Charakterisierung funktioneller Domänen des Vpr-Proteins von $SIV_{mac}239$

Diplomarbeit

aus dem Institut für Klinische und Molekulare Virologie
der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Betreuer:

Prof. Dr. Georg Fey
Lehrstuhl für Genetik
Institut für Biochemie, Mikrobiologie und Genetik

Prof. Dr. Bernhard Fleckenstein
Institut für Klinische und Molekulare Virologie

vorgelegt von
Alexander von Homeyer
aus Nürnberg

Erlangen, im Oktober 1998

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung 1

2. Einleitung 2

3. Aufgabenstellung 7

4. Ergebnisse 8
   - 4.1 Expressionsklonierung von vpr von SIVmac239 8
   - 4.2 Herstellung von vpr-Punktmutanten über PCR 11
   - 4.3 Austestung der Reaktivität monoklonaler Antikörper gegen Vpr 16
   - 4.4 Subzelluläre Lokalisation der Vpr-Proteine 19
   - 4.5 Untersuchung zur Gag-vermittelten Verpackung von SIVmac239 Vpr in Virus-ähnliche Partikel 24

5. Diskussion 32

6. Material und Methode 38
   - 6.1 Biologisches Material 38
   - 6.2 Nukleinsäuren 39
   - 6.3 Chemikalien und Reagenzien 41
   - 6.4 Biochemische und molekularbiologische Standardpuffer 44
   - 6.5 Medien 44
   - 6.6 Bakterienkultur 45
   - 6.7 Zellkulturverfahren 45
   - 6.8 DNA-Methoden 47
   - 6.9 Proteinmethoden 50
   - 6.10 Indirekte Immunfluoreszenz 52
   - 6.11 Computeranalysen 53

7. Abkürzungsverzeichnis 54

8. Literaturverzeichnis 57

9. Anhang 66

1. Zusammenfassung

Zusätzlich zu den retroviralen Strukturgenen *gag*, *pol* und *env* besitzen die Immundefizienzviren des Menschen (HIV-1 und HIV-2) und nichthumaner Primaten (*simian immunodeficiency viruses*, SIVs) eine Reihe regulatorischer Gene. Diese Gene werden in zwei Gruppen eingeteilt: Gene, die für die virale Replikation *in vitro* essentiell sind, und Gene, die nicht notwendig sind. Diese akzessorischen Gene beeinflussen die Replikation *in vivo* und die AIDS-Pathogenese positiv. Hierzu gehört das *vpr*-Gen, das zu den am höchsten konservierten regulatorischen Genen gehört und im zentralen Bereich des Genoms zu finden ist. Für HIV-1 Vpr konnten mehrere verschiedene Funktionen identifiziert werden. So wird die Verpackung des Vpr-Proteins in Viruspartikel durch die Interaktion mit der p6-Region des Pr55gag-Vorläuferproteins vermittelt. Die Expression von Vpr führt in eukaryonten Zellen zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase. Die Fähigkeit von Vpr, bestimmte Zellinien in die Differenzierung zu treiben, ist wahrscheinlich eine Konsequenz der Vpr-vermittelten Störung des normalen Zellzyklusablaufs. Untersuchungen zur Lokalisation von HIV-1 Vpr in der Zelle ergaben, daß es vorwiegend im Zellkern akkumuliert. Vpr weist jedoch kein klassisches basisches Kern-Lokalisationssignal auf, und bisher konnte noch kein definiertes Sequenzelement identifiziert werden, das für die nukleäre Lokalisation erforderlich ist. Darüberhinaus ist noch ungeklärt, inwiefern diese Vpr-vermittelten Funktionen die virale Pathogenität beeinflussen, und was der molekulare und biochemische Wirkungsmechanismus von Vpr ist. HIV-2 und SIV_{mac} tragen zusätzlich zu dem *vpr*-Gen ein *vpx*-Gen, das Sequenzhomologien zu *vpr* aufweist. Somit besteht die Möglichkeit, daß die verschiedenen Funktionen von HIV-1 Vpr bei HIV-2 und SIV_{mac} von den beiden Genen *vpr* und *vpx* wahrgenommen werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich das Vpr-Protein von SIV_{mac} in seinen Eigenschaften von HIV-1 Vpr unterscheidet, und es sollten funktionelle Domänen im Vpr-Protein von SIV_{mac} charakterisiert werden. Hierzu wurden in zwei konservierten Bereichen von SIV_{mac}239 *vpr* mittels Polymerase-Ketten-Reaktion Mutationen eingeführt. Anschließend wurden die konstruierten Vpr-Mutanten mittels indirekter Immunfluoreszenz auf ihre Lokalisation in COS-Zellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, daß das Wildtyp-Vpr-Protein im Zellkern akkumuliert. Im Gegensatz dazu führten die Mutationen im N- und C-terminalen Bereich zum Verlust der Kernlokalisation, und die mutierten Vpr-Proteine waren ausschließlich im Zytoplasma vorzufinden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Assoziation des Vpr-Proteins von SIV_{mac}239 mit Kapsid-Proteinen überprüft. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen konnte allerdings keine Verpackung in Viruspartikel festgestellt werden.

2. Einleitung

Die Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) wurde erstmals im Jahre 1981 bei einer Gruppe homosexueller Männer mit schweren opportunistischen Infektionen beschrieben (Gottlieb *et al*., 1981; Masur *et al*., 1981). Zwei Jahre später wurde durch die Arbeitsgruppen um Luc Montagnier und Robert Gallo erstmals ein Retrovirus isoliert, das als krankheitsverursachendes Agens beschrieben wurde (Barre-Sinoussi *et al*., 1983) und 1986 den Namen Humanes Immundefizienzvirus (HIV, *human immunodeficiency virus*) erhielt. Im selben Jahr wurde aus westafrikanischen AIDS-Patienten ein zweites humanpathogenes Virus isoliert, das als HIV Typ 2 bezeichnet wurde (Clavel *et al*., 1986a). Auch bei nichthumanen Primaten konnten Immundefizienzviren isoliert werden, die mit SIV (*simian immunodeficiency virus*) bezeichnet wurden (Daniel *et al*., 1985; Kanki *et al*., 1985). Untersuchungen zur Nukleinsäuresequenz und Antigenstruktur zeigten, daß HIV-2 eine wesentlich höhere Homologie zu einigen SIV-Isolaten aufweist als zu HIV-1 (Chakrabarti *et al*., 1987; Clavel *et al*., 1986b; Gao *et al*., 1992; Marx *et al*., 1991). Aufgrund der Genomstruktur und Sequenzhomologien des konservierten *pol*-Leserahmens werden die Primaten-Immundefizienzviren in fünf Hauptgruppen eingeteilt (Desrosiers, 1990; Luciw *et al*., 1992; Sakai *et al*., 1991).

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
HIV-1	HIV-2	SIV_{agm}	SIV_{mnd}	SIV_{syk}
SIV_{cpz}	SIV_{smm}			
	SIV_{mac}			
	SIV_{mne}			

Tab. 1 : Einteilung der Immundefizienzviren von Primaten in fünf Gruppen. Die Einteilung erfolgte auf der Basis des konservierten Leserahmens *pol*. Für den Vergleich der Sequenzen wurden Isolate aus Schimpansen (SIV_{cpz}, Huet *et al*., 1990), Halsbandmangaben ($SIV_{smm,}$ Fultz *et al*., 1986; Lowenstine *et al*., 1986; Murphy-Corb *et al*., 1986), Rhesusaffen ($SIV_{mac,}$ Daniel *et al*., 1985), Schweinsaffen (SIV_{mne}, Henderson *et al*., 1988), Afrikanischen Grünen Meerkatzen (SIV_{agm} Otha *et al*., 1988), Mandrillen (SIV_{mnd}, Tsujimoto *et al*., 1988) und Diademmeerkatzen (SIV_{syk}, Emau *et al*., 1991; Hirsch *et al*., 1993) verwendet.

Außer beim Menschen konnten klinische Symptome bisher nur bei mit SIV_{mac} infizierten Rhesusaffen festgestellt werden (Letvin *et al*., 1983). Freilebende Rhesusaffen weisen jedoch keine Seroprävalenz gegen SIV_{mac} auf. Aufgrund von phylogenetischen

Untersuchungen läßt sich schließen, daß SIV_{mac} aus speziesübergreifender Übertragung des Erregers SIV_{smm} von Halsbandmangaben auf Rhesusaffen hervorgegangen ist (Hirsch *et al.*, 1989). Halsbandmangaben zeigen eine hohe Seroprävalenz von ca. 50% auf, ohne daß Krankheitssymptome beobachtet werden (Fultz *et al.*, 1990). Ebenso verhält es sich mit Afrika-nischen Grünen Meerkatzen (Desrosiers *et al.*, 1990). Aufgrund dieser Kenntnisse vermutet man, daß die Infektion mit Immundefizienzviren im natürlichen Wirt apathogen verläuft und erst durch einen Wirtswechsel die Immundefizienz ausgelöst werden kann. Das klinische Krankheitsbild, das mit der SIV-Infektion in Rhesusaffen verbunden ist, ist dem Krankheitsbild von humanen AIDS-Patienten sehr ähnlich. Der Krankheitsverlauf ist jedoch beschleunigt, so daß 50% aller infizierten Tiere innerhalb eines Jahres AIDS entwickeln (King *et al.*, 1990). HIV und SIV besitzen einen hohen Tropismus für $CD4^+$-Zellen (Daniel *et al.*, 1985; Klatzmann *et al.*, 1984). SIV-infizierte Tiere entwickeln im frühen Stadium Lymphadenopathie und Splenomegalie, gefolgt von einer Abnahme der $CD4^+$-Lymphozyten. In der späten Krankheitsphase werden häufig eine Atrophie des Thymus und opportunistische Infektionen beobachtet.

Die Immundefizienzviren gehören zur Untergruppe der Lentiviren innerhalb der Retrovirusfamilie. Die Kapside der Retroviren enthalten zwei Kopien der einzelsträngigen, linearen RNA mit einem 5´-Cap und einem 3´-Poly-A-Ende. Die Größe liegt zwischen 8 und 12 Kilobasen. Die für Retroviren typischen Gene *gag*, *pol* und *env* kodieren für die Strukturproteine. Die mit der RNA komplexierten Nukleokapsidproteine sowie Matrixproteine und Kapsidproteine sind Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag). Das *env*-Gen kodiert für die mit der Hüllmembran assoziierten Glykoproteine gp41 und gp120. Durch Bindung an das CD4-Molekül und zelluläre Chemokinrezeptoren, die als Korezeptoren fungieren, vermittelt gp120 die Adsorption des Virus an seine Wirtszelle und anschließend die Penetration. Die vom *pol*-Gen kodierten Enzyme reverse Transkriptase, RNase H, Integrase und die Protease befinden sich im Viruskapsid. Durch reverse Transkription der RNA in doppelsträngige DNA zu Beginn des Replikationszykluses entstehen terminale Sequenzwiederholungen (LTRs, *long terminal repeats*), die dann die kodierenden Bereiche des Virusgenoms flankieren. Die LTRs enthalten neben Terminations- auch Promotor- und Enhancersequenzen. Durch die Integrase wird die DNA in das Wirtsgenom integriert, wo sie als Provirus persistiert.

