wurden kultiviert und dabei in 10 ml komplettem RPMI Medium resuspendiert. 2×10^6 Zellen wurden anschließend in ein 15 ml Rundbodenröhrchen überführt, 5 min bei 1500 UPM abzentrifugiert und mit 4 ml serumfreien

RPMI gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wie zuvor wurden die Zellen in 4 ml serumfreien RPMI aufgenommen, für 2 min bei 1200 UPM sedimentiert und dann in 50-150 µl $^{51}\text{Na}_2\text{CrO}_4$ -Lösung (3.7×10^4 Bq/µl) für 60-80 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss dreimal durch Resuspension in 10 ml komplettem RPMI Medium und Zentrifugation für 2 min bei 1200 UPM gewaschen. Mit 1 ml komplettem RPMI Medium wurde das gewaschene Zellsediment resuspendiert und jeweils 0.5 ml der Zellsuspension in 19.5 ml komplettes RPMI Medium gegeben (entspricht einer 1:40 -Verdünnung). In der Verdünnung ergab sich eine Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml. Die 3T3-Zellen wurden auf zwei Ansätze aufgeteilt, von den einer mit 100

ng/ml LCMV-Peptid versehen wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurden die markierten Zielzellen für bis zu 30 min bei 37°C gelagert. Die zu untersuchenden Milzzellen (Effektorzellen) wurden mit einer Pipette in ihrem Kulturmedium resuspendiert. Etwa ¼ der Zellsuspension wurde zur erneuten Restimulierung weiterkultiviert, die restlichen ¾ wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1500 UPM für 5 min sedimentiert. Die Zellen wurden anschließend in 700-900 µl RPMI Medium mit 5 % FCS resuspendiert. Die Ko-kultivierung von Effektor- und Zielzellen erfolgte auf 96-Lochplatten mit Rundboden. Für jede Effektorzellkultur und Zielzelllinie wurde eine vertikale Reihe auf der Platte beladen. Anschließend wurden die Zellen für 4-4.5 h bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurde die Zelldichte im restlichen Volumen der Effektorzellsuspension bestimmt, um das Effektor-: Zielzellverhältnis (E:Z) in den Ko-kultivierungen angeben zu können. Am Ende der Inkubation wurden die Platten für 3 min bei 1000 UPM zentrifugiert. Jeweils 50 µl des Überstandes in den Vertiefungen wurde auf Szintillationsplatten überführt und diese über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Strahlungsaktivität der Mediumproben wurde anschließend im Szintillationszähler vermessen. Die aus den markierten Zielzellen freigesetzte Radioaktivität ist ein Maß für die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen auf die entsprechenden Zielzellen. Unter Berücksichtigung der spontan aus den Zielzellen freigesetzten Aktivität und der freigesetzten Aktivität bei vollständiger Lyse der Zielzellen, ließ sich der prozentuale Anteil der spezifischen Lyse der Zielzellen in den Vertiefungen wie folgt berechnen:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{X (\text{Probenwert}) \times \text{spontane Freisetzung } ^{51}\text{Cr} \quad [\text{cpm}]}{\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung} \quad [\text{cpm}]}$$

IV.4.7 Transfektion primärer Maussplenozyten

Primäre Maussplenozyten wurden wie in IV.4.5 kultiviert. Nach drei Tagen wurden je 5 x 10⁶ Zellen abzentrifugiert und in 200 µl RPMI-Medium ohne Zusätze resuspendiert. Nach Zugabe von DNA (siehe Tabelle) und 100 µl Amaxa-Lösung („human T-cell Nucleofector kit“, Amaxa, Köln) wurden die Zellen im Amaxa-Elektroporations-Gerät (Programm T-23) transfiziert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml RPMI ohne IL2 für 24h kultiviert und anschließend in der Durchflußzytometrie (IV.3.7) oder im *in vitro* Kinase Assay (0) untersucht.

pCMV-Nef.GFP	HIV-SF2- <i>nef</i> als Nef.GFP Fusionsprotein
pCMV-G2ANef.GFP	w.o. mit G2ANef-Mutante
pCMV-AxxANef.GFP	w.o. mit A ₇₂ xxA ₇₅ Nef-Mutante
pCMV-GFP	w.o. mit <i>gfp</i> allein

IV.4.8 Induktion einer *delayed type hypersensitivity* Reaktion mit lymphozytärem Choriomeningitis-Virus in Mäusen

Eine *delayed type hypersensitivity* (DTH) Reaktion in NIH/Ola Mäusen wurde durch subkutane Injektion von 5×10^5 cfu des Virus der lymphozytären Choriomeningitis (LCMV) in 50 μ l induziert. Die DTH-Reaktion wurde als lokale Schwellung des infizierten rechten Hinterfußes gemessen. Die dorsoventrale Dicke des Fußes wurde täglich über einen Zeitraum von 15 Tagen mit einer speziellen Schublehre (Oditest, Kröplin, Schlüchtern) bestimmt, die mit einer leichten Rückholfeder ausgestattet war. Die Schwellung wurde als Faktor aus der Dicke des dickeren infizierten Fußes im Vergleich zum contralateralen uninfizierten Fuß errechnet.

IV.4.9 Titration spezifischer Antikörper in LCMV-infizierten Mäusen

LCMV-spezifische Titer von IgG2a, IgM und Gesamt-Ig wurden mit einem *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt. ELISA-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) wurden mit LCMV-Virus beschichtet. Hierzu wurde 1 μ g einer Gradienten-gereinigten LCMV-Präparation (O. Utermöhlen, Köln) in 100 μ l PBS in jeden Napf gegeben und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für eine Stunde mit 1% BSA in PBS blockiert. Danach wurde dreimal mit PBS/0.05% Tween 20 gewaschen. Die Mausseren wurden seriell verdünnt. Die Startverdünnung lag bei 1/50. Je 100 μ l der Verdünnungen wurde auf die ELISA-Platte pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0.05% Tween 20 wurden 100 μ l der 1:1000 Verdünnung eines entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers zugegeben. Diese waren spezifisch für IgG2a, IgM oder Gesamt-Ig. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei RT wurden die Platten abermals dreimal gewaschen. Die Färbereaktion erfolgte bei RT je 50 μ l mit HRP-Substratlösung. Die Färbung wurde nach ca. 10 min mit 1N H₂SO₄ abgestoppt. Die Absorption bei 492 nm wurde im Photometer bestimmt. Die Absorption uninfizierter Mäuse (Normalserum) lag bei <0.1.

V. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIDS	Engl.: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> ; erworbenes Immunschwächesyndrom
Amp.	Ampicillin
ARV	Engl.: <i>AIDS related virus</i>
AS	Aminosäure
α	anti
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
C	Cytosin
CA	Capsidprotein
ca.	circa
CD	Engl.: <i>cluster of differentiation</i> ; Oberflächenprotein/-marker
cfu	Engl.: <i>colony forming units</i>
ConA	Concavalin A
D	Dalton
Δ	Delta
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTH	Engl.: <i>delayed type hypersensitivity</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Env, <i>env</i>	Engl.: <i>envelope</i> , Hüllprotein, Gen des Hüllproteins Env
FACS	Engl.: <i>fluorescence adsorbed cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FTOC	Engl.: <i>fetal thymus organ culture</i> ; Organkultur fötaler Thymi
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Engl.	Englisch
Env, <i>env</i>	Engl: <i>envelope</i> ; Hüllprotein; Gen für das Hüllprotein
EtOH	Ethanol

g	Gramm
G	Guanin
Gag; <i>gag</i>	Engl.: group specific antigen; virale Strukturproteine / Gen für die viralen Strukturproteine
gp	Glycoprotein
h	Stunde
HeBS	Engl.: HEPES buffered saline; HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HTLV	Humanes T-Zell Leukämievirus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	Integrase
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IRES	Engl.: <i>internal ribosome entry site</i>
IU	Engl.: <i>infectious units</i>
k	kilo
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LTR	Engl.: long terminal repeat
LCMV	Lymphozytäres Chroiomeningitis Virus
μ	mikro
m	milli
M	molar
MA	Matrix
MHC	Engl. : <i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
M.O.I.	Engl.: <i>multiplicity of infection</i> , Anzahl der infektiösen Einheiten pro Zelle
Mo, MoMuLV	Moloney Maus Leukämie Virus
MuLV	Murines Leukämievirus
mRNA	Engl.: messenger RNA; Boten-RNA
n	nano
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nukleokapsid
Nef, <i>nef</i>	Nef-Protein; Gen für das Nef-Protein
OD	Optische Dichte
p	Plasmid

Pak	p21-aktivierte Kinase
PBMC	Engl.: peripheral blood monocytes ; periphere Blutlymphozyten
PBS	Engl.: phosphate buffered saline ; Phosphat-gepufferte Salz-lösung
PCR	Engl.: polymerase chain reaction ; Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoeithrin
PIC	Präintegrationskomplex
pNL4.3	proviraler Klon von NL4.3
Pol, <i>pol</i>	Polymeraseproteine: PR, RT, IN; Gen für die Polymerase-proteine
PR	Protease
p30	Kapsid-Protein von MoMuLV
RLU	Relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Meduim
RT	Reverse Transkriptase
s.c.	subkutan
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec.	Sekunde
SH	Engl.: <i>src homology</i>
SIV	Engl.: simian immunodeficiency virus; Affen-Immundefizienz Virus
SU	Oberflächenglykoprotein (gp120)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris/EDTA
Temed	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
tk	Thymin-Kinase-Promotor
TM	Transmembranglykoprotein (gp41)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Engl.: unit ; Einheit
UV	ultraviolett
V	Volt
Wt	Wildtyp
w/v	Gewichts-/Volumenverhältnis
w/w	Gewichts-/Gewichtsverhältnis
z.B.	zum Beispiel

VI. Literaturverzeichnis

1. Acres, R. B., P. J. Conlon, D. Y. Mochizuki, and B. Gallis. 1986. Rapid phosphorylation and modulation of the T4 antigen on cloned helper T cells induced by phorbol myristate acetate or antigen. *J Biol Chem* 261:16210-4.
2. Adachi, A., and Y. Oshima. 1999. Cell-dependent functional roles of HIV-1 Nef for virus replication (review). *Int J Mol Med* 3:427-30.
3. Ahmad, N., and S. Venkatesan. 1988. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR [published erratum appears in *Science* 1988 Oct 7;242(4875):242]. *Science* 241:1481-5.
4. Aiken, C., J. Konner, N. R. Landau, M. E. Lenburg, and D. Trono. 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76:853-64.
5. Aiken, C., and D. Trono. 1995. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J Virol* 69:5048-56.
6. Aldrovandi, G. M., G. Feuer, L. Gao, B. Jamieson, M. Kristeva, I. S. Chen, and J. A. Zack. 1993. The SCID-hu mouse as a model for HIV-1 infection. *Nature* 363:732-6.
7. Aldrovandi, G. M., L. Gao, G. Bristol, and J. A. Zack. 1998. Regions of human immunodeficiency virus type 1 nef required for function in vivo. *J Virol* 72:7032-9.
8. Alexander, L., Z. Du, A. Y. Howe, S. Czajak, and R. C. Desrosiers. 1999. Induction of AIDS in rhesus monkeys by a recombinant simian immunodeficiency virus expressing nef of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 73:5814-25.
9. 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* 71:6094-9.
10. Alexander, L., R. S. Veazey, S. Czajak, M. DeMaria, M. Rosenzweig, A. A. Lackner, R. C. Desrosiers, and V. G. Sasseville. 1999. Recombinant simian immunodeficiency virus expressing green fluorescent protein identifies infected cells in rhesus monkeys. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:11-21.
11. Alimonti, J. B., T. B. Ball, and K. R. Fowke. 2003. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol* 84:1649-61.
12. Arold, S., P. Franken, M. P. Strub, F. Hoh, S. Benichou, R. Benarous, and C. Dumas. 1997. The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signaling. *Structure* 5:1361-72.
13. Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., R. C. d. Sowder, R. E. Benveniste, D. L. Mann, J. C. Chermann, and L. E. Henderson. 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines [see comments]. *Science* 258:1935-8.
14. Asjo, B., E. M. Fenyo, and G. Klein. 1981. Moloney virus (M-MuLV) leukemogenesis: virus spread, antibody production and antigenic expression in neonatally virus-inoculated young mice. *Int J Cancer* 28:65-70.
15. Baba, T. W., Y. S. Jeong, D. Pennick, R. Bronson, M. F. Greene, and R. M. Ruprecht. 1995. Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science* 267:1820-5.
16. Baba, T. W., V. Liska, A. H. Khimani, N. B. Ray, P. J. Dailey, D. Penninck, R. Bronson, M. F. Greene, H. M. McClure, L. N. Martin, and R. M. Ruprecht. 1999. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques [see comments] [published erratum appears in *Nat Med* 199 May;5(5):590]. *Nat Med* 5:194-203.
17. Bagrodia, S., and R. A. Cerione. 1999. Pak to the future. *Trends Cell Biol* 9:350-5.
18. Bandres, J. C., S. Luria, and L. Ratner. 1994. Regulation of human immunodeficiency virus Nef protein by phosphorylation. *Virology* 201:157-61.
19. Bandres, J. C., A. S. Shaw, and L. Ratner. 1995. HIV-1 Nef protein downregulation of CD4 surface expression: relevance of the Ick binding domain of CD4. *Virology* 207:338-41.

20. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-71.
21. Baur, A. S., G. Sass, B. Laffert, D. Willbold, C. Cheng-Mayer, and B. M. Peterlin. 1997. The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase. *Immunity* 6:283-91.
22. Baur, A. S., E. T. Sawai, P. Dazin, W. J. Fantl, C. Cheng-Mayer, and B. M. Peterlin. 1994. HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity* 1:373-84.
23. Bell, I., C. Ashman, J. Maughan, E. Hooker, F. Cook, and T. A. Reinhart. 1998. Association of simian immunodeficiency virus Nef with the T-cell receptor (TCR) zeta chain leads to TCR down-modulation. *J Gen Virol* 79:2717-27.
24. Belli, B., L. Wolff, V. Nazarov, and H. Fan. 1995. Proviral activation of the c-myc proto-oncogene is detectable in preleukemic mice infected neonatally with Moloney murine leukemia virus but not in resulting end stage T lymphomas. *J Virol* 69:5138-41.
25. Benichou, S., M. Bomsel, M. Bodeus, H. Durand, M. Doute, F. Letourneur, J. Camonis, and R. Benarous. 1994. Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. *J Biol Chem* 269:30073-6.
26. Benichou, S., L. X. Liu, L. Erdtmann, L. Selig, and R. Benarous. 1997. Use of the two-hybrid system to identify cellular partners of the HIV1 Nef protein. *Res Virol* 148:71-3.
27. Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657-700.
28. Berndt, C., B. Mopps, S. Angermuller, P. Gierschik, and P. H. Krammer. 1998. CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12556-61.
29. Bieniasz, P. D., and B. R. Cullen. 2000. Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells. *J Virol* 74:9868-77.
30. Biron, C. A., K. B. Nguyen, and G. C. Pien. 2002. Innate immune responses to LCMV infections: natural killer cells and cytokines. *Curr Top Microbiol Immunol* 263:7-27.
31. Blagoveshchenskaya, A. D., L. Thomas, S. F. Feliciangeli, C. H. Hung, and G. Thomas. 2002. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell* 111:853-66.
32. Bodeus, M., A. Marie-Cardine, C. Bougeret, F. Ramos-Morales, and R. Benarous. 1995. In vitro binding and phosphorylation of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein by serine/threonine protein kinase. *J Gen Virol* 76:1337-44.
33. Bonfanti, P., A. Capetti, and G. Rizzardini. 1999. HIV disease treatment in the era of HAART. *Biomed Pharmacother* 53:93-105.
34. Bonzon, C., and H. Fan. 1999. Moloney murine leukemia virus-induced preleukemic thymic atrophy and enhanced thymocyte apoptosis correlate with disease pathogenicity. *J Virol* 73:2434-41.
35. Brady, H. J., D. J. Pennington, C. G. Miles, and E. A. Dzierzak. 1993. CD4 cell surface downregulation in HIV-1 Nef transgenic mice is a consequence of intracellular sequestration. *Embo J* 12:4923-32.
36. Brennan, P. C., T. E. Fritz, and R. J. Flynn. 1965. *Pasteurella pneumotropica*: cultural and biochemical characteristics, and its association with disease in laboratory animals. *Lab Anim Care* 15:307-12.
37. Bresnahan, P. A., W. Yonemoto, S. Ferrell, D. Williams-Herman, R. Geleziunas, and W. C. Greene. 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* 8:1235-8.
38. Bresnahan, P. A., W. Yonemoto, and W. C. Greene. 1999. Cutting edge: SIV Nef protein utilizes both leucine- and tyrosine-based protein sorting pathways for down-regulation of CD4. *J Immunol* 163:2977-81.
39. Brickell, P. M. 1992. The p60c-src family of protein-tyrosine kinases: structure, regulation, and function. *Crit Rev Oncog* 3:401-46.
40. Briggs, J. A., T. Wilk, R. Welker, H. G. Krausslich, and S. D. Fuller. 2003. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *Embo J* 22:1707-15.

41. Briggs, S. D., M. Sharkey, M. Stevenson, and T. E. Smithgall. 1997. SH3-mediated Hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the Nef protein of HIV-1. *J Biol Chem* 272:17899-902.
42. Brightman, B. K., B. R. Davis, and H. Fan. 1990. Preleukemic hematopoietic hyperplasia induced by Moloney murine leukemia virus is an indirect consequence of viral infection. *J Virol* 64:4582-4.
43. Brown, P. O., B. Bowerman, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. 1987. Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* 49:347-56.
44. Bushman, F. D., T. Fujiwara, and R. Craigie. 1990. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* 249:1555-8.
45. Camaur, D., and D. Trono. 1996. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol* 70:6106-11.
46. Chazal, N., G. Singer, C. Aiken, M. L. Hammarskjold, and D. Rekosh. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 particles pseudotyped with envelope proteins that fuse at low pH no longer require Nef for optimal infectivity. *J Virol* 75:4014-8.
47. Chen, Y. L., D. Trono, and D. Camaur. 1998. The proteolytic cleavage of human immunodeficiency virus type 1 Nef does not correlate with its ability to stimulate virion infectivity. *J Virol* 72:3178-84.
48. Cheng, H., J. P. Hoxie, and W. P. Parks. 1999. The conserved core of human immunodeficiency virus type 1 Nef is essential for association with Lck and for enhanced viral replication in T-lymphocytes. *Virology* 264:5-15.
49. Cheng-Mayer, C., P. Iannello, K. Shaw, P. A. Luciw, and J. A. Levy. 1989. Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. *Science* 246:1629-32.
50. Chieco-Bianchi, L., D. Collavo, and G. Biasi. 1988. Immunologic unresponsiveness to murine leukemia virus antigens: mechanisms and role in tumor development. *Adv Cancer Res* 51:277-306.
51. Cicchetti, P., B. J. Mayer, G. Thiel, and D. Baltimore. 1992. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science* 257:803-6.
52. Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al. 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* 232:697.
53. Cohen, G. B., R. T. Gandhi, D. M. Davis, O. Mandelboim, B. K. Chen, J. L. Strominger, and D. Baltimore. 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 10:661-71.
54. Collette, Y., H. Dutartre, A. Benziane, M. Ramos, R. Benarous, M. Harris, and D. Olive. 1996. Physical and functional interaction of Nef with Lck. HIV-1 Nef-induced T-cell signaling defects. *J Biol Chem* 271:6333-41.
55. Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker, and D. Baltimore. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 391:397-401.
56. Craig, H. M., M. W. Pandori, and J. C. Guatelli. 1998. Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11229-34.
57. Crowe, S. M., and S. Sonza. 2000. HIV-1 can be recovered from a variety of cells including peripheral blood monocytes of patients receiving highly active antiretroviral therapy: a further obstacle to eradication. *J Leukoc Biol* 68:345-50.
58. Cuadrado-Gomez, L. M., J. A. Arranz-Caso, J. Cuadros-Gonzalez, and F. Albarran-Hernandez. 1995. *Pasteurella pneumotropica* pneumonia in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 21:445-6.
59. Cuadrado-Gomez, L. M., J. A. Arranz-Caso, J. Cuadros-Gonzalez, and F. Albarran-Hernandez. 1995. *Pasteurella pneumotropica* pneumonia in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 21:445-6.
60. Czuprynski, C., J. Brown, K. Young, and A. Cooley. 1989. Administration of purified anti-L3T4 monoclonal antibody impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 57:100.
61. Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-7.
62. Daniel, M. D., F. Kirchhoff, S. C. Czajak, P. K. Sehgal, and R. C. Desrosiers. 1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258:1938-41.

