

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

---

Institut für Virologie

HIV-1 Vpr stimuliert NFAT zur Induktion der LTR  
Transaktivierung und frühen T-Zellaktivierung

**Kristin Höhne**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaft**

genehmigten Dissertation.

**Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dirk Busch**

**Prüfer der Dissertation:**

**1. Univ.-Prof. Dr. Ulrike Protzer**

**2. Priv.-Doz. Dr. Thomas Floss**

Die Dissertation wurde am 06.02.2014 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.07.2014 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Summary</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
3.1	Lentiviren .....	3
3.2	Entdeckung und Herkunft von HIV.....	4
3.3	Molekulare Architektur und Morphogenese des viralen Partikels.....	5
3.4	Genomaufbau.....	7
3.5	Der Replikationszyklus von HIV-1.....	9
3.6	Übertragung und Pathogenese der HIV-Infektion.....	10
3.7	Das HIV-1 Vpr Protein .....	14
3.7.1	Nukleärer Transport des Pre-Integrationskomplexes .....	16
3.7.2	Vpr induziert die Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase.....	17
3.7.3	Vpr induziert Apoptose in infizierten Zellen .....	19
3.7.4	Vpr induziert die Apoptose über den intrinsischen Signalweg.....	19
3.7.5	Modulation der Genexpression .....	20
3.7.6	Unterdrückung der Immunantwort .....	21
3.7.7	Vpr erhöht die Prozessivität der Reversen Transkription .....	22
3.8	Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) .....	22
3.8.1	Die NFAT Proteinfamilie.....	22
3.8.2	NFAT Regulation .....	23
3.8.3	T-Zellaktivierung und Toleranz.....	24
3.8.4	NFAT Inhibitoren und therapeutische Ansätze .....	25
3.8.5	Die Rolle von NFAT in der HIV Infektion .....	26
3.8.6	Die Wirkung von NFAT-Inhibitoren auf die AIDS Progression .....	26
<b>4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>Material</b>	<b>29</b>
5.1	Reagenzien .....	29
5.1.1	Chemikalien .....	29
5.1.2	Reagenzsysteme (Kits).....	31
5.2	Geräte.....	32

5.3	Lösungen und Puffer .....	33
5.4	Enzyme .....	34
5.5	Inhibitoren .....	35
5.6	Eukaryotische Zelllinien .....	35
5.7	Bakterien .....	36
5.8	Nukleinsäuren .....	36
5.9	Plasmide .....	37
5.10	Antikörper .....	42
5.11	Zellkulturmedien .....	44
5.12	Bakterienkulturmedien .....	44
<b>6</b>	<b>Methoden</b>	<b>45</b>
6.1	Molekularbiologische Methoden .....	45
6.1.1	Standardmethoden .....	45
6.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	45
6.1.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Plasmid-DNA .....	45
6.1.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	45
6.1.5	DNA-Sequenzierung .....	46
6.1.6	Ligation von DNA .....	46
6.1.7	Herstellung der Vpr64-68A Mutante mittels PCR-Mutagenese .....	46
6.1.8	Umklonierung der vorhandenen Vpr-Mutanten .....	50
6.1.9	Bakterienkultivierung .....	51
6.1.10	Transformation in Escherichia coli One Shot® Top10 .....	52
6.2	Zellbiologische Methoden .....	52
6.2.1	Kultivierung von adhärennten Zellen .....	52
6.2.2	Kultivierung von Suspensionszellen .....	52
6.2.3	Herstellen von Dauerkulturen .....	52
6.2.4	Auftauen von Dauerkulturen .....	53
6.2.5	Isolierung primärer Lymphozyten aus BuffyCoat .....	53
6.2.6	Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen (MDM) .....	53
6.2.7	Kalzium-Phosphat-Transfektion von adhärennten Zellen .....	54
6.2.8	Transfektion von eukaryoischen Zellen mit Turbofect .....	54
6.2.9	Herstellung von Virusüberständen in 293T Zellen .....	54
6.2.10	Aufkonzentration von Virusüberständen .....	55
6.2.11	Bestimmung der p24 Konzentration in Virusüberständen .....	55

6.2.12	Infektion der verwendeten Zelllinien .....	56
6.2.13	Infektion von PBMCs.....	56
6.2.14	Infektion von Makrophagen .....	57
6.2.15	Luziferase Assay .....	57
6.2.16	Analyse mittels Durchflusszytometrie und CD69 Antikörperfärbung .....	58
6.2.17	Analyse der Apoptoserate mittels Annexin V Färbung .....	58
6.2.18	FACS-basierter FRET (Förster Resonance Energy Transfer) Assay .....	59
6.2.19	Analyse des Zellzyklus .....	61
6.3	Biochemische Methoden .....	62
6.3.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten.....	62
6.3.2	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	62
6.3.3	Westernblot .....	63
6.4	Mikroskopie .....	63
6.4.1	Immunfluoreszenz für die Mikroskopie .....	63
6.4.2	Fluoreszenz-Mikroskopie von Fusionsproteinen.....	64
6.5	Software .....	65
<b>7</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>66</b>
7.1	Vpr verstärkt die NFAT-Aktivierung in der Frühphase der HIV-1 Infektion .....	66
7.2	Vpr stimuliert die frühe T-Zellaktivierung in PBMCs .....	67
7.3	Vpr vermittelt NFAT-Translokation in infizierten MDMs.....	69
7.4	Funktionelle Charakterisierung unterschiedlicher Vpr Mutanten .....	72
7.4.1	Zelluläre Lokalisation der Vpr Mutanten in 293T Zellen .....	72
7.4.2	Analyse der Vpr Oligomerisierung mittels FACS-basiertem FRET Assay .....	74
7.4.3	Quantifizierung der Vpr-vermittelten PARP-1 Translokation .....	75
7.4.4	Vpr-induzierte Apoptose in HeLa Zellen .....	77
7.4.5	Expressionslevel und Inkorporationseffizienz der Vpr Mutanten .....	79
7.4.6	Untersuchung der Fähigkeit der Vpr Mutanten die Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase zu induzieren .....	80
7.4.7	Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung und LTR-Transaktivierung in Reporterzellen .....	82
7.4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung der Vpr Mutanten .....	84
7.5	Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung steht in mechanistischem Zusammenhang mit dem durch Vpr induzierten G2/M-Arrest .....	87

7.6	Vpr-vermittelte T-Zellaktivierung und LTR-Transaktivierung in PBMCs ist NFAT-abhängig.....	89
7.7	Die Vpr induzierte T-Zellaktivierung und der G2/M-Arrest sind Cyclophilin A unabhängig.....	90
<b>8</b>	<b>Diskussion</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>121</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>125</b>

# 1 Zusammenfassung

HIV-1 Vpr ist ein multifunktionales Protein, welches wichtige Funktionen in der frühen Phase der Infektion übernimmt. Die HIV Genexpression nach der Integration des Virusgenoms ist abhängig von der Transaktivierung des LTR Promoters und findet in ruhenden Zellen nicht oder nur sehr ineffizient statt. Um auch in ruhenden T-Zellen die Virusproduktion zu initiieren, muss HIV Mechanismen evolviert haben um die Wirtszelle in einen aktiven Zustand zu überführen. Vpr wird in hohen Mengen ins Viruspartikel inkorporiert und ist somit gleich nach der Infektion im Zytoplasma der Wirtszelle präsent. Es ist bekannt, dass Vpr die Virusproduktion in primären T-Zellen und die HIV-1 LTR-Transaktivierung verstärkt. Aus diesem Grund wurde in dieser Dissertation die Hypothese verfolgt, dass Vpr als Aktivator in der frühen Phase der Infektion fungiert und die Aktivierung der ruhenden T-Zelle induziert. Somit kann der HIV Replikationszyklus vollendet werden und die Produktion von Viruspartikeln stattfinden. Es konnte gezeigt werden, dass Vpr NFAT in Jurkat Zellen aktiviert, sowie die NFAT-Translokation in Makrophagen induziert. Des Weiteren führt Vpr zur frühen T-Zellaktivierung in PBMCs. Die funktionelle Charakterisierung verschiedener Vpr Mutanten sollte zeigen, ob es eine Korrelation zwischen der NFAT-Aktivierung und anderen Vpr Funktionen gibt und so mechanistische Hinweise liefern. Diese Ergebnisse zeigten einen signifikanten Zusammenhang der NFAT-Aktivierung mit der Induktion des G2/M-Arrests und der durch Vpr verstärkten LTR-Transaktivierung. Nach Inhibition von NFAT mit dem Inhibitor FK506 war die Vpr vermittelte T-Zellaktivierung, LTR-Transaktivierung und der G2/M Arrest in T Zellen stark vermindert. Somit reguliert Vpr durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT verschiedene essentielle Vpr Funktionen wie den G2/M Arrest und die LTR-Transaktivierung.

Zusammenfassend trägt Vpr durch die Verstärkung der NFAT Aktivierung wahrscheinlich zur generalisierten Hyperaktivierung des Immunsystems und damit zum Entstehen hoher Virustiter im Laufe der HIV Infektion bei. Somit leisten die Daten dieser Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der HIV-1 induzierten Immunhyperaktivierung und der damit verbundenen AIDS Progression.

## **2 Summary**

HIV -1 Vpr is a multifunctional protein that is thought to play an important role in the early phase of HIV infection. HIV gene expression after the integration of the viral genome depends on the transactivation of the LTR promoter, and is largely inefficiently in resting cells. To initiate virus production in resting T cells, HIV must have evolved mechanism to convert the host cell into an active state. Vpr is known to be incorporated into viral particles in high amounts, and is thus present in the cytoplasm immediately after the infection of the host cell. Furthermore, Vpr increases virus production in primary T cells and facilitates HIV-1 LTR transactivation. For this reason, we speculated that Vpr acts as an activator in the early stages of infection and induces the activation of resting T cells. Thus, the HIV replication cycle can be completed and aid in the production of virus particles.

It has been shown that Vpr activates NFAT in Jurkat cells and induces the translocation of NFAT in macrophages. Vpr further leads to early T-cell activation in PBMCs. We surmised that the functional characterization of various Vpr mutants could show whether there is a correlation between the activation of NFAT and other Vpr functions, thus providing mechanistic clues. These results revealed a significant association between NFAT activation, the induction of G2/M-Arrest and enhanced LTR transactivation by Vpr. By inhibiting NFAT with the inhibitor FK506, Vpr-mediated T cell activation, LTR transactivation and the G2/M-Arrest in T cells was greatly reduced. Thus, we could show that Vpr regulates various essential functions such as the G2 / M arrest and the LTR transactivation by the activation of the transcription factor NFAT.

In summary, by enhancing the activation of NFAT, Vpr seems to contribute to a generalized hyperactivation of the immune system and thus to the emergence of high virus titers in the course of HIV infection. In this way, the data of this study contribute to the understanding of HIV -1 induced immune hyperactivation and the associated AIDS progression.

## 3 Einleitung

### 3.1 Lentiviren

Lentiviren sind umhüllte Viren mit einem unsegmentierten einzelsträngigen (+) RNA-Genom, die zusätzlich durch ein konisches, zylindrisches Kapsid charakterisiert sind. Sie weisen eine hohe Speziespezifität auf und konnten bisher lediglich in verschiedenen Säugetierarten nachgewiesen werden. Man bezeichnet die Gattung als langsame Viren (lateinisch *lentus* = langsam), da sie häufig chronisch degenerative und langsam fortschreitende Krankheiten auslösen. Manche Infektionen verlaufen für den Wirt auch asymptomatisch. Nach einer Infektion persistiert das Virus lebenslang in seinem Wirt, da es in der Lage ist die Abwehrmechanismen des Immunsystems zu umgehen und sein Genom in das Wirtszellgenom zu integrieren. Zu diesem Zweck wird das diploide ss-RNA-Genom, nach dem Eintritt in die Wirtszelle, durch das virale Enzym Reverse Transkriptase in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben. Katalysiert durch die Integrase wird nun das virale Genom in das der Wirtszelle integriert und fortan als Provirus bezeichnet.

Der bekannteste Vertreter der Lentiviren ist das Humane Immundefizienz-Virus (HIV), welches die Immunschwächekrankheit AIDS (engl. *Acquired immunodeficiency syndrome*) auslöst. Diese, bis heute unheilbare Krankheit, bricht nach einer unterschiedlich langen Inkubationsphase aus, die bis zu 15 Jahre dauern kann.

Die Gruppe der Lentiviren wird in fünf Untergruppen unterteilt, die aufgrund ihrer Wirtsspezifität charakterisiert sind. Das HI-Virus mit seinen beiden Stämmen HIV-1 und HIV-2, sowie SIV (*Simianes Immundefizienzvirus*) mit seinen verschiedenen Arten, gehören zu den Primaten-Lentiviren.

Lentiviren unterscheiden sich von anderen Retroviren dadurch, dass sie auch ruhende Zellen effizient infizieren können, allerdings findet in diesem Fall keine nachweisbare Expression viraler Proteine statt. Außerdem können Retroviren die Regulation ihrer eigenen Gene steuern, zu diesem Zweck weist ihr Genom

Informationen für Gene von regulatorischen und akzessorischen Proteinen auf. Aus diesem Grund zählen sie zu den komplexen Retroviren. Durch die extreme Variabilität ihres Genoms, die hauptsächlich durch die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase und der zellulären RNA-Polymerase verursacht wird, gehören sie zu den am schnellsten evolvierenden Viren [1]. Auf Grund dessen kommt es bei Therapien mit einem Wirkstoff schnell zu einer Resistenzbildung und die Etablierung eines Impfstoffes ist bis heute nicht gelungen.

### **3.2 Entdeckung und Herkunft von HIV**

Im Jahre 1981 wurden bei einer Gruppe homosexueller Männer schwere Infektionen entdeckt, die auf eine Immunschwächeerkrankung zurückzuführen waren. Die Immunschwächekrankheit wurde als AIDS bezeichnet [2]. 1983 bestätigte sich die Vermutung, dass diese Krankheit durch ein Virus ausgelöst wird. Aus Lymphozyten von AIDS Patienten konnte ein Retrovirus isoliert werden [3]. 1986 wurde dem Virus schließlich der heute international gebräuchliche Name Humanes Immundefizienz-Virus Typ 1 zugewiesen [4]. Im gleichen Jahr wurde aus westafrikanischen AIDS Patienten ein HIV-1 verwandtes Virus isoliert und als HIV Typ 2 bezeichnet [5].

Heute weiß man, dass sich HIV Typ 1 und 2 durch die Übertragung von SIVs von unterschiedlichen Affen auf den Menschen entwickelt haben [6]. Aus Schimpansen isolierte man das SIVcpz (*SIV chimpanzee*), welches stark homolog zu HIV-1 ist und somit als dessen Vorläufer identifiziert werden konnte [7]. Wahrscheinlich wurde SIVcpz vom Schimpansen auf den Menschen übertragen und entwickelte sich zu dem humanpathogenem HIV-1. HIV-2 entstand durch die Übertragung des SIVsm (*sooty mangabey*) der Rauchgrauen Mangabe *Cercocebus atys* auf den Menschen [8].

HIV-1 wird in unterschiedliche Gruppen unterteilt, von denen jede aus separaten Übertragungen von SIVs von nichtmenschlichen Primaten auf den Menschen entstanden ist [9]. Gruppe M (*major*), welche für die weltweite AIDS-Pandemie verantwortlich ist, weist zusätzlich noch die Genotypen A – K auf. Die Gruppe N

(*non-M, non-O*) und O (outlier) Viren entstanden aus Übertragungen von SIV Stämmen die in Schimpansen gefunden wurden (SIVcpz; *Pan troglodytes troglodytes*). [10, 11, 12, 13]. Beide Gruppen N und P sind selten in Patienten zu finden.

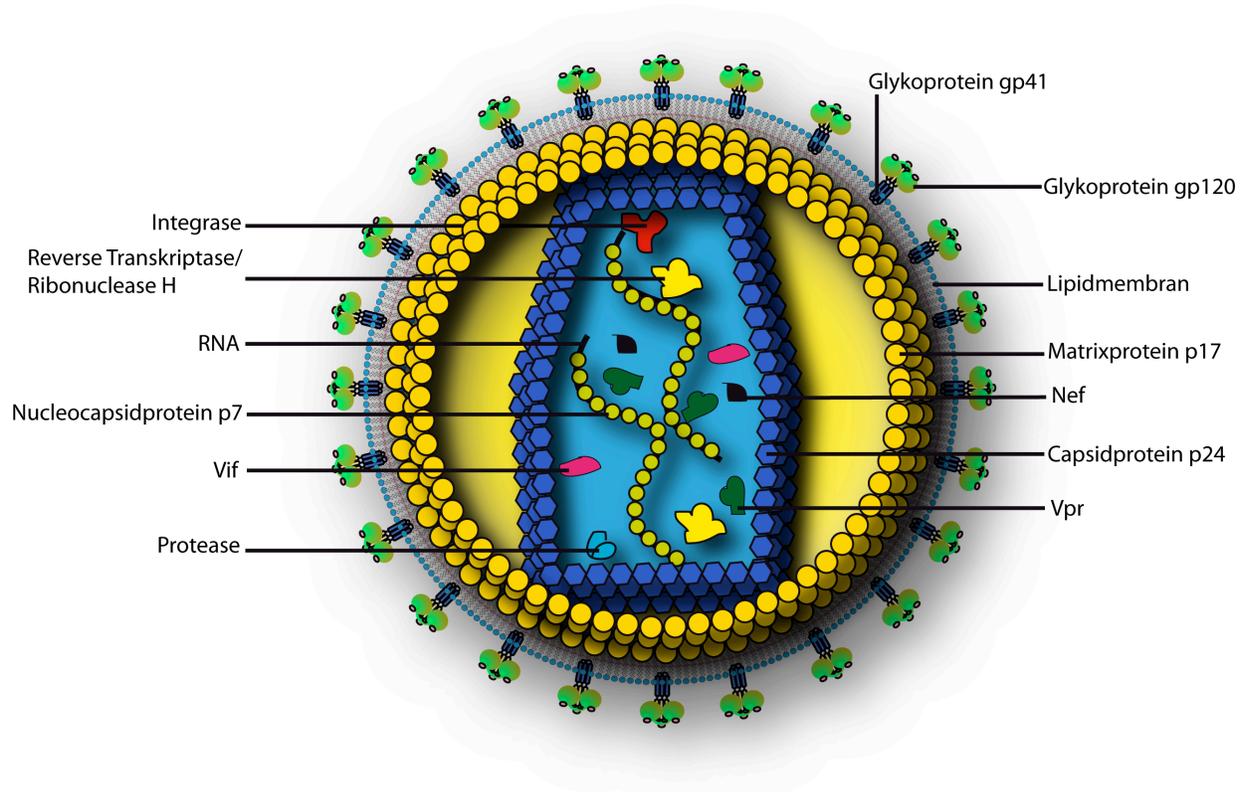
Als neueste Gruppe konnte HIV-1 P bei einer in Frankreich lebenden Kameruner Frau identifiziert werden [14]. HIV-1 P bildet eine distinkte Gruppe, die durch die Übertragung von SIVgor der westlichen Gorillaart *Gorilla gorilla gorilla* auf den Menschen entstanden ist [14, 13, 15]. 2011 konnte ein zweiter HIV-1 P Stamm in einem Kameruner Krankenhaus nachgewiesen werden [16].

### **3.3 Molekulare Architektur und Morphogenese des viralen Partikels**

Retroviren sind umhüllte Viren mit einem Durchmesser von ca. 100 nm. Die Morphogenese und die Knospung des Virus finden an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle statt. Die virale Hülle ist daher der zellulären Plasmamembran abgeleitet. Die Hüllmembran umgibt das Virus-Kapsid, welches das virale Genom enthält. In die Hüllmembran ist das virale Glykoprotein gp41 eingelagert und das sogenannte externe Glykoprotein gp120 ist als Trimer nicht kovalent an den außen liegenden Teil des gp41 gebunden. Es befinden sich in etwa 10 dieser Proteinkomplexe auf der Oberfläche eines viralen Partikels [17]. Der Transmembranbereich des gp41 besteht aus ca. 20 hydrophoben Aminosäuren. Während der Virusmorphogenese wird das gemeinsame Vorläuferprotein von gp120 und gp41 durch eine zelluläre Protease gespalten, welche am Endoplasmatischen Retikulum und am Golgi-Apparat lokalisiert ist.

Das Poly-Protein Gag kodiert für das Matrix Protein (MA), das Kapsid Protein (CA) und das Nukleokapsid Protein (NC), außerdem weist es zusätzlich drei kleine Proteine (SP1, SP2 und p6) auf [17]. Das Matrixprotein p17 (HIV-1) ist über einen Myristinsäurerest mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden, sie bilden eine netzartige Proteinschicht aus. Im Zentrum des Partikels liegt das konische Kapsid (Lentiviren), welches das virale Genom und verschiedene Proteine umgibt. Das

Kapsid ist aus dem Kapsid Protein p24 (HIV-1) aufgebaut und ist über das 6 kDa große Linker-Protein (p6) mit der Hüllmembran verbunden. Das virale Genom liegt in zwei identischen Kopien im Kapsid vor. Die einzelsträngige RNA ist durch Nukleokapsid Protein (p7) komplexiert und die Stränge sind nicht miteinander verbunden. Das Kapsid enthält außerdem die viralen Proteine Integrase, Protease und die Reverse Transkriptase, welche an die RNA angelagert sind. Das Viruspartikel enthält zusätzlich noch die akzessorischen Proteine Vpr und Vif [18, 19,20]. Ob auch Nef in virale Partikel inkorporiert wird, ist in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Zusammensetzung der Viruspartikel wird hauptsächlich durch das virale Gag Protein induziert. Die alleinige Expression von Gag in der Zelle ist ausreichend für die Produktion von nicht-infektiösen virusähnlichen Partikeln. Gag sorgt dafür, dass das virale Genom und andere virale Proteine, wie zum Beispiel Vpr, an die Plasmamembran geleitet werden und in das Virus integriert werden. Dabei werden auch zelluläre Proteine in das Partikel integriert, wie Cyclophilin A und diverse RNA bindende Proteine [17]. Zunächst enthält das Virus große Mengen des nicht gespaltenen Gag Proteins, man spricht dann von einem nicht infektiösen unreifen Partikel. Während der Reifung wird das Gag Polyprotein durch die virale Protease gespalten, dadurch kommt es zu einer Umorganisation des inneren Viruspartikels [17].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des HIV Partikel.**

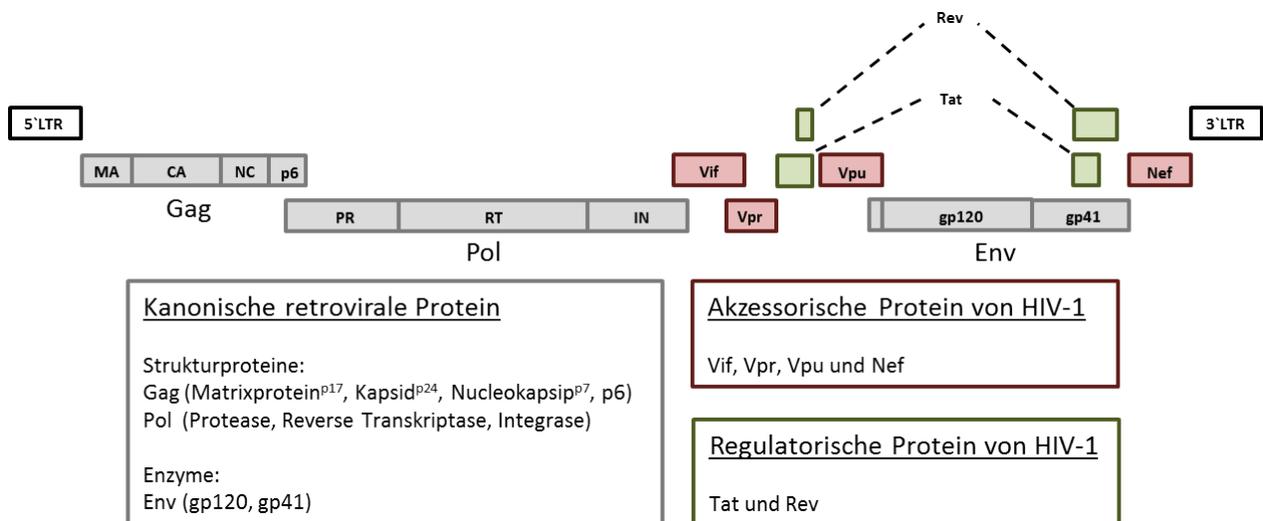
(Verändert nach Abb.: Schematische Darstellung eines HIV Partikels, Dissertation von Dr. Markus Helfer Identifizierung von Hemmstoffen der HIV-Infektion mittels eines neuen HIV Indikatorzellsystems 2011)

### 3.4 Genomaufbau

Das ca. 9 kbp große ss-RNA Genom der Retroviren codiert für die Genprodukte Gag (Gruppenspezifische Antigene), Pol (enzymatische Aktivitäten) und Env (Glykoproteine). Das Polyprotein Gag codiert für die Strukturproteine. Das Vorläuferprotein p55 wird durch die virale Protease gespalten. Pol codiert für die Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase. Das Vorläuferprotein wird als Gag-Pol Polyprotein durch einen ribosomalen Frameshift produziert und anschließend ebenfalls durch die Protease gespalten. Die Glykoproteine gp120 und gp41 haben ihren ORF in der Env Region. Nach der Spaltung des gp160, bilden die Glykoproteine einen nicht kovalenten Komplex an der Hüllmembran des Virus, wobei gp41 die Transmembraneinheit bildet und sich das gp120 zu einem trimeren

Komplex zusammensetzt. Das gp120 enthält die Bindungsdomäne für CD4 und die Co-Rezeptoren.

Lenti- und Spumaviren besitzen zusätzlich noch weitere Gene für regulatorische und akzessorische Proteine und werden deshalb als komplexe Retroviren bezeichnet. Die Proteine werden durch mehrfach gespleißte mRNAs translatiert, da sie häufig aus mehreren Exons bestehen. Bei HIV-1 gehören Tat und Rev zu den regulatorischen Proteinen. Tat reguliert die virale Genexpression und Rev sorgt für die Stabilisierung und den Kernexport der viralen mRNA. Die akzessorischen Proteinen sind Nef, Vpu, Vif und Vpr. Akzessorische Proteine sind *in vivo* für das Virus unverzichtbar, allerdings in der Zellkultur nicht essentiell für eine Infektion. Sie erfüllen wichtige Funktionen während des viralen Replikationszyklus, wie zum Beispiel das neutralisieren von antiviralen Abwehrmechanismen, Regulation von verschiedenen Oberflächenrezeptoren und Aktivierung der Wirtszelle. Das virale Genom weist alle Charakteristika eukaryotischer mRNA auf. Dazu gehört die 5`Cap-Struktur und das 3` Polyadenylierte Ende.



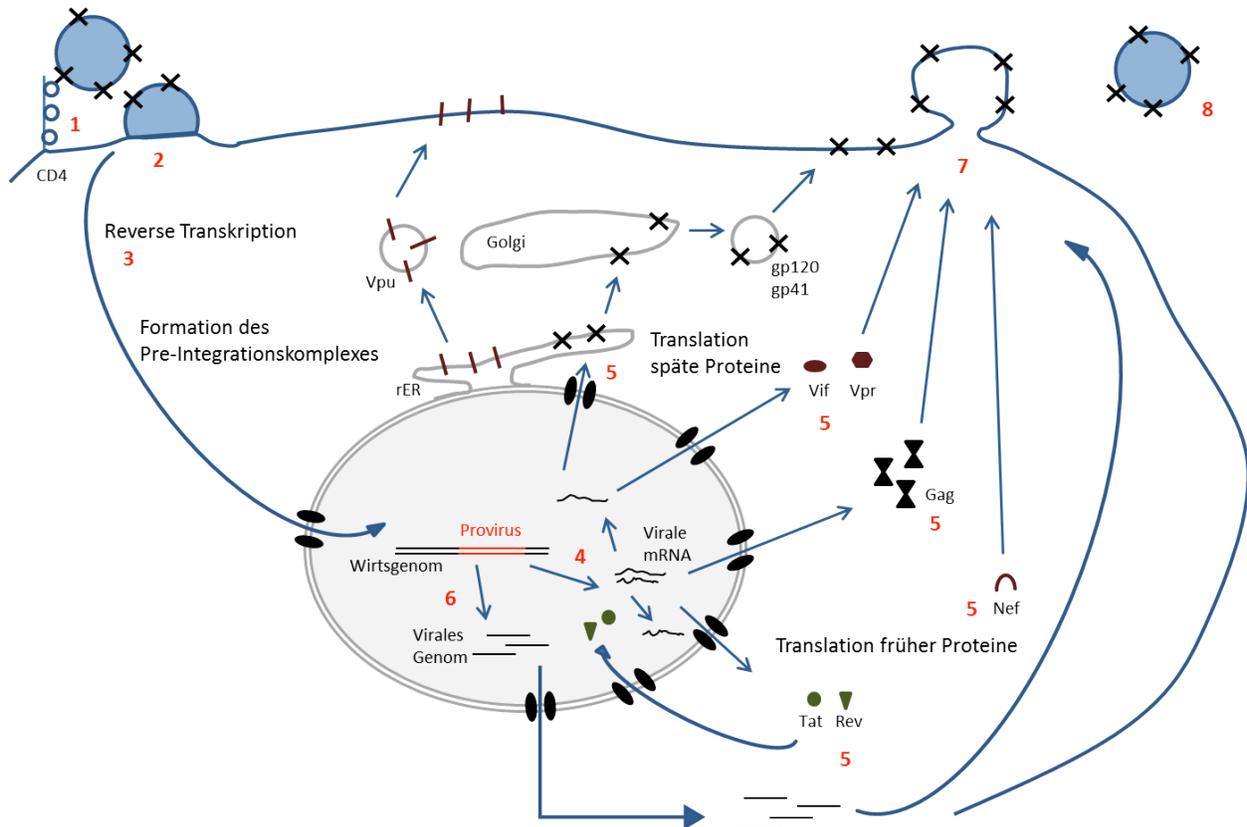
**Abbildung 2: Struktureller Aufbau des HIV-1 Genoms.**

Alle Retroviren kodieren für die kanonischen Gene Gag, Pol und Env (grau). Außerdem besitzen Lenti- und Spumaviren weitere Gene für regulatorische (Grün) und akzessorische (Rot) Proteine, sie werden deshalb als komplexe Retroviren bezeichnet.

### **3.5 Der Replikationszyklus von HIV-1**

Das humane Immundefizienz-Virus infiziert die Wirtszelle durch die Interaktion des gp120 mit dem CD4 Protein, welches ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie ist [21]. Der CD4 Rezeptor ist auf der Oberfläche von T-Helferzellen sowie von Makrophagen und Monozyten lokalisiert, diese Zellen sind somit permissiv für eine HIV Infektion. Die Bindung an den CD4 Rezeptor induziert eine Konformationsänderung des gp120, wodurch es zu einer zweiten Interaktion mit der Zielzelle kommen kann. Das gp120 interagiert nun mit einem Co-Rezeptor, entweder dem Chemokinrezeptor CXCR4 oder CCR5, diese Interaktion führt zu einer Konformationsänderung des gp41 [22]. Infolge dessen kommt es zu einer Fusion der viralen und der zellulären Membran und somit zum Eintritt des Virus in die Wirtszelle [23]. Im Anschluss wird das virale Genom durch die Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. An die DNA lagern sich nun verschiedene Gag und Pol Proteine, sowie das Vpr Protein an und bilden den Pre-Integrationskomplex (PIC) [24]. Dieser Komplex wird nun in den Kern transportiert, dort lagert sich der zelluläre Lens epithelium-derived growth factor/p75 (LEDGF) an den Komplex und fungiert als Verbindung zwischen dem PIC und der genomischen DNA [25]. Die Integrase integriert im Anschluss das virale Genom in das der Wirtszelle [26]. Die virale Proteinexpression erfolgt nach der Aktivierung der infizierten Zelle, wobei das Provirus als Template für die viralen Proteine dient. Zunächst werden nun die frühen Proteine, Tat und Rev produziert. Nach der LTR abhängigen Replikation erfolgt der Transport der einfach oder mehrfach gespleißten Transkripte durch Rev aus dem Zellkern in das Zytoplasma [27]. Gag, Gag/Pol Polyproteine, Vif und Vpr werden an freien zytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und dann mittels unabhängiger Wege zur Plasmamembran transportiert. Vpu und Env werden im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, Env wird anschließend im Golgi glykosyliert und an die Zellmembran transportiert. An der Plasmamembran kommt es zur Akkumulation der viralen Proteine sowie dem HIV-1 Genom und der Zusammenbau und die Freisetzung der neuen Viruspartikel setzt ein [28]. Die Hüllmembran der Viruspartikel entsteht aus der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Nach der Partikelfreisetzung kommt es zur Reifung des Virus, dabei werden die Gag

und Gag/Pol Vorläuferproteinen durch die virale Protease proteolytisch prozessiert. Das Kapsid nimmt seine charakteristische, ikosaedrische Struktur an. Die reifen Viruspartikel können nun weitere Zellen infizieren.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des viralen Replikationszyklus von HIV.**

1) Anheftung an die Wirtszelle, 2) Eintritt in die Zelle durch Membranfusion, 3) Reverse Transkription, 4) Transkription des Provirus, 5) Translation der viralen Proteine, 6) Replikation des viralen Genoms, 7) Aufbau und Ausknospung des unreifen Viruspartikel, 8) Reifung zu einem infektiösen Virus. Details siehe Text. (Abbildung nach Quelle: HIV-1 replication cycle; <http://michitra.wordpress.com/the-hiv-1-replication-cycle/picture2/>, Stand: 19.01.2014)

### 3.6 Übertragung und Pathogenese der HIV-Infektion

HIV wird über den Austausch von infektiösen Körperflüssigkeiten übertragen, dazu gehören Blut, Sperma, Vaginalsekret und Muttermilch. Das Virus tritt über frische, noch blutende Wunden der Schleimhaut und nicht ausreichend verhornte und somit leicht verletzliche Stellen der Außenhaut ein. Außerdem sind Schleimhäute,

besonders die des Vaginal- und Analtrakts, sowie die der Vorhaut besonders permissiv für eine HIV Infektion. Daher ist der häufigste Infektionsweg der ungeschützte Geschlechtsverkehr. Das Übertragungsrisiko ist abhängig von der Viruslast in den verschiedenen Körperflüssigkeiten und die medizinische Behandlung des Virus. Ein besonders hohes Übertragungsrisiko ist kurz nach der Exposition gegeben, bevor es zur Bildung von Antikörpern kommt und in späten Stadien der Infektion. Seit 1985 wird die Routineüberwachung von Blutspendern durchgeführt und senkte das Risiko einer Infektion durch Blutspende erheblich ab. Allerdings besteht ein etwa 25 Tage großes Zeitfenster, in dem die HIV-Infektion nicht über Antikörper nachgewiesen werden kann, aus diesem Grund bleibt ein Restrisiko bestehen, falls sich Blutspender erst vor kurzem infiziert haben sollten [29].