Außer den genannten Strukturproteinen findet man fünf bis sechs weitere Gene, die für regulatorische Proteine kodieren. Hierzu gehören die beiden Regulatorproteine Tat und Rev, die für die virale Replikation essentiell sind. Bei Tat (*transactivator of transcription*) handelt es sich um einen Transaktivator, der zelltypabhängig die virale Transkription um einen Faktor 50 – 1000 steigert (Cullen, 1990). Das Tat-Protein interagiert mit zellulären Faktoren und bindet an das TAR-Element *(tat responsive element*) am 5´-Ende der viralen mRNA, das

eine ausgeprägte Sekundärstruktur aufweist (Herrmann *et al*., 1995; Kashanchi *et al*., 1994; Veschambre *et al*., 1997; Wei *et al*., 1998). Bei Rev (*regulator of expression of virion proteins*) handelt es sich um einen posttranskriptionellen Regulator, der den Export einfach gespleißter und ungespleißter mRNA aus dem Kern in das Zytoplasma fördert (Fischer *et al*., 1994). Seine Wirkung entfaltet es durch Bindung an das RRE-(*rev responsive element*)-Motiv, das nur auf ungespleißter oder einfach gespleißter mRNA vorkommt (Felber *et al*., 1989).

Zu den akzessorischen Genen gehören *vif*, *nef*, *vpu*, *vpx* und *vpr*, die für die virale Replikation in Zellkultur nicht essentiell sind. Das Vif-(*viral infectivity factor*)-Protein, das die Infektiosität der Nachkommenviren beeinflußt, scheint eine wichtige Rolle im Rahmen der reversen Transkription zu spielen (Borman *et al*., 1995; von Schwedler *et al*., 1993). Infektionsexperimente in Rhesusaffen mit *vif*-Deletionsmutanten von $SIV_{mac}239$ zeigten, daß diese Virusvarianten stark abgeschwächt infektiös sind (Desrosiers *et al*., 1998). Vif wird für einen korrekten Zusammenbau des Virions und für eine effiziente Env-vermittelte Infektion der Zielzellen benötigt (Bormann *et al.*, 1995). Das Nef-(*negative factor*)-Protein wird aminoterminal myristilliert und damit in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle verankert (Kaminchik *et al*., 1994; Yu *et al*., 1992). Es interagiert mit zellulären Tyrosin-Kinasen der Src-Familie und mit Serin/Threonin-Kinasen und greift so in die zelluläre Signaltransduktion ein (Du *et al.*, 1995; Lang *et al*., 1997; Saksela *et al*., 1995; Sawai *et al*., 1994). Außerdem führt es zu einer verminderten Expression des zellulären Oberflächenmarkers CD4 (Aiken *et al*., 1994; Rhee und Marsh, 1994). Zudem zeigen neuere Studien, daß Nef auch in Viruspartikel eingebaut wird (Bukovsky *et al*., 1997; Welker *et al*., 1996). Das *vpu*-Gen ist nur in HIV-1 und SIV-Isolaten aus Schimpansen zu finden. Das Vpu-Protein (*viral protein U*) bewirkt die Degradierung des Oberflächenmoleküls CD4 im endoplasmatischen Reticulum (Willey *et al*., 1992a). Dieser Abbau führt zu einer effizienteren Freisetzung von Nachkommenviren, da das virale Hüllprotein gp120 nicht mehr von CD4 komplexiert werden kann (Willey *et al*., 1992b). Folglich wird das gp120 in die Zytoplasmamembran eingelagert. Das Vpx-Protein (*viral protein X*), das nur von HIV-2, SIV_{mac}, SIV_{mne} und SIV_{smm} kodiert wird, ist ein Bestandteil des Viruspartikels. Es stabilisiert den viralen RNA-Proteinkomplex und fördert den Transport des viralen Präintegrationskomplexes in den Zellkern (Fletcher *et al*., 1996; Guyader *et al*., 1989). Die Replikationsfähigkeit der Viren in Makrophagen und peripheren Blutlymphozyten wird durch Vpx gesteigert (Guyader *et al*., 1989). Rhesusaffen, die mit *vpx*-Deletionsmutanten von $SIV_{mac}239$ infiziert waren, zeigten eine deutlich niedrigere Virusbeladung als Kontrolltiere, die mit Wildtyp $SIV_{mac}239$ infiziert waren (Gibbs *et al.*, 1994). Das *vpx*-Gen weist eine hohe Sequenzhomologie zu dem viralen *vpr*-Gen (*viral protein R*) auf, das in allen Immundefizienzviren von Primaten vorkommt. Es wird vermutet, daß das *vpx*-Gen entweder durch eine Duplikation des *vpr*-Vorläufergens oder durch Rekombination

zwischen zwei unterschiedlichen Immundefizienzviren und anschließende Segregation entstanden sein könnte (Sharp *et al*., 1996; Tristem *et al*., 1992).

Das Produkt des *vpr*-Gens ist ein 15 kDa-Protein, das bei allen Immundefizienzviren gut konserviert ist und in äquimolaren Mengen zu Gag in das virale Nukleokapsid verpackt wird (Cohen *et al.*, 1990a ; Yu *et al.*, 1990; Yuan *et al.*, 1990). Die Verpackung des Vpr-Proteins in Virionen wird durch das p6-Protein des Pr55gag-Vorläufers vermittelt (Kondo *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1993; Paxton *et al.*, 1993). Zwei Sequenzmotive in Vpr, die für die Verpackung in Virionen erforderlich sind, werden diskutiert; eine N-terminale hochkonservierte amphipathische α-Helix (DiMarzio *et al.*, 1995; Mahalingam *et al.*, 1995 und 1997; Yao *et al.*, 1995) und C-terminale Sequenzen (Paxton *et al.*, 1993). Im Rahmen der viralen Replikation konnte für Vpr nur ein bescheidener positiver Effekt in T-Zellinien und primären T-Zellen beobachtet werden (Cohen *et al.*, 1990b; Dedera *et al.*, 1989; Lang *et al.*, 1993; Ogawa *et al.*, 1989). Im Gegensatz dazu verstärkt Vpr die virale Replikation in sich nicht teilenden Zellen, wie z.B. primären Makrophagen (Balliet *et al.*, 1994; Connor *et al.*, 1995; Heinzinger *et al.*, 1994). Infektionsexperimente an Rhesusaffen mit einer Vpr-Punktmutante von $SIV_{mac}239$ zeigten einen Selektionsvorteil für ein funktionelles *vpr*-Gen (Lang *et al.*, 1993). Jedoch wiesen Rhesusaffen, die mit einer *vpr*-Deletionsvariante infiziert waren, eine dem Wildtyp-Virus vergleichbare Virusbeladung auf und entwickelten AIDS in einem vergleichbaren Zeitrahmen (Gibbs *et al.*, 1995; Hoch *et al.*, 1995). In infizierten Zellen ist Vpr zum größten Teil im Nukleus lokalisiert (Lu *et al.*, 1993). Allerdings kodiert *vpr* für kein Sequenzmotiv, das als klassisches Kern-Lokalisationssignal (NLS) identifizierbar wäre. Mutationsanalysen an HIV-1 Vpr zeigten, daß sowohl N-terminale als auch C-terminale Aminosäuren für die nukleäre Lokalisation nötig sind (Mahalingam *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1993). Außerdem wurde beschrieben, daß Vpr als schwacher Transkriptionsaktivator auf den eigenen LTR sowie auf eine Reihe anderer heterologer Promotoren einwirkt (Cohen *et al.*, 1990b). Die Modulation der Transkription wird vermutlich durch die Bindung von Vpr an den Transkriptionsfaktor Sp1 und den Tumorsuppressor p53 vermittelt (Sawaya *et al.*, 1998). Der nukleäre Import des viralen Präintegrationskomplexes wird durch das Vpr-Protein von HIV-1 bzw. das Vpx-Protein von HIV-2 vermittelt sowie durch NLS-Sequenzen des Matrixproteins (Fletcher *et al.*, 1996; Heinzinger *et al.*, 1994). In diesem Zusammenhang scheint auch die Bindung von HIV-1 Vpr an zelluläre Nukleoporine eine Rolle zu spielen (Fouchier *et al.*, 1998; Vodicka *et al.*, 1998). In *Saccharomyces cerevisiae* und in T-Zellinien verursacht die Expression des *vpr*-Gens einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase, der über zwei C-terminale HxRxG-Motive vermittelt wird (Goh *et al.*, 1998; Planelles *et al.*, 1995). Mit dem Vpr-vermittelten Zellzyklusarrest korreliert eine Aktivitätsabnahme der Zyklin-abhängigen Kinase p34cdc2 (Bartz *et al.*, 1996; He *et al.*, 1995; Jowett *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1995). Die Beobachtung, daß Vpr in der humanen Rhabdomyosarcoma-Zellinie TE671 Differenzierung

induziert, ist vermutlich auf eine Interferenz mit Regulationsmechanismen des Zellzykluses zurückzuführen (Levy *et al.*, 1993). Somit können vier funktionelle Eigenschaften für Vpr nachgewiesen werden, Verpackung in Virus-partikel, Zellzyklusarrest, nukleäre Lokalisation und Import des Präintegrationskomplexes in den Zellkern, der bei HIV-2 von Vpx übernommen wird. Bisher gibt es noch keine Untersuchungen an HIV-2/SIV_{mac}, welche Sequenzmotive des Vpr-Proteins für die einzelnen funktionellen Eigenschafte relevant sind.

3. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten funktionelle Domänen des Vpr-Proteins von $SIV_{mac}239$ charakterisiert werden. Hierzu sollte das *vpr*-Gen für die nachfolgenden funktionellen Untersuchungen N-terminal an eine Epitop-Markierung fusioniert werden, um mittels der gegen das Epitop gerichteten Antikörper den Nachweis zu ermöglichen. Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion sollten Mutationen in zwei konservierten Bereichen des *vpr*-Gens eingefügt werden, die, nach Möglichkeit, selektiv zur funktionellen Inaktivierung der Vpr-Verpackung in Viruspartikel, der nukleären Lokalisation und des Vpr-vermittelten Zellzyklusarrestes führen sollen. Zusätzlich sollte mit Hilfe monoklonaler Antikörper versucht werden, Domänen im Vpr-Protein zu charakterisieren. Die zelluläre Lokalisation von Vpr und abgeleiteten Mutanten sollte über indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe der spezifischen Epitop-Antikörper bestimmt werden. Die Verpackungsfunktion von Vpr in Viruspartikel, die von Gag-Proteinen abhängig ist, sollte mittels Koexpression beider Proteine untersucht werden. Die Expression von Gag-Proteinen führt zur Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln, in die bei Koexpression Vpr eingebaut werden sollte. Die Virionverpackung von Vpr und der abgeleiteten Mutanten sollte daraufhin im Westernblot untersucht werden. Die geplanten Analysen zum Zellzyklusarrest durch Vpr konnten aus Zeitgründen nicht mehr bearbeitet werden.