63. Davis, B. R., B. K. Brightman, K. G. Chandy, and H. Fan. 1987. Characterization of a preleukemic state induced by Moloney murine leukemia virus: evidence for two infection events during leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4875-9.
64. De, S. K., C. N. Venkateshan, P. Seth, D. C. Gajdusek, and C. J. Gibbs. 1998. Adenovirus-mediated human immunodeficiency virus-1 Nef expression in human monocytes/macrophages and effect of Nef on downmodulation of Fcγ receptors and expression of monokines. *Blood* 91:2108-17.
65. Deacon, N. J., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford-Menting, D. J. Hooker, D. A. McPhee, A. L. Greenway, A. Ellett, C. Chatfield, and et al. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients [see comments]. *Science* 270:988-91.
66. DesGroseillers, L., and P. Jolicoeur. 1984. Mapping the viral sequences conferring leukemogenicity and disease specificity in Moloney and amphotropic murine leukemia viruses. *J Virol* 52:448-56.
67. Dickie, P. 1996. HIV type 1 Nef perturbs eye lens development in transgenic mice. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:177-89.
68. Dickie, P., P. Mounts, D. Purcell, G. Miller, T. Fredrickson, L. J. Chang, and M. A. Martin. 1996. Myopathy and spontaneous *Pasteurella pneumotropica*-induced abscess formation in an HIV-1 transgenic mouse model. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13:101-16.
69. Dickie, P., F. Ramsdell, A. L. Notkins, and S. Venkatesan. 1993. Spontaneous and inducible epidermal hyperplasia in transgenic mice expressing HIV-1 Nef. *Virology* 197:431-8.
70. Dutartre, H., M. Harris, D. Olive, and Y. Collette. 1998. The human immunodeficiency virus type 1 Nef protein binds the Src-related tyrosine kinase Lck SH2 domain through a novel phosphotyrosine independent mechanism. *Virology* 247:200-11.
71. Dvorin, J. D., and M. H. Malim. 2003. Intracellular trafficking of HIV-1 cores: journey to the center of the cell. *Curr Top Microbiol Immunol* 281:179-208.
72. Fackler, O. T., and A. S. Baur. 2002. Live and let die: Nef functions beyond HIV replication. *Immunity* 16:493-7.
73. Fackler, O. T., X. Lu, J. A. Frost, M. Geyer, B. Jiang, W. Luo, A. Abo, A. S. Alberts, and B. M. Peterlin. 2000. p21-activated kinase 1 plays a critical role in cellular activation by Nef. *Mol Cell Biol* 20:2619-27.
74. Fackler, O. T., W. Luo, M. Geyer, A. S. Alberts, and B. M. Peterlin. 1999. Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. *Mol Cell* 3:729-39.
75. Fan, H. 1994. Retroviruses and their role in cancer., p. 313 - 362. *In* J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*, vol. 3. Plenum Press, New York.
76. Feinberg, M. B., and A. R. McLean. 1997. AIDS: decline and fall of immune surveillance? [see comments]. *Curr Biol* 7:R136-40.
77. Fung-Leung, W. P., T. M. Kundig, R. M. Zinkernagel, and T. W. Mak. 1991. Immune response against lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice without CD8 expression. *J Exp Med* 174:1425-9.
78. Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic. 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:865-7.
79. Gandhi, R. T., B. K. Chen, S. E. Straus, J. K. Dale, M. J. Lenardo, and D. Baltimore. 1998. HIV-1 directly kills CD4+ T cells by a Fas-independent mechanism. *J Exp Med* 187:1113-22.
80. Garber, M. E., P. Wei, and K. A. Jones. 1998. HIV-1 Tat interacts with cyclin T1 to direct the P-TEFb CTD kinase complex to TAR RNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:371-80.
81. Garcia, J. V., and A. D. Miller. 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 350:508-11.
82. Geretti, A. M. 1999. Simian immunodeficiency virus as a model of human HIV disease. *Rev Med Virol* 9:57-67.
83. Geyer, M., O. T. Fackler, and B. M. Peterlin. 2001. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep* 2:580-5.
84. Geyer, M., C. E. Munte, J. Schorr, R. Kellner, and H. R. Kalbitzer. 1999. Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein. *J Mol Biol* 289:123-38.

85. Geyer, M., H. Yu, R. Mandic, T. Linnemann, Y. H. Zheng, O. T. Fackler, and B. M. Peterlin. 2002. Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery. *J Biol Chem* **277**:28521-9.
86. Goldsmith, M. A., M. T. Warmerdam, R. E. Atchison, M. D. Miller, and W. C. Greene. 1995. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol* **69**:4112-21.
87. Gotte, M., X. Li, and M. A. Wainberg. 1999. HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys* **365**:199-210.
88. Gratton, S., X. J. Yao, S. Venkatesan, E. A. Cohen, and R. P. Sekaly. 1996. Molecular analysis of the cytoplasmic domain of CD4: overlapping but noncompetitive requirement for Lck association and down-regulation by Nef. *J Immunol* **157**:3305-11.
89. Greenberg, M., L. DeTulleo, I. Rapoport, J. Skowronski, and T. Kirchhausen. 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr Biol* **8**:1239-42.
90. Greenberg, M. E., S. Bronson, M. Lock, M. Neumann, G. N. Pavlakis, and J. Skowronski. 1997. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *Embo J* **16**:6964-76.
91. Greenberg, M. E., A. J. Iafrate, and J. Skowronski. 1998. The SH3 domain-binding surface and an acidic motif in HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes. *Embo J* **17**:2777-89.
92. Greene, W. C. 1991. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **324**:308-17.
93. Greene, W. C., and B. M. Peterlin. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* **8**:673-80.
94. Greenway, A., A. Azad, and D. McPhee. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits activation pathways in peripheral blood mononuclear cells and T-cell lines. *J Virol* **69**:1842-50.
95. Greenway, A., A. Azad, J. Mills, and D. McPhee. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds directly to Lck and mitogen-activated protein kinase, inhibiting kinase activity. *J Virol* **70**:6701-8.
96. Greenway, A. L., H. Dutartre, K. Allen, D. A. McPhee, D. Olive, and Y. Collette. 1999. Simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 nef proteins show distinct patterns and mechanisms of Src kinase activation. *J Virol* **73**:6152-8.
97. Greenway, A. L., G. Holloway, D. A. McPhee, P. Ellis, A. Cornall, and M. Lidman. 2003. HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication. *J Biosci* **28**:323-35.
98. Greenway, A. L., D. A. McPhee, K. Allen, R. Johnstone, G. Holloway, J. Mills, A. Azad, S. Sankovich, and P. Lambert. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *J Virol* **76**:2692-702.
99. Greenway, A. L., D. A. McPhee, E. Grgacic, D. Hewish, A. Lucantoni, I. Macreadie, and A. Azad. 1994. Nef 27, but not the Nef 25 isoform of human immunodeficiency virus-type 1 pNL4.3 down-regulates surface CD4 and IL-2R expression in peripheral blood mononuclear cells and transformed T cells. *Virology* **198**:245-56.
100. Greenway, A. L., J. Mills, D. Rhodes, N. J. Deacon, and D. A. McPhee. 1998. Serological detection of attenuated HIV-1 variants with nef gene deletions. *Aids* **12**:555-61.
101. Groux, H., G. Torpier, D. Monte, Y. Mouton, A. Capron, and J. C. Ameisen. 1992. Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* **175**:331-40.
102. Grzesiek, S., S. J. Stahl, P. T. Wingfield, and A. Bax. 1996. The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* **35**:10256-61.
103. Gulizia, R. J., R. G. Collman, J. A. Levy, D. Trono, and D. E. Mosier. 1997. Deletion of nef slows but does not prevent CD4-positive T-cell depletion in human immunodeficiency virus type 1-infected human-PBL-SCID mice. *J Virol* **71**:4161-4.
104. Guy, B., M. P. Kieny, Y. Riviere, C. Le Peuch, K. Dott, M. Girard, L. Montagnier, and J. P. Lecocq. 1987. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**:266-9.