HIV kann auch während der Schwangerschaft von der Mutter auf das Kind übertragen werden. Das Ansteckungsrisiko während der Schwangerschaft, also in der Gebärmutter liegt bei ca. 7%. Kurz vor oder während der Geburt wird das Kind mit einer Wahrscheinlichkeit von 18% infiziert. Auch durch das Stillen werden ca. 15 % der Kinder infiziert. Die Gabe antiviraler Medikamente und ein Kaiserschnitt in der 36. Schwangerschaftswoche, sowie eine sechswöchige HAART (*Highly Active Antiretrovirale Therapy*) für das Kind, reduziert das Risiko einer Übertragung auf 1 % [30].

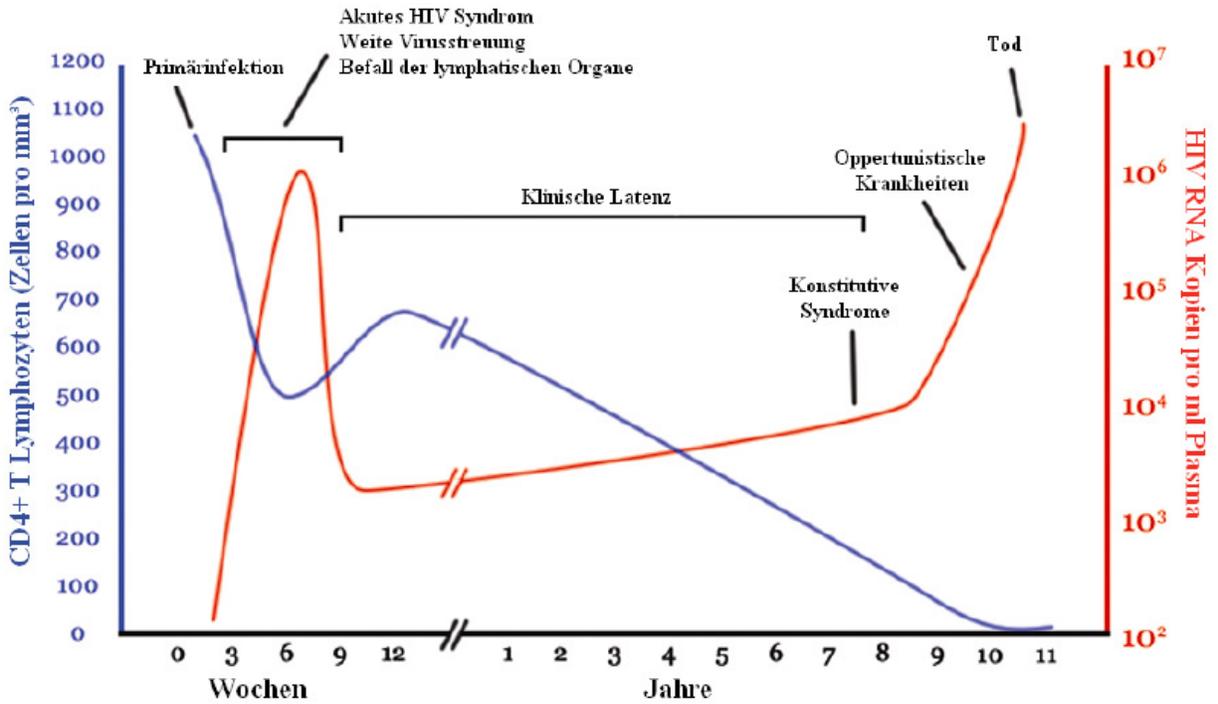
Nach der Primärinfektion mit HIV kommt es in 10-20 % der Fälle nach einigen Tagen bis wenigen Wochen zu einer grippeähnlichen Erkrankung des Patienten [31]. Die häufigsten Symptome sind Fieber, Hautausschlag, Orale Ulzera, Gelenkschmerzen, Rachenentzündung, aber auch Appetit- und Gewichtsverlust und allgemeine Abgeschlagenheit. Da die Symptome aber sehr unspezifisch sind, werden sie in den meisten Fällen erst im nach hinein der HIV Infektion zugesprochen. Diese Phase bezeichnet man als Primärinfektion oder akute Phase der Infektion. Diese ist durch die Infektion der CD4-positiven T-Zellen in der Schleimhaut und den T-Zellen im darmassoziierten lymphatischen Gewebe charakterisiert [32, 33]. Die grippeähnlichen Symptome entstehen durch das Absterben dieser Zellen durch die Virusinfektion. Nach einigen Wochen bis Monaten sinkt die Viruslast im peripheren

Blut ab und es schließt sich ein meistens symptomfreies Latenzstadium an. Während der Latenzphase sinkt die Konzentration der CD4-positive Zellen infolge der Infektion stetig ab, die genauen Gründe dafür sind aber noch nicht gänzlich aufgeklärt. Diese Zerstörung geschieht hauptsächlich in lymphatischem Gewebe, zum Beispiel Lymphknoten, Thymus und Milz. Dort findet auch der Großteil der viralen Replikation statt. Die Arbeitsgruppen von David Ho und George Shaw zeigten, dass auch in der frühen symptomfreien Phase pro Tag ca.  $10^9$  virale Partikel freigesetzt werden und ebenso viele CD4-positive Zellen sterben [34]. Die täglich zerstörten CD4-positiven Zellen machen ca. 5 % der gesamten Lymphozytenzahl des Menschen aus, allerdings werden auch genauso viele wieder regeneriert. Warum kann das Immunsystem dem Druck durch die HIV Infektion nicht standhalten? HIV ist zwar in der Lage ruhende T-Zellen zu infizieren, aber eine effiziente Replikation kann nicht stattfinden. Um diese frühe Blockade der Replikation zu umgehen, hat das Virus Mechanismen evolviert, welche zu einer chronische Hyperaktivierung des Immunsystems führen. Diese chronische Aktivierung korreliert mit der AIDS Progression [35]. In asymptomatisch infizierten Affen tritt diese Hyperaktivierung trotz sehr hoher Viruslast nicht auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Nef Gene der meisten SIVs die Aktivierung von T-Helfer Zellen blockieren und somit die chronische Hyperaktivierung des Immunsystems verhindern [36]. Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich durch die lange Co-Evolution von SIV mit seinem natürlichen Wirt entstanden und ein Zeichen für die Adaption des Virus an seinen natürlichen Wirt. Weitere Effekte der Infektion, wie lytische virale Replikation auf niedrigem Level, sowie aktivierungsinduziertem Zelltod führen letzten Endes zusätzlich zum Verlust der CD4-positiven Zellen [37]. Aus diesem Grund könnte sich das Gleichgewicht zwischen sterbenden und regenerierten CD4-positiven Zellen zu Ungunsten des Patienten verschieben. Zwei bis drei Jahre bevor die klinischen Symptome von AIDS auftreten, kommt es bei vielen der Patienten zu einer persistierenden, generalisierten Lymphadenopathie (PGL, *engl. persistent generalized lymphadenopathy*). Die PGL ist durch die Vergrößerung mindestens zweier peripherer Lymphknoten gekennzeichnet. Die PGL kann sich über mehrere Wochen bis Jahre etablieren bis es in vielen Fällen in den *AIDS-related complex*

(ARC) übergeht. Der ARC ist durch langes Fieber, Gewichtsverlust, persistente Diarrhoe, orale Candidiasis und multidermatomalen Herpes Zoster gekennzeichnet [28]. In manchen Fällen kommt es im Anschluss der PGL direkt zu AIDS.

Im fortschreitenden Krankheitsverlauf kommt es bei allen Patienten zur klinischen AIDS Symptomatik. Ein Marker für die Verschlechterung der klinischen Situation ist der Abfall der CD4-positiven Lymphozyten, wobei die kritische Grenze bei 200 CD4-positiven Zellen pro Mikroliter Blut liegt. Diese letzte Phase der Infektion ist durch opportunistische Erkrankungen, B-Zell Lymphoma und/oder das Kaposi Sarkom gekennzeichnet. Zusätzlich treten ebenfalls Krankheiten des Nervensystems auf, wie zum Beispiel Encephalopathie, Myelopathie und/oder periphere Neuropathie [28]. Die Symptome entstehen durch zunehmende Defekte der zellvermittelten Immunabwehr. In der Spätphase sinkt die CD4-Zellzahl, sowie die Menge an HIV-spezifischen Antikörper stark ab und die Viruslast im peripheren Blut steigt im Gegensatz dazu stark an. Der Körper ist nicht mehr in der Lage die Infektion unter Kontrolle zu halten. Die schweren und lebensbedrohenden opportunistischen Erkrankungen wie Tuberkulose und Pneumonie führen letztendlich zum Tod der Patienten [38].

Bei einer Infektion mit HIV-2 zeigt sich ein weniger aggressiver Krankheitsverlauf und die Progression der Krankheit verläuft wesentlich langsamer [39]. So ist die Latenzphase bei HIV-2 fast doppelt so lang wie bei HIV-1. Die Zusammenhänge zwischen Immunaktivierung und T-Zellverlust und die dafür verantwortlichen viralen Mechanismen bilden somit ein zentrales Thema, dessen Erforschung essentiell für das Verständnis von AIDS ist.



**Abbildung 4: Klinischer Verlauf von der Primärinfektion mit HIV-1 bis zur Immunschwäche AIDS.** (Quelle: Abbildung verändert nach Jurema Oliveira, 24.12.2004, HIV timecourse, <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hiv-timecourse.png>, Stand 19.02.2014).

### 3.7 Das HIV-1 Vpr Protein

Die Pathogenität eines Virus ist von verschiedenen viralen, als auch Wirtsfaktoren abhängig. Im Laufe der Evolution hat der Wirt verschiedene antivirale Mechanismen entwickelt, um sich vor Infektionen zu schützen. Dabei können die verschiedensten Schritte des viralen Replikationszyklus betroffen sein. Ein erfolgreiches Virus muss in der Lage sein, die antiviralen Mechanismen der Wirtszelle zu umgehen, um sich erfolgreich vermehren zu können [136].

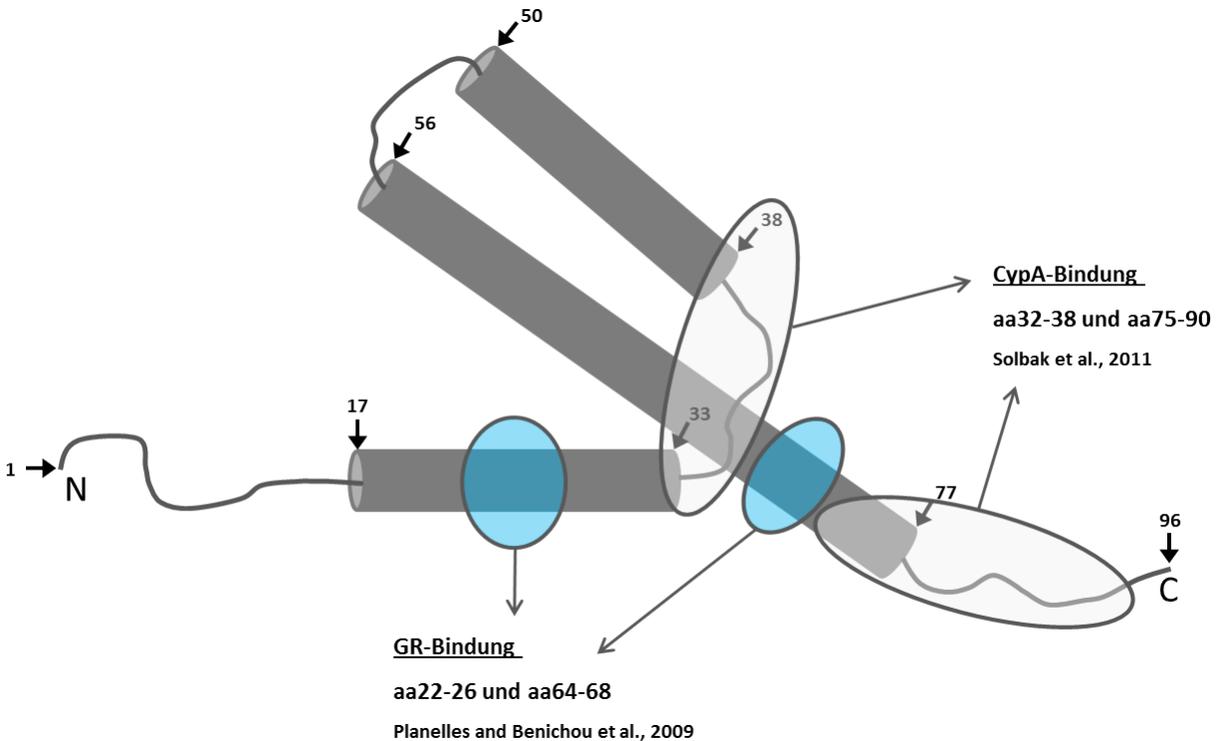
Aus diesem Grund haben Viren eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen evolviert, welche die zellulären Abwehrmechanismen außer Kraft setzten [40]. Das HIV-1 Genom kodiert für zwei regulatorische Proteine (Tat und Rev), welche für die Replikation und Genexpression essentiell sind. Im Gegensatz dazu besitzt es noch

vier akzessorische Proteine (Vif, Vpr, Vpu und Nef), welche im Gegensatz zu den regulatorischen Proteinen *in vitro* entbehrlich sind.

Das HIV-1 virale Protein R (Vpr) besteht aus 96 Aminosäuren und hat eine Größe von 14 kDa. Vpr ist multifunktional und wird in hoher Anzahl (ca. 300 Moleküle) ins Virion inkorporiert [41; 42]. Vpr wird durch die direkte Interaktion von Vpr mit der C-terminalen p6 Region des Gag- Vorläuferproteins ins Viruspartikel eingebaut [43, 44]. Da die Virioninkorporation durch verschiedene Mutationen in Vpr blockiert werden kann, sind vermutlich unterschiedliche Regionen des Proteins für diese Funktion von Bedeutung [45].

Nach der Infektion ist Vpr sofort im Zytoplasma der Wirtszelle nachweisbar [46]. Die *de novo* Synthese von Vpr beginnt erst in der späten Phase des Replikationszyklus nach der Integration des HIV-Genoms in das der Wirtszelle [47]. Es wurden viele verschiedene Effekte und Interaktionspartner des Proteins identifiziert. So wurde gezeigt, dass Vpr den Zellzyklus in der G2 Phase arretiert und proapoptotisch wirkt [48]. Außerdem stabilisiert Vpr die Reverse Transkription [49] und ist am Import des Pre-Integrationskomplexes in den Zellkern beteiligt [50]. Die meisten Vpr Funktionen scheinen eine wichtige Rolle in der frühen Infektionsphase zu spielen. Des Weiteren wurden zahlreiche Interaktionen zwischen Vpr und Wirtszellfaktoren nachgewiesen, wobei deren funktionelle Bedeutung noch weitestgehend unklar ist [51, 52, 53]. Strukturell besteht Vpr aus drei amphipatischen Alpha-Helices. C- und N-Terminus des Proteins sind flexibel und flankieren die Helices (Abbildung 5) [54]. Die dritte Alpha-Helix ist sehr Leucin-reich und zeigt Leucin-Zipper artige Struktur. Diese Region scheint für die Oligomerisierung und die Interaktion von Vpr mit verschiedenen Proteinen zuständig zu sein [55]. Welche Rolle die Di- oder Multimerisierung von Vpr spielt ist allerdings noch unklar. Man nimmt an, dass die Multimerisierung für die Aufnahme von Vpr in das Virion und für die Interaktion mit bestimmten Proteinen wichtig ist. Funktionen der einzelnen Domänen wurden durch Mutagenese-Studien ermittelt [56]. Der zytopathische Effekt von Vpr wird durch den N-Terminus vermittelt. Dieser bildet eine Ionenkanal-ähnliche Struktur in Zellmembranen aus und kann mit

Membranproteinen der Mitochondrien interagieren [57]. Die Modulation des Zellzyklus hingegen wird vom Vpr C-Terminus aus vermittelt [58, 59].



**Abbildung 5: Struktureller Aufbau des HIV-1 Vpr.**  
 (Abbildung nach Quelle. Planelles and Benichou (2009) [137])

### 3.7.1 Nukleärer Transport des Pre-Integrationskomplexes

Die meisten Retroviren nutzen die Auflösung der Kernmembran während der Mitose dazu, ihre neu synthetisierte DNA in den Kern zu schleusen. HIV ist allerdings in der Lage seinen PIC aktiv in den Kern zu schleusen und kann somit auch ruhende Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen effizient infizieren [136]. HIV-1 Vpr steigert die virale Replikation in diesen ruhenden Zellen, da es für den aktiven Import des Pre-Integrationskomplexes in den Zellkern der Wirtszelle sorgt. Der Pre-Integrationskomplex (PIC) von HIV setzt sich neben dem viralen Genom noch aus den viralen Proteinen Reverse Transkriptase, der Integrase, dem Nucleokapsid, dem Matrixprotein und Vpr zusammen [60, 61]. Im Gegensatz zu dem Matrixprotein und der Integrase, ist in Vpr keine NLS (Nuclear-localisation signal) identifiziert worden,

obwohl es nucleophile Eigenschaften zeigt. Es ist also anzunehmen, dass die Kernlokalisierung von Vpr durch einen unbekanntem Mechanismus zustande kommt, welcher sich von dem klassischen NLS- und M9- abhängigen Signalweg unterscheidet. Durch die Verwendung eines GFP markierten Vprs konnte gezeigt werden, dass der PIC mit dem Mikrotubuli-Netzwerk assoziiert ist und entlang dieser Struktur zum Kern transportiert wird. Jedoch ist unklar, ob Vpr den Mikrotubulus-PIC Transport beeinflusst, oder erst zu einem späteren Zeitpunkt eine wichtige Rolle beim Kernimport spielt [62].

Weiterhin ist bekannt, dass Vpr an ein Phenylalanin-Glycin Motif (FG-Motif) von verschiedenen Nucleoporinen (NUPS) und FG-Motif unabhängig an hCG1 (*Nuceoporin-like protein*) bindet. NUPS sind die Untereinheiten des Nuclear-pore Komplexes (NPC), welcher den Eintritt von Proteinen in den Zellkern ermöglicht. Diese Interaktion ist essentiell für die Kernlokalisierung von Vpr, die wiederum wahrscheinlich eine wichtige Rolle für den PIC Import spielt [62, 50, 63, 64, 65].

Neben dem durch Vpr induzierten aktiven Import des PIC wird vermutet, dass Vpr auch aus dem Kern ins Zytoplasma exportiert wird. Dabei nutzt es vermutlich den Exportin 1 abhängigen Export Signalweg. Da Vpr kein NES (*nuclear export signal*) hat vermutet man, dass es an ein zelluläres Protein mit einer NES bindet und ausgeschleust wird [66]. Somit transloziert Vpr vermutlich zwischen beiden Kompartimenten.

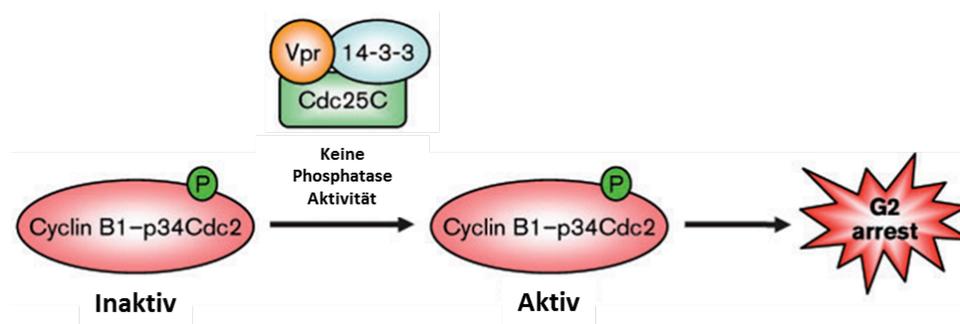
### **3.7.2 Vpr induziert die Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase**

Der Zellzyklus in eukaryotischen Zellen ist stark konserviert und wird über vielfältige Wege kontrolliert und reguliert. Cyclin-abhängige Protein Kinasen (CDK's) regulieren den Zellzyklus indem sie verschiedene Zielproteine phosphorylieren und somit aktivieren. Die enzymatische Aktivität der CDK's ist abhängig von der Ausbildung eines Proteinkomplexes mit Cyclinen. Dabei stellen die Cycline den limitierenden Faktor dar, wobei hingegen CDK's immer ausreichend zur Verfügung stehen. Die Aktivität der Cyclin-CDK Komplexe kann entweder durch die Bindung

von inhibitorischen Molekülen oder durch inhibitorische Phosphorylierung geschehen.

Vpr ist in der Lage den Zellzyklus von infizierten Zellen zu manipulieren und so die virale Replikation zu steigern. Indem es den Übergang von der G2- in die M-Phase blockiert, hält es die Zelle in einem erhöhten Transkriptionslevel. Das Provirus kann nun verstärkt durch die zelluläre Maschinerie abgelesen werden [67; 68].

Zwei Mechanismen wurden postuliert, durch die Vpr die Blockade des Zellzyklus induziert. Vpr inaktiviert die Cdc25C Kinase, welche normalerweise das CyclinB1-p34Cdc2 aktiviert. Dies geschieht zum einen durch eine direkte Interaktion von Vpr mit Cdc25C, wodurch die Phosphatase Aktivität beeinträchtigt ist [69; 70]. Außerdem interagiert Vpr über seinen C-Terminus mit dem 14-3-3 Protein und rekrutiert dieses an die Cdc25C Kinase. Der so entstandene Komplex ist wiederum inaktiv. Sowohl die direkte Bindung von Vpr an Cdc25C, als auch die Rekrutierung von 14-3-3 führen dazu, dass Cdc25C sein Zielprotein Cyclin B1-p34Cdc2 nicht mehr dephosphorylieren, und somit aktivieren kann. Die infizierte Zelle steckt nun in der G2-Phase fest [71].

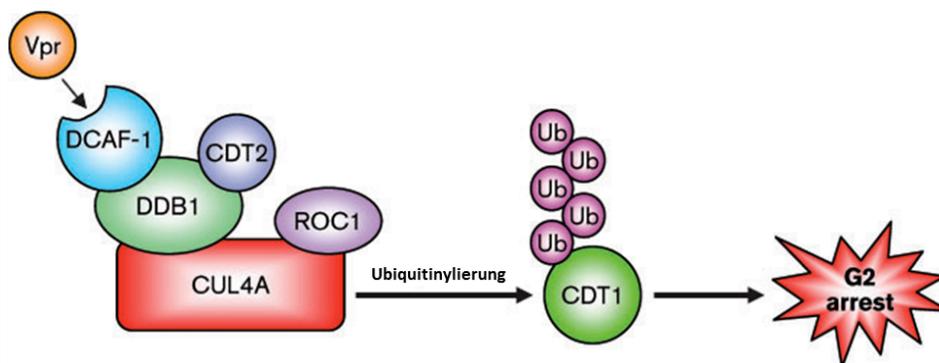


**Abbildung 6: Mechanismus des Vpr induzierten G2/M-Arrests.**

(Verändert nach Romani B. und Engelbrecht S. (2009) [45])

Ein weiterer Mechanismus zur Blockade des Zellzyklus ist die Interaktion von Vpr mit dem VprBP (Vpr Binding Protein), auch als DCAF bekannt (DDB1- and CUL4-associated factor-1). Man vermutet, dass VprBP als Adapter Protein zwischen Vpr

und dem CUL4A-Ubiquitin Ligase Komplex fungiert. Dadurch scheint es Vpr möglich zu sein, gezielt Proteine zu degradieren, welche für den Zellzyklus wichtig sind. Ein Beispiel für ein solches Protein ist CDT1. CDT1 ist ein zellulärer Faktor, der wichtig für die DNA-Replikation ist. Wird dieser Faktor degradiert, kann keine DNA-Replikation stattfinden und der Zellzyklus stagniert [72; 73]. Es wird vermutet, dass nicht nur die Degradation eines einzelnen Faktors zur Manipulation des Zellzyklus führt.



**Abbildung 7: Mechanismus des Vpr induzierten G2/M-Arrests.**

(Verändert nach Romani B. und Engelbrecht S. (2009) [45])

### 3.7.3 Vpr induziert Apoptose in infizierten Zellen

Der kontrollierte Zelltod kann durch zwei verschiedene Signalwege induziert werden. Der extrinsische Weg wird durch externe Liganden ausgelöst, die an Cell-death Rezeptoren an der Zellmembran binden. Bei dem intrinsischen Weg wird die Apoptose durch die Freisetzung von verschiedenen proapoptotischen Proteinen aus den Mitochondrien ausgelöst. Die beiden Signalwege unterscheiden sich allerdings im wesentlichen über die Herkunft der auslösenden Stimuli, in der Folge teilen sie sich aber viele Faktoren, wie zum Beispiel die Kaspasen.

### 3.7.4 Vpr induziert die Apoptose über den intrinsischen Signalweg.

Vpr interagiert sowohl mit dem mitochondrialen Intermembranprotein ANT (*adenine nucleotide translocator*) als auch mit dem PTPC (*permeability transition pore*)

*complex*) [74]. Diese Interaktion führt in der mitochondrialen Membran zur Freisetzung von proapoptotischen Proteinen wie zum Beispiel Cytochrom C. Dieses bindet an Apaf-1 (*apoptotic peptidase-activating factor 1*), wodurch Kaspasen und Apoptose induziert wird [75, 76]. Da ein C-terminales Vpr Peptid (aa71-82) ausreichend ist um in CD4+ T Zellen Apoptose ähnliche Effekte auszulösen, ist vermutlich diese Region für die proapoptotischen Effekte von Vpr verantwortlich [77].

Neben Vpr konnte auch für die anderen akzessorischen und regulatorischen Proteinen von HIV-1 eine proapoptotische Wirkung gezeigt werden. Allerdings ist weder HIV-2, noch SIV Vpr in der Lage Apoptose in Säugetierzellen zu induzieren [76; 78; 79; 80].

### **3.7.5 Modulation der Genexpression**

Vpr induziert nicht nur die Expression viraler, sondern auch zellulärer Proteine, sowie die Proliferation und die Differenzierung der Zelle. Eine Funktion von Vpr die mit der Modulation der viralen Genexpression in Zusammenhang stehen könnte ist die Transaktivierung der HIV-1 LTR (*long terminal repeat*).

Die LTR Region wird durch die beiden Transkriptionsfaktoren p53 und Spl moduliert. Der Transkriptionsfaktor Spl ist wichtig für die Transaktivierung durch Vpr [81, 171], wo hingegen p53 die Aktivierung durch Vpr hemmt. Spl bindet an ein Spl-Motiv in der LTR-Region und wird dann wahrscheinlich seinerseits von Vpr über ein Leucin-Zipper ähnliches Motiv (aa60-81) gebunden [82,83].

Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen der Induktion des G2-Arrest und der Modulation der Genexpression durch Vpr. Zum Beispiel führt Vpr zu einer verstärkten Survivin Expression in der Zelle. Survivin unterdrückt Apoptose und reguliert die Zellteilung. Da Survivin über den Zellzyklus reguliert wird, könnte die Vpr vermittelte Modulation des G2/M-Arrest die Survivinexpression beeinflussen [84].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Vpr mit dem Glucocorticoid Rezeptor interagiert. Die Bindung wird durch ein LxxLL Motiv (Vpr aa64-68) in Vpr vermittelt. Der Glucocorticoid Rezeptor wird durch Glucocorticoide gebunden und aktiviert. Im aktiven Zustand sorgt er für die Expression von anti-inflammatorischen und immunosuppressiven Genen. Somit könnte Vpr durch das LxxLL Motiv einen natürlichen GR Liganden imitieren und somit die HIV-1 Replikation und Genexpression positiv beeinflussen [85, 86, 87].

Des Weiteren könnte Vpr durch Interaktion mit den Transkriptionskofaktoren p300/CBP die HIV-1 LTR Aktivierung verstärken. Transkriptionelle Kofaktoren der p300/CBP Familie erhöhen die Genexpression über mindesten drei unabhängige Signalwege. Durch Histon Acetyltransferase Aktivität wird die Chromatin Struktur entwunden. Sie rekrutieren die Transkriptionsmaschinerie und wirken als Adapterproteine und außerdem binden sie an Vpr und werden somit direkt zur HIV-1 LTR geleitet [86].

Weiterhin soll Vpr mit dem *general transcription factor* TFIIB, AP-1 und NFκB (*Nuclear factor Kappa B*) interagieren, was ebenfalls zu einer erhöhten Genexpression führen könnte [88, 89] und die Expression des viralen Nef Proteins vor der Integration des Provirus in das Wirtszellgenom verstärken [90].

### **3.7.6 Unterdrückung der Immunantwort**

Die negativen Effekte von Vpr auf die Antwort des Immunsystems auf die Virusinfektion sind stark mit anderen Funktionen vernetzt. Die Mechanismen sind komplex und stehen vermutlich in Zusammenhang mit der Modulation des Glucocorticoid Rezeptor (GR) Signalweges, der Induktion der G2-Blockade und dem Effekt auf die Genexpression in der Zelle. Es handelt sich hierbei um Mechanismen, durch den Vpr die Reaktion des Immunsystems auf die Virusinfektion verringert.

Durch die Modulation der Genexpression werden die Expressionslevel verschiedener immunologisch wichtiger Moleküle reduziert. Dazu gehören CD40, CD80, CD83 und CD86 auf Makrophagen und dendritischen Zellen. Dies hat zur Folge, dass die Reifung von Monozyten zu dendritischen Zellen blockiert wird [91].

Durch die Vpr induzierte Modulation des GR-Signalweges und die damit einhergehende Manipulation der Genexpression kann die antivirale Immunantwort eingeschränkt werden [92, 93, 94]. Außerdem vermutet man, dass Vpr die Produktion von Antikörpern hemmt, indem es die Expansion der T-Zell Klone durch die Induktion der G2-Blockade verhindert.

### **3.7.7 Vpr erhöht die Prozessivität der Reversen Transkription**

Da die Reverse Transkriptase keine *Proof reading* Funktion besitzt, wird etwa alle 2000-5000 Nukleotide eine fehlerhafte Base in das HIV-1 Genom eingebaut [95, 96]. Hierdurch können Mutationen entstehen die zu infunktionellen Viruspartikeln führen. Andererseits begründet sich in der hohen Mutationsrate aber auch die Variabilität von HIV-1, die es dem Virus erlaubt der antiviralen Immunantwort zu entgehen oder Resistenzen gegen antivirale Medikamente zu entwickeln [97, 98]. Um eine Hypermutation des viralen Genoms zu verhindern rekrutiert Vpr die zelluläre Uracil-DNA Glykosylase 2 (UNG2), die G zu A Austausch beheben kann. Dadurch wird UNG2 in Viruspartikel inkorporiert was eine 4-fache Reduktion der G zu A Mutationsrate im HIV-1 Genom bewirkt [99, 100]. Ein weiterer positiver Effekt von Vpr auf die Reverse Transkription könnte durch die Interaktion von Vpr mit der Lys-tRNA Synthetase vermittelt werden. Diese katalysiert die Bildung von Lys-tRNA welches als Primer für die Initiation der Reverse Transkription fungiert [102].

## **3.8 Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT)**

### **3.8.1 Die NFAT Proteinfamilie**

NFAT Proteine sind induzierbare Transkriptionsfaktoren die Ursprünglich in T-Zellen identifiziert wurden. Heute weiß man, dass zumindest eines dieser Proteine in nahezu jeder Zelle exprimiert wird. So sind NFATs nicht nur in Zellen des Immunsystems wichtig, sondern übernehmen auch wichtige regulatorische Aufgaben in Zellen des Zentralen Nervensystems, der Blutgefäße, des Herzens, der Nieren, der Knochen, der Skelettmuskulatur und den hämatopoetischen

Stammzellen [103, 104, 105, 106]. Die Funktion von NFAT ist in vielen Geweben nur unvollständig verstanden. In T-Zellen jedoch ist NFAT essentiell für viele Prozesse unter anderem die T-Zellentwicklung/ -aktivierung und -toleranz, sowie die Differenzierung zu T-Helferzellen.

Die Proteinfamilie setzt sich aus 5 Mitgliedern zusammen, NFAT1 (auch NFATp oder NFATc2), NFAT2 (NFATc oder NFATc2), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx oder NFATc3 und NFAT5. Im Gegensatz zu den anderen Vertretern, wird NFAT5 nicht durch Calcium-Calmodulin aktiviert, sondern durch osmotischen Stress [107]. NFAT3 wird nicht in Zellen des Immunsystems exprimiert. Die einheitliche Charakteristik und die Spezifität der DNA-Bindung der NFAT's haben sie der konservierten DNA-Bindungsdomäne zu verdanken. Von jedem NFAT gibt es eine oder mehrere Splicing Varianten, wobei diese nur Unterschiede im N- und C-Terminus, nicht aber in der Kernregion des Proteins aufweisen [108, 109]. Die Kernregion besteht aus zwei Domänen, zum einen der NFAT-Homologie Domäne (Regulatorische Domäne), wo sich die Bindungsstelle für die NFAT-Kinase Calcineurin befindet. Außerdem bestimmt der Phosphorylierungszustand der Serine in dieser Region den Aktivierungszustand und die Lokalisation des Proteins. Die andere Domäne der Kernregion ist die REL-Homologie Region (RHR), diese Region ist der RHR Domäne von Rel und NFκB Proteinen sehr ähnlich. Sie sorgt für die spezifische DNA-Bindung der NFAT Proteine [110].

### **3.8.2 NFAT Regulation**

Der Aktivierungszustand von NFAT wird über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Serinen in der Kernregion des Proteins gesteuert. In inaktiven Zellen liegt NFAT phosphoryliert, und somit inaktiv im Zytoplasma vor. Wird NFAT nun aufgrund eines Stimulus dephosphoryliert, kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins und die NLS (*nuclear localization sites*) wird exponiert. Das Protein kann nun in den Zellkern eintreten und dort die Genexpression seiner Zielgene aktivieren. NFAT's können ebenfalls als Dimere Transkriptionsfaktoren ausbilden. Diese Homodimere können dann an

quasipalindromische Motive binden. So kann das Homodimer von NFAT1 an die LTR von HIV-1 binden.

Prinzipiell wird NFAT über Oberflächenrezeptoren aktiviert, die den Calcium-Signalweg induzieren. In T- und B-Zellen ist dies der Antigen Rezeptor, bei Monozyten und Killerzellen der Fc $\gamma$ -Rezeptor und der Fc $\epsilon$ -Rezeptor auf der Oberfläche von Mastzellen.

Nachdem der Ligand an den entsprechenden Rezeptor gebunden hat, aktiviert dieser die Phospholipase C $\gamma$ , welche dann Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat hydrolysiert. Dabei entstehen die Verbindungen Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP $_3$ ) und Diacylglycerol. InsP $_3$  induziert die Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum, sodass sich die Calcium Konzentration in der Zelle erhöht. Die Calcium Ionen binden nun an das Calcium-sensitive Protein Calmodulin, welches nun die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Calcineurin dephosphoryliert die Serine im NFAT Protein und sorgt somit für die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern, dort kann es auch zu Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren kommen [103, 111].