4. Ergebnisse

4.1 Expressionsklonierung von vpr von $SIV_{mac}239$

Eine Voraussetzung für die nachfolgenden biochemischen und funktionellen Untersuchungen war es, die Expression des Vpr-Proteins von $SIV_{mac}239$ und der zu erstellenden Mutanten nachzuweisen. Aus diesem Grund sollte das Vpr-Protein von $SIV_{mac}239$ am N-Terminus mit einem Peptid fusioniert werden, das spezifisch von monoklonalen Antikörpern erkannt wird. Diese Vorgehensweise sollte sicherstellen, daß mutierte Vpr-Proteine vergleichbar gut wie das Wildtyp-Vpr über das Peptid-Epitop nachgewiesen werden können. Die Verwendung eines polyklonalen α-Vpr Kaninchenserums kann dies nicht gewährleisten. Deshalb wurde das *vpr*-Gen von $SIV_{mac}239$ aus dem Plasmid pcDNA3Flagvpr mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoR*I und *BamH*I herausgespalten, über ein Agarosegel aufgereinigt und in die eukaryonten Expressionsvektoren pCMV6M und pCMV6H umgesetzt. Diese beiden Plasmide ermöglichen eine transiente Expression in COS-Zellen. Außerdem erlauben beide Vektoren die Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalen Epitopen. Das Plasmid pCMV6M ermöglicht hierbei die Fusion von Vpr an das Myc-Epitop (Aminosäuresequenz: EQKLISEEDL), während der Vektor pCMV6H eine Fusion an das HA-(Hämagglutinin)-Epitop (Aminosäuresequenz: YPYDVPDYA) erlaubt. Mit Hilfe dieser 10 bzw. 9 Aminosäuren umfassenden Epitope sollte ein Ex-pressionsnachweis der Vpr-Proteine durch spezifische Antikörper erleichtert werden. Die Insertion in die beiden Expressionsvektoren wurde über eine Restriktionsspaltung mit *EcoR*I und *BamH*I überprüft. Im nächsten Schritt wurde ausgetestet, welches der beiden Epitope einen spezifischen Nachweis zuließ. Um zu überprüfen, ob die erhaltenen Ex-pressionsplasmide die Vpr-Expression erlauben, wurden diese Plasmide in COS-Zellen transfiziert. Als Positivkontrolle für die Transfektion der Myc-fusionierten Vpr-Klone wurde das Expressionsplasmid pCMV6M-MST2 verwendet, das das *MST2*-Gen aus Hefe enthält. Für die HA-Vpr-Klone diente das pCMV6H-PTP-Konstrukt als Positivkontrolle, das die Expression einer Protein-Tyrosin-Phosphatase erlaubt. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte Zellen verwendet. Nach 48 Stunden wurden die transfizierten Zellen geerntet und anschließend in SDS-Probenpuffer lysiert. Danach wurden die Proteine des gesamt-zellulären Lysats über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Membranfilter transferiert. Im Westernblot erfolgte dann mit Hilfe des monoklonalen Anti-körpers α-Myc9E10 der Nachweis der Myc-Vpr-Fusionsproteine, während mit dem Antikörper α-HA12CA5 die HA-Vpr-Fusionsproteine detektiert wurden (Abb. 1). COS-Zellen, die mit den Myc-Vpr-Expressionskonstrukten transfiziert wurden, exprimierten alle ein etwa 14 kDa großes Vpr-

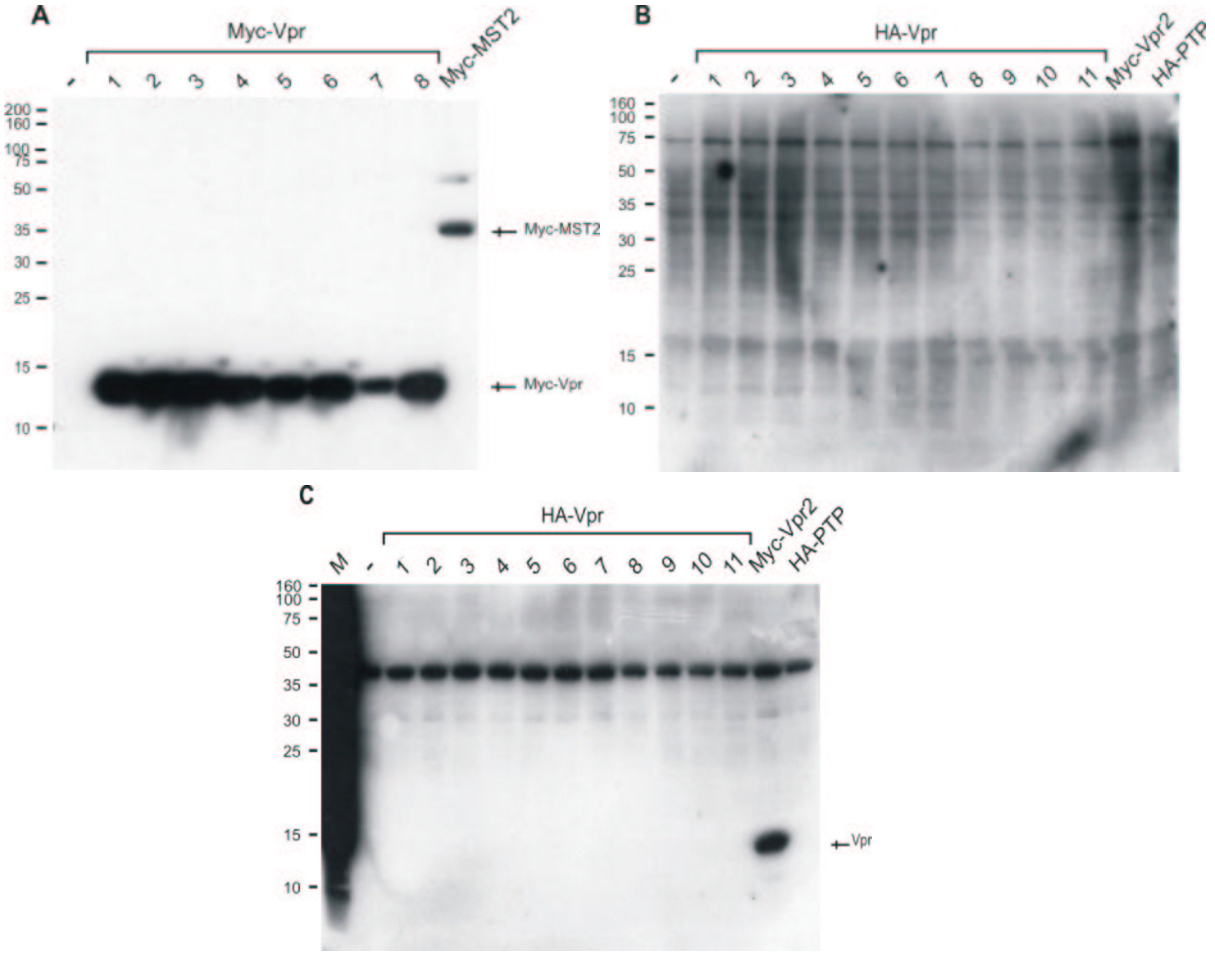


Abb. 1: Expression der N-terminal an Peptid-Epitope fusionierten Vpr-Proteine von SIV_{mac}239 in COS-Zellen. (A) Nachweis der Vpr-Proteine über das N-terminale Myc-Epitop. **(B)** Nachweis der Vpr-Proteine über das N-terminale HA-Epitop. **(C)** Nachweis der Vpr-Proteine mit Hilfe eines polyklonalen α-Vpr-Kaninchenserums. Acht von pCMV6M bzw. elf von pCMV6H abgeleitete Vpr-Expressionskonstrukte (Myc-Vpr 1 bis 8 bzw. HA-Vpr 1 bis 11) wurden in COS-Zellen transfiziert. Als Positivkontrollen wurden pCMV6M-MST2 (Myc-MST2) und pCMV6H-PTP (HA-PTP) verwendet. Als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte COS-Zellen (-). Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Proteine der gesamtzellulären Lysate elektrophoretisch aufgetrennt und auf Membranfilter transferiert. Der Nachweis erfolgte im Westernblot unter Verwendung des Myc-spezifischen Antikörpers α-Myc9E10 (A), des HA-spezifischen Antikörpers α-HA12CA5 (B) und des polyklonalen α-VprS96S6 Kaninchenserums (C). Größenangaben des Proteinstandards (M) am linken Rand in kDa.

Protein (Abb. 1A). In nicht transfizierten Zellen wurde keine Expression nachgewiesen. Dagegen konnten keine HA-Vpr-Fusionsproteine im Westernblot detektiert werden (Abb. 1B). Der Nachweis des als Positivkontrolle mitgeführten HA-PTP-Fusionsproteins war unter Verwendung des α-HA12CA5 Antikörpers ebenfalls negativ. Um nun zu überprüfen, ob der Antikörper α-HA12CA5 das Vpr-Protein nicht erkannt hatte oder ob in den COS-Zellen kein HA-Vpr-Fusionsprotein exprimiert wurde, wurden dieselben Lysate zusätzlich im Westernblot mit einem Vpr-spezifischen polyklonalen Kaninchenserum untersucht (Abb. 1C). Als

Kontrolle wurde gesamtzelluläres Lysat verwendet, das nachweislich Myc-Vpr-Fusionsproteine exprimierte (Abb. 1A und C, Myc-Vpr 2). Keine Expression war jedoch für die untersuchten HA-Vpr-Expressionskonstrukte nachweisbar, obwohl dieselbe *vpr*-Fragmentpräparation für die Insertion in pCMV6H verwendet und das Leseraster eingehalten wurde. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Experimente die Expression von Myc-Fusionsproteinen gewählt. Das von pCMV6M abgeleitete Konstrukt wurde für die nachfolgenden Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, als Positivkontrolle verwendet und mit pCMV6Mvpr bezeichnet.

4.2 Herstellung von vpr-Punktmutanten über PCR

Um zu untersuchen, inwiefern sich die unterschiedlichen Funktionen von Vpr einzelnen Domänen im Protein zuordnen lassen, wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Mutanten von $SIV_{mac}239$ Vpr hergestellt. Idealerweise sollten diese Mutationen möglichst selektiv zur Inaktivierung einzelner Funktionen wie nukleäre Lokalisation, Virionverpackung und Zellzyklus-Arrest führen. Zwei konservierte Bereiche inner-halb des Vpr-Proteins wurden für die Mutagenese ausgewählt: eine N-terminale α-Helix und zwei C-terminale HxRxG-Motive.

Für die Mutagenese im Bereich der amphipathischen α-Helix sollten an den Positionen 21 und 23 die Aminosäure Valin und an den Positionen 24 und 27 die Aminosäure Leucin gegen Alanin substituiert werden (Abb. 2). Unter Verwendung des Oligonukleotides SL100

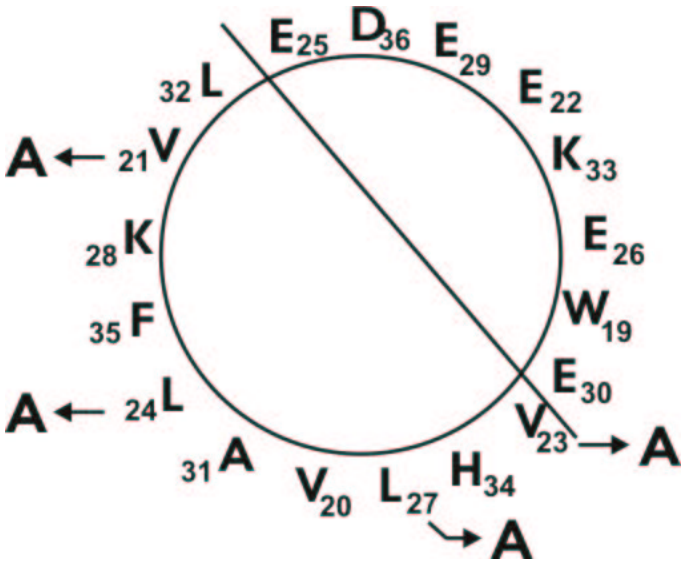


Abb. 2: Amphipathische α-Helix in Vpr von $SIV_{mac}239$. Für die Darstellung wurde der Ein-Buchstaben-Kode verwendet, und die jeweilige Aminosäureposition ist angegeben. Die zu Alanin zu mutierenden Positionen sind markiert.

sollten sechs Punktmutationen gleichzeitig eingefügt werden (Abb. 3). Hierzu waren vier T→C Transitionen und zwei C→G Transversionen notwendig. Die Mutationen wurden mit Hilfe der PCR unter Verwendung der Vent-Polymerase durchgeführt, da sie eine *proof-reading*-Funktion besitzt und damit eine niedrigere Fehlerrate bei der Synthese hat als die Taq-Polymerase. Zunächst wurde mit dem Mutagenese-Oligonukleotid SL100, das die Punktmutationen einfügt, und dem Primer SL80 ein erstes PCR-Amplifikat, der „Megaprimer“ A, erstellt (Abb. 4A).