105. Hanabuchi, S., M. Koyanagi, A. Kawasaki, N. Shinohara, A. Matsuzawa, Y. Nishimura, Y. Kobayashi, S. Yonehara, H. Yagita, and K. Okumura. 1994. Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4930-4.
106. Hanna, Z., D. G. Kay, M. Cool, S. Jothy, N. Rebai, and P. Jolicoeur. 1998. Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. *J Virol* 72:121-32.
107. Hanna, Z., D. G. Kay, N. Rebai, A. Guimond, S. Jothy, and P. Jolicoeur. 1998. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95:163-75.
108. Hanna, Z., X. Weng, D. G. Kay, J. Poudrier, C. Lowell, and P. Jolicoeur. 2001. The pathogenicity of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef in CD4C/HIV transgenic mice is abolished by mutation of its SH3-binding domain, and disease development is delayed in the absence of Hck. *J Virol* 75:9378-92.
109. Harris, M. 1995. The role of myristoylation in the interactions between human immunodeficiency virus type I Nef and cellular proteins. *Biochem Soc Trans* 23:557-61.
110. Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection [see comments]. *Nature* 373:123-6.
111. Howe, A. Y., J. U. Jung, and R. C. Desrosiers. 1998. Zeta chain of the T-cell receptor interacts with nef of simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* 72:9827-34.
112. Howe, L. R., and A. Weiss. 1995. Multiple kinases mediate T-cell-receptor signaling. *Trends Biochem Sci* 20:59-64.
113. Hu, W. S., and H. M. Temin. 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 250:1227-33.
114. Hua, J., W. Blair, R. Truant, and B. R. Cullen. 1997. Identification of regions in HIV-1 Nef required for efficient downregulation of cell surface CD4. *Virology* 231:231-8.
115. Iafrate, A. J., S. Bronson, and J. Skowronski. 1997. Separable functions of Nef disrupt two aspects of T cell receptor machinery: CD4 expression and CD3 signaling. *Embo J* 16:673-84.
116. Jamieson, B. D., G. M. Aldrovandi, V. Planelles, J. B. Jowett, L. Gao, L. M. Bloch, I. S. Chen, and J. A. Zack. 1994. Requirement of human immunodeficiency virus type 1 nef for in vivo replication and pathogenicity. *J Virol* 68:3478-85.
117. Jamieson, B. D., S. Pang, G. M. Aldrovandi, J. Zha, and J. A. Zack. 1995. In vivo pathogenic properties of two clonal human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* 69:6259-64.
118. Johnson, W. E., and R. C. Desrosiers. 2002. Viral persistence: HIV's strategies of immune system evasion. *Annu Rev Med* 53:499-518.
119. Kao, S. Y., A. F. Calman, P. A. Luciw, and B. M. Peterlin. 1987. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 330:489-93.
120. Keppler, O. T., F. J. Welte, T. A. Ngo, P. S. Chin, K. S. Patton, C. L. Tsou, N. W. Abbey, M. E. Sharkey, R. M. Grant, Y. You, J. D. Scarborough, W. Ellmeier, D. R. Littman, M. Stevenson, I. F. Charo, B. G. Herndier, R. F. Speck, and M. A. Goldsmith. 2002. Progress toward a human CD4/CCR5 transgenic rat model for de novo infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Exp Med* 195:719-36.
121. Kestler, H. W., 3rd, D. J. Ringler, K. Mori, D. L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel, and R. C. Desrosiers. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65:651-62.
122. Khan, I. H., E. T. Sawai, E. Antonio, C. J. Weber, C. P. Mandell, P. Montbriand, and P. A. Luciw. 1998. Role of the SH3-ligand domain of simian immunodeficiency virus Nef in interaction with Nef-associated kinase and simian AIDS in rhesus macaques. *J Virol* 72:5820-30.
123. Kim, S., K. Ikeuchi, R. Byrn, J. Groopman, and D. Baltimore. 1989. Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9544-8.
124. Kim, Y. H., S. H. Chang, J. H. Kwon, and S. S. Rhee. 1999. HIV-1 Nef plays an essential role in two independent processes in CD4 down-regulation: dissociation of the CD4-p56(lck) complex and targeting of CD4 to lysosomes. *Virology* 257:208-19.
125. Kimmig, B., and F. Lehmann-Grube. 1979. The immune response of the mouse to lymphocytic choriomeningitis virus. I. Circulating antibodies. *J Gen Virol* 45:703-10.

126. 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 [see comments]. *N Engl J Med* 332:228-32.
127. Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312:767-8.
128. Klenerman, P., and R. M. Zinkernagel. 1997. What can we learn about human immunodeficiency virus infection from a study of lymphocytic choriomeningitis virus? *Immunol Rev* 159:5-16.
129. Knop, E., and N. Knop. 2003. [Eye-associated lymphoid tissue (EALT) is continuously spread throughout the ocular surface from the lacrimal gland to the lacrimal drainage system]. *Ophthalmologie* 100:929-42.
130. Knop, E., and N. Knop. 2002. A functional unit for ocular surface immune defense formed by the lacrimal gland, conjunctiva and lacrimal drainage system. *Adv Exp Med Biol* 506:835-44.
131. Knop, E., N. Knop, and H. Brewitt. 2003. [Dry eye disease as a complex dysregulation of the functional anatomy of the ocular surface. New concepts for understanding dry eye disease]. *Ophthalmologie* 100:917-28.
132. Kotov, A., J. Zhou, P. Flicker, and C. Aiken. 1999. Association of nef with the human immunodeficiency virus type 1 core [In Process Citation]. *J Virol* 73:8824-30.
133. Lama, J., A. Mangasarian, and D. Trono. 1999. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol* 9:622-31.
134. Larsen, J. E., R. H. Massol, T. J. Nieland, and T. Kirchhausen. 2004. HIV Nef-mediated major histocompatibility complex class I down-modulation is independent of Arf6 activity. *Mol Biol Cell* 15:323-31.
135. Le Borgne, S., M. Mancini, R. Le Grand, M. Schleef, D. Dormont, P. Tiollais, Y. Riviere, and M. L. Michel. 1998. In vivo induction of specific cytotoxic T lymphocytes in mice and rhesus macaques immunized with DNA vector encoding an HIV epitope fused with hepatitis B surface antigen. *Virology* 240:304-15.
136. Le Gall, S., L. Erdtmann, S. Benichou, C. Berlioz-Torrent, L. Liu, R. Benarous, J. M. Heard, and O. Schwartz. 1998. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* 8:483-95.
137. Learmont, J. C., A. F. Geczy, J. Mills, L. J. Ashton, C. H. Raynes-Greenow, R. J. Garsia, W. B. Dyer, L. McIntyre, R. B. Oelrichs, D. I. Rhodes, N. J. Deacon, and J. S. Sullivan. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med* 340:1715-22.
138. Learmont, J. C., A. F. Geczy, J. Mills, L. J. Ashton, C. H. Raynes-Greenow, R. J. Garsia, W. B. Dyer, L. McIntyre, R. B. Oelrichs, D. I. Rhodes, N. J. Deacon, and J. S. Sullivan. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort [see comments]. *N Engl J Med* 340:1715-22.
139. Lee, C. H., B. Leung, M. A. Lemmon, J. Zheng, D. Cowburn, J. Kuriyan, and K. Saksela. 1995. A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *Embo J* 14:5006-15.
140. Lehmann-Grube, F., U. Assmann, C. Loliger, D. Moskophidis, and J. Lohler. 1985. Mechanism of recovery from acute virus infection. I. Role of T lymphocytes in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from spleens of mice. *J Immunol* 134:608-15.
141. Lehmann-Grube, F., and D. Moskophidis. 1989. Lymphocytic choriomeningitis virus-specific delayed-type hypersensitivity reaction in mice. *Adv Exp Med Biol* 257:91-107.
142. Lerner, E. C., and T. E. Smithgall. 2002. SH3-dependent stimulation of Src-family kinase autophosphorylation without tail release from the SH2 domain in vivo. *Nat Struct Biol* 9:365-9.
143. Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, and L. S. Oshiro. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225:840-2.
144. Lindemann, D., R. Wilhelm, P. Renard, A. Althage, R. Zinkernagel, and J. Mous. 1994. Severe immunodeficiency associated with a human immunodeficiency virus 1 NEF/3'-long terminal repeat transgene. *J Exp Med* 179:797-807.
145. Linnemann, T., Y. H. Zheng, R. Mandic, and B. M. Peterlin. 2002. Interaction between Nef and phosphatidylinositol-3-kinase leads to activation of p21-activated kinase and increased production of HIV. *Virology* 294:246-55.