Das Bindungsmotiv PXIXIT (X steht für jede beliebige Aminosäure) für Calcineurin befindet sich im N-terminalen Bereich von NFAT und ist stark konserviert [112, 113]. Die 14 Phosphorylierungsstellen in NFAT werden bis auf eine einzige durch Calcineurin dephosphoryliert [115]. Die Phosphorylierung dieser Serine geschieht durch verschiedene Kinasen. Dabei unterscheidet man zwischen denen, die im Zellkern für die Ausschleusung von NFAT aus dem Kern sorgen, wie zum Beispiel GSK3 $\beta$  und denen im Zytoplasma, die die Translokation von NFAT in ruhenden Zellen verhindert [116].

### **3.8.3 T-Zellaktivierung und Toleranz**

Der gleichzeitige Stimulus von TCR und Co-stimulierenden Molekülen (zum Beispiel CD28) auf der Oberfläche von T-Zellen initiiert ein genetisches Programm, welches zum vollen Aktivierungszustand der Zelle führt [117, 118]. Dazu gehört unter anderem die Expression von verschiedenen Zytokinen, wie IL-2, IL-4, Interferon  $\gamma$

und TNF $\alpha$ . Bei Mäusen, denen NFAT1 und 2 fehlen, werden eben diese Zytokine nicht mehr produziert. Ebenfalls war die Expression von IL-5, sowie CD40L und CD95L verringert [119]. Diese Daten belegen, wie wichtig NFAT für die Effektor Funktionen von T-Zellen ist. Für die T-Zellaktivierung muss zum einen der TCR aktiviert (1.Signal) werden und ein kostimulierender Rezeptor (2.Signal) [121, 122]. Findet die Aktivierung des TCR ohne Kostimulus statt, kommt es zur T-Zelltoleranz und die T-Zelle kann nicht mehr aktiviert werden. Wird nur der TCR stimuliert, kommt es zur Aktivierung des Calcium-Signalweges und somit zur NFAT Aktivierung. Da es keinen Kostimulus gibt, werden andere Signalwege wie zum Beispiel über die RAS-MAP Kinase nicht aktiviert. Dieses Ungleichgewicht der Aktivierung führt zu einem anderen Set an Transkriptionsfaktoren im Zellkern [123]. Das Set an Transkriptionsfaktoren die als Interaktionspartner für NFAT in Frage kommen, entscheiden darüber ob es zur T-Zellaktivierung oder Toleranz kommt.

#### **3.8.4 NFAT Inhibitoren und therapeutische Ansätze**

Da NFAT eine essentielle Rolle bei der Kontrolle der T-Zellaktivierung spielt, ist es ein optimales Zielprotein für immunsuppressive therapeutische Ansätze. Inhibitoren für Calcineurin, wie zum Beispiel CsA und FK506 (Tacrolimus) werden schon lange als Immunsuppressiva in der Therapie eingesetzt [124, 125]. Allerdings sind diese Inhibitoren nicht NFAT spezifisch, sondern inhibieren natürlich auch andere Calcineurin Effektoren [126]. Das hat zur Folge, dass diese Medikamente nephrotoxische und neurotoxische Nebenwirkungen aufweisen [127, 128]. Aus diesem Grund ist es wichtig spezifische NFAT Inhibitoren zu identifizieren. Nach der Identifizierung der Bindungsstelle von Calcineurin an NFAT [112, 113] wurde ein hoch affines Peptid (VIVIT) entwickelt, welches mit NFAT um die Bindung an Calcineurin konkurriert [129]. Es blockiert die Bindung von NFAT an das Calcineurin, und somit auch die Dephosphorylierung. VIVIT inhibiert jedoch nicht nur die Bindung von NFAT an Calcineurin, sondern auch die Bindung anderer Faktoren an Calcineurin über dieses Motiv. Weitere Motive (PXIXIT) beeinflussen die Stabilität

der Interaktion zwischen NFAT und Calcineurin [130] und könnten als Angriffspunkte für NFAT spezifischen Inhibitoren dienen.

### **3.8.5 Die Rolle von NFAT in der HIV Infektion**

Die LTR von Retroviren enthält alle cis-aktivierenden Sequenzen, die Promotor- und Enhancer-Sequenzen, welche die retrovirale Genexpression kontrollieren. Zelluläre Transkriptionsfaktoren binden an diese Sequenzen und induzieren die Transkription der viralen Gene des Provirus. Die LTR von HIV-1 enthält verschiedene cis-aktivierende Elemente. Eines der wichtigsten ist die NFκB-Promotor Sequenz. An sie bindet der zelluläre Transkriptionsfaktor NFκB, welcher die virale Transkription einleitet. Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass an diesen Promotor nicht nur NFκB binden kann, sondern auch NFAT1 und NFAT2. In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass NFAT die virale Transkription und die vermehrte Expression von p24 in T-Zellen induziert [131]. Obwohl die LTR von HIV-1 ebenfalls NFAT-Promotorsequenzen aufweist, konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen eher um sogenannte *negative regulatory elements* (NRE) handelt. Der Effekt von NFAT auf die virale Transkription konnte der Bindung von NFAT an den NFκB-Promotor zugeschrieben werden. In Abwesenheit der NFκB-Promotorsequenz, konnte keine NFAT-abhängige Steigerung der LTR-Aktivität gezeigt werden [131]. Man vermutet, dass NFAT allein, aber auch durch die Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren in der Lage ist andere Promotoren zu stimulieren. Dass NFAT für die HIV-1 Genexpression eine entscheidende Rolle spielt, konnte auch experimentell durch NFAT Inhibition gezeigt werden [131].

### **3.8.6 Die Wirkung von NFAT-Inhibitoren auf die AIDS Progression**

In der medizinischen Literatur gibt es viele Fälle bei denen HIV-1 Infizierte aus unterschiedlichen Gründen mit dem NFAT Inhibitor Cyclosporin A behandelt wurden. In einigen Fällen standen diese Patienten mehr als 8 Jahre unter klinischer Beobachtung ohne dass es zur AIDS-Progression kam [132, 133]. Eine weitere Studie dokumentierte Patienten die in einem Zeitraum kurz vor oder nach einer Organtransplantation mit HIV infiziert wurden. Bei den Patienten, die mit CsA

behandelt wurden lag das Risiko einer späteren Erkrankung an AIDS bei 31 %, im Gegensatz dazu belief sich das Risiko bei unbehandelten Patienten bei 90% [134]. Eine andere Langzeitstudie von 27 asymptomatischen HIV positiven Patienten, die über 11 Monate mit CsA behandelt wurden, konnte zeigen das keiner dieser Patienten während der Behandlungszeit an AIDS erkrankte und es konnte keine Änderung der Menge an CD4 positiven T-Zellen nachgewiesen werden. Nach Beendigung der CsA Behandlung sankt die Anzahl an CD4 Zellen allerdings um 50 Zellen/ $\mu$ l pro Jahr [135]. Diese Beobachtungen zeigen, das die Behandlung mit CsA die AIDS Progression verlangsamen, und in machen Fällen zumindest über die Zeit der Studie komplett verhindern kann. CsA konnte in diesen Studien die HIV-1 LTR Aktivität blockieren, wahrscheinlich haben sie aber zusätzlich einen indirekten Effekt auf die Infektion, indem sie die T-Zellaktivierung hemmen [136]. Allerdings sind die Ergebnisse der Studien nicht einheitlich. Eine Studie von Calabrese und Kollegen, bei der HIV-1 infizierte Patienten mit CsA alleine, oder in Kombination mit HAART behandelt wurden, konnte kein CsA Effekt auf die Menge an CD4+ Zellen oder auf die Funktion des Immunsystems detektiert werden [172]. Warum die Ergebnisse so unterschiedlich sind ist unklar. Der Einsatz von CsA in der HIV Therapie könnte in Kombination mit HAART die AIDS-Progression verlangsamen. Allerdings ist eine Langzeitbehandlung mit CsA auch mit Nebenwirkungen und Risiken verbunden. Um CsA oder ähnliche Substanzen, wie zum Beispiel FK506 für die HIV Therapie zu verwenden, sind dringend weitere Studien erforderlich. Die Daten aus den Studien zeigen aber deutlich wie entscheidend die T-Zellaktivierung für die AIDS-Progression ist. Daher ist es wichtig die Mechanismen zu verstehen, welche bei einer HIV-1 Infektion zur Hyperaktivierung des Immunsystems führen. Diese Erkenntnisse könnten helfen Medikamente und Therapieansätze zu entwickeln die der Hyperaktivierung des Immunsystems entgegen wirken und so die AIDS-Progression verlangsamen oder blockieren.

## 4 Zielsetzung der Arbeit

Die Genexpression des HIV-1 Provirus ist abhängig von der Transaktivierung des LTR Promoters und ist in ruhenden T Zellen sehr ineffizient. Das akzessorische HIV-1 Protein Vpr wird ins Virion inkorporiert und liegt direkt nach der Infektion im Zytoplasma und assoziiert mit dem Präintegrationskomplex vor. Deshalb könnte es wichtige Funktionen in der Frühphase der Infektion übernehmen und unter anderem zur Aktivierung der T Zellen beitragen, und so die Genexpression und Virusreplikation ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit sollte diese Hypothese untersucht werden

Vorarbeiten konnten bereits zeigen, dass Vpr NFAT Aktivierung vermittelt. Dieser Effekt sollte zunächst in relevanten primären Zellsystemen verifiziert werden. Anschließend sollte mit Hilfe der funktionellen Charakterisierung unterschiedlicher Vpr Mutanten untersucht werden, ob die Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung mit anderen Funktionen des Proteins mechanistisch in Zusammenhang steht und über welche Domänen Vpr NFAT aktiviert. Durch pharmakologische NFAT Inhibition sollte die Bedeutung der NFAT Aktivierung im Kontext HIV-1 infizierter primärer Zellen untersucht werden.

In der Summe sollen die Daten dieser Arbeit dazu beitragen, die von HIV-1 evolvierten Mechanismen zur Überbrückung der frühen Replikationsblockade in ruhenden T Zellen besser zu verstehen. Weiterhin sollte geklärt werden, ob HIV-1 Vpr eine Determinante der HIV-1 induzierten Immunhyperaktivierung und somit AIDS Entstehung ist.

## **5 Material**

### **5.1 Reagenzien**

#### **5.1.1 Chemikalien**

Agar	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Agarose	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Ampicillin	Ratiopharm GmbH (Ulm)
β-Mercatpoethanol	Sigma (München)
Bromphenolblau	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Bovines Serum Albumin	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
HEPES buffered	Biochrom AG, Berlin, Germany
Calcium chloride (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma GmbH (München)
DRAQ5	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Fetal calf serum (FCS)	PAA (Cölbe)
Glycin	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Glyzerin	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)

G418	PAA (Cölbe)
HCl	AppliChem (Damstadt)
Human AB-serum	Sigma (München, Germany)
HPLC Wasser	AppliChem (Damstadt)
Iononmycin	Sigma (München)
Interleukin-2	Sigma (München)
Isopropanol	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Kanamycin	Ratiopharm GmbH (Ulm)
L-Glutamin	PAA (Cölbe)
Magermilchpulver	Carl Roth® GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
MEM Natriumpyruvate	Gibco (Darmstadt, Germany)
MEM Vitamins	Biochrom (Berlin, Germany)
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
MgSO <sub>4</sub>	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Mowiol	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
NatriumChlorid	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Natriumdesoxycholat	Sigma (München)
Nonidet P-40	Sigma (München)
Normal Goat Serum	Gibco (Darmstadt, Germany)
Normal Mouse Serum	Sigma (München, Germany)
Paraformaldehyde (PFA)	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)

Penicillin/Streptomycin	PAA (Cölbe)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA (Cölbe)
Phytohaemagglutinin (PHA)	Remel Europe (Kent, UK)
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Saponin	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	Sigma (München)
Sucrose	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Triton X-100	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Tris	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)
Tris-Acetat-EDTA Puffer (50x)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Tween 20	Carl Roth® GmbH+Co.KG (Karlsruhe)

### **5.1.2 Reagenzsysteme (Kits)**

GeneClean®II Kit	Dianova GmbH (Hamburg)
Luciferase Assay System	Promega GmbH (Mannheim)
Lysispuffer (P2)	Qiagen (Hilden)
Neutralisationspuffer (P3)	Qiagen (Hilden)
PureYield™ Plasmid Midiprep	Promega GmbH (Mannheim)
Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit	Dianova GmbH (Hamburg)
Resuspensionspuffer (P1)	Qiagen (Hilden)
Takara DNA Ligationskit	Böhringer Ingelheim (Heidelberg)

HIV-1 P24 Antigen Capture Assay Kit	AIDS Repository (Frederick, USA)
SuperSignal West Dura Chemil. Substrate	Pierce

## 5.2 Geräte

DNA Gelelektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Polyacrylamidgelelektrophoresesystem	BioTech
Eppendorf Zentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Zentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Multipette® plus	Eppendorf (Hamburg)
GeneAmp® PCR System 9700	AB Applied Biosystems (Darmstadt)
Gewebekulturplatten (diverse Formen)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
GilsonPipetman® Starter Kit Pipetten	Gilson Inc. (Middleton, USA)
FACSCanto™	B&D, Becton Dickinson, Immuncytometry Systems, (San José, USA)
HERAsafe® Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH
HERAsafe® Sterilbank	Thermo Fisher Scientific GmbH
Infinite® M200 Tecan	Tecan Group Ltd. (Männedorf)
Magnetrührer MR3001	HeidolphElektro GmbH&Co.KG, (Kehlheim)
Mikroporator PEQLAB	Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Nanodrop PEQLAB	Biotechnologie GmbH (Erlangen)

Pipetboyacu IBS INTEGRA	Biosciences (Chur, Schweiz)
Pipetman® P10	Gilson Inc. (Middleton, USA)
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Verschiedene
Pipettenspitzen (10 - 1000 µl)	Verschiedene
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Verschiedene
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Schüttelinkubator Innova® 43	Verschiedene
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg, Germany
UV-Transilluminator Geldoc 2000	Hartenstein (Würzburg)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Zellkulturflaschen (T25,T75,T175)	Verschiedene

### 5.3 Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
Mowiol	0,2 M Tris-HCl, pH 8.5; 12% (w/v) Mowiol 4-88; 30% (w/v) Glyzerin
10x Tris/Glycin Puffer	1,92 M Glycin, 250 mMTris  Bei 1x Tris/Glycin Zugabe von 0,1% SDS
10x Blotpuffer	1,92 M Glycin, 250 mMTris  Für 1x Blotpuffer in 70% Wasser und 20% Ethanol verdünnen

20x TBST	1 M Tris, 18% (w/v) NaCl, pH Wert auf 7.6 einstellen und dann 1% (v/v) Tween20 zugeben
Blockpuffer	10% Milchpulver in TBST
20% Sucrose Lösung	20% Sucrose in PBS erwärmen und lösen, dann sterilfiltrieren
RIPA Puffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% Na-SDS, 5 mM EDTA
SDS-Ladepuffer	4 mL SDS 10%, 1 mL $\beta$ -Mercapto-EtOH, 2 mL Glycerin, 0,2 mL EDTA (1M), 1 mL Bromphenolblau 0,1%, 1,3 ml Tris 1 M pH 6.8, 0,5 mL Wasser

## **Proteinmaker**

PAGE Ruler™ prestained (10-250 kDa) Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

## **5.4 Enzyme**

### **Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen wurden von der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen. Die Anwendung und die Puffersysteme erfolgt nach Angaben des Herstellers.

### **Sonstige Enzyme**

0,05% EDTA-Trypsin	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim)
DreamTaq™ DNAPolymerase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Pfu DNA Polymerase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

## **5.5 Inhibitoren**

Cyclosporin A

Sigma (München)

FK506

Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

## **5.6 Eukaryotische Zelllinien**

### **Jurkat E6.1**

Humane T-Zelllinie (Aguiar-Cordova et al., 1994)

### **Jurkat-NFAT-LUC**

Humane T-Zelllinie, die stabil mit einem Plasmid transfiziert wurde, dass Luziferase als Reportergen unter der Kontrolle des IL-2 Promotor exprimiert. Der Promotor besteht aus drei Kopien der NFAT-1 Bindestellen (Fortin et al., 2004).

### **JurkatCypA -/-**

Humane T-Zelllinie, die einen Knock out des Cyclophilin A Gens beinhaltet (BraatenandLuban et al., 2001).

### **Cem M7**

Humane T-Zelllinie, die CD4, CCR5 und CXCR4 exprimiert. Zusätzlich verfügt sie über Luziferase und GFP als Reportergene die unter der Kontrolle der Tat induzierbaren HIV-1 LTR exprimiert werden (Brandt et al., 2002).

### **HEK 293T**

Humane Nierenepithelzellen, die mit Adenovirus Typ 5 transformiert wurden und das SV40 (*simianvirus 40*) large T-Antigen exprimieren (DuBridge et al., 1987).

## HeLa

HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) und die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde (Gey et al. 1953).

## 5.7 Bakterien

### OneShot® Top10

Chemisch kompetente *Escherichia coli* F- *mcrA* *\_(mrr-hsdRMS-mcrBC)* *\_80lacZ\_M15* *\_lacX74* *recA1* *araD139* *\_(araleu)* *7697* *galUgalKrpsL* *(StrR)* *endA1* *nupG* von Invitrogen (Karlsruhe).

## 5.8 Nukleinsäuren

### Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Biomers Deutschland (Ulm), bzw. bei MWG-Biotech bezogen und sind in den Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

**Tabelle 1: Auflistung der Mutagenese- und Amplifizierungs-Primer**

Primer	Sequenz 5´-3´	Leserichtung
VprWT_P5A_NheI	CCGGCTAGCATGGAACAAGCCGCAGAAGACCAAGG	Forward
NL43VprP5AXbaI_For	CGTCTAGAATATGGAACAAGCCGCAGAAGACCAAGG	Forward
NL43VprXbaI_For_new	CGTCTAGAATATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGG	Forward
NL43VprMluI_Rev_new	CTACGCGTCTAGGATCTACTGGCTCCATTCTTGC	Reverse
5´VprNL43_64-68A	GCCATAATAAGAATTGCGGCAGCAGCGGCGTTTATCCATTTC	Forward
3´VprNL43-_64-68A	GAAATGGATAAACGCCGCTGCTGCCGCAATTCTTATTATGGC	Reverse
vpr-NheI	CCGGCTAGCATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGG	Forward
vpr-AgeI	TCGACCGGTGCACCTGCTCCGGATCTACTGGCTCCATTCTTGC	Reverse

**Tabelle 2: Auflistung der Sequenzierungsprimer**

<b>Primername</b>	<b>Sequenz 5´-3´</b>	<b>Leserichtung</b>
<b>peXFPSeq</b>	GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC	Forward
<b>peXFP-REV</b>	CGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGG	Reverse
<b>3pCG</b>	CTTATTCCAAGCGGCTTCGG	Forward
<b>5pCG</b>	ATAGAAGACACCGGGACCG	Reverse

### **Längenstandard für Agarosegele**

Gene Ruler™ DNA Ladder Mix

Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

### **Nukleotide für die Polymerase-Ketten-Reaktion**

Die dNTPs für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurden von Stratagene (La Jolla, USA) bezogen.

## **5.9 Plasmide**

Die für die Arbeit verwendeten Plasmid tragen entweder ein Ampicillin- oder ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion in Bakterien. Im Anhang sind die Karten der Vektoren angegeben, die den verschiedenen Plasmiden als Grundstruktur gedient haben.

## **Verwendete Plasmide**

### **peYFP-N1**

Expressionsvektor. Die über NheI/AgeI inserierten Allele stehen unter der Kontrolle des CMV Promotors und exprimieren das YFP-Gen N-terminal fusioniert.

### **peCFP-C1**

Expressionsvektor. Die über NheI/AgeI inserierten Allele stehen unter der Kontrolle des CMV Promotors und exprimieren das CFP-Gen N-terminal fusioniert.

### **peYFP-CFP**

Expressionsvektor. Die über NheI/AgeI inserierten Allele stehen unter der Kontrolle des CMV Promotors und exprimieren ein Fusionsprotein aus YFP und CFP.

### **peY/CFPNL43 vpr**

Modifizierter peY/CFP Vektor, enthält das NL43 Vpr Gen.

### **peY/CFPNL43 vprMutante**

Modifizierte peY/CFP Vektoren, enthalten das NL43 Vpr Gen mit jeweils den folgenden Mutationen (P5A, P10A, P14A, E21/24Q, L22A, L23F, K27M,

P35A, L64P, 64-68A, C76A, R77A, R77Q und R80A).

**peCFP-C1 PARP**

Modifizierter peCFP Vektor, enthält das PARP Gen, welches aus einer cDNA-Bank amplifiziert wurde.

**pMD2G (VSV-G)**

Expressionsvektor. Das Insert steht unter der Kontrolle des CMV Promotors. Der Vektor enthält das Glykoprotein von VSV. Die Selektion in Bakterien erfolgt durch Ampicillin.

**pCG-NL43nef3\*-IRES-GFP**

pCG Vektor, der für die ersten 3 Basen des HIV-1 NL43 Nef Proteins kodiert. Als Expressionskontrolle kodiert das Plasmid zusätzlich für ein IRES GFP.

**pCG-NL43 Vpr-IRES-GFP**

pCG Vektor, der für das HIV-1 NL43 Vpr Protein. Als Expressionskontrolle kodiert das Plasmid zusätzlich für ein IRES GFP.

**pCG-NL43 Vpr Mutante-IRES-GFP**

pCG Vektor, der für jeweils eine der folgenden Vpr Mutanten (P5A, P10A, P14A, E21/24Q, L22A, L23F, K27M,

P35A, L64P, 64-68A, C76A, R77A, R77Q und R80A). Als Expressionskontrolle kodiert das Plasmid zusätzlich für ein IRES GFP.

**pBR-NL43-IRES-eGFP**

pBR322 Vektor, der das HIV-1 NL43 Provirus enthält. Das virale Genom und das eGFP werden mittels eines IRES-Elements von einer bicistronischen mRNA exprimiert (Schindler et al., 2003).

**pBR-NL43 vpr\* IRES-eGFP**

pBR322 Vektor, der das HIV-1 NL43 Provirus enthält. Das Vpr Gen wurde aus dem Provirus deletiert. Das virale Genom und das eGFP werden mittels eines IRES-Elements von einer bicistronischen mRNA exprimiert (Schindler et al., 2003).

**pBR-NL43-V3 92th014.12\_IRES-eGFP**

pBR322 Vektor, der für das HIV-1 NL43 Provirus kodiert. Das Provirus enthält die Geninformation für ein R5-tropes Virus. Das virale Genom und das eGFP werden mittels eines IRES-Elements von einer bicistronischen mRNA exprimiert (Papkalla et al., 2002).

**pBR-NL43-V3 92th014.12\_vpr-\_IRES-eGFP** pBR322 Vektor, der für das HIV-1 NL43 Provirus kodiert. Das Provirus enthält die Geninformation für ein R5-tropes Virus. Das Vpr Gen wurden aus dem Provirus deletiert. Das virale Genom und das eGFP werden mittels eines IRES-Elements von einer bicistronischen mRNA exprimiert.

## Sequenzen

### HIV-1 NL43 Vpr

```
ATG GAA CAA GCC CCA GAA GAC CAA GGG CCA CAG AGG GAG CCA TAC AAT GAA TGG ACA
CTA GAG CTT TTA GAG GAA CTT AAG AGT GAA GCT GTT AGA CAT TTT CCT AGG ATA TGG
CTC CAT AAC TTA GGA CAA CAT ATC TAT GAA ACT TAC GGG GAT ACT TGG GCA GGA GTG
GAA GCC ATA ATA AGA ATT ATG CAA CAA CTG CTG TTT ATC CAT TTC AGA ATT GGG TGT
CGA CAT AGC AGA ATA GGC GTT ACT CGA CAG AGG AGA GCA AGA AAT GGA GCC AGT AGA
TCC TAG
```

### PARP-1 (Poly (ADP-ribose) polymerase)

```
atggcggag
tcttcggata agctctatcg agtcgagtac gccaaagagcg ggcgcgccctc ttgcaagaaa
tgcagcgaga gcatcccaaa ggactcgctc cggatggcca tcatggtgca gtcgcccacg
tttgatggaa aagtcccaca ctggtaccac ttctcctgct tctggaaggt gggccactcc
atccggcacc ctgacgttga ggtggatggg ttctctgagc ttcggtggga tgaccagcag
aaagtcaaga agacagcggg agctggagga gtgacaggca aaggccagga tggaattggt
agcaaggcag agaagactct gggtgacttt gcagcagagt atgccaagtc caacagaagt
acgtgcaagg ggtgatgga gaagatagaa aaggccaggt tgcgcctgtc caagaagatg
gtggaccgag agaagccaca gctaggcatg attgaccgct ggtaccatcc aggtgctttt
gtcaagaaca gggaggagct gggtttccgg cccgagtaca gtgcgagtca gctcaagggc
ttcagcctcc ttgctacaga ggataaagaa gccctgaaga agcagctccc aggagtcaag
agtgaaggaa agagaaaagg cgatgagggtg gatggagtgg atgaagtggc gaagaagaaa
tctaaaaaag aaaaagacaa ggatagtaag cttgaaaaag ccctaaaggc tcagaacgac
ctgatctgga acatcaagga cgagctaaag aaagtgtggt caactaatga cctgaaggag
ctactcatct tcaacaagca gcaagtgcct tctggggagt cggcgatctt ggaccgagta
gctgatggca tgggtgttcgg tgccctcctt ccctgagagg aatgctcggg tcagctggtc
ttcaagagcg atgcctatta ctgactggg gacgtcactg cctggaccaa gtgatgggtc
aagacacaga cacccaaccg gaaggagtgg gtaaccccaa aggaattccg agaaatctct
tacctcaaga aattgaaggt taaaaaacag gaccgtatat tccccccaga aaccagcgcc
tccgtggcgg ccacgcctcc gccctccaca gcctcggctc ctgctgctgt gaactcctct
gcttcagcag ataagccatt atccaacatg aagatcctga ctctcgggaa gctgtcccgg
aacaaggatg aagtgaaggc catgattgag aaactcgggg ggaagttgac ggggacggcc
aacaaggctt ccctgtgcat cagcaccaaa aaggaggtgg aaaagatgaa taagaagatg
```

```

gaggaagtaa aggaagccaa catccgagtt gtgtctgagg acttctcca ggacgtctcc
gcctccacca agagccttca ggagttgttc ttagcgcaca tcttgtcccc ttggggggca
gaggtgaagg cagagcctgt tgaagttgtg gccccaagag ggaagtcagg ggctgcgctc
tccaaaaaaa gcaagggcca ggtcaaggag gaaggtatca acaaactctga aaagagaatg
aaattaactc ttaaaggagg agcagctgtg gatcctgatt ctggactgga acactctgcg
catgtcctgg agaaagggtg gaaggtcttc agtgccacc ttggcctggg ggacatcggt
aaaggaacca actcctacta caagctgcag cttctggagg acgacaagga aaacaggtat
tggatattca ggtcctgggg ccgtgtgggt acgggtgatcg gtagcaaca actggaacag
atgccgtcca aggaggatgc cattgagcac ttcataaaat tatatgaaga aaaaaccggg
aacgcttggc actccaaaaa tttcacgaag tatcccaaaa agttctacc cctggagatt
gactatggcc aggatgaaga ggcagtgaag aagctgacag taaatcctgg caccaagtcc
aagctcccca agccagttca ggacctcatc aagatgatct ttgatgtgga aagtatgaag
aaagccatgg tggagtatga gatcgacctt cagaagatgc ccttggggaa gctgagcaaa
aggcagatcc aggcgcata ctccatcctc agtgagggtc agcaggcggg gtctcagggc
agcagcgact ctcagatcct ggatctctca aatcgctttt acaccctgat cccccacgac
tttgggatga agaagcctcc gctcctgaac aatgcagaca gtgtgcaggc caaggtggaa
atgcttgaca acctgctgga catcgagggt gcctacagtc tgctcagggg agggctctgat
gatagcagca aggatcccat cgatgtcaac tatgagaagc tcaaaactga cattaaggtg
gttgacagag attctgaaga agccgagatc atcaggaagt atgttaagaa cactcatgca
accacacaca atgctgatga cttggaagtc atcgatatct ttaagataga gcgtgaaggc
gaatgccagc gttacaagcc ctttaagcag cttcataacc gaagattgct gtggcacggg
tccaggacca ccaactttgc tgggatcctg tcccagggtc ttcggatagc cccgcctgaa
gcgcccgtga caggctacat gtttggtaaa gggatctatt tcgctgacat ggtctccaag
agtgccaaact actgccatac gtctcagggg gacccaatag gcttaatcct gttgggagaa
gttgcccttg gaaacatgta tgaactgaag cacgcttcac atatcagcaa gttaccaag
ggcaagcaca gtgtcaaagg tttgggcaa actaccctg atccttcagc taacattagt
ctggatgggt tagacgttcc tcttgggacc gggatttcat ctgggtgtgaa tgacacctct
ctactatata acgagtacat tgtctatgat attgctcagg taaatctgaa gtatctgctg
aaactgaaat tcaattttaa gacctccctg tggtaa

```

## 5.10 Antikörper

### Primäre Antikörper

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten primären Antikörper**

Antigen	Beschreibung	Verdünnung	Herkunft/Ref.
HIV-1 Vpr	Polyklonaler Antikörper gegen HIV-1 Vpr aus Immunisierten Mäusen.	WB 1:2000	Votteler et al. 2007 [146]
NFAT1	Monoklonaler Antikörper, produziert durch die Immunisierung von Kanninchen mit einem synthetischen Peptid, aus der umgebenden Sequenz des Gly87 des menschlichen NFAT1 Proteins	IF 1:50	CellSignaling

KC57-RD1 (HIV-1 p24)	Monoklonaler Antikörper aus der Immunisierung von Mäusen gegen das HIV-1 Core Polyproteins. Der Antikörper erkennt auf dem Westerblot die unterschiedlichen Proteins mit 55, 39, 33 and 24 kD.	WB 1:5000  IF 1:50	BeckmanCoulter, Inc.
CD69	Monoklonaler Antikörper aus immunisierten Mäusen spezifisch für humanes CD69. Dieser Antikörper ist APC konjugiert und für den Einsatz in der Durchflusszytometrie validiert.	FACS- Analyse: 1µl pro Ansatz	Invitrogen (Karlsruhe)
Alpha Tubulin	Monoklonaler Antikörper aus immunisierten Mäusen spezifisch für Tubulin verschiedener Spezies.	WB 1:5000	Sigma-Aldrich (München)

## Sekundäre Antikörper

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper**

Antigen	Verdünnung	Herkunft/Referenz
Alexa Fluor® 555 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	IF 1:500	Invitrogen (Darmstadt)
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	IF 1:500	Invitrogen (Darmstadt)
Goat anti-mouse Horse radish peroxidase	WB 1:10000	Dianova (Hamburg)
Goat anti-rabbit Horse radish peroxidase	WB 1:10000	Dianova (Hamburg)

## **5.11 Zellkulturmedien**

### **Adhärente Zellen**

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

### **Suspensionszellen**

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

### **Makrophagen- Medium**

RPMI-1640 (Gibco, Darmstadt, Germany) mit 4% (v/v) humanes AB-Serum, 120 µg/ml Penicillin und 120 µg/ml Streptomycinsulfat, 10 mM MEM nicht-essentielle Aminosäuren Lösung, MEM Natrium Pyruvat, MEM Vitamine und 350 µg/ml L-Glutamin.

## **5.12 Bakterienkulturmedien**

### **LB-Medium**

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

### **LB-Agar**

15 g/l Agar und 100 mg/l Ampicillin bzw. Kanamycin in LB-Medium.

### **SOC-Medium**

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

## **6 Methoden**

### **6.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **6.1.1 Standardmethoden**

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

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

#### **6.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde das Pure Yield™ Midipräp Kit von der Promega GmbH (Mannheim) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

#### **6.1.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Plasmid-DNA**

Die isolierte Plasmid-DNA wurde für die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mit dem Nanodrop vermessen. Die Konzentration ergibt sich aus der Extinktion bei 260 nm. Die Reinheit wird über den Quotienten der Extinktion bei 260 und 280nm ermittelt. Für eine anschließende Transfektion der Plasmid-DNA in eukaryontischen Zellen ist eine Reinheit von 1,8 optimal.

#### **6.1.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die DNA-Fragmente wurden zunächst je nach Größe in einem 0,7-1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Ethidiumbromid im Gel konnten die

Fragmente unter Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht werden. Die Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Wenn nötig, wurde die DNA mit Hilfe des GeneClean® II Kit entsprechend den Herstelleranweisungen isoliert und aufgereinigt.

### **6.1.5 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierungsreaktionen erfolgte durch die Firma SeqLab. Für jede Sequenzierungsreaktion wurden 0,6-0,7 µg DNA und 20 pmol des entsprechenden Sequenzierungsprimers eingeschickt.

### **6.1.6 Ligation von DNA**

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde das Takara DNA-Ligationskit von Boehringer Ingelheim, Heidelberg verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben.

### **6.1.7 Herstellung der Vpr64-68A Mutante mittels PCR-Mutagenese**

Um das Vpr Protein zu charakterisieren sollte zusätzlich zu den bereits vorhandenen Vpr Mutanten noch eine Variante erstellt werden, die eine Mutation der gesamten Glukokortikoidrezeptor Bindungsstelle (LxxLL) enthält. Benannt wir die Mutate als Vpr 64-68A. Für die Generierung der Mutante wurden in ein intaktes NL4-3 Vpr Gen, mit Hilfe einer PCR-Mutagenese, die gewünschten Mutationen eingebaut. Als Template diente ein bereits vorhandenes Plasmid, welches für Vpr als Fusionsprotein mit YFP codiert.

Zu diesem Zweck wurden verschiedenen Primer benötigt, ein Primer Paar welches vorne und hinten am Vpr-Gen (Rot) bindet, um das gesamte Gen zu amplifizieren. Die flankierenden Primer enthalten Schnittstellen für Restriktionsenzyme, der Forward Primer trägt die Schnittstelle für NheI und der Reverse Primer für AgeI. Die Schnittstellen machen es möglich die PCR-Produkte in einen Vektor zu klonieren. Außerdem wurden Mutagenese-Primer (Grün) mit entsprechenden komplementären Primern designt. In diese Primer wurden die gewünschten Mutationen eingefügt. In

diesem Fall, sollten die Aminosäuren des GR-Motifs in Alanine mutiert werden. Die Sequenzen der Primer sind in der Tabelle 5 und 6 aufgeführt.