α-Helix-Mutante:

```
                 *        *  **           **
GAA TGG GTA GCG GAG GCT GCG GAA GAA GCG AAA GAA GAA
CTT ACC CAT CGC CTC CGA CGC CTT CTT CGC TTT CTT CTT
E   W   V   A   E   A   A   E   E   A   K   E   E
            21      23  24          27
```

Abb. 3: Sequenzausschnitt aus der α-Helix-Mutante: Der dargestellte Ausschnitt umfaßt die Aminosäuren 18-30 aus dem Vpr-Protein von $SIV_{mac}239$. Für die Darstellung der Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Kode verwendet. Die T→C Transitionen und C→G Transversionen sind durch Sterne markiert. Die zu Alanin mutierten Positionen sind fett gedruckt.

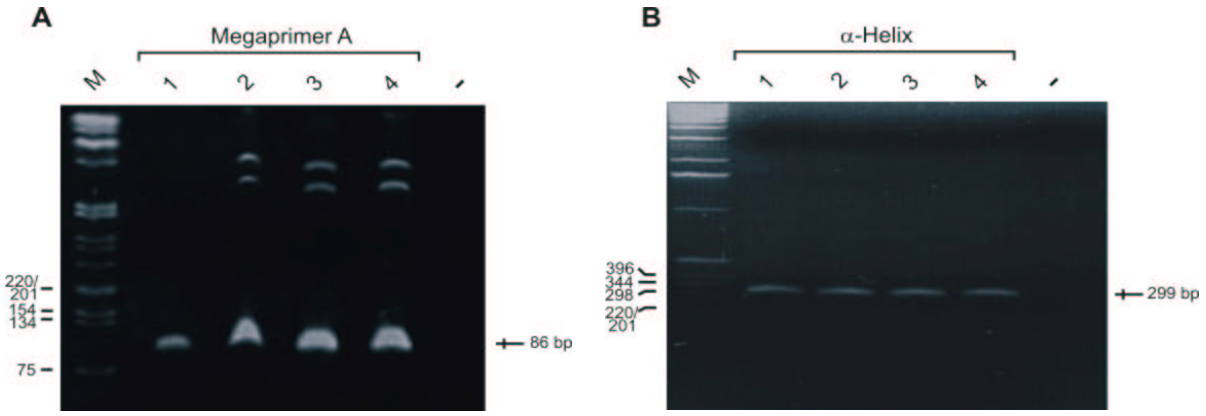


Abb. 4: Herstellung der α-Helix-Mutante von Vpr. Zunächst wurde mit dem Primer SL100 und dem Primer SL80 ein „Megaprimer“ A erstellt (A). Dieses Amplifikat wurde dann zusammen mit dem Primer SL81 in der zweiten PCR-Runde zur Synthese des *vpr*-Gens eingesetzt (B). Als Matrize wurden 20 ng pCMV6Mvpr eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne Matrizen-DNA (-). Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung variabler $MgSO_4$-Konzentration durchgeführt: 2 mM (Spur 1), 3 mM (Spur 2), 4 mM (Spur 3), 5 mM (Spur 4). Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über Polyacrylamid- (A) bzw. Agarosegel-Elektrophorese (B). Größenangaben des DNA-Standards (M) am linken Rand in bp.

Mit Hilfe des 86 bp großen „Megaprimers“ A und dem Oligonukleotid SL81 wurde in einer zweiten PCR-Runde Volle-Länge-*vpr* amplifiziert (Abb. 4B). Die PCR-Bedingungen sind dem Abschnitt 6.7 zu entnehmen.

In allen Vpr-Proteinen der Immundefizienzviren von Primaten sind zwei sogenannte HxRxG-Motive zu finden. Daher sollten diese konservierten Motive jeweils einzeln sowie in Kombination zu AxAxA mutiert werden (Abb. 5). Hierfür sollten einmal die Aminosäuren Histidin, Arginin und Glycin an den Positionen 72, 74 und 76 bzw. 79, 81 und 83 gegen Alanin substituiert werden. Alle sechs genannten Mutationen sollten in der kombinierten HxRxG-Mutante vertreten sein. Die Primer SL101 und SL81 bzw. SL102 und

HxRxG1:

```
            **      **       *
CTC TTC ATG GCT TTC GCA GGC GCA TGC ATC CAC TCC AGA ATC GGC CAA CCT
GAG AAG TAC CGA AAG CGT CCG CGT ACG TAG CGG AGG CGT TAG CGG GTT GGA
L   F   M   A   F   A   G   A   C   I   H   S   R   I   G   Q   P
            72      74      76          79      81      83
```

HxRxG2:

```
                                        **      **       *
CTC TTC ATG CAT TTC AGA GGC GGA TGC ATC GCC TCC GCA ATC GCC CAA CCT
GAG AAG TAC CGA AAG CGT CCG CGT ACG TAG CGG AGG CGT TAG CGG GTT GGA
L   F   M   H   F   R   G   G   C   I   A   S   A   I   A   Q   P
            72      74      76          79      81      83
```

HxRxG1+2:

```
            **      **       *           **      **       *
CTC TTC ATG GCT TTC GCA GGC GCA TGC ATC GCC TCC GCA ATC GCC CAA CCT
GAG AAG TAC CGA AAG CGT CCG CGT ACG TAG CGG AGG CGT TAG CGG GTT GGA
L   F   M   A   F   A   G   A   C   I   A   S   A   I   A   Q   P
            72      74      76          79      81      83
```

Abb. 5: Sequenzausschnitte aus den HxRxG-Mutanten. Der dargestellte Ausschnitt umfaßt die Aminosäuren 69-85 aus dem Vpr-Protein von $SIV_{mac}239$. Für die Darstellung der Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Kode verwendet. C→G, A→C, G→C Transversionen und A→G Transitionen sind durch Sterne markiert. Die zu Alanin mutierten Positionen sind fett gedruckt.

SL81 wurden für die Amplifikation der „Megaprimer“ B und C eingesetzt (Abb. 6A und B). Unter

Verwendung des Primers SL80 und des „Megaprimers“ B bzw. C wurde Volle-Länge-*vpr* mit Mutationen im HxRxG1- beziehungsweise HxRxG2-Motiv amplifiziert (Abb. 6C und D). Zur Herstellung der Doppelmutante in den C-terminalen HxRxG-Motiven wurde das Konstrukt pCMV6Mvprm2 als Matrize eingesetzt und mit dem „Megaprimer“ C und SL80 amplifiziert (Abb. 6D). Die sonstigen PCR-Bedingungen sind dem Abschnitt 6.7 zu entnehmen. Durch die Primer SL80 und SL81 wurden Restriktionsschnittstellen für *BamH*I und *EcoR*I eingeführt. Nach Aufreinigung der Amplifikate und anschließender Restriktionsspaltung wurden die PCR-Fragmente über die Restriktionsschnittstellen *EcoR*I und *BamH*I in den Vektor pCMV6M kloniert. Dadurch wurden die Klone pCMV6Mvprm1 (α-Helix), pCMV6Mvprm2 (HxRxG1), pCMV6Mvprm3 (HxRxG2) und pCMV6Mvprdm (HxRxG1+2)

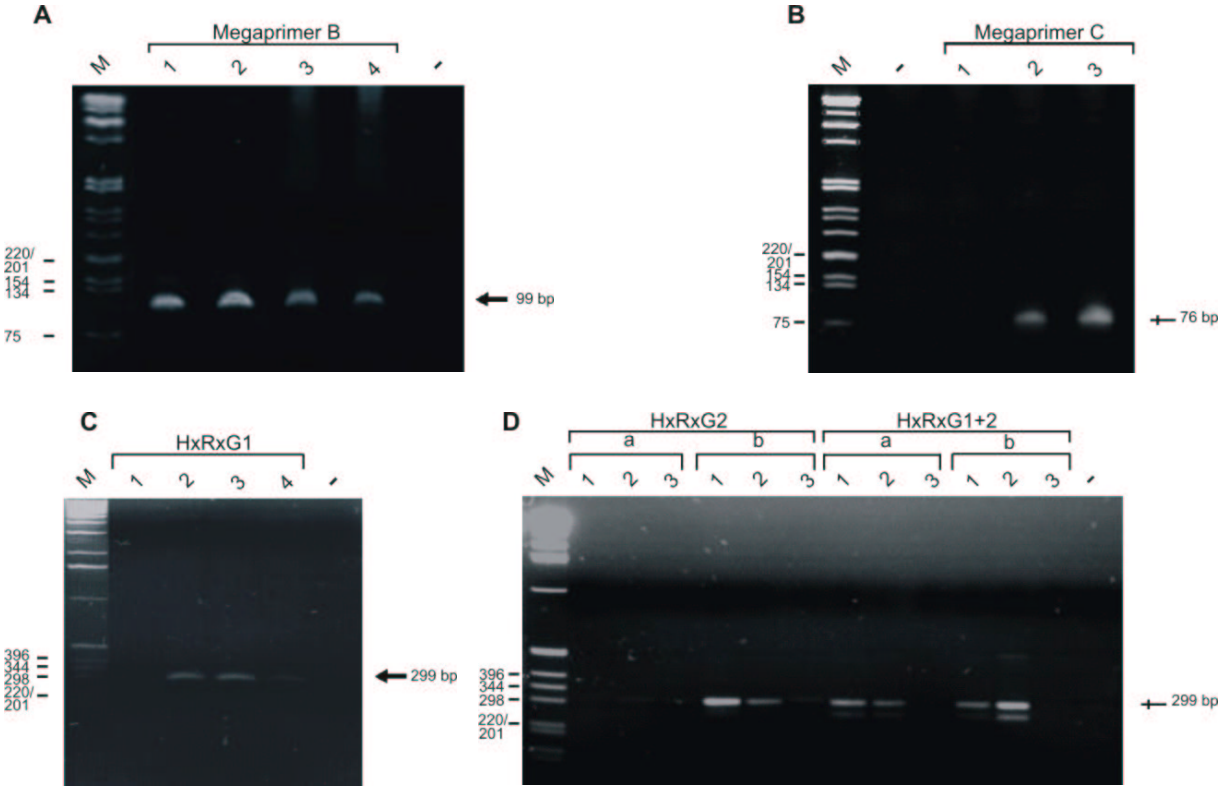


Abb. 6: Herstellung der HxRxG-Mutanten von Vpr. Zuerst wurden mit den Primern SL101 und SL81 bzw. SL102 und SL81 die „Megaprimer“ B und C amplifiziert (A und B). Unter Verwendung des Primers SL80 und des „Megaprimers“ B bzw. C wurden in der zweiten PCR-Runde Volle-Länge-*vpr* mit Mutationen im HxRxG1- bzw. HxRxG2-Motiv amplifiziert (C und D, linke Hälfte). Für die Erstellung der HxRxG1-Mutante wurden als Matrize 20 ng pCMV6Mvpr eingesetzt (C). Für die Amplifizierung der HxRxG2-Mutante wurden sowohl 10 ng (D, a, linke Hälfte), als auch 20 ng (D, b, linke Hälfte) pCMV6Mvpr als Matrizen-DNA eingesetzt. Zur Herstellung der Doppelmutante HxRxG1+2 wurden 10 ng (D, a, rechte Hälfte) bzw. 20 ng (D, b, rechte Hälfte) des Plasmids pCMV6Mvprm2 als Matrize eingesetzt und mit dem „Megaprimer“ C und SL80 amplifiziert. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne Matrizen-DNA (-). Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung variabler $MgSO_4$-Konzentration durchgeführt: 2 mM (Spur 1), 3 mM (Spur 2), 4 mM (Spur 3), 5 mM (Spur 4). Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über Polyacrylamid- (A und B) bzw. Agarosegel-Elektrophorese (C und D). Größenangaben des DNA-Standards (M) am linken bzw. am rechten Rand in bp.

erhalten. Durch die Mutagenese des ersten HxRxG-Motives entstand bei den Klonen pCMV6Mvprm2 und pCMV6Mvprdm eine zusätzliche *Sph*I-Restriktionsschnittstelle, die eine schnelle vorläufige Analyse erlaubte.