146. Liu, H., X. Wu, M. Newman, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and J. C. Kappes. 1995. The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J Virol* **69**:7630-8.
147. Logg, C. R., A. Logg, C. K. Tai, P. M. Cannon, and N. Kasahara. 2001. Genomic stability of murine leukemia viruses containing insertions at the Env-3' untranslated region boundary. *J Virol* **75**:6989-98.
148. Lu, Y. L., P. Spearman, and L. Ratner. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol* **67**:6542-50.
149. Luciw, P. A. 1996. Human immunodeficiency viruses and their replication. *Fields Virology*:1881-1951.
150. Lundquist, C. A., M. Tobiume, J. Zhou, D. Unutmaz, and C. Aiken. 2002. Nef-mediated downregulation of CD4 enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary T lymphocytes. *J Virol* **76**:4625-33.
151. Luo, T., S. J. Anderson, and J. V. Garcia. 1996. Inhibition of Nef- and phorbol ester-induced CD4 degradation by macrolide antibiotics. *J Virol* **70**:1527-34.
152. Luo, T., J. L. Foster, and J. V. Garcia. 1997. Molecular Determinants of Nef Function. *J Biomed Sci* **4**:132-138.
153. Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-48.
154. Maddon, P. J., D. R. Littman, M. Godfrey, D. E. Maddon, L. Chess, and R. Axel. 1985. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* **42**:93-104.
155. Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen. 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-7.
156. Mangasarian, A., V. Piguet, J. K. Wang, Y. L. Chen, and D. Trono. 1999. Nef-induced CD4 and major histocompatibility complex class I (MHC-I) down-regulation are governed by distinct determinants: N-terminal alpha helix and proline repeat of Nef selectively regulate MHC-I trafficking. *J Virol* **73**:1964-73.
157. Manninen, A., M. Hiipakka, M. Vihinen, W. Lu, B. J. Mayer, and K. Saksela. 1998. SH3-Domain binding function of HIV-1 Nef is required for association with a PAK-related kinase. *Virology* **250**:273-82.
158. Manninen, A., P. Huotari, M. Hiipakka, G. H. Renkema, and K. Saksela. 2001. Activation of NFAT-dependent gene expression by Nef: conservation among divergent Nef alleles, dependence on SH3 binding and membrane association, and cooperation with protein kinase C-theta. *J Virol* **75**:3034-7.
159. Manninen, A., G. H. Renkema, and K. Saksela. 2000. Synergistic activation of NFAT by HIV-1 nef and the Ras/MAPK pathway. *J Biol Chem* **275**:16513-7.
160. Mariani, R., B. A. Rasala, G. Rutter, K. Wieggers, S. M. Brandt, H. G. Krausslich, and N. R. Landau. 2001. Mouse-human heterokaryons support efficient human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol* **75**:3141-51.
161. Mariani, R., G. Rutter, M. E. Harris, T. J. Hope, H. G. Krausslich, and N. R. Landau. 2000. A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *J Virol* **74**:3859-70.
162. Marsh, J. W. 1999. The numerous effector functions of Nef. *Arch Biochem Biophys* **365**:192-8.
163. McCune, J. M., R. Namikawa, H. Kaneshima, L. D. Shultz, M. Lieberman, and I. L. Weissman. 1988. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* **241**:1632-9.
164. Meyaard, L., S. A. Otto, R. R. Jonker, M. J. Mijster, R. P. Keet, and F. Miedema. 1992. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* **257**:217-9.
165. Mikazuki, K., T. Hirasawa, H. Chiba, K. Takahashi, Y. Sakai, S. Ohhara, and H. Nenui. 1994. Colonization pattern of *Pasteurella pneumotropica* in mice with latent pasteurellosis. *Jikken Dobutsu* **43**:375-9.
166. Mikkers, H., and A. Berns. 2003. Retroviral insertional mutagenesis: tagging cancer pathways. *Adv Cancer Res* **88**:53-99.

167. 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* 179:101-13.
168. Monks, C. R., H. Kupfer, I. Tamir, A. Barlow, and A. Kupfer. 1997. Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* 385:83-6.
169. Moore, G. J. 1979. Conjunctivitis in the nude rat (rnu/rnu). *Lab Anim* 13:35.
170. Morrow, W. J., M. Wharton, D. Lau, and J. A. Levy. 1987. Small animals are not susceptible to human immunodeficiency virus infection. *J Gen Virol* 68 (Pt 8):2253-7.
171. Moskophidis, D., L. Fang, J. Gossmann, R. Drjupin, J. Lohler, M. Bruns, and F. Lehmann-Grube. 1990. Virus-specific delayed-type hypersensitivity (DTH). Cells mediating lymphocytic choriomeningitis virus-specific DTH reaction in mice. *J Immunol* 144:1926-34.
172. Moskophidis, D., and F. Lehmann-Grube. 1984. The immune response of the mouse to lymphocytic choriomeningitis virus. IV. Enumeration of antibody-producing cells in spleens during acute and persistent infection. *J Immunol* 133:3366-70.
173. Moskophidis, D., and F. Lehmann-Grube. 1989. Virus-induced delayed-type hypersensitivity reaction is sequentially mediated by CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3291-5.
174. Muesing, M. A., D. H. Smith, and D. J. Capon. 1987. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell* 48:691-701.
175. Mullis, K. B., and F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-50.
176. Namikawa, R., H. Kaneshima, M. Lieberman, I. L. Weissman, and J. M. McCune. 1988. Infection of the SCID-hu mouse by HIV-1. *Science* 242:1684-6.
177. Namikawa, R., K. N. Weilbaecher, H. Kaneshima, E. J. Yee, and J. M. McCune. 1990. Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. *J Exp Med* 172:1055-63.
178. Needham, J. R., and J. E. Cooper. 1975. An eye infection in laboratory mice associated with *Pasteurella pneumotropica*. *Lab Anim* 9:197-200.
179. Needham, J. R., and J. E. Cooper. 1975. An eye infection in laboratory mice associated with *Pasteurella pneumotropica*. *Lab Anim* 9:197-200.
180. Niederman, T. M., J. V. Garcia, W. R. Hastings, S. Luria, and L. Ratner. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits NF-kappa B induction in human T cells. *J Virol* 66:6213-9.
181. Niederman, T. M., B. J. Thielan, and L. Ratner. 1989. Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1128-32.
182. Okimoto, M. A., and H. Fan. 1999. Moloney murine leukemia virus infects cells of the developing hair follicle after neonatal subcutaneous inoculation in mice. *J Virol* 73:2509-16.
183. Ott, D. E., J. Keller, K. Sill, and A. Rein. 1992. Phenotypes of murine leukemia virus-induced tumors: influence of 3' viral coding sequences. *J Virol* 66:6107-16.
184. Oyaizu, N., T. W. McCloskey, M. Coronese, N. Chirmule, V. S. Kalyanaraman, and S. Pahwa. 1993. Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-linked PBMCs from normal individuals. *Blood* 82:3392-400.
185. Pandori, M., H. Craig, L. Moutouh, J. Corbeil, and J. Guatelli. 1998. Virological importance of the protease-cleavage site in human immunodeficiency virus type 1 Nef is independent of both intravirion processing and CD4 down-regulation. *Virology* 251:302-16.
186. Pandori, M. W., N. J. Fitch, H. M. Craig, D. D. Richman, C. A. Spina, and J. C. Guatelli. 1996. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J Virol* 70:4283-90.
187. Paulsen, D. 1999. Murine Leukämieviren mit dem gfp Gen oder dem HIV nef Gen. Verlag für Wissenschaft und Forschung.
188. Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott, and D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8392-6.