Für die Mutagenese mittels PCR sind zwei aufeinander folgende PCR-Reaktionen notwendig. Zunächst werden zwei Fragmente pro Mutante generiert die bedingt durch die komplementären Mutagenese-Primer (Grün) überlappende Sequenzen im Bereich der eingefügten Mutation aufweisen. Als Template für diese erste PCR wurde das peYFP-Vpr Konstrukt verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2 % iges Agarosegel aufgetragen, im Anschluss wurden die Fragmente der entsprechenden Größen (siehe Tabelle 5) aus dem Gel isoliert, aufgereinigt (siehe 7.1.4) und als Template für die 2. PCR-Reaktion verwendet. Bei dieser PCR lagern sich die komplementären Bereiche der Fragmente nach der Denaturierung aneinander. Der kurze doppelsträngige Bereich fungiert als Primer für den ersten Elongationsschritt. Das so entstandene Produkt dient als Template für die nächsten Zyklen. In den folgenden Elongationsschritten wurde nun das gesamte Vpr Gen mit der entsprechenden Mutation durch die flankierenden Primer (Rot) amplifiziert (Abb.: 8). Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches sowie die Programme für die PCR-Reaktionen sind im Folgenden dargestellt.

**Tabelle 5: Verwendete Templates und Primer für die 1. PCR**

Fragment	Template	Primer For	Primer Rev	Größe
1	peYFP_NL43Vpr	Vpr_NheI	3`VprNL43 64-68A	216 bp
2		5`VprNL43 64-68A	Vpr_AgeI	114 bp

**PCR Mutagenese-Ansatz: Programm:**

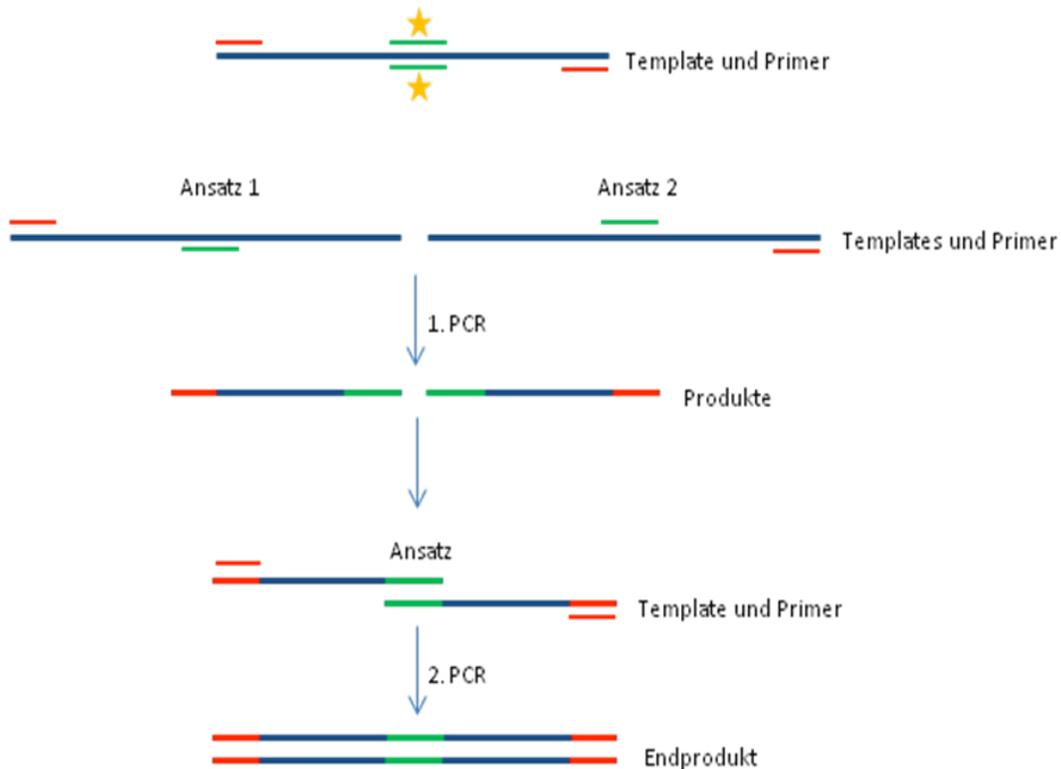
Reagenz	pro Ansatz [ $\mu$ L]	
5xPhusion-Puffer	10	1. 96 °C 5 min
Template	0,5	2. 96 °C 1 min
Primer 1	0,75	3. 52 °C 1 min
Primer 2	0,75	4. 72 °C 1:30 min
dNTPs (10 mmol)	3	5. 2.-4. 35 Zyklen
Phusion	0,25	6. 72 °C 8 min
Aqua bidest.	34,75	7. 4 °C unendlich
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>	

**Tabelle 6 Verwendete Templates und Primer für die 2.PCR (Overlap-PCR)**

Mutante	Fragmente	Primer For	Primer Rev	Fragmentgröße [bp]
Vpr64-68A	1+2	vpr-NheI	vpr-AgeI	308

**2. PCR (Overlap-PCR)****Programm:**

Reagenz	pro Ansatz [ $\mu$ L]	
5xPhusion-Puffer	10	1. 96 °C 5 min
Fragment X	0,5	2. 96 °C 1 min
Fragment Y	0,5	3. 52 °C 1 min
Primer 1	0,75	4. 72 °C 2 min
Primer 2	0,75	5. 2.-4. 35 Zyklen
dNTPs (10 mmol)	3	6. 72 °C 8 min
Phusion	0,25	7. 4 °C unendlich
Aqua bidest.	34,25	
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>	



**Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Mutagenese mittels PCR.**

Die PCR-Produkte und die Vektoren wurden mit NheI und AgeI verdaut, auf ein 2% iges Agarosegel aufgetragen und aufgereinigt (siehe 7.1.4). Anschließend konnten die Produkte in die Vektoren peYFP-N1 und peCFP-C1 inkloniert werden. Im Anschluss erfolgte eine Transformation der Plasmide in E.coli, danach wurden die Bakterien auf Selektionsagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden einzelne Klone von den Platten gepickt um eine Übernachtskultur anzusetzen. Am nächsten Tag wurde eine Mini Plasmid-Präparation durchgeführt und die DNA wurde mit NheI und AgeI kontrollverdaut. Die positiven Klone wurden sequenziert und erneut für eine Übernachtskultur verwendet um eine Midi Plasmid-Präparation durchführen zu können.

### **6.1.8 Umklonierung der vorhandenen Vpr-Mutanten**

Um auch die Mutanten P5A, P10A, P14A, L23F, K27M und P35A eines Kooperationspartners als Fusionsprotein im peY/CFP-Vektor und als unfusioniertes Protein über den pCG-Vektor exprimieren zu können, mussten die Vpr-Gene zunächst mittels PCR aus dem Ursprungsplasmid aufamplifiziert werden. Dafür wurden die Primer Vpr\_NheI, Vpr\_AgeI für die Klonierung in den peY/CFP-Vektor und NL43VprXbaI\_For\_new, NL43VprMluI\_Rev\_new für die Klonierung in den pCG-IRES\_GFP Vektor aus Tabelle 7 verwendet. Das PCR-Programm, sowie das Reaktionsgemisch sind im folgenden dargestellt. Nach einer erfolgreichen PCR erhält man so das komplette Vpr-Gen, welches durch Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NheI/AgeI oder XaI/MluI flankiert ist. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2% Agarosegel aufgetragen, anschließend wurden die spezifischen Banden (ca. 300 bp) aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Gene clean Kits isoliert und aufgereinigt. Im Anschluss wurden die Inserts und die Vektoren mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und ligiert. Nach der Transformation in E.coli wurden die Bakterien auf Selektionsagar ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Von den Platten wurden einige Klone pro Ansatz gepickt und für eine Übernachtskultur mit anschließender Mini DNA-Präparation verwendet. Die isolierten Plasmide wurden erneut mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und auf ein Gel aufgetragen. Nach dem Verdau sollten zwei Banden auf dem Gel zu sehen sein, eine Bande die der Größe des Vektors entspricht und eine die der Größe des Vpr-Gens entspricht. Die Klone die das Insert tragen wurden für eine Übernachtskultur verwendet, aus der schließlich die Plasmid-DNA für die Experimente isoliert wurde.

**Tabelle 7 Verwendete Templates und Primer für die PCR**

Template	Primer For	Primer Rev	Fragmentgröße [bp]
VprP5A	Vpr_NheI	Vpr_AgeI	288
VprP10A			
VprP14A			
VprL23F			
VprK27M			
VprP35A			

**PCR Ansatz:**

**Programm:**

Reagenz	pro Ansatz [ $\mu$ L]		
5xPhusion-Puffer	5	1. 96 °C	5 min
Template	0,5	2. 96 °C	1 min
Primer 1	0,75	3. 53°C	1 min
Primer 2	0,75	4. 72 °C	1 min
dNTPs (10 mmol)	3	5. 2.-4.	30 Zyklen
Phusion	0,3	6. 72 °C	8 min
Aqua bidest.	39,7	7. 4 °C	unendlich
Gesamtvolumen	50		

**6.1.9 Bakterienkultivierung**

Alle verwendeten Plasmide enthalten entweder ein Kanamycin- oder ein Ampicillinresistenzgen. Transformierte Bakterien wurden daher durch Zusatz von Ampicillin bzw. Kanamycin zum Kulturmedium selektiert. Verwendet wurde

*Escherichia coli* OneShot® Top10. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C in LB-Flüssigmedium geschüttelt oder auf LB-Agar Platten inkubiert.

### **6.1.10 Transformation in Escherichia coli One Shot® Top10**

Die kompetenten Top 10 Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Ein Aliquot von 10 µl wurde mit 1 µl Ligationsansatz für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec. Nach der Zugabe von 150 µl SOC-Medium und einer Inkubation von 30 min bei 37 °C, wurde die Bakterienkultur auf eine Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

## **6.2 Zellbiologische Methoden**

### **6.2.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen**

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

### **6.2.2 Kultivierung von Suspensionszellen**

Die Suspensionszellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>Zellkulturflaschen in RPMI-1640 bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich 1:10 bis 1:20 gesplittet. Bei den Jurkat NFAT-Luc, sowie bei den CemM7 Zellen ist die Zugabe von G418 für die Selektionierung notwendig.

### **6.2.3 Herstellen von Dauerkulturen**

Um Zellen über einen langen Zeitraum bei -80°C lagern zu können müssen Dauerkulturen hergestellt werden. Zu diesem Zweck werden Zellen aus der laufenden Kultur bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und durch Einfriermedium ersetzt. Das Vol. des Einfriermediums ist dabei abhängig von der geernteten Zellzahl. Die Zellsuspension wird nun schnell in 1 ml Portionen in Cyrotubes aliquotiert und sofort bei -80°C eingefroren.

#### **6.2.4 Auftauen von Dauerkulturen**

Um gelagerte Zellen in Kultur zu nehmen, wird die Dauerkultur soweit aufgetaut, dass man sie in ein Greiner Röhrchen (50 ml) mit ca. 40 ml frischem Medium überführen kann. Die Zellen werden anschließend bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche (T25) überführt. Handelt es sich bei den Zellen um stabil transfizierte Zellen, die eine Selektion durch G418 benötigen, so wird das Antibiotikum erst 1-2 Tage nach dem Auftauen zugegeben.

#### **6.2.5 Isolierung primärer Lymphozyten aus BuffyCoat**

Zur Isolierung primärer Blutlymphozyten (PBL „*primarybloodlymphocyte*“ oder PBMC „*peripheralbloodmononuclearcells*“) wurde *BuffyCoat* (Lymphozytenkonzentrat aus 500 ml Vollblut) von der Blutspendenzentrale des Universitätsklinikum Eppendorf bezogen und 2:1 in PBS verdünnt. Dann wurde der verdünnte *BuffyCoat* über Bicolll geschichtet und über Dichtegradientenzentrifugation für 30 min bei 1700 rpm aufgetrennt. Die angereicherten Lymphozyten wurden aus der Interphase abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Die aufgereinigten PBMCs wurden anschließend in RPMI in einer Konzentration von  $50 \times 10^6$  Zellen pro ml aufgenommen. Zur Stimulation der Lymphozyten erfolgte durch die Zugabe von 10 ng/ml IL-2 und 1 µg/ml PHA.

#### **6.2.6 Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen (MDM)**

Um die PBMCs zu Monozyten-abgeleiteten Makrophagen ausdifferenzieren, wurden 1,5 Mio Zellen pro ml in MDM-Medium aufgenommen und in 100x 15 mm Petrischalen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen haben sich die adhärennten Zellen an der Petrischale abgesetzt. Die verbliebenden Suspensionszellen (zumeist Lymphozyten) werden nun durch einmaliges waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurde frisches MDM-Medium zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 3 Tagen Inkubationszeit sind die Monozyten zu Makrophagen ausdifferenziert.

### **6.2.7 Kalzium-Phosphat-Transfektion von adhärenenten Zellen**

Die Transfektion der 293T-Zellen wurde mit Hilfe des CalPhos™ Mammalian Transfection Kit durchgeführt. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Zelldichte von  $0,4 \times 10^6$  Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Die Zellen sollten zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluität von ca. 70% aufweisen. Für die Transfektion wurden ca. 6 µg DNA für eine 6-Well-Platte (die Menge an DNA und die Volumina werden an die Fläche der Wells angepasst) mit 13 µl CaCl<sub>2</sub> gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde tropfenweise zu 100 µL 2xHBS gegeben und nach kurzem Vortexen für 15 min inkubiert. Anschließend wird jeder Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Nach 6 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Das Protokoll kann an andere Multiwell Formate angepasst werden.

### **6.2.8 Transfektion von eukaryoischen Zellen mit Turbofect**

Für die Transfektion von HeLa Zellen wurde das Transfektionsreagenz Turbofect von Fermentas verwendet. Die Anwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### **6.2.9 Herstellung von Virusüberständen in 293T Zellen**

Für die Infektion der unterschiedlichen Zellen werden Virusüberstände hergestellt. Zu diesem Zweck werden einen Tag vor der Kalzium-Phosphat-Transfektion HEK 293T Zellen mit einer Zellzahl von ca. 350000 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen werden nun eine Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Für die Transfektion wurden die verschiedenen pBR-Vektoren NL4-3 mit dem pMD2G (VSV-G) Vektor kotransfiziert. Für die Herstellung transkomplimentierter Viren wurde ein pBR-Vektor verwendet, welcher kein Vpr Gen kodiert. Dieser Vektor wurde mit den pCG-Expressionsplasmiden der verschiedenen Vpr Mutanten und dem pMD2G Vektor kotransfiziert.

Man erhält nun Viren, die zusätzlich zu den HIV Oberflächenproteinen durch das VSV-GP pseudotypisiert sind und die Zellen effizienter infizieren können. GFP wird im viralen Genom über ein IRES-Element kodiert und dessen Expression korreliert

mit der Expression viraler Gene. Alle produzierten Viren sind Envpositive und somit replikationsfähig, solchen Viren dürfen ausschließlich unter S3-Bedingungen gehandelt werden. Die Transfektion erfolgt wie in 7.2.7 beschrieben. 48 h nach der Transfektion können die Viren geerntet werden, dazu wird der Zellüberstand abgenommen und in 2 ml Eppendorfggefäße überführt, bei 1200 rpm in einer Zentrifuge abgefugt. Der Überstand wurde nun in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Die Virusüberstände können bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden, allerdings sollten sie nicht länger als 14 Tage nach der Ernte benutzt werden. Wenn nötig, wurde die Konzentration an p24 der Virusüberstände mittels ELISA ermittelt (7.2.11).

### **6.2.10 Aufkonzentration von Virusüberständen**

Nachdem der Virusüberstand wie in Kapitel 7.2.9 beschrieben abgenommen wurde kann er für die Analyse mittels Westernblot aufkonzentriert werden. Dafür wurden 200 µl 20% ige Sucrose Lösung in ein 1,5 ml Eppendorfggefäß vorgelegt und mit 1 ml Virusüberstand vorsichtig überschichtet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 20000 xg für 90 min bei 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 20000 xg für 90 min bei 4°C. Der Überstand wird erneut vorsichtig abgenommen, ohne das Pellet zu berühren. Das Virus-Pellet wurde in 30 µl 1% Triton X-100 aufgeommen und über Nacht bei 4°C gelagert. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Ladepuffer konnte die Virionen mittels Westernblot analysiert werden.

### **6.2.11 Bestimmung der p24 Konzentration in Virusüberständen**

Für die Bestimmung der p24 Konzentration der Virusüberstände, mussten diese zuvor mit Triton X-100 lysiert werden. Dazu wurden 180 µl des Virusüberstand mit 20 µl Triton X-100 (Endkonzentration 1%) vermengt und 20 min bei 4 °C inkubieren. DasHIV-1 p24 Antigen Capture Assay Kit (AIDS Repository, Frederick USA) wurde im Anschluss wie durch den Hersteller vorgegeben durchgeführt.

### **6.2.12 Infektion der verwendeten Zelllinien**

Für die Infektion von diversen Zelllinien wurden je 1 Millionen Suspensionszellen pro Virusstock aus der Kulturflasche abgenommen und bei 1300 rpm für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 500 µl Virusstock resuspendiert. Bei der Verwendung von weniger Zellen, wurde das Volumen dem entsprechend angeglichen. Für Versuche, bei denen eine einheitliche Menge p24 verwendet werden sollte, wurde ein dem entsprechendes Volumen des Virusüberstands verwendet, anschließend wurden alle Proben auf ein einheitliches Infektionsvolumen mit Medium aufgefüllt. Für die Infektion von 1 Mio Zellen wurden 200 ng p24 verwendet. Bei der Verwendung von weniger Zellen, wurde die Menge entsprechend angeglichen. Die Inkubation erfolgte für 5-6 h bei 37°C und 5 % Co<sub>2</sub>-Gehalt danach werden je 2,5 ml Medium zu den Zellen pipetiert. Je nach Fragestellung wurden die Zellen unterschiedlich lange inkubiert bis die Analyse erfolgte.

### **6.2.13 Infektion von PBMCs**

Die frisch isolierten PBMCs wurden in RPMI Medium mit 10 ng/ml IL-2 kultiviert. Für die Infektion wurden ausreichend Zellen mit 1 µg/ml PHA vorstimuliert und für 60 h inkubiert. Anschließend wurden 1 Mio Zellen pro Virusüberstand aus der Kulturflasche abgenommen und bei 1300 rpm für 5 min abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 500 µl Virusstock resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 6 h bei 37°C und 5 % Co<sub>2</sub>-Gehalt, danach wurden je 2,5 ml Medium zu den Zellen pipetiert. Für die Analyse der Oberflächenexpression der Aktivierungsmarkern CD69 wurde 12 h vor der Analyse die Zellen erneut mit PHA (1 µg/ml) stimuliert, zuvor wird überprüft ob die Infektion erfolgreich war. Dazu wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, leuchteten die Zellen grün, so war die Infektion erfolgreich. Für die Analyse der LTR-Aktivierung wurden die Zellen nicht erneut mit PHA stimuliert. Die Analyse der Zellen erfolgte vier Tage nach der Infektion. Bei der Verwendung des NFAT-Inhibitors FK506 wurden die PBMCs 1,5 h vor der Infektion mit 10 ng/ml FK506 versetzt und während der gesamten Zeit bis zur Analyse damit inkubiert.

### **6.2.14 Infektion von MDMs (monocyte-derived macrophages)**

Für die Analyse der Vpr-vermittelten NFAT-Translokation in Makrophagen wurden die ausdifferenzierten Zellen einen Abend vor der Infektion in einer 12-Well Platte auf 12 mm Glasplättchen und einer Zelldichte von 100 000 Zellen/ Well ausgesät. Nach Anlagerung der Zellen an die Glasplättchen am nächsten Morgen wurden in Zellen in manchen Wells mit verschiedenen Reagenzien behandelt (50 ng/ml PMA+ 2 µM Ionomycin; 10 ng/ml FK506 und 5 µM CsA) für 1,5 Stunden vorinkubiert und anschließend mit 500 µl Virusüberstand infiziert. Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurden 500 µl frisches MDM-Medium pro Well dazu pipettiert. Die anschließende Färbung erfolgte 24 h nach der Infektion und ist in Kapitel 7.4.1 beschrieben. Die Vpr-vermittelte NFAT-Translokation wurde mittels Spinning Disk Mikroskopie analysiert.

### **6.2.15 Luziferase Assay**

Für die Analyse der Promotoraktivität werden sogenannte Reporter Gene, z.B. Luziferase (luc) aus dem Leuchtkäfer *Photinuspyralis* verwendet. Die regulatorische Sequenz wird dafür vor die cDNA des Reporter Gens in einen promotorlosen Vektor kloniert. Das Genprodukt des Konstrukts kann dann mit Hilfe eines Luziferase-Aktivitätstests nachgewiesen werden. Der Test beruht darauf, dass die Luziferase das zugegebene Substrat Luziferin in Gegenwart von ATP und  $Mg^{2+}$  oxidativ decarboxiliert, wobei Lumineszenz mit einem Luminometer detektiert werden kann. Dabei ist die Lumineszenz direkt proportional zur Menge der exprimierten Luziferase. Die Reporterzellen wurden mit den Virusüberständen infiziert. Bei den Jurkat NFAT-Luc Zellen ist ein Stimulus 8 h vor dem Luziferase-Assay mit 1 µg/ml PHA (Phytohämagglutinin) notwendig. Anschließend wurden die Zellen in eine 96-Well Platte mit 50 000 Zellen/Well überführt und bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Die Zellen wurden in je 25 µl Lysepuffer resuspendiert und für ca. 20 min bei 4°C lysiert. Anschließend wurden je 20 µl der Zelllysate in weißwandige 96-Well-Platten pipettiert. Sofort nach Zugabe von 40 µl Luziferase Reagenz je Probe wurde in einem Luminometer (Infinite® M200 Tecan) die Lumineszenz gemessen.

### **6.2.16 Analyse mittels Durchflusszytometrie und CD69 Antikörperfärbung**

Einzelne Zellen können in einer Suspension aufgrund von Streulicht- und Fluoreszenz eigenschaften analysiert werden. Dies erreicht man mit Hilfe der Durchflusszytometrie, oder auch der FACS (*fluorescence activated cell sorting*) Methode. In dieser Arbeit wurden Zellen so unter anderem auf Transfektions- und Infektionseffizienz sowie LTR-Aktivität untersucht. Die Transfektionseffizienz wurde entweder über die GFP-Expression oder durch das transfizierte Protein selber (Y/CFP-Fusionsprotein) ermittelt. Für die Infektion wurden Reporterviren verwendet, welche GFP über eine IRES (*internal ribosomal entry site*) hinter dem Nef Gene kodieren. Dies ermöglicht nicht nur die Identifikation von infizierten Zellen, sondern auch die Ermittlung des LTR-Transaktivierungszustands. Die Zellen wurden hierfür in FACS-Röhrchen überführt und bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml FACS-Puffer (PBS + 2 % FCS + 1mMol EDTA) resuspendiert. Dann wurden die Zellen erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Zellen in 100-300 µl (je nach Zellzahl) 2% PFA-Lösung aufgenommen und vermessen. Das PFA fixiert die Zellen, da sie sonst nicht aus dem S3-Labor ausgeführt werden dürfen.

Um die Oberflächenexpression von CD69 auf PBMCs und somit deren Zellaktivierung zu analysieren wurden die Zellen mit dem CD69 Antikörper (APC konjugiert) gefärbt. Hierfür wurden die Zellen gewaschen und anschließend in 100 µl FACS-Puffer ohne EDTA + Antikörper (1 µl CD69-Antikörper) aufgenommen und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer ohne EDTA wurden die Zellen 200 µl 2% PFA-Lösung aufgenommen und im FACS analysiert. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit dem Programm FACS Diva, Becton Dickinson, Heidelberg.

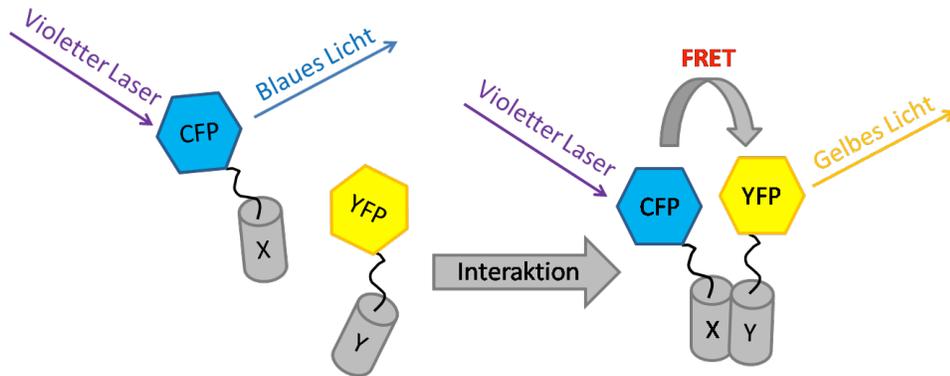
### **6.2.17 Analyse der Apoptoserate mittels Annexin V Färbung**

Durch die Färbung mit fluoreszenzmarktierten Annexin V kann die Apoptoserate in Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt werden. Bei lebenden Zellen

befinden sich Phosphatidylserin (PS) auf der Innenseite der Zellmembran. Während der Apoptose translozieren die PS auf die Außenseite der Zellmembran. Annexin V kann nun an PS binden und so apoptotische Zellen markieren. Apoptotische Zellen können so von lebenden Zellen mittels Durchflusszytometrie unterscheiden und die Apoptoserate bestimmt werden. Die HeLa wurde mit Expressionsplasmiden der unterschiedlichen Vpr Mutanten transfiziert (siehe 7.2.8), nach 32 h wurden die Zellen abgelöst und mit PBS gewaschen. Pro Ansatz erfolgte die Zugabe von 100 µl Annexin V Bindepuffer, welcher das fluoreszenzmarkierte Annexin V in einer Verdünnung von 1:20 enthielt. Nach dem Resuspendieren wurde die Zellsuspension für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl Annexin Bindepuffer in 2% PFA Lösung zum Fixieren der Zellen wurden diese erneut 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Analyse erfolgte unmittelbar mittels Durchflusszytometrie.

### **6.2.18 FACS-basierter FRET (Förster Resonance Energy Transfer) Assay**

Eine der wenigen nicht-invasiven Methoden zur Detektion von Interaktionen verschiedener Proteine basiert auf einem physikalischen Prinzip, welches 1946 von Theodor Förster entdeckt wurde, dem Förster Resonanz Energie Transfer (FRET). Bei dieser Methode wird Energie von einem angeregten Donor-Molekül (hier CFP) strahlungsfrei auf ein in räumlicher Nähe befindliches Akzeptor-Molekül (hier YFP) übertragen. Die Voraussetzung für die Energieübertragung und das daraus resultierende verschobene Fluoreszenzsignal ist die direkte räumliche Nähe (bis zu 10 nm) der verwendeten Fluorophore und der spektrale Überlapp von Donor Emission und Akzeptor Excitation.

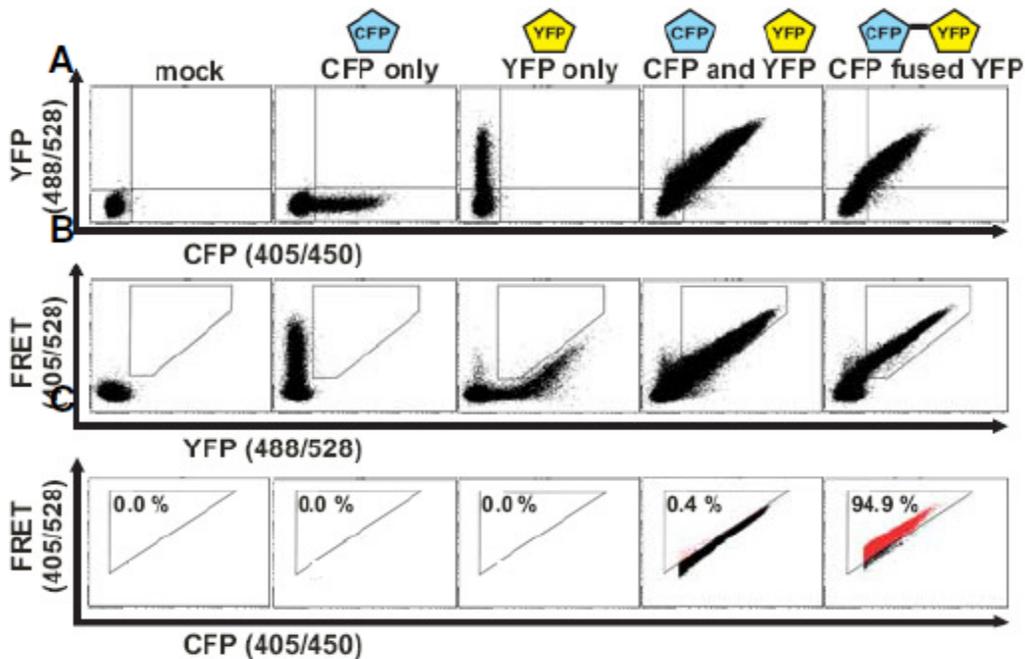


**Abbildung 9: FRET (Förster Resonance Energy Transfer)**

Dargestellt sind sowohl die Grundlage der FRET-Methode (rechts), als auch die überlappenden Absorptions- und Emmissionsspektren von CFP und YFP (links).

Nach einer von Banning et al. 2010 entwickelten und etablierten Methode ist es möglich FRET Signale mit Hilfe eines Fluoreszenz Cytometers zu messen [141]. Vorteil im Vergleich zur FRET-Messung im Mikroskop ist die Möglichkeit eine hohe Anzahl an lebenden Zellen auf schnelle, unkomplizierte und reproduzierbare Art und Weise zu analysieren. Für die Detektion eines aussagekräftigen FRET Signals, sind die richtige Gating-Strategie und die richtigen Kontrollen absolut essentiell (Abbildung 10). Als Kontrollen dienen 293T Zellen, welche entweder *CFPonly*, *YFPonly* Plasmid-Konstrukte tragen analysiert. Außerdem werden Zellen sowohl mit *CFPonly*- als auch *YFPonly*-Plasmiden kotransfiziert, desweiteren werden Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches ein CFP-YFP Fusionsprotein exprimiert. Alle im Bezug auf den *forward*- und *sidewardscatter* (FSC/SSC) lebenden Zellen werden gated und die PMT (*photomultipliertube*) Voltages wie auch die Kompensation so gewählt, dass die spezifische Messung des FRET Signals in den doppelt positiven Zellen möglich ist. YFP wird zu einem geringen Anteil auch mit dem violetten Laser (405 nm) angeregt. Zellen, die sehr viel YFP exprimieren strahlen somit in den FRET-Kanal (violette Anregung (405 nm), Detektion der YFP-typischen, gelben Emission (509/24 nm Filter) und würden ein falsch-positives Signal geben. In einem zweiten Gatingsschritt werden solche Zellen aus der Messung rausgenommen.

Anschließend werden die aufgrund des YFP Anregungsspektrums von 405 nm falsch positiven Zellen ausgeschlossen (Abbildung 10). Durch die Auftragung von FRET gegen CFP ist es möglich, den direkten Cross-talk in den mit YFP und CFP kotransfizierten Zellen, also der Negativkontrolle, zu visualisieren und damit das Gate festzulegen, welches die Messung eines echten FRET-Signals möglich macht. Die FRET-Effizienz kann somit einfach anhand der Prozentzahl FRET-positiver Zellen ablesen werden (Abbildung 10).



**Abbildung 10: : Gating-Strategie für eine FRET-Messung mittels FACS.**

293T Zellen wurden mit den Kontrollkonstrukten YFP only, CFP only, CFP und YFP und YFP-CFP als Fusion transfiziert und im FACS analysiert (Abbildung verändert nach Banning et al., 2010, [141]).

### 6.2.19 Analyse des Zellzyklus

Die Jurkat E6.1 Zellen wurden 48 h nach der Infektion (siehe 7.2.12) abzentrifugiert und mit kaltem PBS gewaschen und bei 1200 rpm für 5 min pelletiert. Um die Zellen zu fixieren wurde das Zellpellet in 300 µl 2% PFA resuspendiert und für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit kaltem PBS wurde das

Zellpellet durch tropfenweise Zugabe von kaltem 80%igem Ethanol und einer Inkubation von 1 Stunden oder über Nacht bei -20°C permeabilisiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1200 rpm für 5 min) und in 200 µl einer Propidiumiodid Lösung (50 µg/ml PI; 0,33 mg/ml RNase A in PBS) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurden die Zellen umgehend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

## **6.3 Biochemische Methoden**

### **6.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten**

Zur Gewinnung von Proteinlysate für die Westernblot Analysen wurden die adhärenente Zellen zunächst mit PBS vom Boden der Multiwellplatte gewaschen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und mit einer geeigneten Menge (50-100 µl) kaltem RIPA-Puffer lysiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 5 Minuten auf Eis. Danach wurden in einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 20.000 x g und 4°C die unlöslichen Bestandteile pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### **6.3.2 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen wurde mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Gele wurden selber hergestellt und hatten eine Konzentration von 12% Bisacrylamid. Die Proteinlysate wurden mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und zur Denaturierung 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Taschen der Gele wurden in einer Elektrodenpuffer enthaltenden Gelkammer (BioTech) mit den Proben beladen und die Elektrophorese zunächst bei 80 V für ca. 15 Minuten durchgeführt, solange sich die Proteine noch im Sammelgel befinden. Die Trennung der Proteine im Trenngel erfolgt bei 160 V für 40 Minuten. Als Proteinstandard wurden der PAGE Ruler™ prestained Protein Ladder von Fermentas eingesetzt.

### **6.3.3 Westernblot**

Die Analyse der Proteinmenge an Vpr, p24 und Tubulin im Virion und den Produktionszellen wurde mittels Westernblot durchgeführt. Nach Trennung der zu analysierenden Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine durch das Wet-Blot System (Biorad) bei 300 mA für die Dauer von einer Stunde auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer wurde durch Färbung der Membran mit einer Ponceau S-Färbelösung kontrolliert. Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Membran in 10% Magermilchpulver/TBS-T für mindestens 30 min geschwenkt. Die primären Antikörper wurden in 5% Magermilchpulver/TBS-T verdünnt und über Nacht mit der Membran bei 4°C leicht geschwenkt. Der Vpr-Antikörper wurde für die Inkubation nicht in Magermilch-Lösung, sondern in einer 1,5 % BSA/TBS-T Lösung inkubiert. Die Membran wurde anschließend 3x10 min mit TBS-T gewaschen. Die HRP gekoppelten sekundären Antikörper wurden ebenfalls in 5% Magermilchpulver/TBS-T verdünnt und die Membran wurden in dieser Lösung für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem schwenken inkubiert. Dann wurde die Membran erneut 3x 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte durch die Verwendung des SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate Kit von Pierce.

## **6.4 Mikroskopie**

### **6.4.1 Immunfluoreszenz für die Mikroskopie**

In dieser Arbeit sollte die Translokation des zellulären Proteins NFAT nach einer Infektion durch verschiedene Viren in Makrophagen untersucht werden. Dafür wurden Makrophagen abends in einer 12-Well Platte auf Glasplättchen mit einer Zelldichte von 100 000 Zellen/ Well ausgesät. Nach Anlagerung der Zellen an die Glasplättchen am nächsten Morgen wurden die Zellen mit den verschiedenen Viren infiziert (Siehe 7.2.14), nach 24 h wurden der Überstand abgenommen, die Zellen wurden mit 1 ml PBS/ Well gewaschen und anschließend mit 2% PFA-Lösung fixiert. Nach 20 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut mit 1 ml PBS/ Well gewaschen und mit 1% Saponin für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert.

Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit einer 5% igen BSA-PBS-Lösung für 20 min blockiert. Wieder erfolgte ein Waschschrift und im Anschluss wurden die Zellen mit einem NFAT-Antikörper (1:50 verdünnt in 1% BSA-PBS-Lösung) und/oder einem Anti p24 Antikörper (1:50 verdünnt in 1% BSA-PBS-Lösung) für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift erfolgte die Färbung durch die fluoreszenzmarkierten sekundär Antikörper (Anti- Maus Antikörper Alexa 488, und Anti- Kaninchen Antikörper Alexa 555; je 1:500 verdünnt in 1% BSA-PBS-Lösung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt, dazu wurde eine 1 µg/ml konzentrierte Lösung hergestellt und die Zellen wurden in dieser Lösung für 15 min inkubiert. Ohne weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit Mowiol auf einem Objektträger aufgebracht. Das Mowiol trocknete über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln, anschließend konnten die Proben mittels Spinning Disk Mikroskopie analysiert werden.

#### **6.4.2 Fluoreszenz-Mikroskopie von Fusionsproteinen**

Um die Lokalisation, bzw. die Translokation von verschiedenen Proteinen zu visualisieren, wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop der Firma Zeiss verwendet. Zunächst wurden Fusionsproteine aus den interessierenden Proteinen und einem Chromophor hergestellt. Hierzu wurden die Proteine in den peYFP-N1 oder wahlweise den peCFP-C1 Vektor kloniert unter der Verwendung von den Restriktionsenzymen NheI und AgeI. Durch die Wahl dieser Restriktionsenzyme wurden die Proteine am N-Terminus an das Chromophor gekoppelt. Diese Plasmide wurden mittels Kalzium-Phosphat-Transfektion (7.2.7) in 293T Zellentransfiziert. Die Zellen wurden einen Tag zuvor in einer 12-Well Platte mit einem 12 mm Deckgläschen ausgesät. In diesen Zellen wurden nun die Fusionsproteine mit unterschiedlichen Chromophoren exprimiert. Nach 32 h wurde das Medium von den Zellen entfernt, nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Proben zur Fixierung mit 500 µL einer 2% PFA PBS-Lösung versetzt, die Inkubation erfolgte bei 4°C für ca. 20 min. Um die Deckgläschen mit den Zellen für den Mikroskopiervorgang auf

einem Objektträger zu fixieren wurde ein Tropfen Mowiol auf den Objektträger aufgetropft und das Deckglas mit den Zellen nach unten blasenfrei auf den Tropfen gelegt. Für die Färbung der DNA wurde dem Mowiol der Farbstoff DRAQ5 in einer Verdünnung von 1:1000 zugefügt. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur über Nacht im Dunkeln getrocknet. Am darauffolgenden Tag konnten die Präparate unter der Anregung der entsprechenden Laser am CLSM analysiert werden.

## **6.5 Software**

Für die Auswertung der DNA-Sequenzen wurden folgende Internet-basierte Programme benutzt:

Sequence Reverse Complementor: [bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

MultAlin V5.4.1: [prodes.toulouse.inra.fr/multalin](http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin)

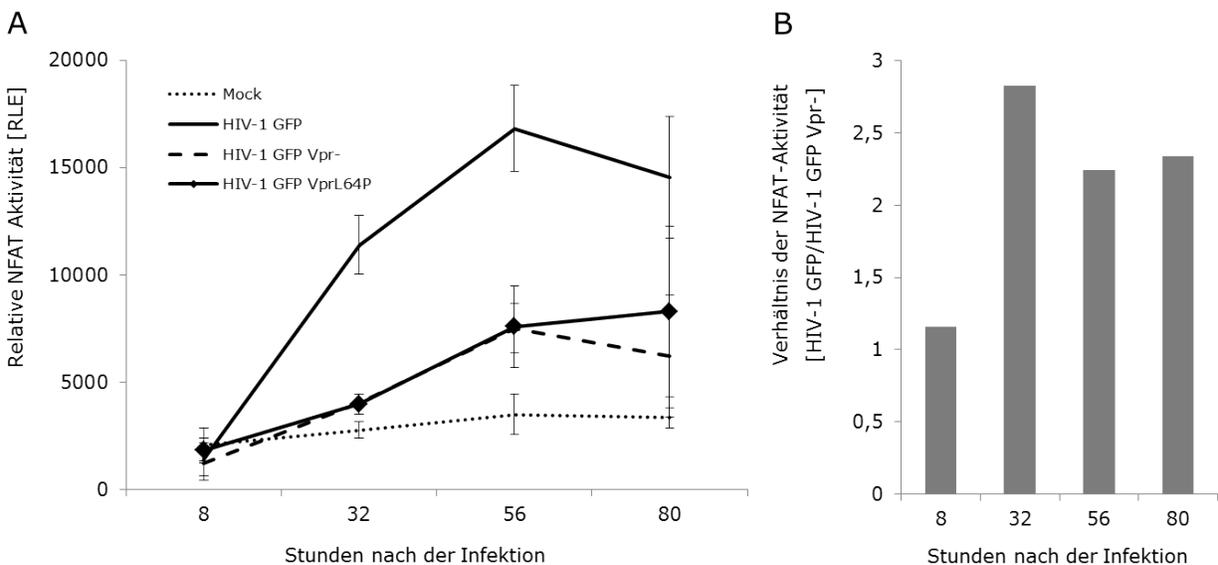
Expasy-Tool: [www.expasy.ch/tools/dna.html](http://www.expasy.ch/tools/dna.html)

Zur Errechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen und zur Erstellung von Diagrammen wurde Microsoft® Excel benutzt. Die Korrelationsanalysen, sowie die Bestimmung der Signifikanz wurden mit Graph Pad Prism durchgeführt. Die CLSM Bilder wurden mit LSM Image Browser bearbeitet. Die Bilder der Spinning Disk Mikroskopie wurden mit dem Programm Volocity 3D Image Analysis Software von Perkin Elmer bearbeitet. Für die Bearbeitung und Zusammenstellung der Abbildungen wurde das Programm Power Point von der Firma Microsoft verwendet.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Vpr verstärkt die NFAT-Aktivierung in der Frühphase der HIV-1 Infektion

Vpr induziert die Aktivierung des zellulären Transkriptionsfaktors NFAT [138], wodurch es zu dessen Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern kommt. Hier induziert NFAT die Genexpression verschiedener Interleukine, wie Interleukin-2 (IL-2) und ist somit ein wichtiger Faktor für die Aktivierung von T-Zellen. Zur Untersuchung der NFAT-Aktivierung nach HIV-1 Infektion durch Vpr über die Zeit wurden zunächst Jurkat NFAT-Luc Zellen mit HIV-1 NL4-3 eGFP, Vpr- und VprL64P Reporterviren infiziert, die GFP über eine IRES zusammen mit dem Nef Protein exprimieren. Die VprL64P Mutante wird nicht effizient in Viruspartikel inkorporiert und dient somit als zusätzliche Negativkontrolle. Die Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung wurde zu angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion durch Messung der Luziferaseaktivität quantifiziert.



**Abbildung 11: Vpr verstärkt die NFAT-Aktivierung in der Frühphase der HIV-1 Infektion.**

1 Mio Jurkat NFAT-Luc Zellen wurden mit 30ng p24 HIV-1 GFP, HIV-1 GFP Vpr- und HIV-1 GFP VprL64P Viren infiziert. 8, 32, 56 und 80 Stunden nach der Infektion wurde in Aliquots

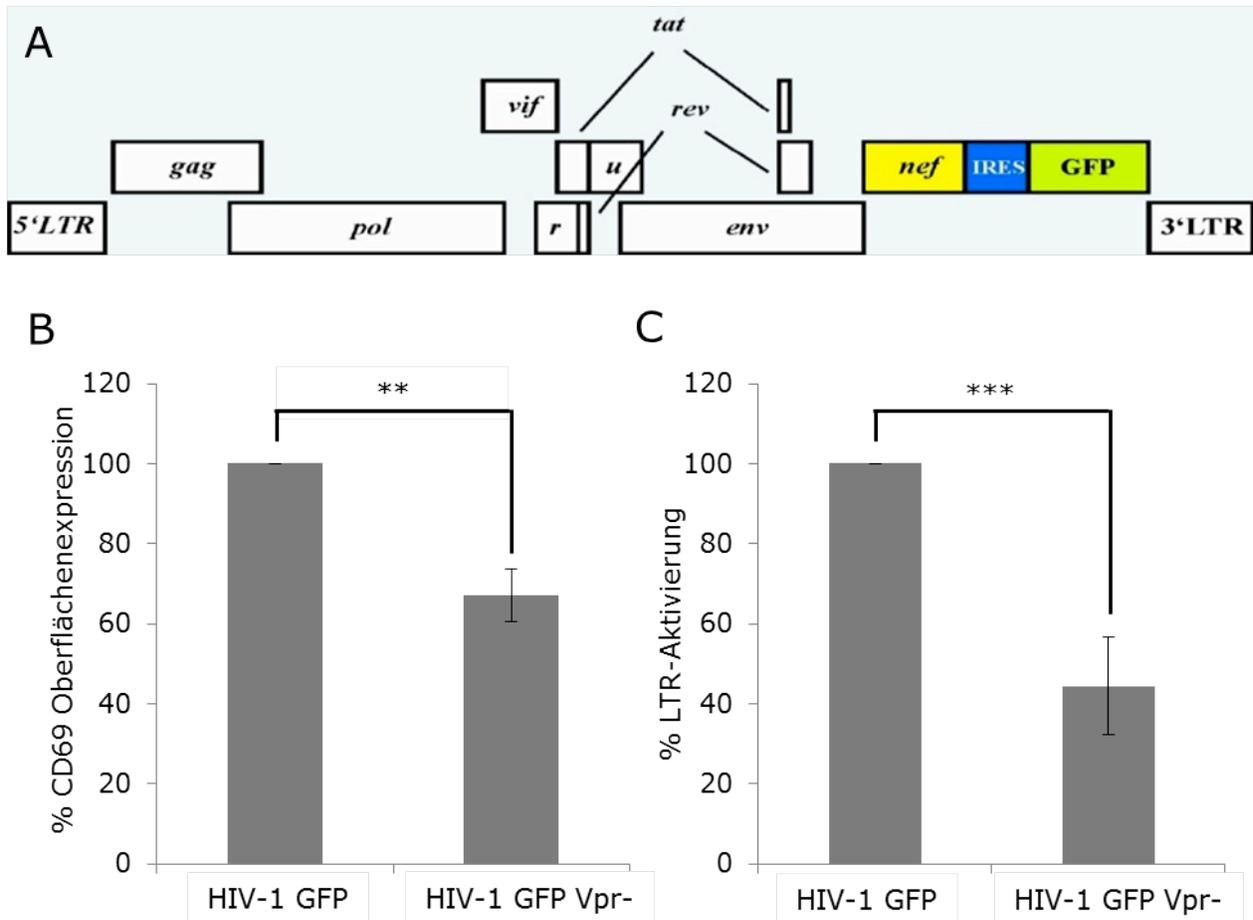
die Messung der Luciferaseaktivität durchgeführt. Die Zellen wurden 8 Stunden vor der Messung mit 1 µg/ml PHA stimuliert. (A) Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von N=4. (B) Im Diagramm ist das Verhältnis der mittleren NFAT-Aktivität [RLE] von HIV-1 NL4-3 eGFP zu HIV-1 Vpr- eGFP infizierten Jurkat Zellen dargestellt. Abkürzungen: RLE (relative Lichteinheiten).

32 Stunden nach der Infektion mit HIV-1 NL4-3 eGFP, konnte eine 3 Mal höhere NFAT-Aktivität im Vergleich zur Infektion mit HIV-1 Vpr- eGFP Viren und der VprL64P Mutante detektiert werden (Abb. 11). 56 Stunden nach der Infektion sinkt die NFAT-Aktivität der HIV-1 NL4-3 eGFP infizierten Zellen ab. Die Infektion mit der inkorporationsdefekten VprL64P Mutante zeigt im Vergleich zu nicht infizierten Zellen nur einen geringen Anstieg der NFAT-Aktivierung und ist vergleichbar mit HIV-1 Vpr- eGFP infizierten Proben. Die Analyse der Reporteraktivität zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion konnte zeigen, dass Vpr die NFAT-Aktivierung früh nach der Infektion verstärkt. Das Verhältnis der NFAT-Aktivierung von HIV-1 NL4-3 zu HIV-1 Vpr- erreicht 32 Stunden nach der Infektion sein Maximum.

## **7.2 Vpr stimuliert die frühe T-Zellaktivierung in PBMCs**

Eine verstärkte NFAT-Aktivierung könnte zu einer erhöhten T-Zellaktivierung und LTR-Transkription führen. Die Vpr-vermittelte T-Zellaktivierung in HIV-1 infizierten PBMCs sollte anhand der Expression des frühen T-Zellaktivierungsmarkers CD69 analysiert werden. Zusätzlich sollte der Effekt von Vpr auf die Transaktivierung der HIV-1 LTR untersucht werden.

Vorstimulierte PBMCs wurden mit HIV-1 NL4-3 eGFP und Vpr- Viren infiziert. Da bei den verwendeten Reporterviren die Transkription der bicistronischen Nef mRNA durch die LTR-Region reguliert wird, ist die GFP Fluoreszenzintensität ein Maß für die Transaktivierung der LTR. Infizierte Zellen können nun durch die GFP Expression identifiziert werden, 4 Tage nach der Infektion wurde die T-Zellaktivierung anhand der Oberflächenexpression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 über eine Antikörperfärbung mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die LTR-Transaktivierung wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von GFP bestimmt.



**Abbildung 12: Vpr stimuliert die frühe T-Zellaktivierung in PBMCs.**

Schematische Darstellung des HIV-1 Reportervirus (A). PBMCs wurden zwei Tage mit  $1\mu\text{g/ml}$  PHA vorstimuliert, gewaschen und 1 Mio Zellen mit  $500\mu\text{l}$  Virusüberstand der entsprechenden Viren infiziert. 3 Tage nach der Infektion wurden die Zellen erneut mit PHA stimuliert, 12 Stunden später wurde eine Oberflächenfärbung mit einem Anti-CD69-APC Antikörper durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (B) so wie die mittlere Fluoreszenzintensität von GFP der Zellen via Durchflusszytometrie ermittelt (C). Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten aus  $N=4$  (2 Spender), die MFI der HIV-1 GFP infizierten Zellen wurden als 100% definiert. (\*\*  $p=0,0018$ ; \*\*\*  $p<0,0001$ )

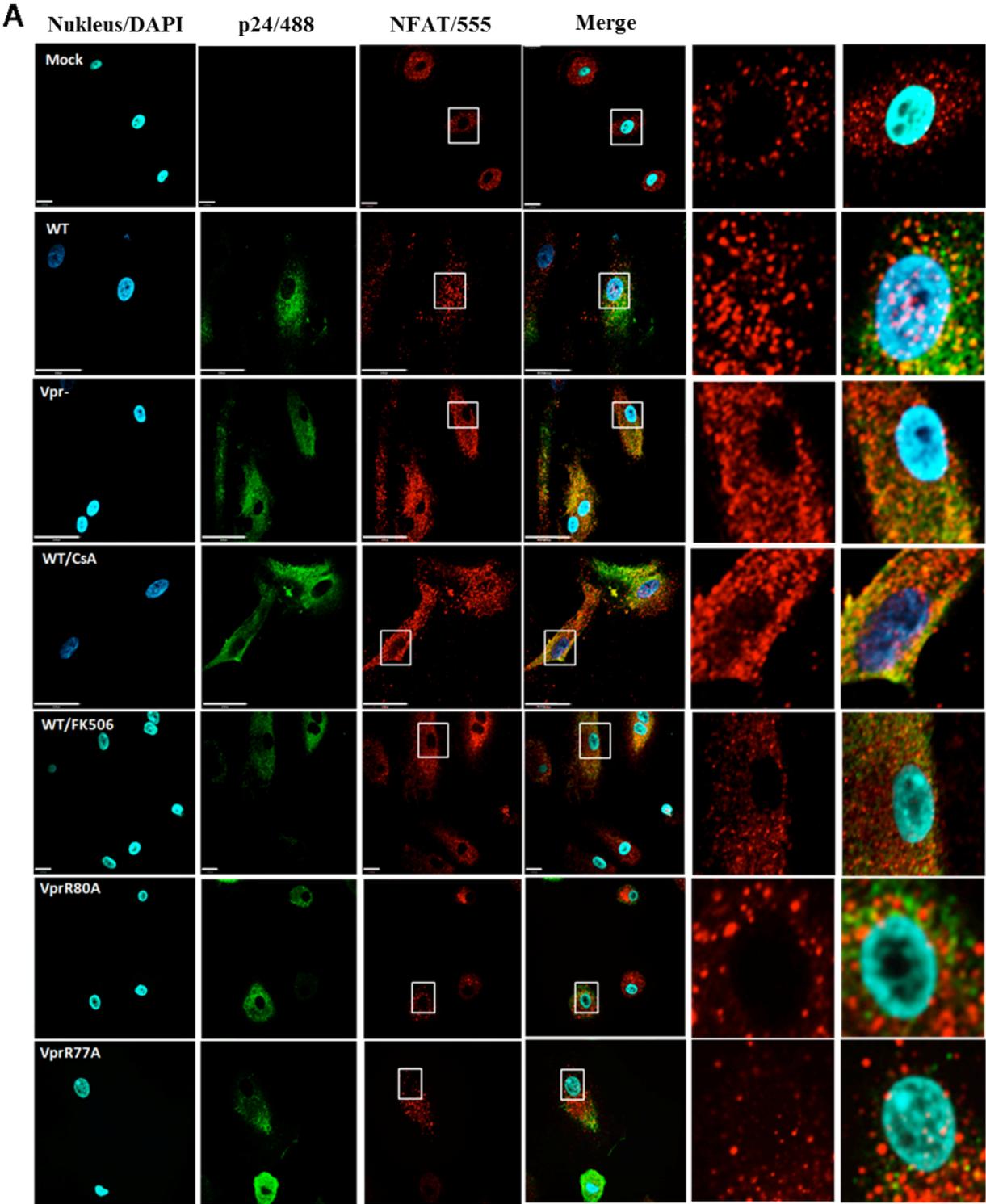
Die mit HIV-1 Vpr- eGFP Virus infizierten PBMCs weisen eine 40 % geringere CD69-Oberflächenexpression und eine um 50% geringere LTR-Transaktivierung im Vergleich zu den mit HIV-1 NL4-3 eGFP infizierten PBMCs auf. Die Ergebnisse

zeigen, dass Vpr sowohl die frühe T-Zellaktivierung stimuliert, als auch die LTR-Transaktivierung in PBMCs verstärkt.

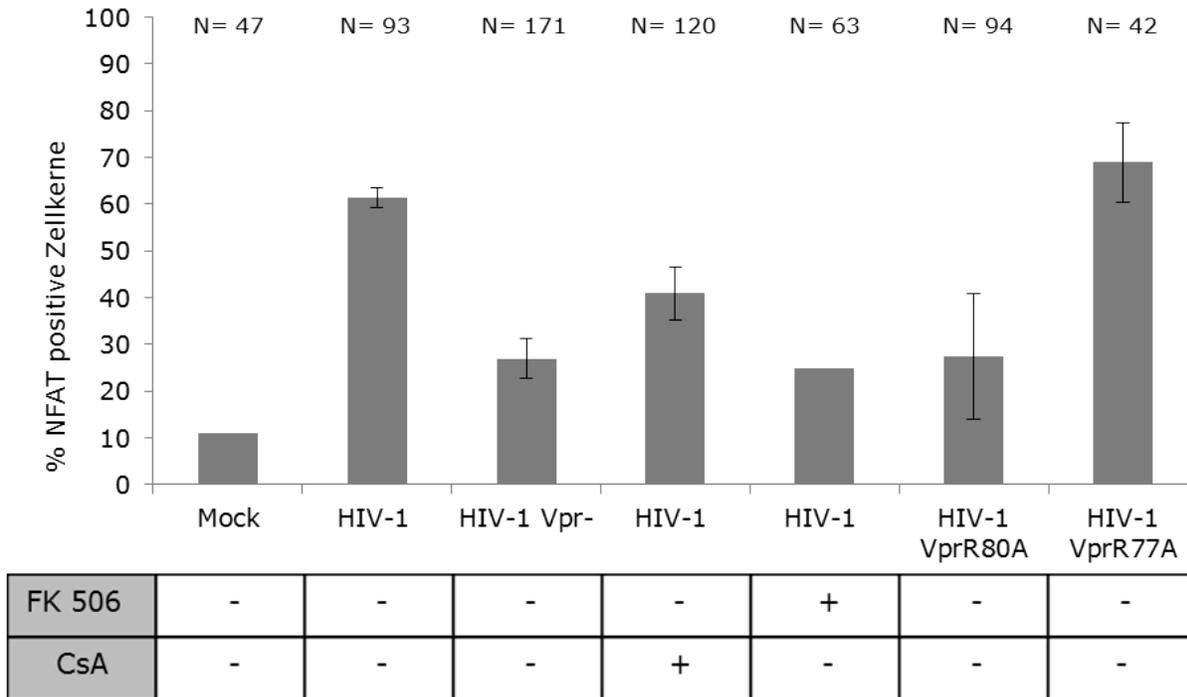
### **7.3 Vpr vermittelt NFAT-Translokation in infizierten MDMs**

Neben CD4+ T-Zellen sind auch Makrophagen wichtige Zielzellen des HIV-1 *in vivo*. Die effiziente Infektion dieser Zellen erfolgt nicht wie in T-Zellen über die Interaktion mit dem Korezeptor CXCR4, sondern mit dem CCR5 Rezeptor. Die Virusproduktion in Makrophagen ist zwar deutlich geringer als in T-Zellen, sie sind jedoch sehr viel widerstandsfähiger gegenüber einer HIV-Infektion. Das Virus kann in diesen Zellen lange persistieren ohne dem Immunsystem ausgesetzt zu sein [139]. Makrophagen sind somit ein wichtiges Reservoir für das Virus. Es ist bekannt, dass Vpr gerade in Makrophagen und anderen sich nicht-teilenden Zellen eine essentielle Rolle bei der Infektion spielt, da es aktiv den Transport des PIC in den Zellkern vermittelt [62, 50, 63, 64, 65]. Aufgrund dessen sollte im Folgenden untersucht werden, ob Vpr auch in Makrophagen zu einer verstärkten NFAT-Aktivierung führt. Dazu wurde die zelluläre Verteilung von NFAT mittels Immunfluoreszenz analysiert. Im inaktiven Zustand befindet sich NFAT im Zytoplasma. Wird NFAT aktiviert, kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch dessen NLS exponiert wird und das Protein in den Zellkern transloziert. Als Negativkontrollen dienten die NFAT Inhibitoren CsA und FK506.

Primäre MDMs wurden mit den entsprechenden Reagenzien vorbehandelt und im Anschluss mit CCR5-tropen HIV-1 NL4-3, Vpr- und den zwei Vpr Mutanten R80A und R77A infiziert. Bei den Mutanten handelt es sich um natürliche Varianten des Proteins, welche aus Patienten isoliert werden konnten. Während die R77A Mutante in MDM bezüglich der Replikationsfähigkeit mit dem NL4-3 Vpr vergleichbar ist, konnte für die R80A Variante eine verringerte Replikationsfähigkeit gezeigt werden [140]. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und eine Immunofluoreszenzfärbung durchgeführt. Die zelluläre Verteilung von NFAT in infizierten MDMs wurde anschließend durch *Spinning Disk* Mikroskopie analysiert.



**B**



**Abbildung 13: Vpr vermittelt NFAT-Translokation in infizierten MDMs.**

Makrophagen wurden mit 500 µl CCR5-tropen HIV-1 NL4-3, HIV-1 Vpr-, HIV-1 VprR77A und HIV-1VprR80A infiziert und 1 Stunde vor der Infektion mit CsA und FK506 behandelt. 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (grün = p24; rot = endogenes NFAT, blau = Nukleus). (A) Gezeigt sind repräsentative Bilder der mikroskopischen Analyse. (B) Für die quantitative Auswertung wurden die Prozentzahlen von analysierten Zellen (=N) ermittelt, bei denen NFAT im Nukleus vorliegt. 100% entspricht bei dieser Analyse der Gesamtzahl der analysierten Zellkerne je Probe. Das Diagramm repräsentiert die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

In unbehandelten Makrophagen befindet sich NFAT fast ausschließlich im Zytoplasma, lediglich 10 % der Zellkerne sind NFAT positiv. Nach der Infektion mit HIV-1 NL4-3 konnte in 60% der analysierten Zellkerne NFAT detektiert werden. Im Vergleich dazu sind nach der Infektion mit HIV-1 Vpr- nur 30 % der Zellkerne NFAT positiv. Die Zugabe der NFAT-Inhibitoren verringert die Translokation von NFAT in HIV-1 NL4-3 infizierten Zellen deutlich, insbesondere die Verwendung von FK506.

Die NFAT-Translokation nach der Infektion mit HIV-1 VprR77A ist vergleichbar mit der nach Infektion mit HIV-1 NL4-3. Die Translokationsrate in den mit HIV-1 VprR80A infizierten Makrophagen ist vergleichbar mit der Infektion mit HIV-1 Vpr. Somit führt die Mutation von Arginin an Position 80 zu Alanin in Vpr zum Verlust der Fähigkeit, die NFAT Translokation zu induzieren. In der Summe zeigen diese Daten, dass Vpr in Makrophagen die Translokation von NFAT in den Zellkern induziert.

## **7.4 Funktionelle Charakterisierung unterschiedlicher Vpr Mutanten**

Nachdem sowohl in der T-Zelllinie als auch in 2 primären Zellsystemen gezeigt werden konnte, dass Vpr die Aktivierung von NFAT während der HIV-1 Infektion stimuliert sollte im Folgenden der zu Grunde liegende Mechanismus aufgeklärt werden.

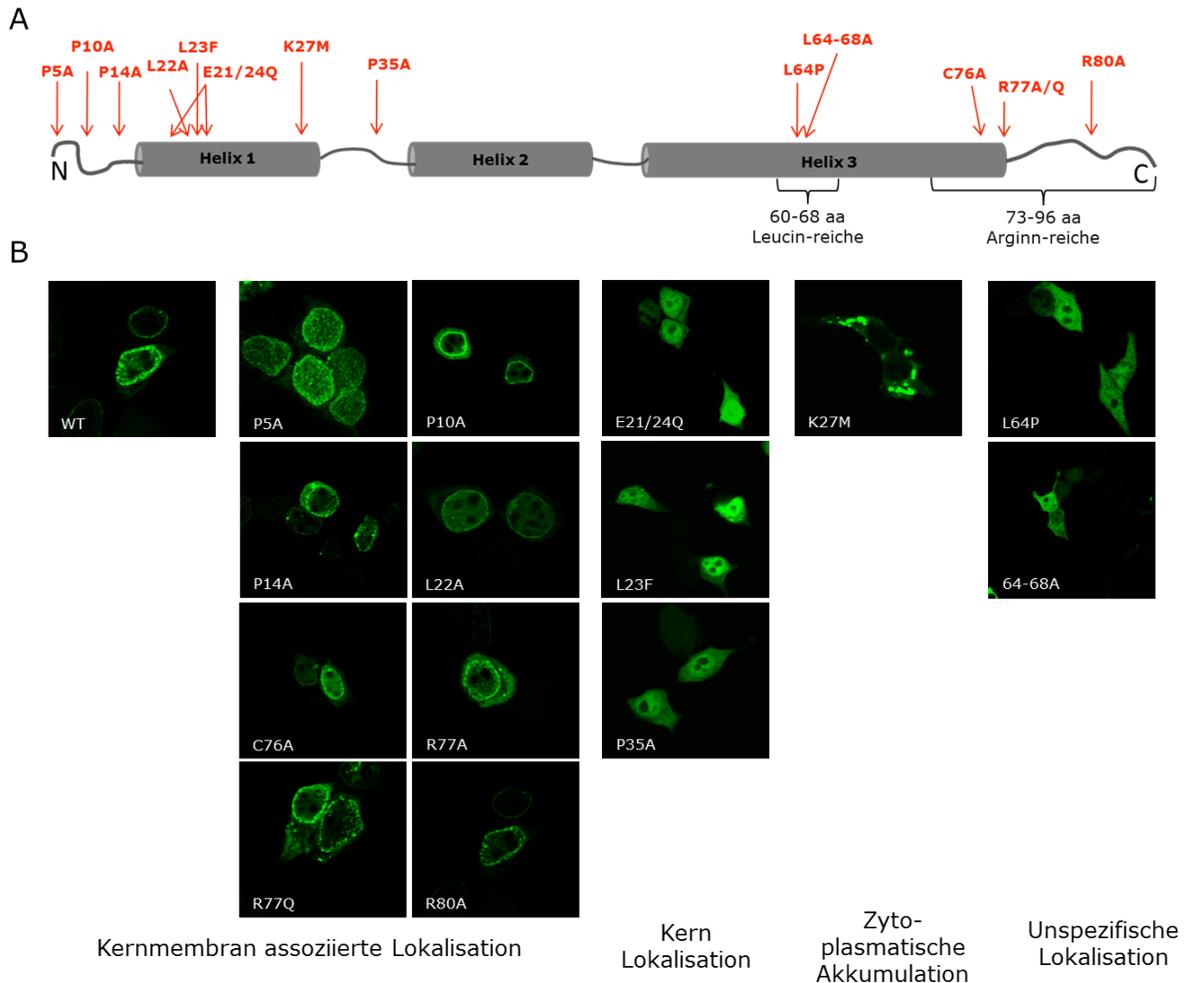
Dazu wurden verschiedene, zum Teil bereits in der Literatur beschriebene Vpr Mutanten generiert. Die unterschiedlichen Mutanten sind schematisch in Abbildung 4 A dargestellt. Als Template für die verschiedenen Mutanten wurde das Vpr aus dem Laborstamm NL4-3 verwendet und wird im Folgenden als Vpr WT bezeichnet. Durch die funktionelle Charakterisierung der Mutanten sollte untersucht werden, ob die NFAT-Aktivierung mit bekannten Funktionen von Vpr in Zusammenhang gebracht werden kann.

Die Mutanten liegen für die folgenden Versuche sowohl als Fusionsproteine mit YFP/CFP, als auch in einem Expressionsvektor vor, der GFP zusammen mit Vpr über eine IRES exprimiert.

### **7.4.1 Zelluläre Lokalisation der Vpr Mutanten in 293T Zellen**

Zunächst wurde die subzelluläre Lokalisation der Mutanten untersucht. Vpr lokalisiert hauptsächlich an der Kernmembran [63]. Diese Kernassoziiierung soll besonders für den aktiven Transport des PIC in den Nukleus von Bedeutung sein [62, 50, 64, 65].

Für die Lokalisationsanalyse wurden die verschiedenen Vpr Mutanten als Fusionsprotein mit YFP in 293T Zellen durch Transfektion exprimiert. 32 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation der einzelnen Mutanten mittels Confocal Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) analysiert.



**Abbildung 14: Zelluläre Lokalisation der Vpr Mutanten in 293T Zellen.**

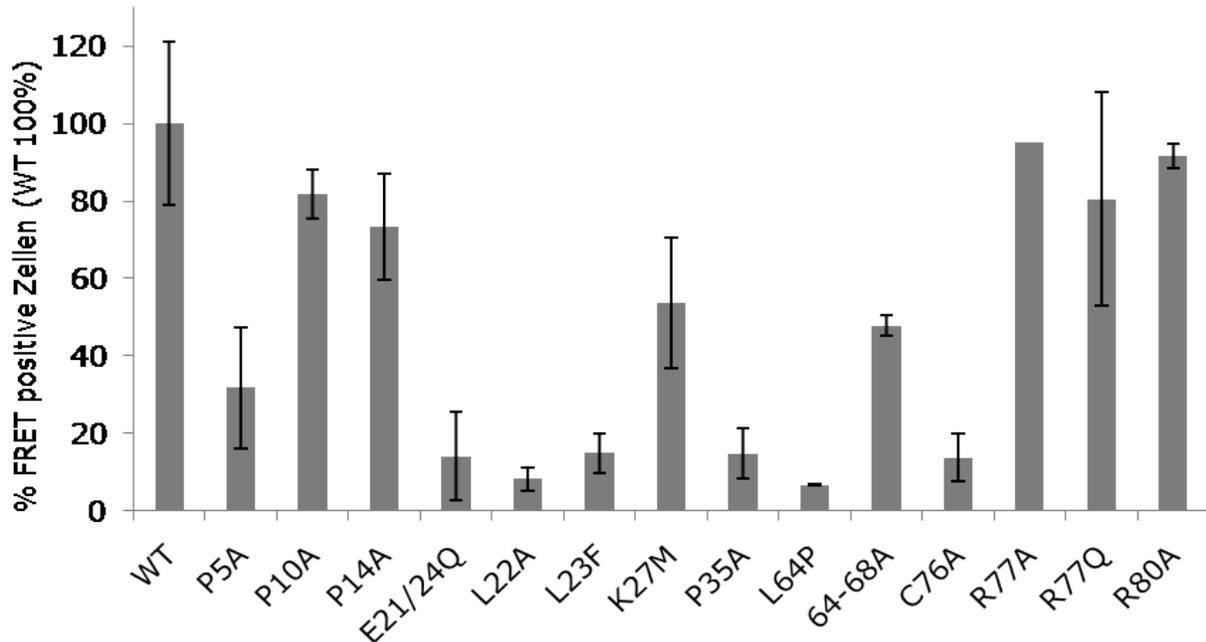
(A) Schematische Darstellung der Mutationsstellen im Vpr Protein. (B) 293T Zellen wurden mit Expressionsvektoren der verschiedenen Vpr Mutanten mittels der Kalzium-Phosphat-Methode transfiziert. Die Expressionsvektoren kodieren für die Mutanten als Fusionsprotein mit YFP. 32 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mittels CLSM analysiert.

Durch die mikroskopische Analyse konnte gezeigt werden, dass das Vpr WT Fusionsprotein wie in der Literatur beschrieben hauptsächlich an der Kernmembran

lokalisiert ist [62, 50, 63, 64, 65]. Es ist davon auszugehen, dass die Fusion von Vpr mit einem Chromophor, in diesem Fall YFP, keinen Einfluss auf die Lokalisation hat. Die mikroskopische Untersuchung ergab, dass die Mutanten P5A, P10A, P14A, L22A, C76A, R77A, R77Q und R80A eine mit dem Vpr WT vergleichbare Lokalisation aufweisen. Die Mutanten E21/24Q, L23F und P35A lokalisieren jedoch verstärkt im Zellkern. Die Punktmutation K27M verursacht eine ausgeprägte Akkumulierung des Proteins im Zytoplasma der Zelle. Die Mutanten L64P und 64-68A, zeigten eine diffuse unspezifische Verteilung in der Zelle.