Nach vollständiger Sequenzanalyse beider DNA-Stränge von allen Expressionskonstrukten stellte sich heraus, daß sämtliche Mutanten außer den erwünschten Punktmutationen noch zusätzliche Punkt-Mutationen im C-terminalen Bereich an zwei Positionen (6692 und 6697 in SIV_{mac}) enthielten. Der Austausch beider Basen überlappt mit dem 3´-Oligonukleotid SL81 und ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Fehlsynthese zurückzuführen. Es zeigte sich, daß die Mutation an Position 6697 eine stille Mutation war und somit keinen Amino-

säureaustausch nach sich zog. Die Mutation an Position 6692 dagegen verursachte auf Aminosäureebene einen Austausch von Prolin gegen Threonin. Hierauf wurde der Primer SL81 neu synthetisiert und damit alle Mutanten reamplifiziert, um diese Mutationen zu beheben. Nach erneuter Sequenzierung stellte sich heraus, daß zwar die Mutation an Position 6697 behoben war, aber die eigentlich relevante zusätzliche Punkt-mutation immer noch manifest war (siehe Anhang). Aus Zeitmangel konnte nicht erneut versucht werden diese Punktmutation zu beheben.

Alle vier erstellten Vpr-Mutanten wurden zusammen mit dem Ausgangsplasmid pCMV6Mvpr zum Expressionsnachweis in COS-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte Zellen und Zellen, die mit dem leeren Vektor pCMV6M transfiziert wurden. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion geerntet und in SDS-Probenpuffer lysiert. Die Auftrennung erfolgte über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Proteine wurden im Westernblot über ihren Myc-Fusionsanteil mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers α-Myc9E10 nachgewiesen (Abb. 7). Die Mutanten Vprm1 und Vprm3 zeigten ein re-produzierbar verändertes Laufverhalten gegenüber Wildtyp-Vpr und den beiden Mutanten Vprm2 und Vprdm. Dies könnte an einer durch die Mutationen hervorgerufenen Kon-formationsänderung der beiden Proteine liegen.

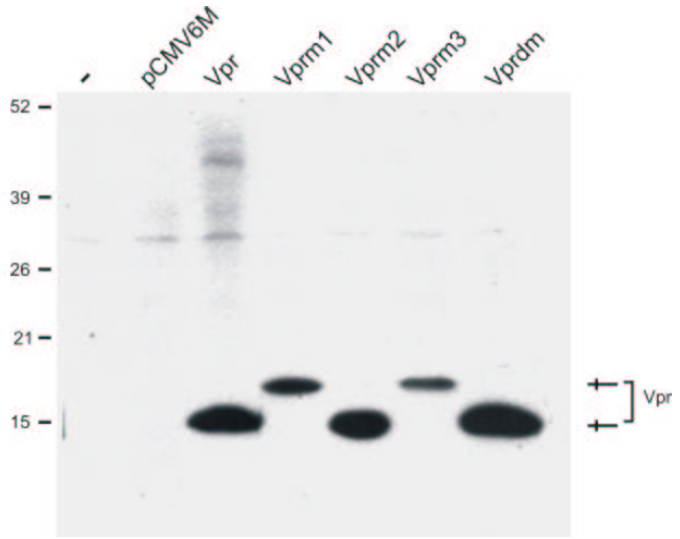


Abb. 7: Expression der N-terminal an das Myc-Epitop fusionierten Vpr-Mutanten in COS-Zellen. Die Transfektion von COS-Zellen erfolgte mit je 2 µg von pCMV6M-abgeleiteten Expressionskonstrukten für Wildtyp-Vpr (Vpr) sowie Vpr-Mutanten in der α-Helix (Vprm1), im HxRxG1-Motiv (Vprm2), im HxRxG2-Motiv (Vprm3) und in beiden HxRxG-Motiven (Vprdm). Als Negativkon-trolle dienten nicht transfizierte Zellen (-) und Zellen, die mit dem leeren Vektor pCMV6M transfiziert wurden. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit SDS-Probenpuffer lysiert. Die gesamtzellulären Lysate wurden elektro-phoretisch aufgetrennt und im Westernblot unter Verwendung von α-Myc9E10 auf die Expression der Myc-fusionierten Vpr-Proteine getestet. Größenangaben des Proteinstandards am linken Rand in kDa.

4.3 Austestung der Reaktivität monoklonaler Antikörper gegen Vpr

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mutationen in zwei potentiell funktionellen Domänen von Vpr eingefügt. Die Analysen der Domänenstruktur sollten sowohl funktionell als auch strukturell durchgeführt werden. Für die strukturellen Untersuchungen sollten Vpr-spezifische monoklonale Antikörper auf ihre Reaktivität gegen die α-Helix-Domäne und das HxRxG-Motiv getestet werden.

Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern waren im Vorfeld dieser Arbeit Balb/c-Mäuse mit aufgereinigtem, prokaryont exprimiertem β-Galaktosidase-Vpr-Fusionsprotein immunisiert worden. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden elf Hybridome identifiziert, deren Überstände eine erhöhte Reaktivität gegen Vpr im ELISA gezeigt hatten. Die Spezifität dieser Überstände war noch nicht bestätigt. Um β-Galaktosidase-reaktive Antikörper von Vpr-spezifischen zu unterscheiden, sollte Vpr als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein prokaryont exprimiert werden und als Antigen im Westernblot eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde das *vpr*-Gen über die Restriktionsenzyme *EcoR*I und *BamH*I aus dem Vektor pcDNA3Flagvpr herausgeschnitten und in den prokaryonten Expressionsvektor pGEX2TK inseriert. Die Insertion des *vpr*-Gens wurde über Restriktionsspaltungen mit *EcoR*I und *BamH*I überprüft. Die Expression von GST-Vpr-Fusionsproteinen in *E. coli* wurde durch

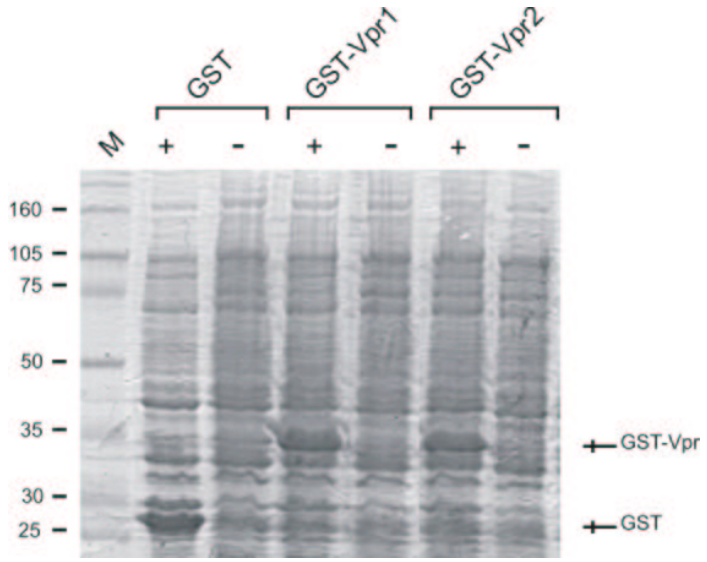


Abb. 8: Prokaryonte Expression von GST-Vpr-Fusionsproteinen. Mit pGEX2TKvpr transformierte Bakterienkulturen wurden in flüssigem Medium angezogen. Anschließend wurde für jeden Klon eine Kultur mit IPTG induziert (+) und eine zweite Kultur ohne IPTG-Zugabe (-) inkubiert. Nach 2 Stunden wurden die Bakterien geerntet und in SDS-Probenpuffer lysiert. Die bakteriellen Proteine wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Als Kontrolle dienten Bakterien, die mit dem leeren Vektor pGEX2TK transformiert wurden und nur GST exprimierten (GST). Größenangaben des Proteinstandards (M) am linken Rand in kDa.

Zugabe von IPTG induziert. Zwei Stunden nach Induktion wurden die Bakterien geerntet und in SDS-Probenpuffer lysiert. Die Induktion der GST-Fusionsproteine wurde über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 8). Anhand des Vergleichs von Bakterienlysaten induzierter und nicht induzierter Kulturen sowie der Größe des Fusionsproteins wurden positive Klone identifiziert. Das Laufverhalten des GST-Vpr-Fusionsproteins zeigte eine relative Größe von 35 kDa, die von der mit ca. 40 kDa berechneten Größe abwich. Die erhaltenen Plasmide wurden mit pGEX2TKvpr1 und 2 bezeichnet.

Die Bakterienlysate, die GST oder GST-Vpr-Fusionsproteine enthielten, wurden dann als Antigen für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt. Die Lysate wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf Membranfilter transferiert. Der Membranfilter wurde in Doppelstreifen geschnitten, die jeweils GST-Vpr und GST enthielten. Diese wurden mit den 1:10 verdünnten Zellkultur-Überständen von Hybridomen inkubiert. Als Negativkontrolle diente der Zellkultur-Überstand von Jurkat-Zellen, die keine Antikörper produzieren.

Als positiv stellten sich die Hybridom-Überstände #6, #7 und schwach #11 heraus, da die Antikörperbindung an Vpr spezifisch war. Der Hybridom-Überstand #8 zeigte eine erhöhte Reaktivität gegen das GST-Protein. Keine spezifischen Antikörper waren dagegen bei den Hybridom-Überständen #3, #4, #9 und #10 nachweisbar. Eine unspezifische Reaktivität wurde für die Hybridom-Überstände #1, #2 und #5 beobachtet (Abb. 9). Die Überstände #6 und #7 wurden anschließend auf ihre Reaktivität gegen in COS-Zellen exprimiertes Vpr untersucht. Hierzu wurden Zellysate, die nachweislich Vpr exprimierten, über SDS-

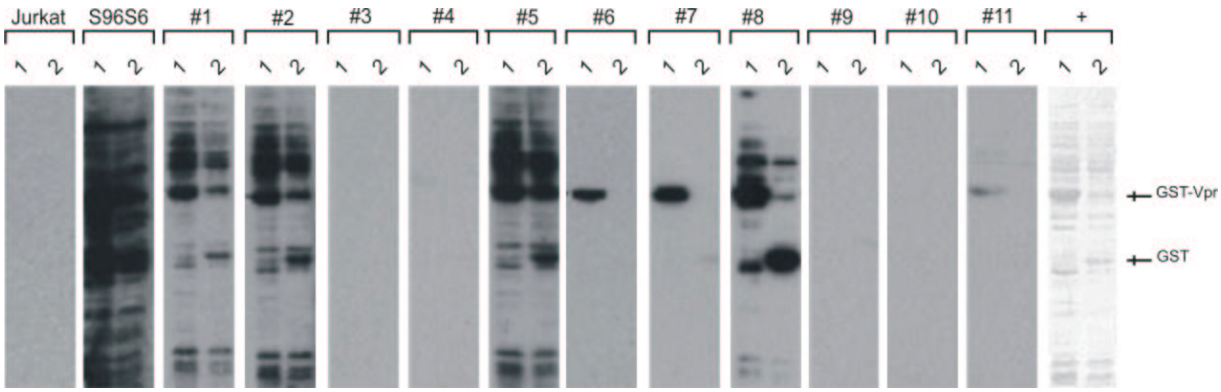


Abb. 9: Reaktivität monoklonaler Antikörper gegen GST und GST-Vpr-Fusionsproteine. GST und GST-Vpr enthaltende bakterielle Lysate wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf einen Membranfilter transferiert. Die Überstände von elf Hybridomen (#1 bis #11) wurden im Westernblot auf reaktive Antikörper getestet. Als Negativkontrolle wurden Überstände von Jurkat-Zellen (Jurkat) verwendet, als Positivkontrolle diente polyklonales α-Vpr Kaninchenserum (S96S6). Auf Membranfilter transferierte Proteine wurden mit Coomassie angefärbt (+). Spur 1, GST-Vpr Lysat und Spur 2, GST Lysat.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf Membranfilter transferiert. Im Westernblot wurde dann die Reaktivität der monoklonalen Antikörper überprüft. In COS-Zellen exprimiertes Vpr-Protein konnte mit Hilfe dieser Zellkulturüberstände nicht nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich auf ein Sensitivitätsproblem zurückzuführen, da zum einen die Antikörperkonzentration in Zellkulturüberständen oft gering ist, und auch das Antigen in diesem Ansatz deutlich reduziert war im Vergleich zu bakteriellem GST-Vpr-Fusionsprotein. Aus diesem Grund konnten Untersuchungen zur Domänenstruktur anhand der Vpr-Mutanzen Vprm1, Vprm2, Vprm3 und Vprdm nicht durchgeführt werden.