189. Penninger, J. M., K. D. Fischer, T. Sasaki, I. Kozieradzki, J. Le, K. Tedford, K. Bachmaier, P. S. Ohashi, and M. F. Bachmann. 1999. The oncogene product Vav is a crucial regulator of primary cytotoxic T cell responses but has no apparent role in CD28-mediated co-stimulation. *Eur J Immunol* 29:1709-18.
190. Perelson, A. S., A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard, and D. D. Ho. 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271:1582-6.
191. Picard, C., A. Greenway, G. Holloway, D. Olive, and Y. Collette. 2002. Interaction with simian Hck tyrosine kinase reveals convergent evolution of the Nef protein from simian and human immunodeficiency viruses despite differential molecular surface usage. *Virology* 295:320-7.
192. Piguet, V., Y. L. Chen, A. Mangasarian, M. Foti, J. L. Carpentier, and D. Trono. 1998. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *Embo J* 17:2472-81.
193. Piguet, V., F. Gu, M. Foti, N. Demaurex, J. Gruenberg, J. L. Carpentier, and D. Trono. 1999. Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell* 97:63-73.
194. Piguet, V., O. Schwartz, S. Le Gall, and D. Trono. 1999. The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol Rev* 168:51-63.
195. Piguet, V., L. Wan, C. Borel, A. Mangasarian, N. Demaurex, G. Thomas, and D. Trono. 2000. HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. *Nat Cell Biol* 2:163-7.
196. Preusser, A., L. Briese, A. S. Baur, and D. Willbold. 2001. Direct in vitro binding of full-length human immunodeficiency virus type 1 Nef protein to CD4 cytoplasmic domain. *J Virol* 75:3960-4.
197. Reif, K., and D. A. Cantrell. 1998. Networking Rho family GTPases in lymphocytes. *Immunity* 8:395-401.
198. Ren, R., B. J. Mayer, P. Cicchetti, and D. Baltimore. 1993. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259:1157-61.
199. Renkema, G. H., A. Manninen, D. A. Mann, M. Harris, and K. Saksela. 1999. Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. *Curr Biol* 9:1407-10.
200. Renkema, G. H., and K. Saksela. 2000. Interactions of HIV-1 NEF with cellular signal transducing proteins. *Front Biosci* 5:D268-83.
201. Rhee, S. S., and J. W. Marsh. 1994. HIV-1 Nef activity in murine T cells. CD4 modulation and positive enhancement. *J Immunol* 152:5128-34.
202. Robert-Guroff, M., M. Popovic, S. Gartner, P. Markham, R. C. Gallo, and M. S. Reitz. 1990. Structure and expression of tat-, rev-, and nef-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages. *J Virol* 64:3391-8.
203. Rosen, F. S. 1985. The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J Clin Invest* 75:1-3.
204. Ross, T. M., A. E. Oran, and B. R. Cullen. 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol* 9:613-21.
205. Rossi, F., A. Gallina, and G. Milanesi. 1996. Nef-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system. *Virology* 217:397-403.
206. Rudd, C. E., O. Janssen, Y. C. Cai, A. J. da Silva, M. Raab, and K. V. Prasad. 1994. Two-step TCR zeta/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol Today* 15:225-34.
207. Saksela, K., G. Cheng, and D. Baltimore. 1995. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *Embo J* 14:484-91.
208. Saksela, K., C. Stevens, P. Rubinstein, and D. Baltimore. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 mRNA expression in peripheral blood cells predicts disease progression independently of the numbers of CD4+ lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1104-8.
209. Saksela, K., C. E. Stevens, P. Rubinstein, P. E. Taylor, and D. Baltimore. 1995. HIV-1 messenger RNA in peripheral blood mononuclear cells as an early marker of risk for progression to AIDS [comment]. *Ann Intern Med* 123:641-8.

210. Salghetti, S., R. Mariani, and J. Skowronski. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:349-53.
211. Salvi, R., A. R. Garbuglia, A. Di Caro, S. Pulciani, F. Montella, and A. Benedetto. 1998. Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J Virol* 72:3646-57.
212. Sasaki, T., M. Mieno, H. Udono, K. Yamaguchi, T. Usui, K. Hara, H. Shiku, and E. Nakayama. 1990. Roles of CD4+ and CD8+ cells, and the effect of administration of recombinant murine interferon gamma in listerial infection. *J Exp Med* 171:1141-54.
213. Sawada, S., K. Gowrishankar, R. Kitamura, M. Suzuki, G. Suzuki, S. Tahara, and A. Koito. 1998. Disturbed CD4+ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors. *J Exp Med* 187:1439-49.
214. Scharmann, W., and A. Heller. 2001. Survival and transmissibility of *Pasteurella pneumotropica*. *Lab Anim* 35:163-6.
215. Schiavoni, I., S. Trapp, A. C. Santarcangelo, V. Piacentini, K. Pugliese, A. Baur, and M. Federico. 2004. HIV-1 Nef Enhances Both Membrane Expression and Virion Incorporation of Env Products: A MODEL FOR THE NEF-DEPENDENT INCREASE OF HIV-1 INFECTIVITY. *J Biol Chem* 279:22996-3006.
216. Schragar, J. A., V. Der Minassian, and J. W. Marsh. 2002. HIV Nef increases T cell ERK MAP kinase activity. *J Biol Chem* 277:6137-42.
217. Schragar, J. A., and J. W. Marsh. 1999. HIV-1 Nef increases T cell activation in a stimulus-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8167-72.
218. Schwartz, O., V. Marechal, O. Danos, and J. M. Heard. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J Virol* 69:4053-9.
219. Schwartz, O., V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J. M. Heard. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2:338-42.
220. Schwartz, O., Y. Riviere, J. M. Heard, and O. Danos. 1993. Reduced cell surface expression of processed human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the presence of Nef. *J Virol* 67:3274-80.
221. Shafer, R. W., and D. A. Vuitton. 1999. Highly active antiretroviral therapy (HAART) for the treatment of infection with human immunodeficiency virus type 1. *Biomed Pharmacother* 53:73-86.
222. Shaw, A. S., K. E. Amrein, C. Hammond, D. F. Stern, B. M. Sefton, and J. K. Rose. 1989. The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* 59:627-36.
223. Shin, N. H., D. Hartigan-O'Connor, J. K. Pfeiffer, and A. Telesnitsky. 2000. Replication of lengthened Moloney murine leukemia virus genomes is impaired at multiple stages. *J Virol* 74:2694-702.
224. Shinnick, T. M., R. A. Lerner, and J. G. Sutcliffe. 1981. Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* 293:543-8.
225. Simard, M. C., P. Chrobak, D. G. Kay, Z. Hanna, S. Jothy, and P. Jolicoeur. 2002. Expression of simian immunodeficiency virus nef in immune cells of transgenic mice leads to a severe AIDS-like disease. *J Virol* 76:3981-95.
226. Simmons, A., V. Aluvihare, and A. McMichael. 2001. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity* 14:763-77.
227. Skowronski, J., M. E. Greenberg, M. Lock, R. Mariani, S. Salghetti, T. Swigut, and A. J. Iafrate. 1999. HIV and SIV Nef modulate signal transduction and protein sorting in T cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64:453-63.
228. Skowronski, J., D. Parks, and R. Mariani. 1993. Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. *Embo J* 12:703-13.
229. Smith, B. L., B. W. Krushelnycky, D. Mochly-Rosen, and P. Berg. 1996. The HIV nef protein associates with protein kinase C theta. *J Biol Chem* 271:16753-7.
230. Sodeik, B. 2002. Unchain my heart, baby let me go--the entry and intracellular transport of HIV. *J Cell Biol* 159:393-5.