#### **7.4.2 Analyse der Vpr Oligomerisierung mittels FACS-basiertem FRET Assay**

Die Eigenschaft von Vpr Homo-Oligomere zu bilden, soll vor allem bei der Verpackung ins Virion, aber auch bei der Interaktion mit anderen Proteinen von Bedeutung sein [164]. Die Oligomerisierung der Vpr Mutanten sollte mittels FACS-FRET analysiert werden. Dazu wurden 293T Zellen mit den entsprechenden YFP- und CFP-Fusionsproteinen kotransfiziert und nach 32 Stunden mittels FACS analysiert [141].



**Abbildung 15: Analyse der Vpr Oligomerisierung mittels FACS-basiertem FRET Assay.**

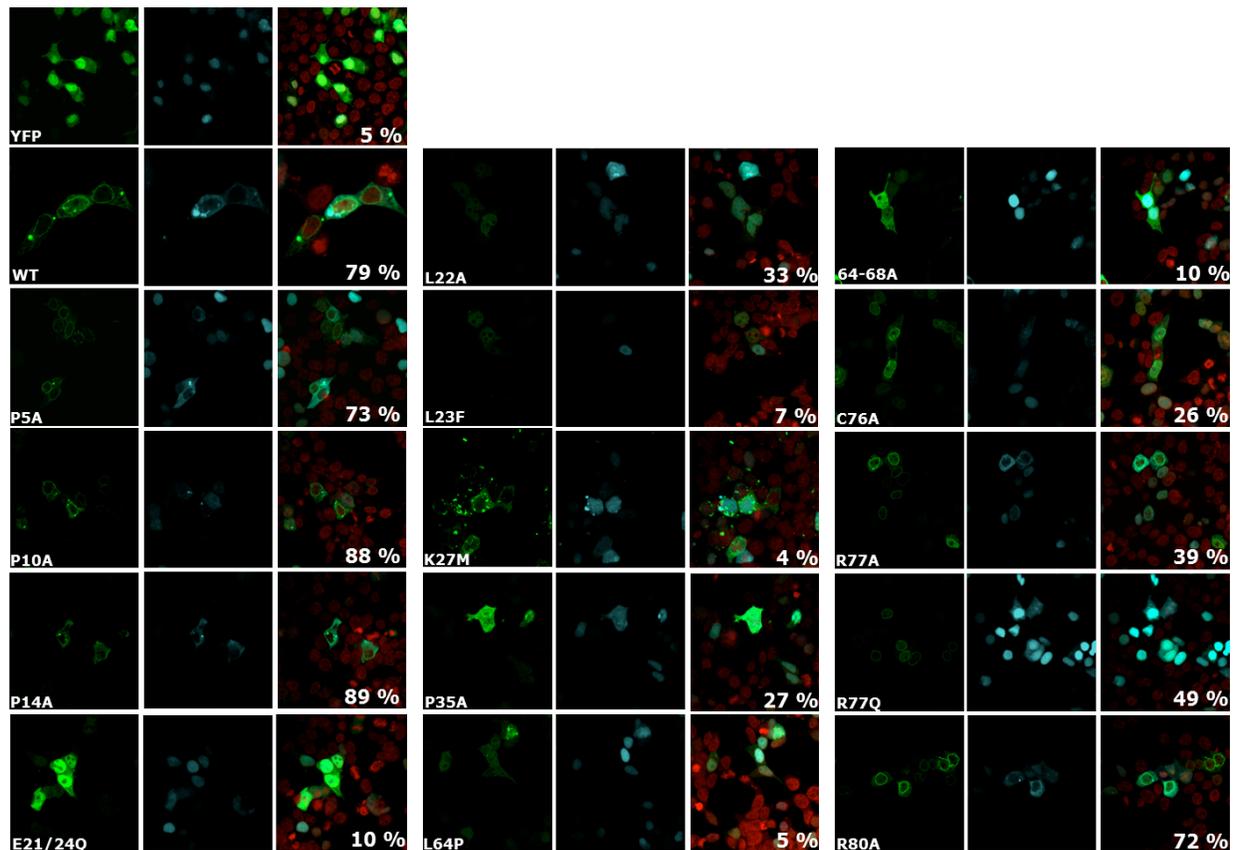
293T Zellen wurden mit den einzelnen Mutanten, jeweils als YFP- und CFP-Fusionsprotein kotransfiziert. 32 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie und einer speziellen Gating Strategie auf Oligomerisierung untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus N=2.

Die Analyse der Vpr Mutanten mittels FACS-basiertem FRET Assay zeigte, dass die Mutationen E21/24Q, L22A, L23F, P35A, L64P und C76A zu einem nahezu vollständigen Verlust der Oligomerisierungsfähigkeit des Proteins führen (Abbildung 15). Die Mutanten P5A, K27M und 64-68A weisen eine abgeschwächte Oligomerisierung auf. P10A, P14A R77A, R77Q sowie R80A zeigten eine mit NL4-3 Vpr vergleichbare Aktivität. Zusammenfassend führten vor allem Punktmutationen in den Vpr Helices zu einer verminderten Vpr Oligomerisierung.

### 7.4.3 Quantifizierung der Vpr-vermittelten PARP-1 Translokation

Vpr induziert die Translokation des DNA-Reparatur Proteins PARP-1 aus dem Zellkern in das Zytoplasma [142]. Valdor et al. konnten zeigen, dass PARP-1 mit

NFAT1 interagiert und so dessen Aktivität inhibiert [143]. Die Vpr-vermittelte Translokation von PARP-1 aus dem Zellkern könnte somit dessen NFAT inhibierende Wirkung aufheben. Vpr könnte über diesen Mechanismus die NFAT-Aktivität in der Zelle verstärken. Um die Vpr-vermittelte PARP1-Translokation zu quantifizieren, wurden die Vpr-YFP Fusionsproteine zusammen mit CFP-PARP-1 in 293T Zellen transfiziert. Nach 32 Stunden wurden die Zellen fixiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte die Translokation des PARP-1 Fusionsproteins unter dem Einfluss der Vpr Mutanten in der Zelle analysiert werden.



**Abbildung 16: Quantifizierung der Vpr-vermittelten PARP-1 Translokation.**

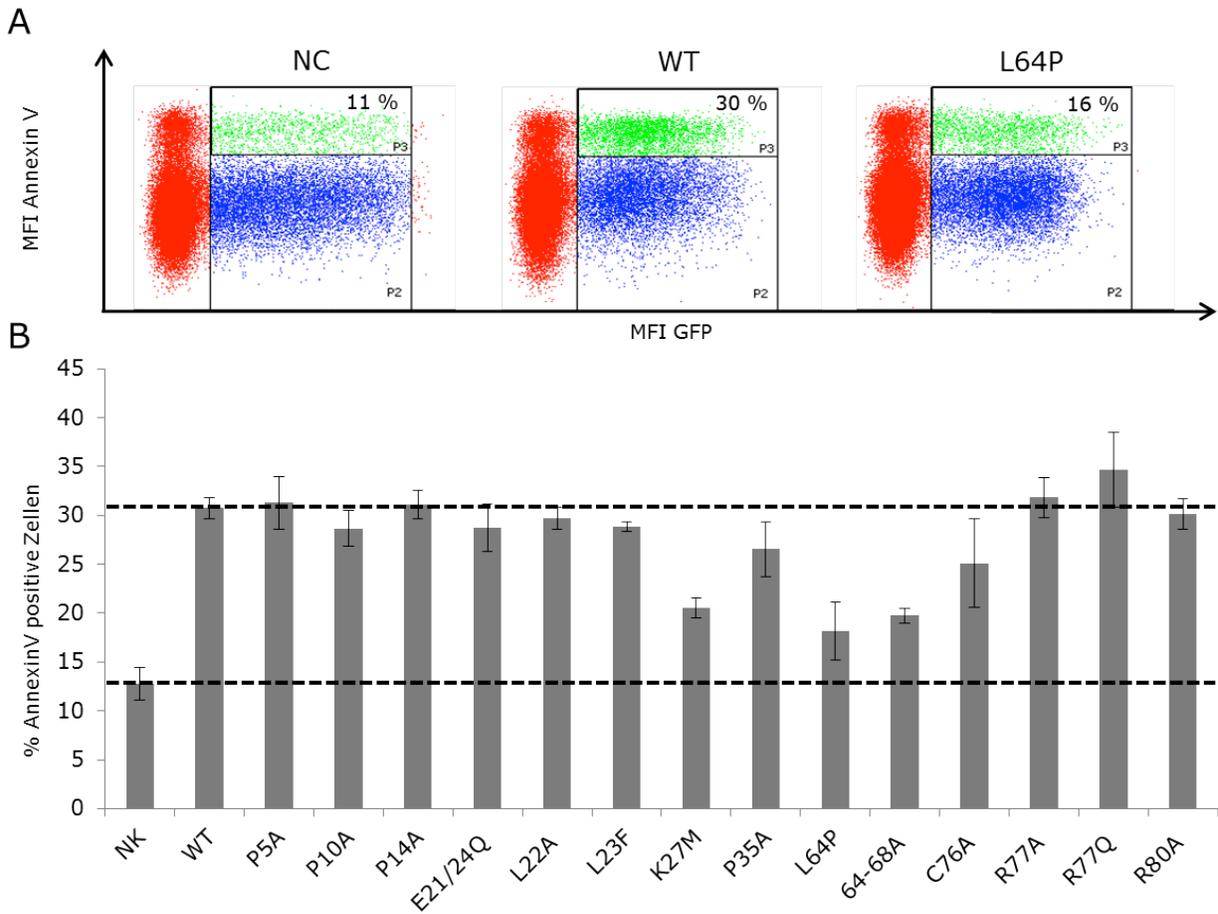
293T Zellen wurden mit den unterschiedlichen *peYFP Vpr* und dem *peCFP PARP1* Plasmiden kotransfiziert. Nach 32 Stunden wurden die Zellen fixiert und mittels CLSM analysiert. Für die Kernfärbung wurde der Farbstoff DRAQ5 verwendet. Die Quantifizierung der Proben erfolgte über Auszählung der Zellen, die Vpr und PARP-1 exprimieren und bei denen PARP-1 im Zytoplasma vorliegt. 100% entspricht der Anzahl ausgezählter Zellen pro Probe (Grün: YFP, Blau: CFP, Rot: DRAQ5).

Die mikroskopische Analyse der Vpr WT und PARP-1 kotransfizierten Zellen zeigte eine Translokation des PARP-1 Fusionsproteins aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Die Vpr induzierte PARP-1 Translokation konnte bestätigt werden. Die Mutanten P5A, P10A, P14A und R80A zeigten eine vergleichbare PARP-1 Translokationsrate wie Vpr WT (> 70% der analysierten Zellen weisen eine PARP-1 Translokation auf). Die Mutationen L22A, P35A, C76A, R77A und R77Q führen zu einer verringerten Translokationsrate im Vergleich zu Vpr WT. Bei den Mutanten E21/24Q, L23F, K27M und bei den Mutationen im GR Binundgsmotif L64P und 64-68A konnte kaum eine Vpr induzierte PARP-1 Translokation detektiert werden (< 10% der analysierten Zellen weisen eine PARP-1 Translokation auf).

#### **7.4.4 Vpr-induzierte Apoptose in HeLa Zellen**

Die Expression von Vpr kann in unterschiedlichen Zelltypen Apoptose auslösen. Möglicherweise sind dafür Interaktionen von Vpr mit verschiedenen Proteinen der mitochondrialen Membran verantwortlich, die eine Permeabilisierung der mitochondrialen Membran verursachen und somit den Austritt proapoptotischer Proteine, wie zum Beispiel Cytochrom C, bewirken [74, 75, 76].

Um den mechanistischen Hintergrund der Vpr-vermittelten NFAT-Aktivierung zu ermitteln sollte auch die proapoptotische Wirkung der Vpr Mutanten untersucht werden um einen möglichen Zusammenhang beider Funktionen zu untersuchen. Hierzu wurden HeLa Zellen mit den verschiedenen Vpr Mutanten transfiziert und nach 32 Stunden auf eine mögliche proapoptotische Funktion mittels Annexin-Färbung und Durchflusszytometrie analysiert.



**Abbildung 17: Vpr vermittelte Apoptose in HeLa Zellen.**

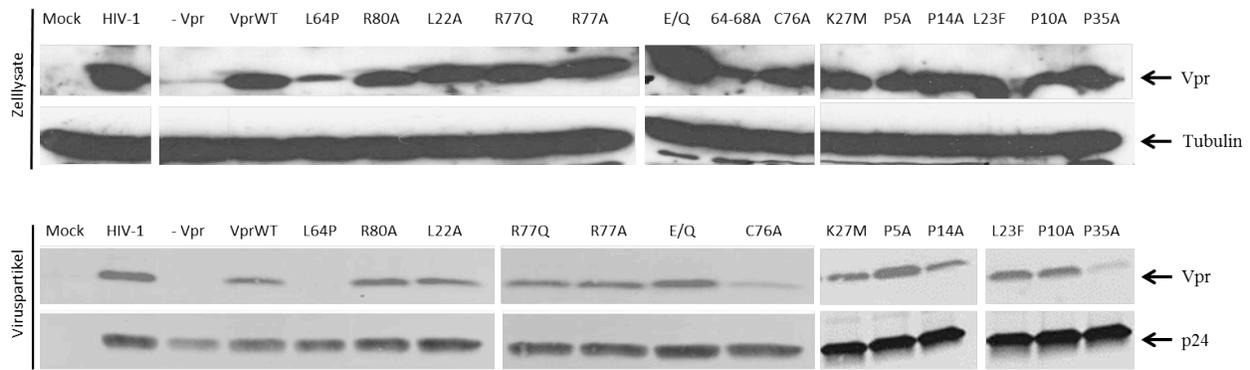
(A) Beispiel für die verwendete Gating Strategie bei der FACS Analyse. (B) HeLa Zellen wurden mit pCG Expressionsplasmiden der verschiedenen Vpr Mutanten transfiziert. Als Transfektionskontrolle dient die Expression von GFP. 32 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Annexin V gefärbt und anschließend mittels FACS untersucht. Als Negativkontrolle wurde das Nef\*-IRES GFP Plasmid verwendet (NK). Das Diagramm repräsentiert die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus N=3 Transfektionen.

Die Expression von Vpr in HeLa Zellen induziert in 30 % der Zellen Apoptose. Bei Transfektion der Negativkontrolle, die nur GFP exprimiert sind ca 12% der Zellen apoptotisch. Somit führt Vpr zu einer 2,5 fachen Erhöhung der Apoptoserate (Abbildung 17). Des Weiteren haben fast alle getesteten Mutanten einen

proapoptotischen Effekt, der mit dem von Vpr WT vergleichbar ist. Lediglich die Mutanten K27M, P35A, L64P und 64-68A weisen einen verringerten proapoptotischen Effekt auf.

#### **7.4.5 Expressionslevel und Inkorporationseffizienz der Vpr Mutanten**

HIV-1 Virionen enthalten ca. 300 Vpr Moleküle [41, 42], für die Verpackung des Proteins in die Viruspartikel ist eine Interaktion von Vpr mit der p6 Region des Gag Proteins essentiell [43, 44, 45]. Nachdem das Virus an die Rezeptoren der Wirtszelle gebunden hat, kommt es zu einer Fusion der viralen und der zellulären Membranen, wodurch das virale Kapsid und verschiedene Proteine, wie Vpr in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen werden. Für die anschließenden Infektionsexperimente sollte Vpr-transkomplementiertes HIV-1 verwendet werden, um so ausschließlich den Effekt von Virion-assoziiertem Vpr zu untersuchen. Hierzu wurden 293T Zellen mit pBR-NL43 vpr\* IRES-eGFP und den verschiedenen pCG-Vpr Expressionsplasmiden kotransfiziert. Während der Ausknospung der Viruspartikel wird Vpr durch die Interaktion mit p6 inkorporiert [43, 44]. Um die Inkorporationseffizienz der verschiedenen Vpr Mutanten zu analysieren, wurde der Virus-haltige Zellkulturüberstand über einen Sucrosegradienten aufkonzentriert. Mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot wurde zunächst die Menge an Vpr im Virusüberstand in Relation zur p24 Expression ermittelt. Um sicher zu stellen, dass der verwendete Vpr-Antikörper die unterschiedlichen Vpr Varianten detektieren kann und um zusätzlich die Expressionslevel der Mutanten in transfizierten Zellen zu vergleichen, wurden zudem die Lysate der Produktionszellen untersucht.



**Abbildung 18: Expressionslevel und Inkorporationseffizienz der Vpr Mutanten.**

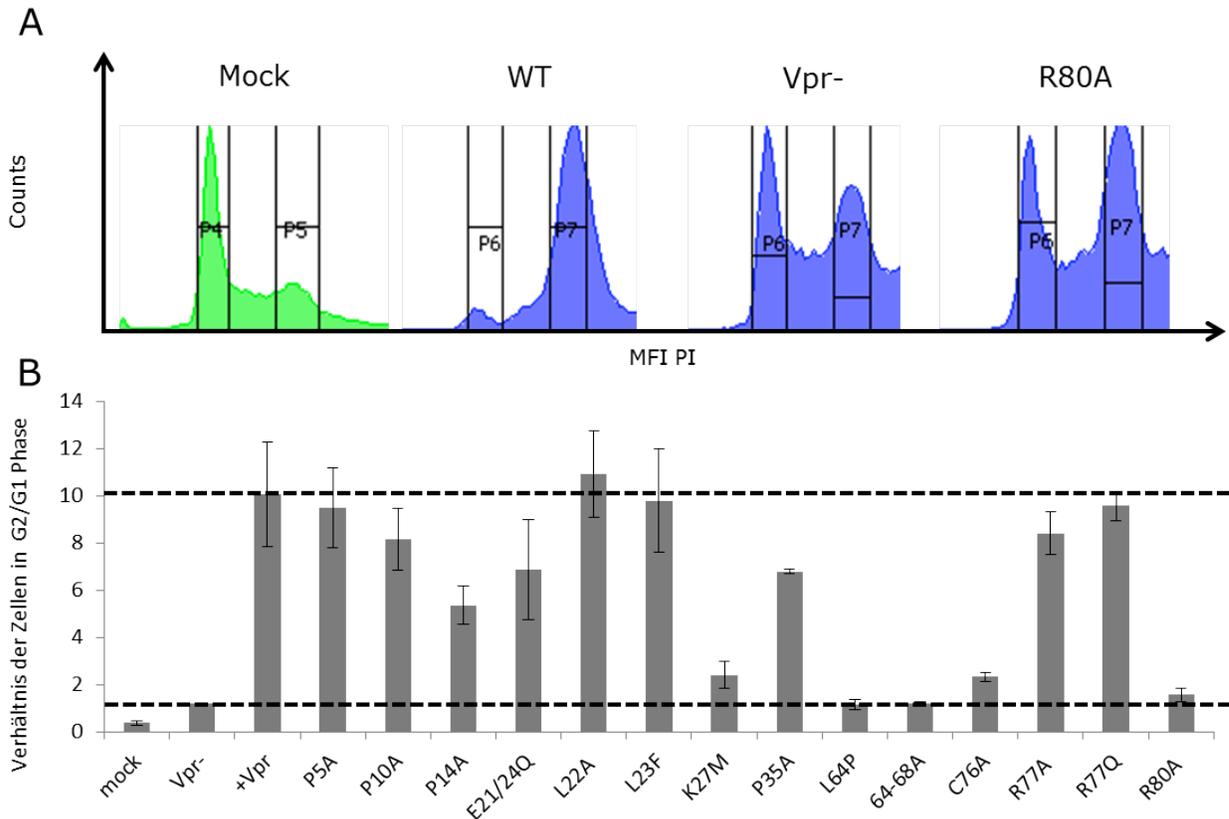
293T Zellen wurden mit pBR-NL43 vpr\* IRES-eGFP und den pCG-Expressionsplasmiden der verschiedenen Vpr Mutanten kotransfiziert. Mittels SDS-PAGE und Immunoblot wurden die Expressionsmengen von Vpr in den Produktionszellen (oberer Teil) und die Menge an Vpr im Zellkulturüberstand (unterer Teil) untersucht. Als Ladekontrolle wurde Alpha-Tubulin im Zelllysate (oberer Teil) bzw. die Gesamtmenge an p24 im Zellkulturüberstand (unterer Teil) verwendet.

In diesem Immunoblot der 293T Zellen zeigen die meisten Vpr Mutanten mit Vpr WT vergleichbare Expressionslevel. Während die Vpr Mutanten L64P und 64-68A weniger stark exprimiert werden als das WT-Vpr, scheint die E21/24Q Variante hingegen leicht verstärkt exprimiert zu werden. Die Untersuchung des Virus-haltigen Zellkulturüberstands ergab, dass die Mehrzahl der Mutanten mit dem Vpr WT vergleichbar effizient in das virale Partikel inkorporiert werden. Die Mutationen C76A und P35A scheinen jedoch, trotz gleicher Expressionsmengen in den Produktionszellen, die Fähigkeit von Vpr ins Virion aufgenommen zu werden zu verringern. Die Mutante L64P wird in den Produktionszellen schwächer exprimiert und ist im viralen Partikel nicht detektierbar. Die 64-68A Mutante wurde nicht auf Inkorporationseffizienz untersucht, weißt aber vermutlich den gleichen Phänotyp auf wie Vpr L64P.

#### **7.4.6 Untersuchung der Fähigkeit der Vpr Mutanten die Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase zu induzieren**

Die Vpr induzierte Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase ist die am besten untersuchte Funktion des Proteins. Indem es den Übergang von der G2- in die M-

Phase blockiert, hält es die Zelle in einem erhöhten Transkriptionslevel und verstärkt so die virale Genexpression. [67; 68]. Um die Vpr Mutanten auf dessen Fähigkeit zur Blockade des Zellzyklus zu testen, wurden Jurkat Zellen mit den unterschiedlichen transkomplementierten Viren infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und die Zellzyklusphasen mittels anschließender Durchflusszytometrie analysiert.



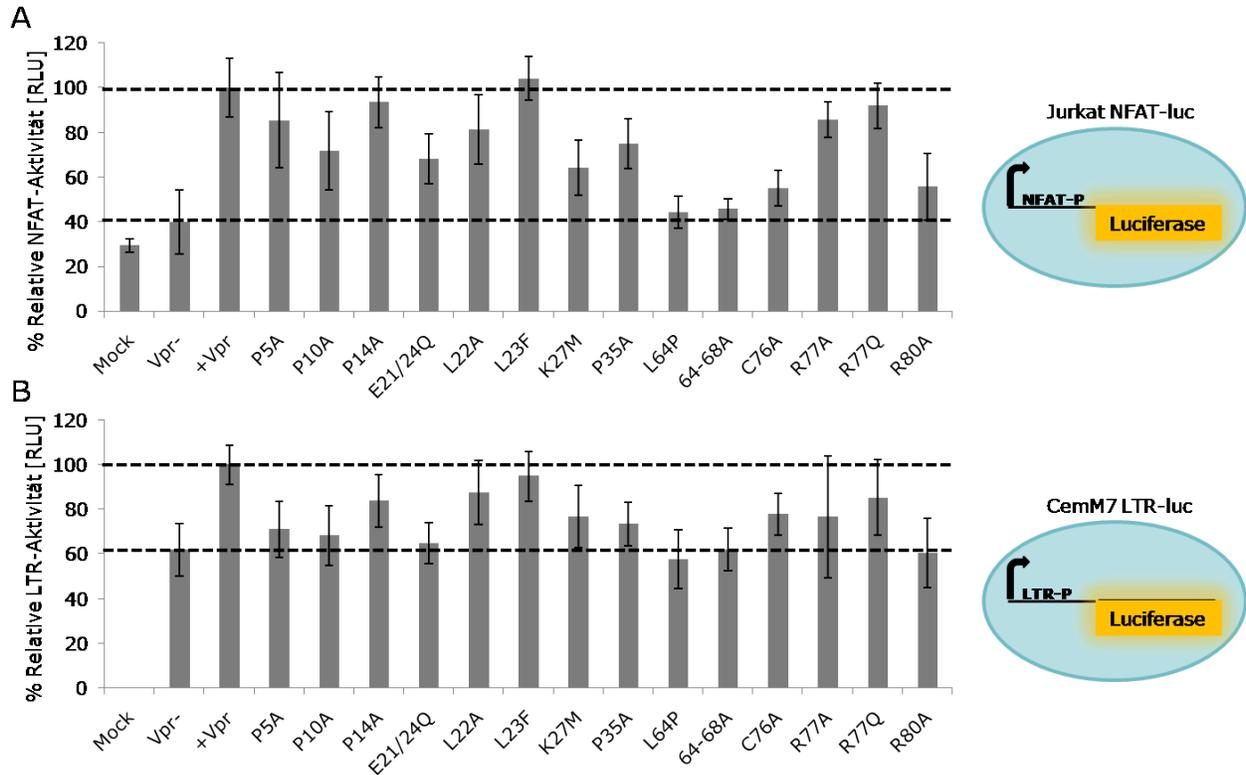
**Abbildung 19: Untersuchung der Fähigkeit der Vpr Mutanten die Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase zu induzieren.**

(A) Beispielhafte Darstellung der Gating Strategie für die Durchflusszytometrie-basierte Analyse der Zellzyklusphase. (B) Jurkat Zellen wurden mit transkomplementierten Reporterviren der verschiedenen Vpr Mutanten infiziert. Zur Identifikation der infizierten Zellen in der anschließenden Durchflusszytometrie dient die GFP Expression. 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert und mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Zur Berechnung wurde die Anzahl der Zellen in der G2 Phase durch die Anzahl der Zellen in der G1 Phase dividiert. Das Diagramm repräsentiert die Ergebnisse und die Standardabweichung aus N=2 unabhängigen Versuchen.

Transfektion der Zellen mit Vpr WT erhöht den Anteil an Zellen in der G2/M Phase um das 10-fache im Vergleich zur Negativkontrolle. Bei der Transfektion der Mutanten P14A, P35A und E21/24Q befinden sich weniger Zellen in einem G2/M-Arrest. Die Vpr-Varianten K27M, L64P, 64-68A, C76A und R80A sind hingegen nicht dazu in der Lage einen Arrest des Zellzyklus in der G2/M Phase in Jurkat Zellen zu induzieren. Die meisten Vpr Mutanten, die für die Vermittlung des G2/M-Arrests defekt sind, tragen eine Mutation in der 3.Helix.

#### **7.4.7 Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung und LTR-Transaktivierung in Reporterzellen**

Wie bereits in vorhergehenden Versuchen gezeigt werden konnte, ist Vpr in der Lage die NFAT-Aktivierung zu steigern und die LTR-Transaktivierung zu erhöhen [81, 82, 83, 138]. Ziel der vorangegangenen funktionellen Charakterisierung der unterschiedlichen Vpr Mutanten war es herauszufinden, ob eine der bekannten Funktionen mit der NFAT-Aktivierung in Zusammenhang steht. Um dies zu überprüfen, wurden die Vpr Varianten auf NFAT- und LTR-Aktivierung untersucht. Für diesen Versuch wurden die Reporterzelllinien Jurkat NFAT-Luc und CemM7 LTR-Luc verwendet. CemM7 LTR-Luc Zellen kodieren für ein Luziferasegen unter der Kontrolle der HIV-1 LTR. Die Luziferaseaktivität ist direkt proportional zur LTR Transaktivierung in CemM7 LTR-Luc, bzw. zur NFAT-Aktivität in Jurkat NFAT-Luc Zellen. Beide Reporterzelllinien wurden mit den transkomplementierten Viren der verschiedenen Vpr Mutanten infiziert, anschließend wurde mittels eines Luziferase-Assays die LTR-Transaktivierung, bzw. die NFAT-Aktivität detektiert.



**Abbildung 20: Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung und LTR-Transaktivierung in Reporterzellen.**

(A) Jurkat NFAT-Luc und (B) CemM7 LTR-Luc Zellen wurden mit 10ng p24 transkomplementiertem HIV-1 WT, Vpr- und den unterschiedlichen Vpr Mutanten infiziert und nach 30 Stunden ein Luziferase-Assay durchgeführt. Jurkat NFAT-Luc Zellen wurden zusätzlich 8 Stunden vor jeder Messung mit PHA stimuliert. Die Diagramme repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichungen von N= 6 aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die Infektion mit Vpr WT transkomplementiertem HIV-1 zeigt eine 60 % höhere NFAT-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb.20). Die Mutanten L64P, 64-68A, C76A und R80A sind nicht in der Lage, NFAT in dem Maße wie Vpr WT zu induzieren. Die Vpr Varianten L64P, 64-68A und C76A zeigen keine, bzw. eine sehr geringe NFAT-Aktivierung. Diese Mutanten werden allerdings nicht oder nur in einer geringen Menge in Virionen inkorporiert. Die Infektion mit Vpr WT transkomplementierten Viren zeigt eine 40 % höhere LTR-Transaktivierung im Vergleich zu der Negativkontrolle. Die Mutanten L64P, 64-68A, E21/24Q und R80A

zeigen keine LTR-Transaktivierung im Vergleich zur Negativkontrolle. Weitere Mutanten weisen eine moderat bis stark verringerte Funktionalität auf. Grundsätzlich konnten bei der Analyse der LTR-Transaktivierung keine starken Unterschiede zwischen den einzelnen Vpr Mutanten detektiert werden.

#### **7.4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung der Vpr Mutanten**

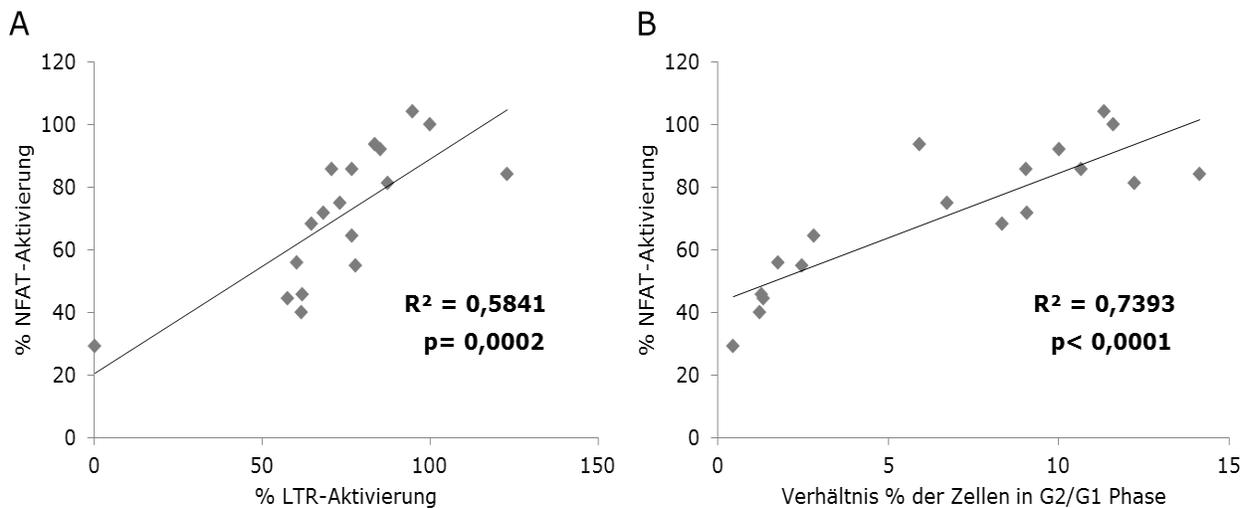
Um die untersuchten Eigenschaften aller Vpr-Mutanten zu vergleichen und Zusammenhänge einzelner Funktionen zu analysieren, wurden die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung in der Tabelle 8 zusammengefasst:

***Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung der Vpr Mutanten***

<b>+</b>	Aktiv
<b>(+)</b>	Attenuierte Aktivität im Vergleich zu NL4-3 Vpr
<b>-</b>	Inaktiv
<b>N</b>	Lokalisation im Nukleus
<b>ZA</b>	Zytoplasmatische Akkumulation
<b>NPK</b>	Lokalisation am <i>Nuclear-Pore</i> Komplex
<b>D</b>	Diffuse Lokalisation

		Lokalisation	Oligomerisierung	PARP-1 Translokation	NFAT-Aktivierung	LTR-Transaktivierung	Vermittlung des G2-Arrest in Jurkat Zellen	Apoptose	Verpackung in Virionen
<b>NL4-3 Vpr</b>		NPK	+	+	+	+	+	+	+
<b>N-Term</b>	P 5A	NPK	(+)	+	+	(+)	+	+	+
	P 10A	NPK	+	+	(+)	(+)	+	+	+
	P 14A	NPK	+	+	+	(+)	(+)	+	+
<b>Helix 1</b>	E21/24Q	N	-	-	(+)	-	+	+	+
	L22A	NPK	-	(+)	+	+	+	+	+
	L23F	N	-	-	+	+	+	+	+
	K27M	ZA	(+)	-	(+)	(+)	-	-	+
<b>Linker 1</b>	P 35A	N	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>Helix 3</b>	L64P	D	-	-	-	-	-	-	-
	64-68A	D	(+)	-	-	-	-	-	-
	C 76A	NPK	-	(+)	-	(+)	-	(+)	(+)
	R 77A	NPK	+	(+)	+	+	+	+	+
	R 77Q	NPK	+	(+)	+	+	+	+	+
<b>C-Term</b>	R 80A	NPK	+	+	-	-	-	+	+

Die Durchführung einer Korrelationsanalyse sollte zeigen, ob einzelne Vpr Funktionen mit der Vpr-vermittelten NFAT-Aktivierung in Zusammenhang stehen. Dies könnte Rückschlüsse auf den zu Grunde liegenden Mechanismus zulassen. Da mit Vpr transkomplementierten Viren gearbeitet wurde, führt eine schwächere oder nicht vorhandene Inkorporation bei den betroffenen Vpr Mutanten zu verminderten Effekten bei den Infektionsversuchen. Die Translokation von PARP1, die Vermittlung von Apoptose sowie die Lokalisation von Vpr spielen für die Verstärkung der NFAT-Aktivierung vermutlich keine Rolle. Beispielweise induziert die R80A Mutante Apoptose und die Translokation von PARP-1, ist aber defekt in der Verstärkung der NFAT-Aktivierung. Die qualitative Analyse suggeriert die Korrelation zwischen NFAT-Aktivierung durch Vpr und G2/M-Arrest sowie Erhöhung der LTR-Transaktivierung (Tabelle 8). Diese Funktionen wurden quantitativ mit Graph Pad Prism 5.0 korreliert und statistisch analysiert (Abbildung 21).