4.4 Subzelluläre Lokalisation der Vpr-Proteine

Sowohl für das Vpr-Protein von HIV-1, als auch von SIV wurde eine Lokalisation im Zellkern infizierter Zellen beschrieben. Jedoch besitzt das Vpr-Protein kein klassisches nukleäres Lokalisationselement und es ist noch nicht bekannt, welche Sequenzmotive in Vpr für die Kernlokalisation notwendig sind. Die im Rahmen dieser Diplomarbeit hergestellten Vpr-Punktmutanten sollten nun mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf ihre zelluläre Lokalisation untersucht werden. Diese Analysen sollten helfen, Sequenzmotive zu identifizieren, die für die Kernlokalisation verantwortlich sind.

Mittels der DEAE-Dextran-Methode wurden pCMV6M-Expressionskonstrukte für die Vpr-Mutanten und das Wildtyp-Vpr-Protein in COS-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurde ein Teil der Zellen auf Deckgläschen ausgesät und am darauffolgenden Tag fixiert. Für die Zellfixierung wurden zwei verschiedene Methoden parallel ausgetestet. Die Methanolfixierung ist einfach und erlaubt die Anfärbung von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen. Die Formaldehyd-Fixierung erlaubt primär die Anfärbung von zytoplasmatischen Proteinen. Für die Untersuchung an nukleären Proteinen muß hier ein Permeabilisierungsschritt unter Verwendung von TritonX-100 angeschlossen werden. Für die Fixierung mit Formaldehyd wurden nicht so gute Ergebnisse erzielt, da die Antikörper bei diesen Präparaten einen unspezifischeren Hintergrund als bei methanolfixierten Präparaten verursachten und die Zellstrukturen nicht so gut erhalten waren. Daraufhin wurden die Präparate mit Methanol fixiert. Die Anfärbung der Vpr-Proteine erfolgte über das N-terminale Myc-Epitop und einen sekundären, Fluoreszin (FITC)-markierten α-Maus-Antikörper. Zusätzlich wurden die Zellen mit DAPI gegengefärbt, das in die zelluläre DNA interkaliert und in einer spezifischen Anfärbung des Zellkerns resultiert. Bei Bestrahlung mit UV wird DAPI zu einer blauen Fluoreszenz angeregt. Hiermit sollte es ermöglicht werden, zwischen zytoplasmatischer oder nukleärer Vpr-Lokalisation zu diskriminieren. Alle Präparate wurden anschließend im Immunfluoreszenz-Mikroskop mit den entsprechenden Filtern für FITC und DAPI ausgewertet. Für die Analyse wurden nur Zellen ausgewählt, die nach der Fixierung noch gut ausgespreitet an den Deckgläsern adhärierten. Nur unter diesen Bedingungen ist eine klare Abgrenzung zwischen Zellkern und Zytoplasma möglich (Abb. 10, PHAKO). Über die grüne Fluoreszenz der FITC-markierten Antikörper wurde die Lokalisation der Vpr-Proteine bestimmt (Abb. 10, FITC). Zellen, die Wildtyp-Vpr exprimierten, zeigten erwartungsgemäß die Grünfluoreszenz überwiegend im Zellkern und nur eine sehr schwache Anfärbung des Zytoplasmas (Abb. 10, Vpr1 und Vpr2). Dies wurde durch Überlagerung der Fluoreszenzen für Wildtyp-Vpr und der DAPI-Färbung des Zellkerns

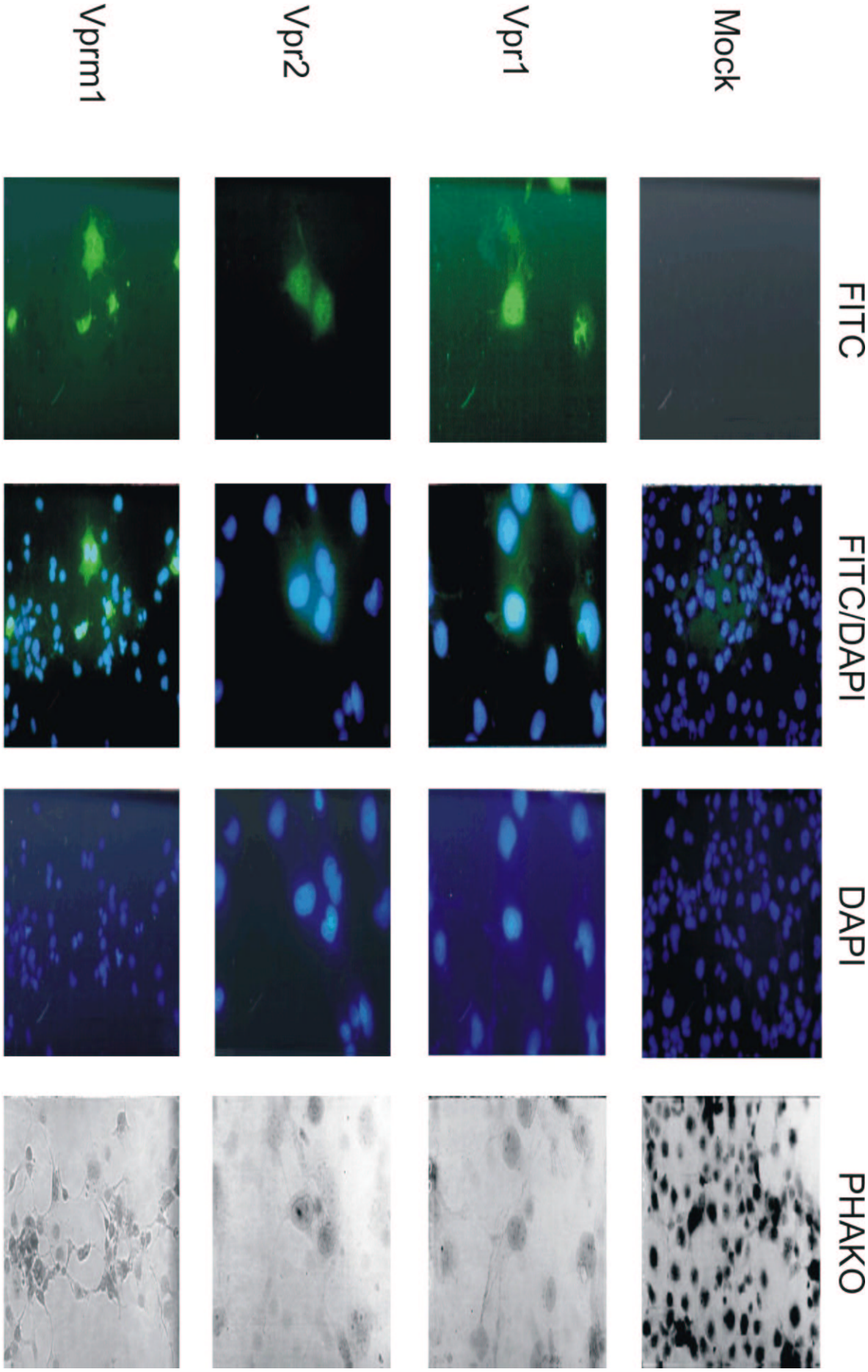
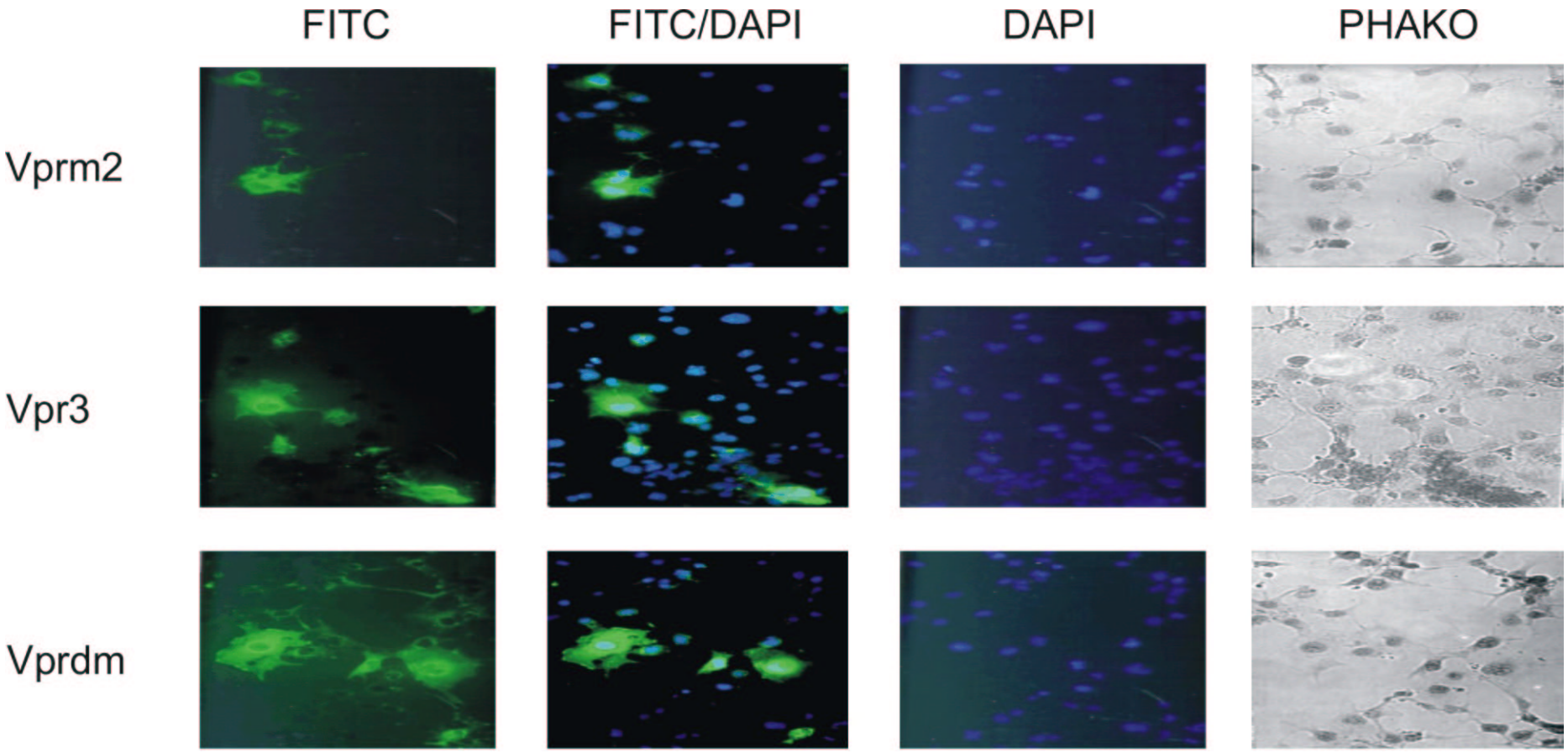