231. Spina, C. A., T. J. Kwok, M. Y. Chowes, 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* 179:115-23.
232. Steffen, D. 1984. Proviruses are adjacent to c-myc in some murine leukemia virus-induced lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2097-101.
233. Stoddart, C. A., R. Geleziunas, S. Ferrell, V. Linnquist-Stepps, M. E. Moreno, C. Bare, W. Xu, W. Yonemoto, P. A. Bresnahan, J. M. McCune, and W. C. Greene. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-mediated downregulation of CD4 correlates with Nef enhancement of viral pathogenesis. *J Virol* 77:2124-33.
234. Storch, T. G., P. Arnstein, V. Manohar, W. M. Leiserson, and T. M. Chused. 1985. Proliferation of infected lymphoid precursors before Moloney murine leukemia virus-induced T-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 74:137-43.
235. Stove, V., E. Naessens, C. Stove, T. Swigut, J. Plum, and B. Verhasselt. 2003. Signaling but not trafficking function of HIV-1 protein Nef is essential for Nef-induced defects in human intrathymic T-cell development. *Blood* 102:2925-32.
236. Swigut, T., A. J. Iafrate, J. Muench, F. Kirchhoff, and J. Skowronski. 2000. Simian and human immunodeficiency virus Nef proteins use different surfaces to downregulate class I major histocompatibility complex antigen expression. *J Virol* 74:5691-701.
237. Swingler, S., A. Mann, J. Jacque, B. Brichacek, V. G. Sasseville, K. Williams, A. A. Lackner, E. N. Janoff, R. Wang, D. Fisher, and M. Stevenson. 1999. HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med* 5:997-103.
238. Turner, J. M., M. H. Brodsky, B. A. Irving, S. D. Levin, R. M. Perlmutter, and D. R. Littman. 1990. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 60:755-65.
239. van Lohuizen, M., S. Verbeek, B. Scheijgen, E. Wientjens, H. van der Gulden, and A. Berns. 1991. Identification of cooperating oncogenes in Eμ-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65:737 - 752.
240. Varela-Echavarria, A., C. M. Prorock, Y. Ron, and J. P. Dougherty. 1993. High rate of genetic rearrangement during replication of a Moloney murine leukemia virus-based vector. *J Virol* 67:6357-64.
241. Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, and J. B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55:301-8.
242. Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, L. E. Samelson, and J. B. Bolen. 1989. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature* 338:257-9.
243. Villalba, M., N. Coudronniere, M. Deckert, E. Teixeira, P. Mas, and A. Altman. 2000. A novel functional interaction between Vav and PKCθ is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity* 12:151-60.
244. Wang, J. K., E. Kiyokawa, E. Verdin, and D. Trono. 2000. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:394-9.
245. Wang, R. A., R. K. Vadlamudi, R. Bagheri-Yarmand, I. Beuvink, N. E. Hynes, and R. Kumar. 2003. Essential functions of p21-activated kinase 1 in morphogenesis and differentiation of mammary glands. *J Cell Biol* 161:583-92.
246. Wei, B. L., V. K. Arora, J. L. Foster, D. L. Sodora, and J. V. Garcia. 2003. In vivo analysis of Nef function. *Curr HIV Res* 1:41-50.
247. Weiss, A., and D. R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263-74.
248. Welker, R., M. Harris, B. Cardel, and H. G. Krausslich. 1998. Virion incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Nef is mediated by a bipartite membrane-targeting signal: analysis of its role in enhancement of viral infectivity. *J Virol* 72:8833-40.
249. Welker, R., H. Kottler, H. R. Kalbitzer, and H. G. Krausslich. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* 219:228-36.
250. Weng, X., E. Priceputu, P. Chrobak, J. Poudrier, D. G. Kay, Z. Hanna, T. W. Mak, and P. Jolicoeur. 2004. CD4(+) T Cells from CD4C/HIV(Nef) Transgenic Mice Show Enhanced Activation In Vivo with Impaired

- Proliferation In Vitro but Are Dispensable for the Development of a Severe AIDS-Like Organ Disease. *J Virol* 78:5244-5257.
251. Werlen, G., E. Jacinto, Y. Xia, and M. Karin. 1998. Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *Embo J* 17:3101-11.
252. Wiskerchen, M., and C. Cheng-Mayer. 1996. HIV-1 Nef association with cellular serine kinase correlates with enhanced virion infectivity and efficient proviral DNA synthesis. *Virology* 224:292-301.
253. Wolf, D., V. Witte, B. Laffert, K. Blume, E. Stromer, S. Trapp, P. d'Aloja, A. Schurmann, and A. S. Baur. 2001. HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals. *Nat Med* 7:1217-24.
254. Xu, X. N., B. Laffert, G. R. Screaton, M. Kraft, D. Wolf, W. Kolanus, J. Mongkolsapay, A. J. McMichael, and A. S. Baur. 1999. Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J Exp Med* 189:1489-96.
255. Yang, X., and D. Gabuzda. 1999. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* 73:3460-6.
256. Zazopoulos, E., and W. A. Haseltine. 1992. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Eli Nef function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6634-8.

VII. Danksagung

Die hier vorgelegte Arbeit wurde in der Abteilung Virologie des Hygieneinstitutes der Universität Heidelberg in der Zeit von Mai 2001 bis Juli 2004 angefertigt.

Prof. H-G. Kräusslich danke ich für die sehr guten Arbeitsmöglichkeiten und die Überlassung des Projektes, außerdem für sein förderndes Interesse und die Diskussionsbereitschaft.

Bei Prof. M. Lanzer bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens der vorliegenden Arbeit.

Besonderer Dank gilt Dr. O. Utermöhlen für die gute Kooperation, die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung während meiner Forschungsaufenthalte am Universitätsklinikum in Köln.

Für die sehr gute Kooperation, Diskussionsmöglichkeiten und Anregungen möchte ich mich bei Dr. O. Fackler und Dr. O. Keppler bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei D. Paulsen deren Dissertation die Grundlage für diese Arbeit war und die vor allem während der Übernahme des Projektes immer zur Diskussion bereit war.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Kollegen für die gute Zusammenarbeit während der letzten drei Jahre.

Ein herzlicher Dank geht an meine Eltern für die immerwährende Unterstützung.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Freundin Ira für Ihr Verständnis und Ihre Unterstützung zu jeder möglichen und unmöglichen Tages- und Nachtzeit .