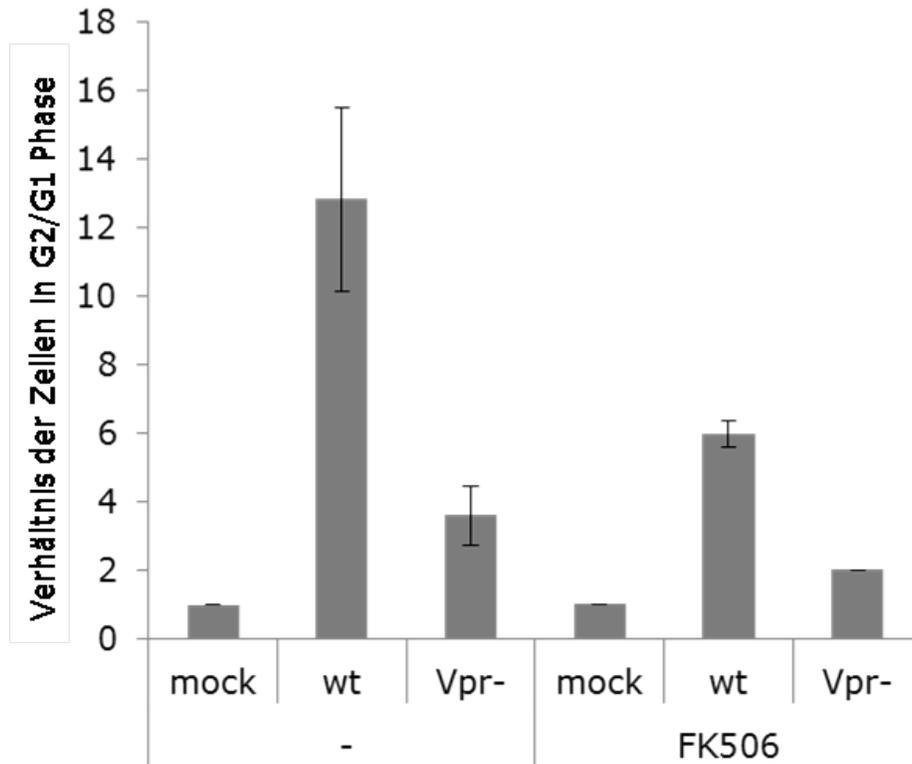
**Abbildung 21: Korrelationsanalyse der Vpr vermittelten NFAT-Aktivierung mit G2/M-Arrest und LTR Transaktivierung.**

(A) Die prozentuale NFAT-Aktivierung der verschiedenen Vpr Mutanten wurden gegen die prozentuale LTR-Aktivierung durch Vpr aufgetragen. Bei allen Funktionen wurde der Effekt durch Vpr WT als 100 % definiert. (B) Die Ergebnisse der NFAT-Aktivierung der verschiedenen Vpr Mutanten wurden gegen die Daten des Vpr-vermittelten G2-Arrests aufgetragen. Die Korrelationsanalysen, sowie die Bestimmung der Signifikanz (Students T Test) wurden mit dem Program Graph Pad Prism5.0 durchgeführt.

Diese Analyse zeigte dass Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung und die LTR-Transaktivierung sowie NFAT Aktivierung und G2/M-Arrest signifikant miteinander korrelieren. Diese Daten sind ein Hinweis darauf, dass ein mechanistischer Zusammenhang zwischen diesen Funktionen bestehen könnte.

### **7.5 Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung steht in mechanistischem Zusammenhang mit dem durch Vpr induzierten G2/M-Arrest**

Um zu überprüfen, ob die NFAT-Aktivierung und die Vpr induzierte Blockade des Zellzyklus in einem mechanistischen Zusammenhang steht, wurde der Effekt des NFAT-Inhibitors FK506 auf den Vpr-vermittelten G2/M-Arrest untersucht. Jurkat Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit FK506 behandelt bevor sie mit HIV-1 NL4-3 eGFP und Vpr defekten Viren infiziert wurden. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Jurkat Zellen mit Propidiumiodid gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Zellzyklusphase der infizierten Zellen bestimmt, welche anhand der GFP Expression identifiziert werden konnten.



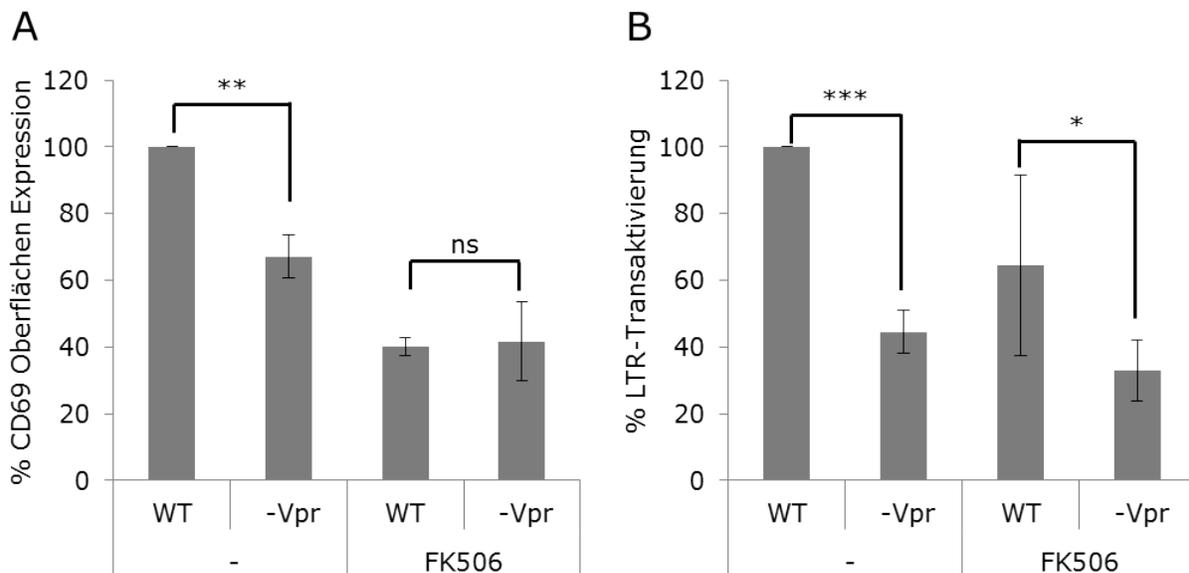
**Abbildung 22: Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung steht in mechanistischem Zusammenhang mit dem durch Vpr induzierten G2/M-Arrest.**

Jurkat Zellen wurden mit HIV-1 WT und der Vpr- Variante des GFP Reportervirus infiziert. Ein Teil der Zellen wurde mit dem NFAT-Inhibitor FK506 für 1 Stunde vorinkubiert. Zur Identifizierung der infizierten Zellen in der anschließenden FACS Analyse diente die GFP Expression. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit 2 % PFA fixiert und mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Analyse des Zellzyklus erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Das Diagramm repräsentiert die Mittelwerte und die Standardabweichung von N= 3

Die Behandlung der Zellen mit FK506 inhibiert den Vpr-vermittelten G2/M-Arrest in HIV-1 NL4-3 eGFP infizierten Jurkat Zellen, wobei die Behandlung der HIV-1 Vpr-eGFP infizierten Zellen keinen Einfluss hat. Die Verwendung des NFAT-Inhibitors FK506 allein hat keinen Einfluss auf den Zellzyklus im Vergleich zu unbehandelten Jurkat Zellen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Vpr induzierte Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase abhängig vom Transkriptionsfaktor NFAT ist.

## 7.6 Vpr-vermittelte T-Zellaktivierung und LTR-Transaktivierung in PBMCs ist NFAT-abhängig

In einem nächsten Schritt sollte der Effekt des NFAT-Inhibitors auf die Vpr induzierte T-Zellaktivierung und die LTR-Transaktivierung in PBMCs untersucht werden. PBMCs wurden unbehandelt belassen oder mit FK506 behandelt, bevor sie mit HIV-1 NL4-3 eGFP und Vpr- Viren infiziert wurden. 4 Tage nach Infektion wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CD69 inkubiert und fixiert. Zusätzlich wurde die LTR-Transaktivierung über die Fluoreszenzintensität von GFP mittels Durchflusszytometrie untersucht.



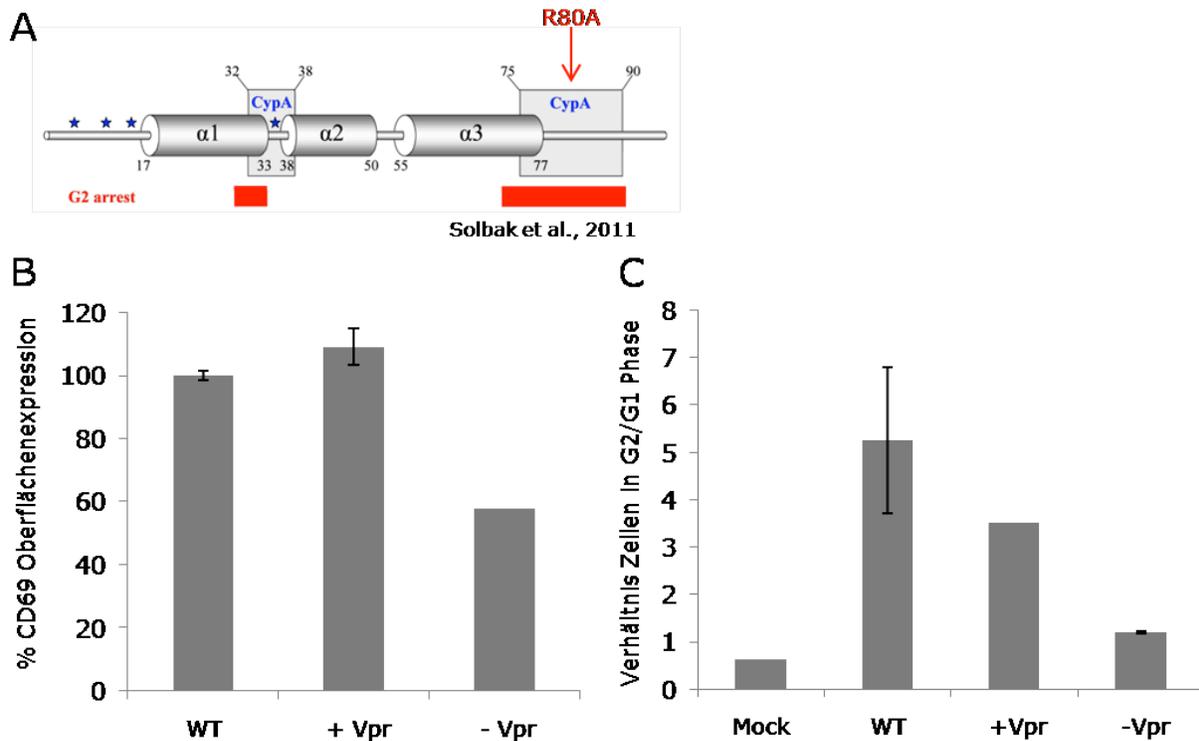
**Abbildung 23: Vpr-vermittelte T-Zellaktivierung und LTR-Transaktivierung in PBMCs ist NFAT-abhängig.**

PBMCs wurden drei Tage mit PHA vorstimuliert und anschließend mit den entsprechenden HIV-1 NL4-3 eGFP und Vpr- Viren infiziert. Ein Teil der Zellen wurde eine Stunde vor der Infektion mit FK506 vorinkubiert. (A) 3 Tage nach der Infektion wurden die Zellen erneut mit PHA stimuliert, 12 Stunden später wurde die Oberflächenfärbung mit fluoreszenzmarkiertem CD69 Antikörper durchgeführt und (B) die mittlere GFP Fluoreszenzintensität der Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Fluoreszenzintensitäten aus N= 4 (2 Spender). (\*\* p=0,0018; \*\*\* p < 0,0001; ns p=0,7634; \* p=0,0346)

Durch die Zugabe von FK506 kann die Vpr induzierte Expression von CD69 in PBMCs komplett inhibiert werden, es ist kein Unterschied zwischen HIV-1 NL4-3 eGFP und der Vpr- infizierten Zellen detektierbar. Die Behandlung der Zellen mit FK506 führt auch zu einer deutlich reduzierten Vpr-vermittelten LTR-Transaktivierung, die Unterschiede bleiben jedoch signifikant. Diese Daten legen einen mechanistischen Zusammenhang zwischen der NFAT-Aktivierung und der verstärkten CD69 Oberflächenexpression, sowie der LTR-Transaktivierung nahe und bestätigen somit vorherige Annahmen der Korrelationsanalysen.

### **7.7 Die Vpr induzierte T-Zellaktivierung und der G2/M-Arrest sind Cyclophilin A unabhängig**

Die Vpr Mutante R80A ist defekt für NFAT-Aktivierung, für die LTR-Transaktivierung und die Induktion des G2/M-Arrests. Ansonsten weist sie den gleichen Phänotyp auf wie Vpr WT. Die Punktmutation R80A befindet sich in einer von zwei Cyclophilin A (CypA) Bindestellen (Abb.: 24 A). CypA ist ein multifunktionales Protein und gehört zur Familie der Immunophiline [187]. Cyp A interagiert mit dem Immunosuppressiva CsA und inhibiert so die Enzymaktivität von Calcineurin, was die NFAT-Aktivierung blockiert [174, 175]. Um zu überprüfen, ob CypA für die Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung und die damit verknüpften Funktionen wichtig ist, wurden CypA -/- Jurkat Zellen mit HIV-1 NL4-3 eGFP, Vpr- und Vpr transkomplimentierten Viren infiziert. Anschließend wurde bei infizierten Zellen die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 und die Zellzyklusphase mittels Durchflusszytometrie analysiert.



**Abbildung 24: Die Vpr induzierte T-Zellaktivierung und der G2/M-Arrest sind CypA unabhängig.**

(A) Darstellung der Bindungsstelle für CypA im Vpr Protein. (B) Jurkat CypA  $-/-$  Zellen wurden mit WT, Vpr- und transkomplimentierten Vpr Reporterviren infiziert. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit PHA stimuliert und 8 Stunden später eine Oberflächenfärbung mit einem fluoreszenzmarkierten CD69 Antikörper durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. (C) 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit 2 % PFA fixiert und mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Analyse der Zellzyklusphase erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Abbildungen B und C repräsentieren Daten aus N=2 Versuchen.

Sowohl die Infektion mit HIV-1 NL4-3 eGFP als auch die mit Vpr-transkomplimentierten Viren induziert eine verstärkte Oberflächenexpression von CD69 in CypA $-/-$  Jurkat Zellen. Auch der Vpr-vermittelte G2/M-Arrest kann in diesen Zellen detektiert werden. Diese Daten zeigen, dass sowohl die Vpr-vermittelte T-Zellaktivierung als auch die Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase CypA unabhängig sind.

## 8 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass Virus assoziiertes HIV-1 Vpr früh nach der Infektion die Aktivierung des zellulären Transkriptionsfaktors NFAT induziert. Dadurch erfolgt die NFAT Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo der Transkriptionsfaktor die Genexpression verschiedener Interleukine, unter anderem von IL-2 induzieren kann. Aufgrund dessen könnte die Vpr induzierte NFAT Translokation ein wichtiger Faktor für die Aktivierung von T-Zellen während der HIV-1 Infektion sein. Ruhende T-Zellen können durch HIV-1 zwar infiziert werden, es findet aber keine effiziente Synthese viraler Gene statt. Um diese frühe Blockade des Replikationszyklus zu überwinden, muss die virale Genexpression induziert werden. Der Transaktivator der HIV-1 LTR ist das virale Tat Protein. Da Tat nicht in Viruspartikel eingebaut wird, muss die initiale Transaktivierung der LTR Tat-unabhängig erfolgen. Durch die NFAT Translokation und die damit verbundene Induktion der LTR Promotoraktivität könnte Vpr ein essentieller Aktivator der LTR in der Frühphase der Infektion sein. Außerdem scheint NFAT die Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase zu kontrollieren und somit die Wirtszelle in einen aktivierten Zustand zu überführen.

Um den Mechanismus der Vpr-vermittelten NFAT-Aktivierung zu untersuchen, wurde ein Set unterschiedlicher Vpr Mutanten auf Grundlage des HIV-1 NL4-3 Vpr generiert und in verschiedenen funktionellen Assays charakterisiert. Die Mutanten wurden dafür auf deren subzelluläre Lokalisation, Multimerisierung, PARP-1 Translokation, Vermittlung von Apoptose und Inkorporation in Viruspartikel untersucht. Weiterhin wurden im viralen Kontext deren Fähigkeit zur T-Zellaktivierung, Induktion des G2-Arrests und die Vermittlung der HIV-1 LTR-Transaktivierung untersucht.

Die funktionelle Charakterisierung der Vpr Mutanten ergab eine Korrelation zwischen der LTR-Transaktivierung, dem G2/M-Arrest und der Vpr-vermittelten NFAT-Aktivierung, nicht aber mit den anderen getesteten Funktionen des Proteins. Da eine Korrelation zweier Funktionen kein Beweis für einen mechanistischen

Zusammenhang darstellt, wurden Versuchen mit dem Inhibitor FK506 durchgeführt. Dieser Inhibitor blockiert, ähnlich wie das bekanntere Cyclosporin A, die Aktivität des Kalzium-sensitiven Proteins Calcineurin, welches die inaktive Form von NFAT dephosphoryliert und somit aktiviert. FK506 wird bereits seit längerem bei der Behandlung von Transplantationspatienten verwendet um Abwehrreaktionen auf das eingesetzte Organ zu verringern [173]. Der Wirkmechanismus der beiden Inhibitoren ist sehr ähnlich. Beide Moleküle binden an zelluläre Immunophiline, FK506 bindet an das FKBP12 (*FK Binding Protein 12*) und CsA an Cyclophilin A, sie werden daher als *Co-Drugs* bezeichnet [174, 175]. Diese Komplexe inhibieren die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin, wodurch NFAT nicht aktiviert werden kann. Für die Versuche wurde FK506 verwendet, da es im Vergleich zu CsA eine 50-100 fach erhöhte Wirksamkeit und eine höhere Spezifität aufweist [176, 177]. Allerdings sind beide Inhibitoren nicht NFAT spezifisch, sondern können auch andere *Down-Stream* Prozesse beeinflussen, die durch Calcineurin gesteuert werden. Durch die Inhibition der NFAT-Aktivität konnte die Vpr-vermittelte HIV-1 LTR-Transaktivierung in PBMCs, sowie die Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase in Jurkat Zellen deutlich reduziert oder sogar blockiert werden. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Vpr-vermittelte Steigerung der NFAT-Aktivität sowohl für die LTR-Transaktivierung, also auch für die Induktion des G2/M-Arrest wichtig ist. Zusätzlich weisen die Inhibitor-Versuche darauf hin, dass durch die Vpr vermittelte NFAT-Aktivierung die LTR-Transaktivierung und die Induktion des G2/M-Arrest reguliert werden kann.

Die HIV-1 LTR verfügt über unterschiedliche Promotorsequenzen, unter anderem auch für NFAT. Die wichtigste Promotorsequenz zur Transaktivierung der LTR ist die für den Transkriptionsfaktor NFκB. Allerdings ist bekannt, dass an diesen Promotor nicht nur NFκB binden kann, sondern auch NFAT1 und NFAT2 [131]. In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass NFAT die virale Transkription und die vermehrte Expression von p24 in T-Zellen verstärkt [131]. Obwohl die LTR von HIV-1 ebenfalls NFAT-Promotorsequenzen aufweist, handelt es sich bei diesen eher um sogenannte *negative regulatory elements* (NRE) deren Funktion noch unklar ist. Der Effekt von NFAT auf die virale Transkription konnte der Bindung von

NFAT an den NFκB-Promotor zugeschrieben werden [131]. Die Vpr vermittelte Steigerung der NFAT-Aktivität könnte zu einer Bindung des Transkriptionsfaktors an die Promotersequenzen der HIV-1 LTR führen und so dessen Transaktivierung verstärken. Diese Hypothese wird durch die Korrelation der Vpr-vermittelten NFAT Aktivierung mit der LTR Aktivität und der Blockade der LTR Transaktivierung durch FK506 gestützt.

Wie die vorher erwähnten Inhibitor Versuche zeigen konnten, ist die Vpr-induzierte Blockade des Zellzyklus in der G2/M-Phase ebenfalls NFAT-abhängig. NFAT reguliert neben der Expression verschiedener Interleukine auch die Expression unterschiedlicher CDKs und Cycline [178]. Für den Übergang der G2-Phase in die M-Phase des Zellzyklus ist der Komplex aus CyclinB1 und p34Cdc2 wichtig. Vpr bindet an Cdc25C und verhindert so die Aktivierung des CyclinB1- p34Cdc2 Komplexes, was die Blockade des Zellzyklus induziert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass NFAT während der T-Zellaktivierung einen negativ-regulatorischen Effekt auf die Expression von Cyclin B1 ausübt [179]. Am Ende der S-Phase bildet Cyclin A einen Komplex mit CDK1 und CDK2, dies sorgt für den Übergang in die G2-Phase. NFAT verstärkt die Expressionslevel von Cyclin A und erhöht so dessen Konzentration in der Zelle [180]. Somit könnte Vpr durch die direkte Interaktion mit Cdc25C, aber auch durch die Aktivierung von NFAT und die damit verbundene Dysregulation von Cyclin A und B1 die Zelle in der G2/M Phase arretieren.

Die durch Vpr verstärkte NFAT-Aktivierung wurde zunächst in den Jurkat NFAT-Luc Reporterzellen gezeigt. Die für diese Versuche verwendeten HIV-1 Virusstocks waren mit Vpr transkomplementiert. Die detektierte NFAT-Aktivierung wurde also durch Virus-assoziiertes Vpr induziert. Zusätzlich findet die Erhöhung der NFAT-Aktivität zu einem frühen Zeitpunkt nach der Infektion statt und erreicht ihr Maximum 32 Stunden nach der Exposition mit den Viren. Dies unterstützt unsere Hypothese, dass Vpr als Aktivator in die Wirtszelle eingeschleust wird um dort die ruhende T-Zelle in einen aktiven Zustand zu überführen. Auch das virale Nef Protein erhöht die Aktivität von NFAT. Obwohl Nef bereits von der nicht-integrierten viralen DNA translatiert wird [182, 183], ist Vpr sehr viel früher in der Wirtszelle

vorhanden. Außerdem ist die Translation der mRNA von Nef, welche durch die nicht-integrierte DNA transkribiert wird, limitiert durch die sehr geringe Menge an Rev und Tat zu diesem Zeitpunkt [184]. Des Weiteren hat die Expression von Nef in Cem Zellen ihren Höhepunkt 48 h nach der Infektion [184]. Da die in dieser Arbeit ermittelte maximale NFAT-Aktivierung bereits 32 Stunden nach der Infektion statt findet, spielt die Nef vermittelte NFAT-Aktivierung bei der initialen LTR Transaktivierung und Regulation des G2/M-Arrest vermutlich keine wichtige Rolle. Somit sind die Ergebnisse auf die funktionelle Expression von Vpr zurück zu führen.

Die Steigerung der NFAT-Aktivität könnte außerdem zu einer erhöhten IL-2 Expression in der Zelle und somit zur Aktivierung der Wirtszelle führen, wodurch die virale Genexpression und Replikation gesteigert werden könnte [145]. Zusätzlich wird das produzierte IL-2 von der Wirtszelle sekretiert und sorgt so für die Aktivierung von umliegenden Zellen, welches eine Virusausbreitung begünstigt [185]. Es gibt Hinweis darauf, dass Vpr durch infizierte Zelle sekretiert wird und in nicht-infizierte Zellen über eine Protein-Transduktionsdomäne eindringen kann [156]. Sekretiertes Vpr könnte umliegende Zellen bereits vor einer Infektion in einen aktiven Zustand überführen und so die effiziente Virusreplikation vorbereiten. Interessanter Weise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden das Viren, welche mit der Vpr Mutante R80A transkomplementiert wurden, keine Steigerung der NFAT-Aktivierung vermitteln. Die Punktmutation der Mutante liegt im Bereich der Protein-Transduktionsdomäne. Die NFAT-Aktivierung könnte also sowohl durch Virus-assoziiertes, als auch durch sekretiertes Vpr verstärkt werden.

Vpr könnte den NFAT-Signalweg über unterschiedliche Mechanismen modulieren. Vpr soll Ionenkanal-ähnliche Strukturen bilden, die für Kationen durchlässig sind [48]. Die Aktivierung von NFAT findet über das Kalzium-sensitive Enzym Calcineurin statt. Der durch Vpr gebildete Ionenkanal könnte die Zellmembran oder auch die Membran des endoplasmatischen Reticulums für Kalzium Ionen permeabel machen und somit die NFAT-Aktivität verstärken. Für die Manipulation des NFAT-Signalweges ist auch eine direkte Interaktion von Vpr mit Calcineurin oder indirekt über Calmodulin denkbar. Vpr ist ein kleines multifunktionales Protein, welches viele

zelluläre Interaktionspartner hat. Es könnte als Adapterprotein zwischen Calmodulin und Calcineurin fungieren, deren Bindung verstärken und somit die Wirkung der enzymatischen Aktivität von Calcineurin verstärken.

Ein weiterer möglicher Mechanismus der NFAT-Aktivierung ist die Interaktion mit Vpr und dem zelluläre Immunophilin Cyclophilin A welches in Anwesenheit des Immunsuppressiva CsA an dieses bindet und Calcineurin inaktiviert. Die zuvor bereits erwähnte Vpr Mutante R80A weist eine Punktmutation in einer der beiden Bindestellen für CypA auf. Diese Mutante ist selektiv defekt für die NFAT-Aktivierung, LTR-Transaktivierung und die Induktion des G2/M-Arrest. Die Bedeutung von CypA für die Vpr-vermittelte T-Zellaktivierung konnte durch CypA-defekte Jurkat Zellen untersucht werden. Diese Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Vpr induzierte T-Zellaktivierung und der G2/M-Arrest CypA-unabhängig sind.

Vpr induziert die Translokation des DNA-Reparaturproteins PARP-1 aus dem Zellkern in das Zytoplasma [142] und PARP-1 soll NFAT-1 inhibieren [143]. Durch die Vpr-induzierte Translokation von PARP-1 könnte dessen inhibitorischer Effekt auf NFAT durch räumliche Separation verhindert werden. Anhand der Mutanten-Studie konnte allerdings keine Korrelation zwischen der Vpr-vermittelten PARP-1 Translokation und der NFAT-Aktivierung ermittelt werden. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die Vpr induzierte PARP-1 Translokation zur Steigerung der NFAT-Aktivität führt.

Zusammenfassend konnten die mechanistischen Studien dieser Arbeit belegen, dass CypA und PARP-1 nicht verantwortlich sind für die Steigerung der NFAT Aktivität durch Vpr. In laufenden Experimenten wird der potentielle Effekt von Vpr auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration und die Interaktion mit Calcineurin oder Calmodulin untersucht.

Um den Effekt von Vpr auf die T-Zellaktivierung in primären Zellen zu untersuchen wurden PBMCs infiziert und deren Aktivierungszustand über die Oberflächenexpression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 untersucht. Zusätzlich wurde auch die LTR-Transaktivierung über die GFP Expression der Reporterviren ermittelt. Die mit Vpr defektem HIV-1 infizierten PBMCs zeigten sowohl eine

signifikant reduzierte CD69 Oberflächenexpression, als auch eine stark verringerte LTR-Transaktivierung im Vergleich zu den HIV-1 WT infizierten Zellen. Um diese Ergebnisse mit der Vpr-vermittelten NFAT-Aktivierung in einen mechanistischen Zusammenhang zu bringen wurden die Zellen in einem weiteren Versuch vor und während der Infektion mit FK506 behandelt und so die NFAT-Aktivierung inhibiert. Dies resultierte in einer reduzierten Vpr-abhängigen CD69-Oberflächenexpression und LTR-Transaktivierung. Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass die Steigerung der NFAT-Aktivität durch Vpr die T-Zellaktivierung induziert und die HIV-1 LTR-Transaktivierung in primären T-Zellen verstärkt.

Vpr ist besonders für die Infektion von nicht-teilenden Zellen wie Makrophagen wichtig. Auch in diesem Zellsystem sollte die Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung untersucht werden. Nach ihrer Aktivierung wird die NLS von NFAT exponiert und das Protein kann in den Zellkern wandern um dort an seine Promotorsequenzen zu binden. Nach Infektion der MDMs wurde die Vpr-abhängige Translokation von NFAT in den Zellkern mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die Auswertung der mikroskopischen Untersuchung zeigt, dass Vpr die Translokation von NFAT in den Zellkern verstärkt. Die Behandlung der Zellen mit CsA und FK506 konnte diese Translokation blockieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Vpr in Makrophagen die NFAT-Aktivierung induziert. Die Funktion von NFAT in Makrophagen ist bis heute weitgehend unbekannt. NFAT reguliert in Makrophagen die Genexpression und Ausschüttung verschiedener Zytokine, wie IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  [186]. Wird IL-6 durch Makrophagen sekretiert, werden dadurch CD3+ T-Lymphozyten rekrutiert. Zu diesen Zellen zählen auch CD4+ T-Zellen, welche die hauptsächlichen Zielzellen für die HIV-1 Infektion sind. Die Vpr-vermittelte NFAT-Aktivierung in Makrophagen könnte somit zu verstärkter IL-6 Sekretion führen, und die Rekrutierung und Infektion von CD4+ T-Zellen begünstigen. Dies wäre ein wichtiger Mechanismus der HIV-1 Transmission in unterschiedliche Organe. Des Weiteren könnte die vermehrte Ausschüttung von IL-12 und TNF- $\alpha$  zu einer erhöhten Aktivierung von nicht infizierten T-Zellen führen, was die virale Replikation in infizierten, aber bis dato ruhenden Zellen verstärken könnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass HIV-1 auch in Makrophagen einen G2/M-Arrest

induziert und dies mit der Produktion von p24 korreliert [151]. Ob diese Mechanismen Vpr und NFAT abhängig sind ist momentan allerdings nicht experimentell belegt und muss in weiteren Studien geklärt werden.

Die chronische Aktivierung des Immunsystems im Verlauf der HIV Infektion steht in direkten Zusammenhang mit dem Verlust an CD4+ T Zellen, der AIDS-Progression und der viralen Replikation. Die Menge der CD4+ T Zellen im Blut HIV Infizierter wird als Maß für den Krankheitsverlauf herangezogen [188]. Hauptsächlich sind davon *Memory* CD4+ und CD8+ T-Zellen betroffen [188, 189]. Diese Zellen zeigen eine verstärkte Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern, wie zum Beispiel CD38 und HLA-DR [190], spontaner Apoptose und erhöhter Zellzyklusrate [189, 191]. Meistens sind diese Zellen weder HIV spezifisch, noch HIV infizierte [192, 193]. Auch nicht-infizierte B-Zellen sind von der HIV Infektion betroffen, was sich an der Änderung der Subpopulation und an der Hyperaktivierung zeigt [194, 195]. Besonders die chronische Aktivierung von CD4+ Zellen fördert die virale Replikation, da hauptsächlich diese Zellen für die Virus-Produktion verantwortlich sind. In ruhenden T-Zellen kommt es zu keiner effizienten viralen Genexpression, da die Transaktivierung der LTR durch zelluläre Kofaktoren wie NfκB [88, 89], SP1 [81, 171], und NFAT [131] ausbleibt oder die LTR epigenetisch inaktiviert ist. Durch die permanente generalisierte Immunaktivierung kommt es zum induzierten Zelltod und zum Verlust von CD4 T-Zellen. Dieser T-Zellverlust kann im fortgeschrittenen Stadium der Infektion nicht mehr durch die Neubildung kompensiert werden. Das so geschwächte Immunsystem ist nicht mehr in der Lage andere Infektionen und Erreger abzuwehren und es kommt zum AIDS Stadium mit ausgeprägten opportunistischen Erkrankungen, die schließlich zum Tode führen. Moderne Medikamente sind heute in der Lage den Krankheitsverlauf stark zu verzögern und die Anzahl an CD4+ T Zellen über Jahre konstant zu halten. Die Medikamente sind allerdings mit starken Nebenwirkungen verbunden und die Einstellung der Medikamente auf die Patienten muss ständig überprüft werden. Dies führt immer noch zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität. Zusätzlich führen die Medikamente häufig zur Resistenzbildung, was die Etablierung neuer Medikamente und Therapieansätze notwendig macht. Da die Hyperaktivierung ein entscheidender

Faktor bei der AIDS-Progression ist, wurden bereits klinische Studien mit immunsuppressiven Medikamenten durchgeführt. Cyclosporin A hatte einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Krankheit und die Anzahl der CD4+ T Zellen. In einigen Fällen standen die Patienten der Studie mehr als 8 Jahre unter klinischer Beobachtung, ohne dass es zu einer AIDS-Progression kam [132, 133]. Eine weitere Studie zeigte, dass während der Behandlung mit CsA keiner der Patienten an AIDS erkrankte und die Anzahl der CD4+ T Zellen konstant blieb. Nach Beendigung der Behandlung sank die Anzahl an CD4+ Zellen allerdings ab [135]. Jedoch hatte in einer anderen Studie CsA alleine, oder in Kombination mit HAART keinen positiven Effekt auf die CD4+ T Zellzahl oder Funktionalität des Immunsystems [172]. Die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse sind unklar, es ist jedoch möglich, dass nicht nur die CsA Dosis und die Dauer der Behandlung eine wichtige Rolle spielen, sondern auch weitere Faktoren, wie zum Beispiel das Krankheitsstadium der Patienten. Der Einsatz von CsA in der HIV Therapie ist daher noch umstritten, könnte aber in Kombination mit HAART die AIDS-Progression verlangsamen. Ein Problem ist, dass Immunsuppressiva zum Teil schwere Nebenwirkungen verursachen und somit nicht für die Langzeittherapie geeignet sind. Alternativ könnte die Aufklärung der Mechanismen der HIV-vermittelten Immunhyperaktivierung zu neuen Ansätzen für die Therapie von HIV Patienten führen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Vpr NFAT Aktivierung verstärkt und dadurch verschiedene bekannte Vpr Funktionen wie LTR-Aktivierung und G2/M Arrest reguliert. Außerdem trägt Vpr dadurch vermutlich zur Immunhyperaktivierung und effizienten viralen Replikation im Verlauf der HIV-Infektion bei. Somit leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der HIV-1 assoziierten Hyperaktivierung des Immunsystems und der AIDS Pathogenese.

## 9 Literaturverzeichnis

[1] G. Myers, G. N. Pavlakis (1992): Evolutionary potential of complex retroviruses. In: J. Levy (Hrsg.): The Retroviridae. Vol. 1 Plenum Press, New York.

[2] Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A. and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N. Engl. J. Med. 305, 1425-1431.

[3] Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C. et al. (1983). Isolation of a Tlymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220, 868-871.

[4] Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H. and Vogt, P. (1986). What to call the AIDS virus? Nature 321, 10.

[5] Clavel, F., Guyader, M., Guetard, D., Salle, M., Montagnier, L. and Alizon, M. (1986). Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. Nature 324, 691-695.

[6] Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F. et al. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and non pandemic HIV-1. Science 313, 523-526.

[7] Peeters, M., Honoré C., Huet, T., Bedjabaga, L., Ossari, S., Bussi, P., Cooper, RW. And Delaporte, E.(1989). Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. AIDS: 625-30.

[8] Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H. and Johnson, P. R. (1989). An african primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. Nature 339, 389- 392.