FITC
FITC/DAPI
DAPI
PHAKO
Mock
Vpr1
Vpr2
Vprm1

Abb. 10: Zelluläre Lokalisation von Vpr und Vpr-Mutanten in COS-Zellen. Expressionskonstrukte für die vier Vpr-Mutanten und das Wildtyp-Vpr wurden mit Hilfe der DEAE-Dextran-Methode in COS-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Vpr-Proteine wurden mit Hilfe des monoklonale Antikörpers α-Myc9E10 nachgewiesen. Die Anfärbung erfolgte mit Hilfe eines FITC-konjugierten sekundären Antikörpers. Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI gefärbt. Die Untersuchung der Zellen erfolgte am Immunfluoreszenz-Mikroskop im Phasenkontrast (PHAKO) und parallel mit Hilfe verschiedener UV-Filter (FITC, FITC/DAPI und DAPI). Der Nachweis der Vpr-Proteine erfolgte über grüne Fluoreszenz (FITC) und der Zellkerne über blaue Fluoreszenz (DAPI). Präparate für das Wildtyp-Vpr (Vpr1 und Vpr2) wurden bei 625x Vergrößerung aufgenommen. Die Vpr-Mutanten in der α-Helix (Vprm1), im HxRxG1-Motiv (Vprm2), HxRxG2-Motif (Vprm3) und in beiden HxRxG-Motiven (Vprdm) wurden bei 250x Vergrößerung photographiert.



bestätigt (Abb. 10, FITC/DAPI). Das Verteilungsmuster der Vpr-Fluoreszenz zeigte eine homogene Anfärbung des Zellkerns oder die Anfärbung von Kernstrukturen und von auf den Zellkern aufgelagerten Strukturen. Die Fluoreszenz war spezifisch für Vpr, da nicht transfizierte Zellen keine bis eine sehr schwache grüne Fluoreszenz zeigten, was den unspezifischen Hintergrund der Antikörperbindung wiedergab. Alle Vpr-Mutanten zeigten eine starke Grünfluoreszenz im Zytoplasma (Abb. 10). Deutlich war eine starke Anfärbung der Kernmembran zu beobachten, wobei der Zellkern selbst nur schwach angefärbt war. Diese schwache Fluoreszenz des Kerns kann auf die Überlagerung mit der zytoplasmatischen Fluoreszenz zurückzuführen sein. Auffällig war auch, daß bei den Zellen, die Wildtyp-Vpr exprimierten, ein sehr hoher Anteil auf den Deckgläsern nicht ausgespreitet sondern abgekugelt war. Dies ist möglicherweise so zu erklären, daß Vpr durch den induzierten Zellzyklusarrest toxisch für Zellen ist. Kontrollzellen und Zellen, die mutierte Vpr-Proteine exprimierten, zeigten diese Eigenschaft nicht. Sie wuchsen ausgespreitet auf den Deckgläschen an, und der Zellkern war gut vom Zytoplasma zu unterscheiden.

Parallel zu den Immunfluoreszenz-Analysen wurde ein Teil der Zellen in SDS-Probenpuffer lysiert, um die Expression von Vpr und den Vpr-Mutanten im Westernblot zu überprüfen.

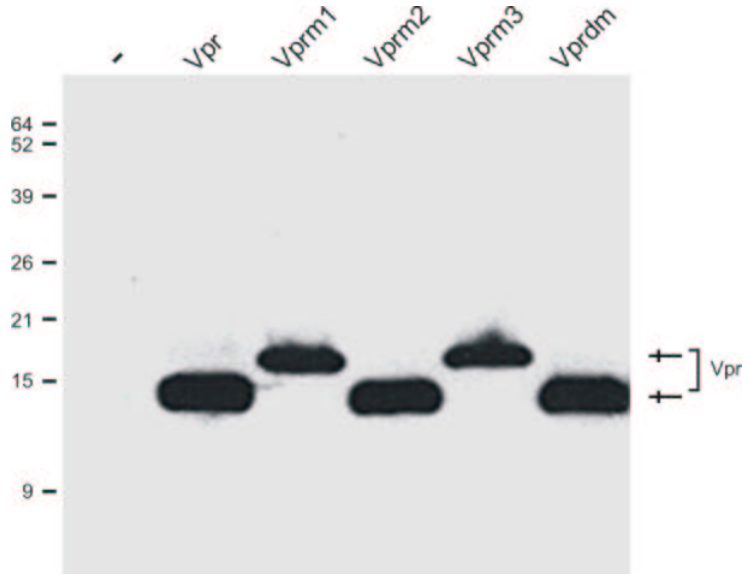


Abb. 11: Nachweis der Expression von Vpr und Vpr-Mutanten parallel zu den Immunfluoreszenz-Untersuchungen. Alle Vpr-Mutanten (Vprm1, Vprm2, Vprm3, Vprdm) und das Wildtyp-Vpr wurden mit Hilfe der DEAE-Dextran-Methode in COS-Zellen trans-fiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit SDS-Probenpuffer lysiert. Die Lysate wurden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufge-trennt und auf einen Membranfilter transferiert. Der Expressionsnachweis erfolgte im Westernblot mit dem monoklonalen Antikörper α-Myc9E10 über den N-terminalen Myc-Fusionsanteil der Proteine. Als Negativkontrolle (-) dienten nicht transfizierte Zellen, als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit Wildtyp-Vpr transfiziert wurden (Vpr). Größenangaben des Pro-teinstandards (M) am linken Rand in kDa.

Hierzu wurden diese gesamtzellulären Lysate über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf einen Membranfilter transferiert. Der Expressionsnachweis der Vpr-Proteine erfolgte über deren N-terminalen Myc-Fusionsanteil im Westernblot mit dem monoklonalen Antikörper α-Myc9E10 (Abb. 11). Sowohl für das Vpr-Wildtyp-Protein, als auch für die einzelnen Vpr-Mutanten konnte in den Zellysaten reproduzierbar eine gute Expression nachgewiesen werden. In nicht transfizierten Zellen war keine Expression nachweisbar.

4.5 Untersuchung zur Gag-vermittelten Verpackung von SIVmac239 Vpr in Virus-ähnliche Partikel

Die Verpackung von HIV-1 Vpr in Viruspartikel ist direkt abhängig von den viralen Gag-Proteinen. Um zu untersuchen, ob die hergestellten Vpr-Mutanten in Viruskapside verpackt werden können, sollten virusähnliche Partikel in eukaryonten Zellen hergestellt werden. Die Expression von Gag-Proteinen in eukaryonten Zellen ist ausreichend für die Produktion Virus-ähnlicher Partikel, die aus viralen Gag-Proteinen und einer von der Zytoplasmamembran abgeleiteten Hülle bestehen. Diese Partikel, die keine weiteren viralen Proteine und kein virales Genom enthalten, sind nicht infektiös und erfordern keine besonderen Sicherheitsmaßnahmen. Bei Koexpression mit Gag-Proteinen wurde die Verpackung von HIV-1 Vpr in diese virusähnlichen Partikel beschrieben. Die virusähnlichen Partikel können direkt aus dem Zellkulturüberstand gewonnen und aufgereinigt werden. Der Nachweis von Gag- und Vpr-Proteinen in Zellysaten und Virus-ähnlichen Partikeln sollte über Westernblot erfolgen und eine Aussage über die Verpackungseffizienz von Vpr und Vpr-

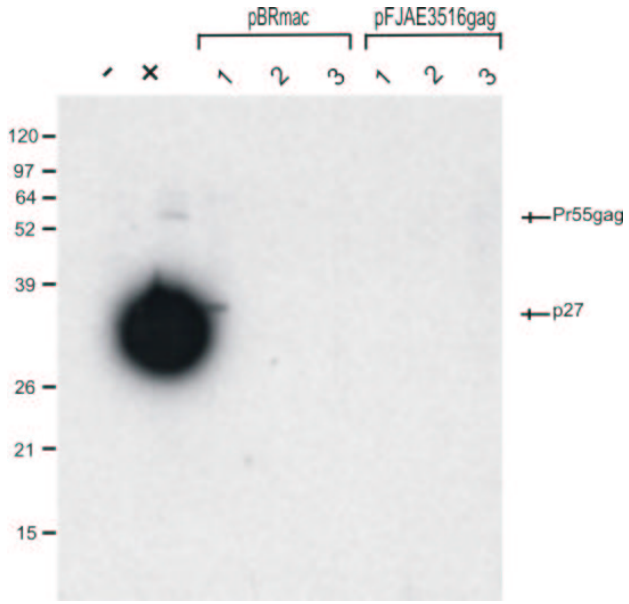


Abb. 12: Expression von Gag-Proteinen in COS-Zellen. COS-Zellen wurden mit den Plasmiden pFJAE3516gag und pBRmacΔ*env*2Δ*nfrxluc* (pBRmac) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden aus dem Überstand Virus-ähnliche Partikel sedimentiert. Die Zellen, die Virus-ähnlichen Partikel und der Zellkulturüberstand nach der Sedimentation wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte im Westernblot der Nachweis der Gag-Proteine mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers α-Gag55-2F12. Gesamtzelluläre Lysate (1), Virusähnliche Partikel (2), Überstand nach Sedimentation (3). Als Positivkontrolle (+) diente aufgereinigtes SIV_{mac}-Virusantigen. Als Negativkontrolle (-) dienten Lysate von nicht transfizierten Zellen. Größenangaben des Proteinstandards am linken Rand in kDa.

Mutanten zulassen.

Um dies zu untersuchen, mußte zunächst ein Expressionskonstrukt für Gag-Proteine hergestellt werden. Deshalb sollte der *gag*-Leserahmen aus dem Plasmid p2395´SpSp herauspräpariert werden. Das gesamte Gen für *gag* wurde zusammen mit 5´- und 3´-flankierenden Sequenzen als ein Fragment von 3516 bp Größe durch Restriktionsspaltung mit *Asp*718 isoliert. Nach Aufreinigung wurde dieses Fragment in den Expressionsvektor pFJAE kloniert, und durch Restriktionsspaltungen dieses Plasmides wurde die richtige Orientierung überprüft. Das erhaltene Plasmid wurde mit pFJAE3516gag bezeichnet. Anschließend wurde das Konstrukt pFJAE3516gag in COS-Zellen transfiziert, und die Expression der Gag-Proteine im Westernblot unter Verwendung des α-Gag55-2F12 Antikörpers überprüft (Abb. 12). Es war nicht möglich Klone zu identifizieren, die Gag-Proteine exprimierten. Deswegen wurde das Expressionskonstrukt pBRmacΔ*env*2Δ*nfrxluc* aus-gewählt, das die SIV_{mac} Gag-Proteine exprimieren sollte. Neben den Genen *gag* und *pol* enthält dieses Plasmid die viralen Regulatorgene *tat* und *rev* unter der Kontrolle des SIV-LTR. Für den Expressionsnachweis wurden die mit pFJAE3516gag und pBRmacΔ*env*2Δ*nfrxluc* transfizierten COS-Zellen nach 48 Stunden in SDS-Probenpuffer lysiert. Es wurde versucht aus den Zellkulturüberständen Virus-ähnliche Partikel zu sedimentieren. Diese Sedimente wurden anschließend in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die gesamtzellulären Lysate und die sedimentierten Virus-ähnlichen Partikel wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der Gag-Proteine erfolgte im Westernblot unter Verwendung des Gag-spezifischen Antikörpers 55-2F12. Zusätzlich wurde auch ein Teil des Überstandes nach Zentrifugation aufgetragen, um festzustellen, ob alle Viruskapside sedimentiert waren. Als Positivkontrolle diente aufgereinigtes SIV_{mac}-Virusantigen. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte Zellen eingesetzt (Abb. 13). In Lysaten von COS-Zellen, die mit dem Plasmid pBRmacΔ*env*2Δ*nfrxluc* transfiziert waren, konnten nur sehr geringe Mengen an Gag-Proteinen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten das 55 kDa Gag-Vorläuferprotein (Pr55gag) und das proteolytische Spaltprodukt p27 (Kapsidprotein) eine verändertes Laufverhalten im Vergleich zu Gag-Proteinen aus aufgereinigten SIV_{mac}-Virionen. Aus den Zellkulturüberständen konnten keine Gag-Proteine aufgereinigt werden. Aus diesen Gründen wurde ein neues Expressionssystem unter Verwendung von rekombinantem Vaccinia-Virus gewählt. Hierfür wurde Hühner-Vaccinia-Virus ausgesucht, das in Säugerzellen nicht produktiv repliziert und diese auch nicht lysiert. Das gewählte Vaccinia-Virus, $chTF_{7-3}$, exprimiert die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 und ermöglicht die Transkription von T7-Promotoren in eukaryonten Zellen. Als Gag-Expressionsplasmid wurde p2395´SpSpM131 verwendet, das den T7-Promotor stromaufwärts von *gag* trägt. Um eine gute Expression von Vpr- und Gag-Proteinen zu erhalten, mußte die optimale Infektionsdosis