- [9] Brennan, C. A., et al. (2008). The prevalence of diverse HIV-1 strains was stable in Cameroonian blood donors from 1996 to 2004. *J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.* 49:432–439
- [10] Gao, F., et al. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 397:436–441.
- [11] Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F. et al. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and non pandemic HIV-1. *Science* 313, 523-526.
- [12] Simon, F., et al. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* 4:1032–1037.
- [13] Takehisa, J., et al. (2009). Origins and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *J. Virol.* 83:1635–1648
- [14] Plantier, J.-C., et al. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15:871–872.
- [15] Van Heuverswyn, F., et al. (2006). SIV infection in wild gorillas. *Nature* 444:164.
- [16] Vallari et al. (2011); Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon; *Journal of Virology* vol. 85 no. 3 1403-1407.
- [17] John A. G. Briggs and Hans-Georg Kräusslich (2011); The Molecular Architecture of HIV; *J. Mol. Biol.*
- [18] Cohen, E. A., Dehni, G., Sodroski, J. G. and Haseltine, W. A. (1990). Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* 64, 3097-3099.
- [19] Liu, H., Wu, X., Newman, M., Shaw, G. M., Hahn, B. H. and Kappes, J. C. (1995). The vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J. Virol.* 69, 7630-7638.

- [20] Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H. R. and Krausslich, H. G. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* 219, 228-236.
- [21] Eckert MD, Kim SP. (2001). Mechanisms of virale membrane fusion and its inhibition. *Annual Review of Biochemistry* Vol. 70: 777-810.
- [22] Zwick, M. B., Saphire, E. O. and Burton, D. R. (2004). gp41: HIV's shy protein. *Nat. Med.* 10, 133-134.
- [23] Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.
- [24] Bukrinsky, M. I., Sharova, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S. and Stevenson, M. (1992). Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6580-6584.
- [25] Angela Ciuffi and Frederic D. Bushman (2006); Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75; *TRENDS in genetics*.
- [26] Miller, M. D., Farnet, C. M. and Bushman, F. D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: Studies of organization and composition. *J. Virol.* 71, 5382-5390.
- [27] Pollard, V. W. and Malim, M. H. (1998). The HIV-1 rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 491-532.
- [28] Bulletin of the World Health Organisation, 65 (4): 453-463 (1987). Immunology of HIV infection and AIDS Memorandum from a WHO/IUIS Meeting
- [29] Lackritz, EM., Satten, GA., Aberle-Grasse, J., Dodd, RY., Raimondi, VP., Janssen, RS., Lewis, WF., Notari, EP 4th. and Petersen, LR. (1995). Estimated risk of transmission of the human immunodeficiency virus by screened blood in the United States. *N Engl J Med*:1721-5.

- [30] Ioannidis, Abrams, Ammann, Bulterys, Goedert, Gray, Korber, Mayaux, Mofenson, Newell, Shapiro, Teglas und Wilfert. (2001). Perinatal Transmission of Human Immunodeficiency Virus 1 by Pregnant Women with RNA Virus Loads <1000 Copies/mL. *The Journal of Infectious Diseases*.
- [31] Ono, A. and Freed, E. O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13925-13930.
- [32] Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., Nguyen, P. L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A. T. et al. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 200, 749-759.
- [33] Centlivre, M., Sala, M., Wain-Hobson, S. and Berkhout, B. (2007). In HIV-1 pathogenesis the die is cast during primary infection. *AIDS* 21, 1-11.
- [34] Ragni MV, Urbach AH, Taylor S, Claassen D, Gupta P, Lewis JH, Ho DD and Shaw GM. (1987). Isolation of human immunodeficiency virus and detection of HIV DNA sequences in the brain of an ELISA antibody-negative child with acquired immune deficiency syndrome and progressive encephalopathy. *J Pediatr.* Jun; 110(6):892-4.
- [35] Guido Silvestri<sup>1,2</sup>, Mirko Paiardini<sup>1</sup>, Ivona Pandrea<sup>3,4</sup>, Michael M. Lederman<sup>4</sup> and Donald L. Sodora (2007); Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts; *Science in medicine* Vol. 117.
- [36] Michael Schindler, Jan Münch, Olaf Kutsch, Hui Li, Mario L. Santiago, Frederic Bibollet-Ruche, Michaela C. Müller-Trutwin, Francis J. Novembre, Martine Peeters, Valerie Courgnaud, Elizabeth Bailes, Pierre Roques, Donald L. Sodora, Guido Silvestri, Paul M. Sharp, Beatrice H. Hahn, and Frank Kirchhoff (2006); Nef-Mediated Suppression of T Cell Activation Was Lost in a Lentiviral Lineage that Gave Rise to HIV-1; *Cell*.
- [37] Stevenson, M. (2003). HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* 9, 853-860.

[38] Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M. and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123-126.

[39] Leligidowicz, A., Yindom, L. M., Onyango, C., Sarge-Njie, R., Alabi, A., Cotten, M., Vincent, T., da Costa, C., Aaby, P., Jaye, A. et al. (2007). Robust gag-specific T cell responses characterize viremia control in HIV-2 infection. *J. Clin. Invest.* 117, 3067-3074.

[40] Tungaturthi et al. (2004); HIV-1 Vpr: Genetic Diversity and Functional Features from the Perspective of Structure; *DNA and Cell Biology*.

[41] Müller B, Tessmer U, Schubert U, Kräusslich HG. (2000); Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Protein Is Incorporated into the Virion in Significantly Smaller Amounts than Gag and Is Phosphorylated in Infected Cells; *JVI* 9727-31

[42] Volker M. Vogt<sup>1,\*</sup> and Martha N. Simon (1999). ; Mass determination of Rous sarcoma virus virions by scanning transmission electron microscopy. *J. Virol.*

[43] Bachand, F., Yao, X. J., Hrimech, M., Rougeau, N. & Cohen, E. (1999). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 Gag precursor. *J BiolChem* 274, 9083–9091.

[44] Lavalley, C., Yao, X. J., Ladha, A., Gottlinger, H., Haseltine, W. A. & Cohen, E. A. (1994). Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J Virol* 68, 1926–1934.

[45] Romani B., Engelbrecht S. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions. *Journal of General Virology* 90, 1795-1805.

- [46] Tungaturthi PK., Sawaya BE., Singh SP. et al. (2003). Role of HIV-1 Vpr in AIDS pathogenesis: relevance and implications of intravirion, intracellular and free Vpr. *Biomed Pharmacother.* 57:20-24.
- [47] Schwartz S, Felber BK, Pavlakis GN. (1991). Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is REv-dependent and regulated by splicing. *Virology* 183:677-686.
- [48] Piller, S. C., Ewart, G. D., Jans, D. A., Gage, P. W. & Cox, G. B. (1999). The amino-terminal region of Vpr from human immunodeficiency virus type 1 forms ion channels and kills neurons. *J. Virol* 73, 4230–4238.
- [49] Rogel, M. E., Wu, L. I. & Emerman, M. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol* 69, 882–888.
- [50] Vodicka, M. A., Koepf, D. M., Silver, P. M. & Emerman, M. (1998). HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev* 12, 175–185.
- [51] Felzien, L. K., Woffendin, C., Hottiger, M. O., Subbramanian, R. A., Cohen, E. A. & Nabel, G. J. (1998). HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5281–5286.
- [52] Ramanathan, M. P., Curley, E., III, Su, M., Chambers, J. A. & Weiner, D. B. (2002). Carboxyl terminus of hVIP/mov34 is critical for HIV-1- Vpr interaction and glucocorticoid-mediated signaling. *J BiolChem* 277, 7854–47860.
- [53] Sawaya, B. E., Khalili, K., Gordon, J., Taube, R. & Amini, S. (2000). Cooperative interaction between HIV-1 regulatory proteins Tat and Vpr modulates transcription of the viral genome. *J BiolChem* 275, 35209–35214.
- [54] Morellet N, Bouaziz S, Petitjean P, Roques BP (2003) NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J MolBiol* 327:215–227

- [55] Schuler W, Wecker K, de Rocquigny H et al (1999) NMR structure of the (52–96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: molecular insights into its biological functions. *J Mol Biol* 285:2105–2117
- [56] Tungaturthi, P. K., Sawaya, B. E., Ayyavoo, V., Murali, R. & Srinivasan, A. (2004). HIV-1 Vpr: genetic diversity and functional features from the perspective of structure. *DNA Cell Biol* 23, 207–222.
- [57] Piller, S. C., Jans, P., Gage, P. W. & Jans, D. A. (1998). Extracellular HIV-1 virus protein R causes a large inward current and cell death in cultured hippocampal neurons: implications for AIDS pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4595–4600.
- [58] Roumier, T., Vieira, H. L., Castedo, M., Ferri, K. F., Boya, P., Andreau, K., Druillennec, S., Joza, N., Penninger, J. M. & other authors (2002). The C-terminal moiety of HIV-1 Vpr induces cell death via a caspase independent mitochondrial pathway. *Cell Death Differ* 9, 1212–1219.
- [59] Srinivasan, A., Ayyavoo, V., Mahalingam, S., Kannan, A., Boyd, A., Datta, D., Kalyanaraman, V. S., Cristillo, A., Collman, R. G. & other authors (2008). A comprehensive analysis of the naturally occurring polymorphisms in HIV-1 Vpr: potential impact on CTL epitopes. *Virology* 380, 99.
- [60] Schang, L. M. (2003). The cell cycle, cyclin-dependent kinases, and viral infections: new horizons and unexpected connections. *Prog Cell Cycle Res* 5, 103–124.
- [61] Suzuki, T., Yamamoto, N., Nonaka, M., Hashimoto, Y., Matsuda, G., Takeshima, S. N., Matsuyama, M., Igarashi, T., Miura, T. & other authors (2009). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr–importin interactions as a novel HIV-1 therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 380, 838–843.
- [62] Le Rouzic, E. & Benichou, S. (2005). The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2, 11.

- [63] Le Rouzic & Benichou (2002); Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1; *J BiolChem*.
- [64] Marie A. Vodicka, Deanna M. Koepp, Pamela A. Silver, and Michael Emerman (1998); HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection; *Genes* 175–185.
- [65] Zeitle r& Weis (2004); The FG-repeat asymmetry of the nuclear pore complex is dispensable for bulk nucleocytoplasmic transport in vivo. *J. Cell Biol*.
- [66] Sherman MP, de Noronha CM, Heusch MI, Greene S, Greene WC (2001); Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr; *J. Virol*.
- [67] Belzile, J. P. (2007); HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1–CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog*.
- [68] Elder RT, Yu M, Chen M, Zhu X, Yanagida M, Zhao Y. (2001); HIV-1 Vpr induces cell cycle G2 arrest in fission yeast (*Schizosaccharomycespombe*) through a pathway involving regulatory and catalytic subunits of PP2A and acting on both Wee1 and Cdc25. *Virology*.
- [69] Goh WC, Manel N, Emerman M. (2004); The human immunodeficiency virus Vpr protein binds Cdc25C: implications for G2 arrest. *Virology* 318(1):337-49.
- [70] J He, S Choe, R Walker, P Di Marzio, D O Morgan, and N R Landau (1995); Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J. Virol*. 6705–6711.
- [71] Kino T, Gragerov A, Valentin A, Tsopanomialou M, Ilyina-Gragerova G, Erwin-Cohen R, Chrousos GP, Pavlakis GN. (2005); Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to 14-3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C: implications for cell cycle arrest. *J Virol* 79(5):2780-7.
- [72] Higa, L. A. & Zhang, H. (2007); Stealing the spotlight: CUL4–DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy. *Cell Div*.

[73] Jin, J. (2006). A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Mol Cell*.

[74] Jacotot, E. (2000). The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* 191, 33–45.

[75] Jacotot, E., Ferri, K. F., El Hamel, C., Brenner, C., Druillennec, S., Hoebeke, J., Rustin, P., Me´tivier, D., Lenoir, C. & other authors (2001). Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein R and Bcl-2. *J Exp Med* 193, 509–519.

[76] Yedavalli, V. S. R. K., Shih, H. M., Chiang, Y. P., Lu, C. Y., Chang, L. Y., Chen, M. Y., Chuang, C. Y., Dayton, A. I., Jeang, K. T. & Huang, L. M. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with antiapoptotic mitochondrial protein HAX-1. *J Virol* 79, 13735–13746.

[77] Arunagiri, C., Macreadie, I., Hewish, D. & Azad, A. (1997). A C-terminal domain of HIV-1 accessory protein Vpr is involved in penetration, mitochondrial dysfunction and apoptosis of human CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *Apoptosis* 2, 69–76.

[78] Andersen, J. L., Le Rouzic, E. & Planelles, V. (2008). HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp Mol Pathol* 85, 2–10.

[79] Chang, L. J., Chen, C. H., Urlacher, V. & Lee, T. F. (2000). Differential apoptosis effects of primate lentiviral Vpr and Vpx in mammalian cells. *J Biomed Sci* 7, 322–333.

[80] Conti, L., Matarrese, P., Varano, B., Gauzzi, M. C., Sato, A., Malorni, W., Belardelli, F. & Gessani, S. (2000). Dual role of the HIV-1 Vpr protein in the modulation of the apoptotic response of T cells. *J Immunol* 165, 3293–3300.

[81] Pauls, E., Senserrich, J., Clotet, B. & Este, J. A. (2006). Inhibition of HIV-1 replication by RNA interference of p53 expression. *J Leukoc Biol* 80, 659–667.

- [82] Wang, L., Mukherjee, S., Jia, F., Narayan, O. & Zhao, L. J. (1995). Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *J BiolChem* 270, 25564–25569.
- [83] Wang, L., Mukherjee, S., Narayan, O. & Zhao, L. J. (1996). Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* 178, 7–13.
- [84] Zou, H., Yang, R., Hao, J., Wang, J., Sun, C., Fesik, S. W., Wu, J. C., Tomaselli, K. J. & Armstrong, R. C. (2003). Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J BiolChem* 278, 8091–8098.
- [85] Ramanathan, M. P., Curley, E., III, Su, M., Chambers, J. A. & Weiner, D. B. (2002). Carboxyl terminus of hVIP/mov34 is critical for HIV-1-Vpr interaction and glucocorticoid-mediated signaling. *J BiolChem* 277, 47854–47860.
- [86] Kino, T., Gragerov, A. & Slobodskaya, O. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J Virol* 76, 9724–9734.
- [87] Shrivastav, S., Kino, T., Cunningham, T., Ichijo, T., Schubert, U., Heinklein, P., Chrousos, G. P. & Kopp, J. B. (2008). Human immunodeficiency virus (HIV)-1 viral protein R suppresses transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and inhibits adipocyte differentiation: implications for HIV-associated lipodystrophy. *MolEndocrinol* 22, 234–247.
- [88] Agostini, I., Navarro, J. M., Bouhamdan, M., Willetts, K., Rey, F., Spire, B., Vigne, R., Pomerantz, R. & Sire, J. (1999). The HIV-1 Vpr co-activator induces a conformational change in TFIIB. *FEBS Lett* 450, 235–239.
- [89] Varin, A., Decrion, A. Z., Sabbah, E., Quivy, V., Sire, J., Lint, C. V., Roques, B. P., Aggarwal, B. B. & Herbein, G. (2005). Synthetic Vpr protein activates activator

protein-1, c-jun N-terminal kinase, and NF- $\kappa$ B and stimulates HIV-1 transcription in promonocytic cells and primary macrophages. *J Biol Chem* 280, 42557–42567.

[90] Poon, B., Chang, M. A. & Chen, I. S. Y. (2007). Vpr is required for efficient Nef expression from unintegrated HIV-1 DNA. *J Virol* 81, 10515–10523.

[91] Muthumani, K., Hwang, D. S., Choo, A. Y., Mayilvahanan, S., Dayes, N. S., Thieu, K. P. & Weiner, D. B. (2004b). HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells in vitro. *Int Immunol* 17, 103–116.

[92] Andersen, J. L. & Planellas, V. (2005). The role of Vpr in HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV Res* 3, 43–51.

[93] Moon, H. S. & Yang, J. S. (2006). Role of HIV Vpr as a regulator of apoptosis and an effector on bystander cells. *Mol Cells* 21, 7–20.

[94] Muthumani, K., Choo, A. Y., Zong, W. X., Madesh, M., Hwang, D. S., Premkumar, A., Thieu, K. P., Emmanuel, J., Kumar, S. & other authors (2006). The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1. *Nat Cell Biol* 8, 170–179.

[95] Basavapathruni, A. & Anderson, K. S. (2007). Reverse transcription of the HIV-1 pandemic. *FASEB J* 21, 3795–3808.

[96] Li, Y., Zhang, Z., Wakefield, J. K., Kang, S. M. & Morrow, C. D. (1997). Nucleotide substitutions within U5 are critical for efficient reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 with a primer binding site complementary to tRNA<sup>His</sup>. *J Virol* 71, 6315–6322.

[97] Berkhout, B. & de Ronde, A. (2004). APOBEC3G versus reverse transcriptase in the generation of HIV-1 drug-resistance mutations. *AIDS* 18, 1861–1863.

[98] Keele, B. F., Giorgi, E. E., Salazar-Gonzalez, J. F., Decker, J. M., Pham, K. T., Salazar, M. G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S. & other authors (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl Acad Sci U S A* 105, 7552–7557.

- [99] Chen, R., Le Rouzic, E., Kearney, J. A., Mansky, L. M. & Benichou, S. (2004). Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *J Biol Chem* 279, 28419–28425.
- [100] Mansky, L.M. (1996). The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. *Virology* 222, 391–400.
- [101] Bouhamdan, M., Benichou, S., Rey, F., Navarro, J. M., Agostini, I., Spire, B., Camonis, J., Slupphaug, G., Vigne, R. & other authors (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to the uracil DNA glycosylase DNA repair enzyme. *J Virol* 70, 697–704.
- [102] Stark, L. A. & Hay, R. T. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral protein R (Vpr) interacts with Lys-tRNA synthetase: implications for priming of HIV-1 reverse transcription. *J Virol* 72, 3037–3044.
- [103] Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17, 2205–2232.
- [104] Graef, I. A., Chen, F. & Crabtree, G. R. (2001). NFAT signaling in vertebrate development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 505–512.
- [105] Crabtree, G. R. & Olson, E. N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109, S67–S79.
- [106] Kiani, A. et al. (2004). Expression and regulation of NFAT (nuclear factors of activated T cells) in human CD34+ cells: downregulation upon myeloid differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 76, 1057–1065.
- [107] Lopez-Rodriguez, C., Aramburu, J., Rakeman, A. S. & Rao, A. (1999). NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 7214–7219.

[108] Luo, C. et al. (1996). Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3955–3966.

[109] Chuvpilo, S. et al. (1999). Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J. Immunol.* 162, 7294–7301.

[110] Chen, L., Glover, J. N., Hogan, P. G., Rao, A. & Harrison, S. C. (1998) Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 392, 42–48.

[111] Macain F. (2005); NFAT Proteins: Key regulators of T-cell development and function. *Nature*.

[112] Garcia-Cozar, F. J. et al. Two-site interaction of nuclear factor of activated T cells with activated calcineurin. *J. Biol. Chem.* 273, 23877–23883 (1998).

[113] Aramburu, J. et al. (1998) Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol. Cell* 1, 627–637.

[115] Okamura, H. et al. (2000) Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol. Cell* 6, 539–550.

[116] Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P. & Crabtree, G. R. (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275, 1930–1934.

[117] Diehn, M. et al. (2002) Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 11796–11801.

[118] Riley, J. L. et al. (2002) Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 11790–11795.

- [119] Peng, S. L., Gerth, A. J., Ranger, A. M. & Glimcher, L. H. (2001) NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 14, 13–20.
- [120] Baksh, S. et al. (2002) NFATc2-mediated repression of cyclin dependent kinase 4 expression. *Mol. Cell* 10, 1071–1081.
- [121] Macian, F., Im, S. H., Garcia-Cozar, F. J. & Rao, (2004) A. T-cell anergy. *Curr.Opin.Immunol.*16, 209–216.
- [122] Schwartz, R. H. (2003) T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 305–334.
- [123] Macian, F. et al. (2002) Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109, 719–731.
- [124] Gremese, E. & Ferraccioli, G. F. (2004) Benefit/risk of cyclosporine in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*22, S101–S107.
- [125] Kaufman, D. B. et al. Immunosuppression: practice and trends. *Am. J. Transplant.* 4, 38–53 (2004).
- [126] Kiani, A., Rao, A. & Aramburu, J. (2000) Manipulating immuneresponses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* 12, 359–372.
- [127] Bechstein, W. O. (2000) Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl. Int.* 13, 313–326.
- [128] Olyaei, A. J., de Mattos, A. M. & Bennett, W. M. (2001) Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr.Opin.Crit. Care* 7, 384–389.
- [129] Aramburu, J. et al. (1999) Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science*285, 2129–2133.
- [130] Li, H., Rao, A., Hogan P. G. (2004) Structural delineation of the calcineurin–NFAT interactions and its parallels to PP1 targeting interactions. *J. Mol. Biol.* 342, 1659–1674.

[131] Cron R. Q.; (2000) NFAT enhances HIV-1 gene expression in primary human CD4 T-cells; *Clinical Immunol. ogy*.

[132] Bandini, G.; (1991) HIV infection and bone-marrow transplantation [letter; comment]. *Lancet*.

[133] Jacobson, S.; Outcome of HIV infection in transplant patients on cyclosporine [letter].*Lancet*, 1991.

[134] Schwarz A.; (1993) The effect of cyclosporine on progression of human immunodeficiency virus type 1 infection transmitted by transplantation: Data on four cases and review of the literature. *Transplantation*.

[135] Levy, R.; (1995) Long-term follow-up of HIV positive asymptomatic patients having received cyclosporine A. *Adv. Exp. Med. Biol*.

[136] Schnittman, S.; Preferential infection of CD4 memory T cells by human immunodeficiency virus typ 1: Evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990.

[137] Planelles, V., Benichou, S. (2009) Vpr and its interactions with cellular proteins. *Current Topics in Mikrobiologie und Immunologie* 339.

[138] Höhne, Kristin; (2010) Funktionelle Charakterisierung des HIV-1 Vpr Proteins, Master Thesis.

[139] Herwig Koppensteiner, Ruth Brack-Werner and Michael Schindler; (2012) Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology*.

[140] Rajan D; (2006) Effect of R77Q, R77A and R80A changes in Vpr on HIV-1 replication and CD4 T cell depletion in human lymphoid tissue ex vivo. *AIDS*.

[141] Banning C., Votteler J., Hoffmann D., Koppensteiner H., Warmer M., Reimer R., Kirchhoff F., Schubert U., Hauber J., Schindler M. (2010) A Flow Cytometry-

Based FRET Assay to Identify and Analyse Protein-Protein Interactions in Living Cells. PLoS One.

[142] K., Choo, AY., Zong, WX., Madesh, M., Hwang, DS., Premkumar, A., Thieu, KP., Emmanuel, J., Kumar, S., Thompson, CB., Weiner, DB. (2006). The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1. *Nat Cell Biol.* 8(3):299.

[143] Valdor R., Schreiber, V., Saenz a, L., Martinez, T., Muñoz-Suano, A., Dominguez-Villar, M., Ramírez, P., Parrilla, P., Aguado, A., García-Cózar, F., Y´elamos, J. (2008). Regulation of NFAT by poly (ADP-ribose) polymerase activity in T cells. *Molecular Immunology* 1863–1871

[144] Solbak SM (2010) The intriguing Cyclophilin A-HIV-1 Vpr interaction: prolylcis/trans isomerisation catalysis and specific binding. *BMC Struct Biol.*

[145] Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. (1988) Identification of a putative regulator of early T-cell activation genes. *Science*;241(4862):202-205.

[146] Votteler J, Studtrucker N, Sörgel S, Münch J, Rücker E, Kirchhoff F, Schick B, Henklein P, Fossen T, Bruns K, Sharma A, Wray V, Schubert U (2007) Proline 35 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Vpr Regulates the Integrity of the N-Terminal Helix and the Incorporation of Vpr into Virus Particles and Supports the Replication of R5-Tropic HIV-1 in Human Lymphoid Tissue Ex Vivo. *J Virol.*

[147] Aki Manninen, Päivi Huotari, Marita Hiipakka, G. Herma Renkema and Kalle 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. *J Virol.*

[148] Manninen A, Renkema GH, Saksela K. (2000) Synergistic activation of NFAT by HIV-1 nef and the Ras/MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 275:16513–16517.

[149] Elloumi HZ.A (2012) Cell Permeable Peptide Inhibitor of NFAT Inhibits Macrophage Cytokine Expression and Ameliorates Experimental Colitis. Plos One.

[150] Yarinina A, Xu K, Chen J, Ivashkiv LB. (2011) TNF activates calcium-nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 signaling pathways in human macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A.

[151] Wang X, Lewis DE. (2001) CD86 expression correlates with amounts of HIV produced by macrophages in vitro. Journal of Leukocyte Biology.

[152] Joëlle V. Fritz, Denis Dujardin, Julien Godet, Pascal Didier, Jan De Mey, Jean-Luc Darlix, Yves Mély, and Hugues de Rocquigny (2008) HIV-1 Vpr Oligomerization but Not That of Gag Directs the Interaction between Vpr and Gag. Retrovirologie.

[153] Yao XJ. (1995) Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. J Virol.

[154] Dineshkumar T. (2005) Structure-functional analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr: role of leucine residues on Vpr-mediated transactivation and virus replication. Virology.

[155] Piller, S. C., Ewart, G. D., Premkumar, A., Cox, G. B., and Gage P. W. (1996). Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. Vol. 93, pp. 111-115, January 1996 Biochemistry

[156] Sherman MP, Schubert U, Williams SA et al (2002) HIV-1 Vpr displays natural protein-transducing properties: implications for viral pathogenesis. Virology 302:95-105

[157] Lum JJ, et al. (2003) Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. J Clin Invest 111:1547-1554.

[158] Maudet C. (2011) Molecular Insight into How HIV-1 Vpr Protein Impairs Cell Growth through Two Genetically Distinct Pathways. J Biol Chem.

- [159] Jian H. and Zhao L.J. (2003) Pro-apoptotic activity of HIV-1 auxiliary regulatory protein Vpr is subtype-dependent and potently enhanced by non-conservative changes of the leucine residue at position 64. *J Biol Chem*.
- [160] Schröfelbauer B. (2007) HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- [161] Paxton W, Connor RI, Landau NR. (1993) Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol*.
- [162] Lindi Tan, Elana Ehrlich, and Xiao-Fang Yu. (2007) DDB1 and Cul4A Are Required for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr-Induced G2 Arrest. *J Virol*.
- [163] Hashizume C, et al. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with spliceosomal protein SAP145 to mediate cellular pre-mRNA splicing inhibition. *Microbes Infect*.
- [164] Venkatachari NJ. (2010) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: oligomerization is an essential feature for its incorporation into virus particles. *Virology Journal*.
- [165] Somasundaran, M., Sharkey, M., Brichacek, B., Luzuriaga, K., Emerman, M., Sullivan, J. L., and Stevenson, M. (2002) Evidence for a cytopathogenicity determinant in HIV-1 Vpr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99,9503–9508
- [166] Lum, J. J. (2003) Vpr Apoptotic Activity Determined by Leu64 and Viral Subtype 44329. Dardon, J., Cohen, E. A., and Badley, A. D. *J. Clin. Investig.*
- [167] Jacquot G. (2007) Localization of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope: Impact on Vpr functions and virus replication in macrophages. *Retrovirology*.
- [168] Zander K. (2003) Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression. *J Biol Chem*.

- [169] Orly Ardon, Erik S. Zimmerman, Joshua L. Andersen, Jason L. DeHart, Jana Blackett, and Vicente Planelles. (2006) Induction of G<sub>2</sub> Arrest and Binding to Cyclophilin A Are Independent Phenotypes of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr. *J Virol*.
- [170] Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwirth B, Walsh CT, Sodroski J, Göttlinger HG. (1994) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 1994.
- [171] Sawaya, B. E., Khalili, K., Mercer, W. E., Denisova, L. & Amini, S. (1998). Cooperative actions of HIV-1 Vpr and p53 modulate viral gene transcription. *J Biol Chem* 273, 20052–20057.
- [172] CALABRESE, L., LEDERMAN, M.M., PAREKH, N., SPRITZLER, J., COOMBS, R., AWEEKA, F., FOX, L., and ACTG 334 TEAM. (2000) A controlled trial of cyclosporine in HIV infection [abstract 373]. 7<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco.
- [173] Dumont FJ, (2000) FK506, An Immunosuppressant Targeting Calcineurin Function. *Current Medicinal Chemistry*.
- [174] Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*. 1989;341(6244):755–757.
- [175] Klee, C.B., Ren, H., Wang, X. J. (1998) Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *Biol. Chem.*, 13367-13370.
- [176] Dumont, F.J., Staruch, M.J., Koprak, S.L., Melino, M.R., Sigal, N.H. J. (1990) Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *Immunol.*, 144, 251-258.
- [177] Lin, C.S., Boltz, R.C., Siekierka, J.J., Sigal, N.H. (1991) FK-506 and cyclosporin A inhibit highly similar signal transduction pathways in human T lymphocytes. *Cell. Immunol.* 133, 269-284.

[178] Viola et al. NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res*, 2005.

[179] Caetano MS, Vieira-de-Abreu A, Teixeira LK, Werneck MB, Barcinski MA, Viola JP. (2002) NFATc2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB Journal*.

[180] Tomono M, Toyoshima K, Ito M, Amano H, Kiss Z. (1998) Inhibitors of Calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblasts. *Archives of Bio-Chemistry and Biophysics*.

[181] Palkowitsch L. (2011) The Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphatase calcineurin controls the formation of the Carma1-Bcl10-Malt1 complex during T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem*.

[182] Wu Y et al. (2001) Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science*.

[183] Gillim-Ross L et al. (2005) Nef expressed from human immunodeficiency virus type 1 extrachromosomal DNA downregulates CD4 on primary CD4+ T lymphocytes: implications for integrase inhibitors. *J Gen Virol*.

[184] Wu Y, Marsh J. (2003) Early transcription from nonintegrated DNA in human Immunodeficiency virus infection. *J Virol*.

[185] Chow C. (1999) Requirement for Transcription Factor NFAT in Interleukin-2 Expression. *Mol. Cell. Biol*.

[186] Fric J, Zelante T, Wong AY, Mertes A, Yu HB, Ricciardi-Castagnoli P. (2012) NFAT control of innate immunity. *Blood*.

[187] Ping Wang and Joseph Heitman. (2005) The cyclophilins. *Genome Biology*.

[188] Haas A. (2011) Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection. *J Virol*.

[189] Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, Miedema F, Hamann D. (2000) T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood*.

[190] Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. (2002) CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J. Immunol.*

[191] Hellerstein, M. K., and J. M. McCune. (1997) T cell turnover in HIV-1 disease. *Immunity*.

[192] Kaiser, P., et al. (2007). Productive human immunodeficiency virus type 1 infection in peripheral blood predominantly takes place in CD4/CD8 double-negative T lymphocytes. *J. Virol.* 81:9693–9706.

[193] Harper, M. E., L. M. Marselle, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal. (1986). Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:772–776.

[194] Lane, H. C., et al. (1983). Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 309:453–458.

[195] Moir, S., and A. S. Fauci. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9:235–245.

## 10 Abkürzungen

<b>AS</b>	Aminosäure
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AIDS</b>	acquired immunodeficiency syndrome
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>ca.</b>	circa
<b>cDNA</b>	complementäre DNA
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus
<b>CsA</b>	Cyclosporin A
<b>Dex</b>	Dexamethason
<b>DMEM</b>	Dulbecco`s modified eagle medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphate
<b>ds</b>	doppelsträngig
<b>E.coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>Env</b>	envelope

<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>FACS</b>	fluorescence activated cell sorter
<b>FKS</b>	fötales Kälberserum
<b>g</b>	Gramm
<b>Gag</b>	group specific antigen
<b>GFP</b>	green fluorescent protein
<b>eGFP</b>	enhanced green fluorescent protein
<b>Glu</b>	Glutamin
<b>GP</b>	Glykoprotein
<b>GR</b>	Glukokortikoidrezeptor
<b>h</b>	hour
<b>HAART</b>	highly active antiretroviral therapy
<b>HBS</b>	HEPES buffered saline
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienzvirus
<b>IL</b>	Interleukin
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>Lsg.</b>	Lösung
<b>IRES</b>	internal ribosomal entry site
<b>kB</b>	Kilobasen
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>l</b>	Liter

<b>LTR</b>	long terminal repeat
<b>m</b>	milli (10 <sup>3</sup> )
<b>μ</b>	mikro (10 <sup>6</sup> )
<b>M</b>	Molar (mol/l)
<b>MDM</b>	monocyte-derived macrophages
<b>min</b>	Minute
<b>MFI</b>	Mittlere Floureszenz Intensität
<b>n</b>	nano (10 <sup>9</sup> )
<b>nef</b>	negative factor
<b>NFAT</b>	nuclear factor of activated T-cells
<b>ORF</b>	open reading frame
<b>PARP-1</b>	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PBMC</b>	peripheral blood mononucleated cell
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pH</b>	potentium hydrogenii
<b>PHA</b>	Phytohämagglutinin
<b>Pol</b>	Polymerase
<b>Rev</b>	regulator of expression of virion proteins
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure

<b>rpm</b>	rounds per minute
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase oder Raumtemperatur
<b>ss</b>	single stranded
<b>SIV</b>	simian immunodeficiency virus
<b>SV40</b>	aimian virus 40
<b>Stabw</b>	Standardabweichung
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>tat</b>	transactivator of transcription
<b>TM</b>	Transmembranprotein
<b>vif</b>	viral infectivity factor
<b>Vol</b>	Volumen
<b>vpr</b>	viral protein R
<b>vpu</b>	viral protein out
<b>vpx</b>	viral protein x
<b>VSV</b>	vesicular stomatitis virus
<b>VSV-G</b>	vesicular stomatitis virus glycoprotein
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>www</b>	world wide web

## **11 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Michael Schindler, der mir dieses interessante Projekt ermöglicht hat. Besonders geschätzt habe ich die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die von ihm gewährte Freiheit, mein Projekt eigenständig vorantreiben zu können.

Ein weiterer Dank gilt meinen Gutachtern Frau Prof. Ulrike Protzer und PD Dr. Thomas Floss für die wertvolle wissenschaftliche Diskussion über mein Projekt!

Ein dickes Dankeschön an Carina Banning, Herwig Koppensteiner, Nicole Hagen, Karen Bayer, Stephan Hofmann, Marvin Gondim, Sebastian Bolduan! Es war mir ein Vergnügen mit dieser wundervollen Arbeitsgruppe gearbeitet zu haben! Ihr habt mich immer unterstützt und auch der Spaß ist nicht zu kurz gekommen, das werde ich euch nicht vergessen!!

Vielen Dank an Carolina Russo, Karen Bayer, Martha Schneider, Markus Helfer und meiner Mama für die vielen hilfreichen Korrekturvorschläge dieser Dissertation!

Ich möchte mich bei meiner Familie und Freunde für ihre Unterstützung bedanken, mit der sie mich nicht nur durch mein berufliches Leben begleiten! Ohne Eure Unterstützung hätte ich das nie geschafft!