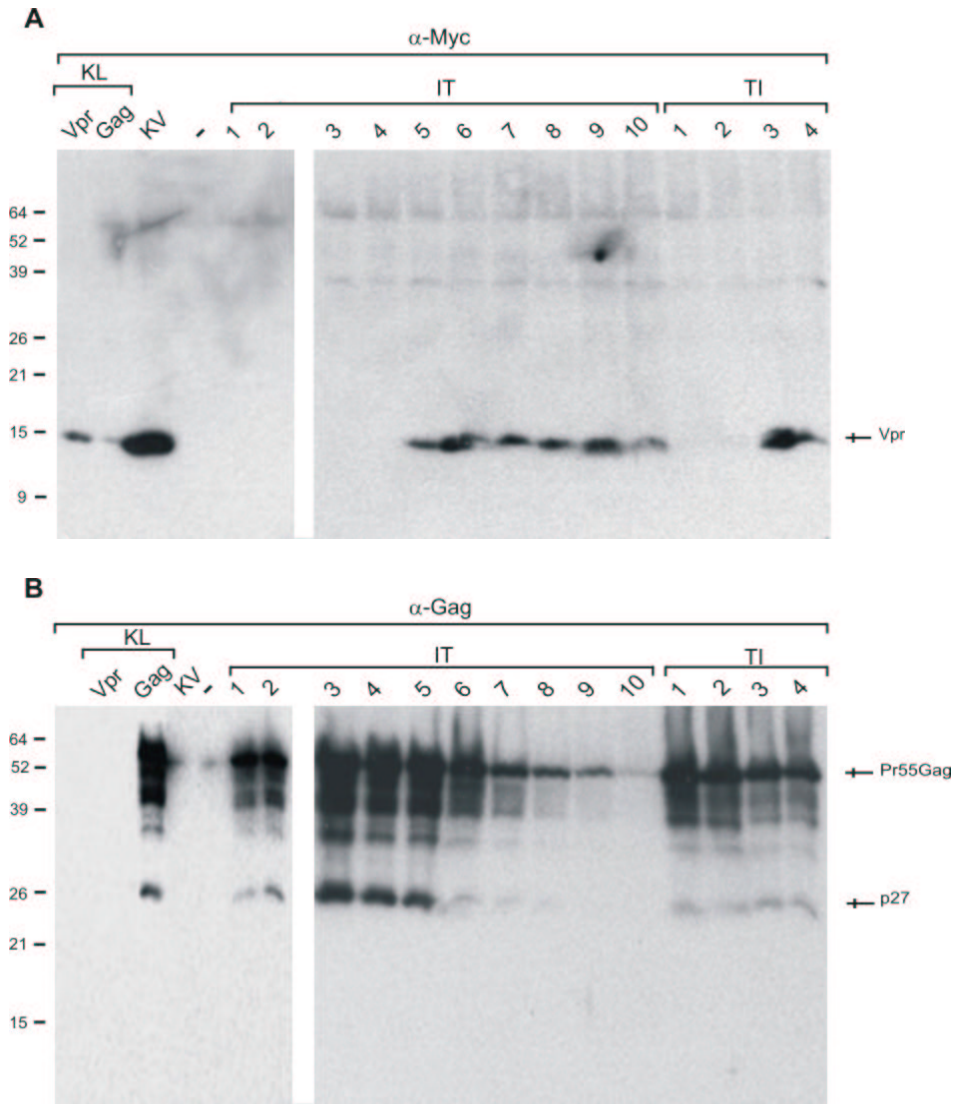


Abb. 13: Optimierung der Vpr- und der Gag-Expression. (A) Expression von Vpr-Proteinen und (B) Expression von Gag-Proteinen in COS-Zellysaten. Für die Infektion wurde eine serielle 1:2 Verdünnungsreihe des Vaccinia-Virus verwendet. Im Ansatz IT wurden COS-Zellen mit verschiedenen Virus-Verdünnungen infiziert (1-10) und anschließend mit den Plasmiden pCMV6MVpr und p2395´SpSpM131 transfiziert. Im Ansatz TI erfolgte zuerst die Transfektion mit pCMV6MVpr und p2395´SpSpM131, gefolgt von der Infektion mit vier der Verdünnungsstufen (1-4). Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis des Vpr-Proteins bzw. der Gag-Proteine erfolgte im Westernblot mittels der Antikörper α-Myc9E10 (α-Myc) bzw. α-Gag55-2F12 (α-Gag). (-), nicht transfizierte Zellen. KV, mit pCMV6Mvpr und p2395´SpSpM131 transfizierte Zellen. KL, Kontrollysate, die nachweislich Vpr (Vpr) bzw Gag (Gag) exprimieren. 1-10, Infektion mit einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe von Vaccinia. Größenangaben des Proteinstandards (M) am linken Rand in kDa.

von $chTF_{7\text{-}3}$ identifiziert werden. Dies war nötig, da die Infektion mit Vaccinia zu einer raschen Inaktivierung des Stoffwechsels der Wirtszelle („*host shut off*“) führt und auch die Expression von Vpr behindert werden kann. COS-Zellen wurden deshalb mit verschiedenen Verdünnungsstufen einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe 10^0 bis $2x10^{-3}$ des rekombinanten

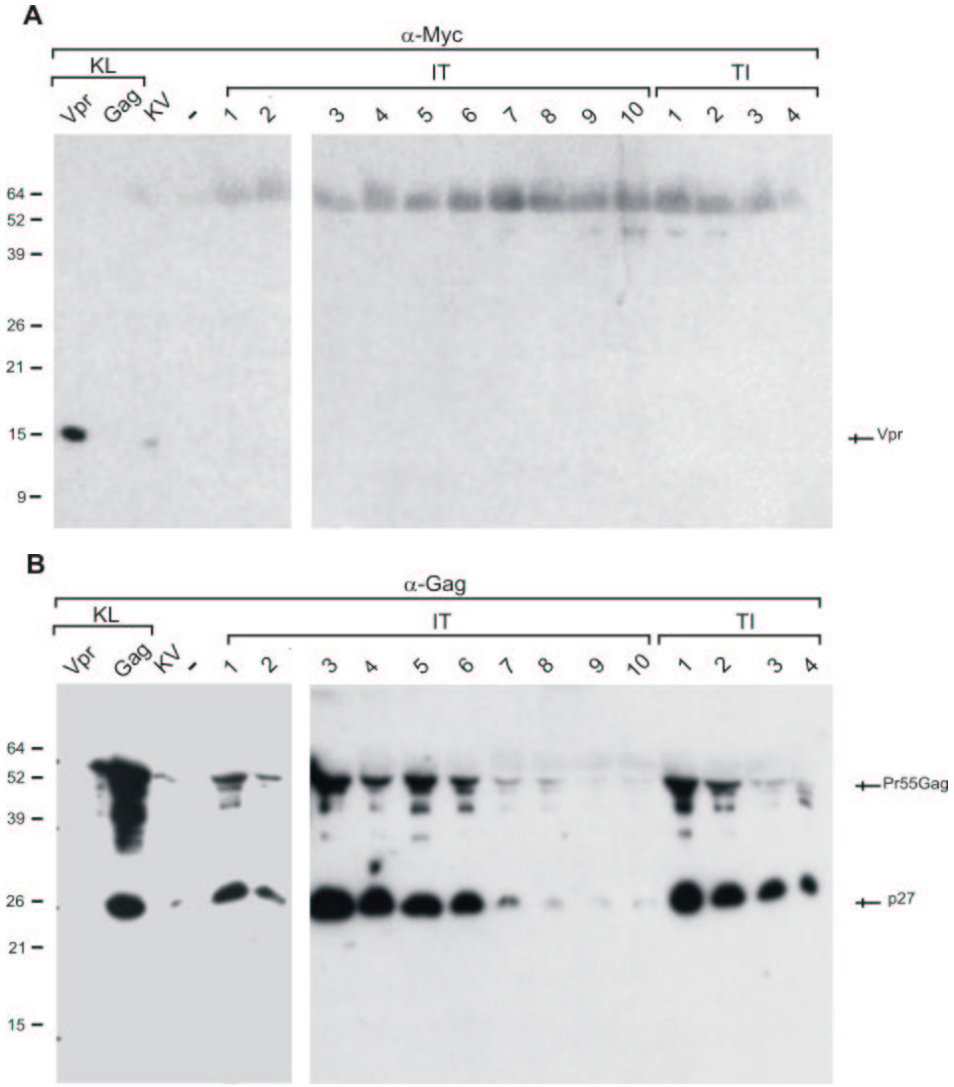


Abb. 14: Optimierung der Vpr-Verpackung in Virus-ähnliche Partikel. (A) Nachweis des Vpr-Proteins und (B) Nachweis der Gag-Proteine. Eine serielle 1:2 Verdünnungsreihe des Vaccinia-Virus wurde für die Infektion verwendet. Im Ansatz IT wurden COS-Zellen mit verschiedenen Virus-Verdünnungen infiziert (1-10) und anschließend mit den Plasmiden pCMV6MVpr und p2395´SpSpM131 transfiziert. Im Ansatz TI erfolgte zuerst die Transfektion mit pCMV6MVpr und p2395´SpSpM131 gefolgt von der Infektion mit vier der Verdünnungsstufen (1-4). Nach 48 Stunden wurden Virus-ähnliche Partikel aus dem Zellkulturüberstand sedimentiert, lysiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis des Vpr-Proteins bzw. der Gag-Proteine erfolgte im Westernblot mittels der Antikörper α-Myc9E10 (α-Myc) bzw. α-Gag55-2F12 (α-Gag). (-), nicht transfizierte Zellen. KV, mit pCMV6Mvpr und p2395´SpSpM131 transfizierte Zellen. KL, Kontrollysate, die nachweislich Vpr (Vpr) oder Gag (Gag) exprimieren. 1-10, Infektion mit einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe von Vaccinia. Größenangaben des Proteinstandards (M) am linken Rand in kDa.

Virus infiziert, und gleichzeitig mit p2395´SpSpM131 und pCMV6Mvpr transfiziert. Zusätzlich wurden zwei Parallelansätze untersucht. Im ersten Ansatz wurden Zellen zuerst mit dem Virusstock infiziert und direkt im Anschluß transfiziert. Der zweite Ansatz dagegen wurde zuerst transfiziert und 24 Stunden später infiziert.

Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und Virus-ähnliche Partikel aus dem Überstand sedimentiert. Nach der Lyse mit dem SDS-Probenpuffer wurden die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf einen Membranfilter transferiert. Als Positivkontrolle dienten Zellysate, von denen bekannt war, daß sie entweder

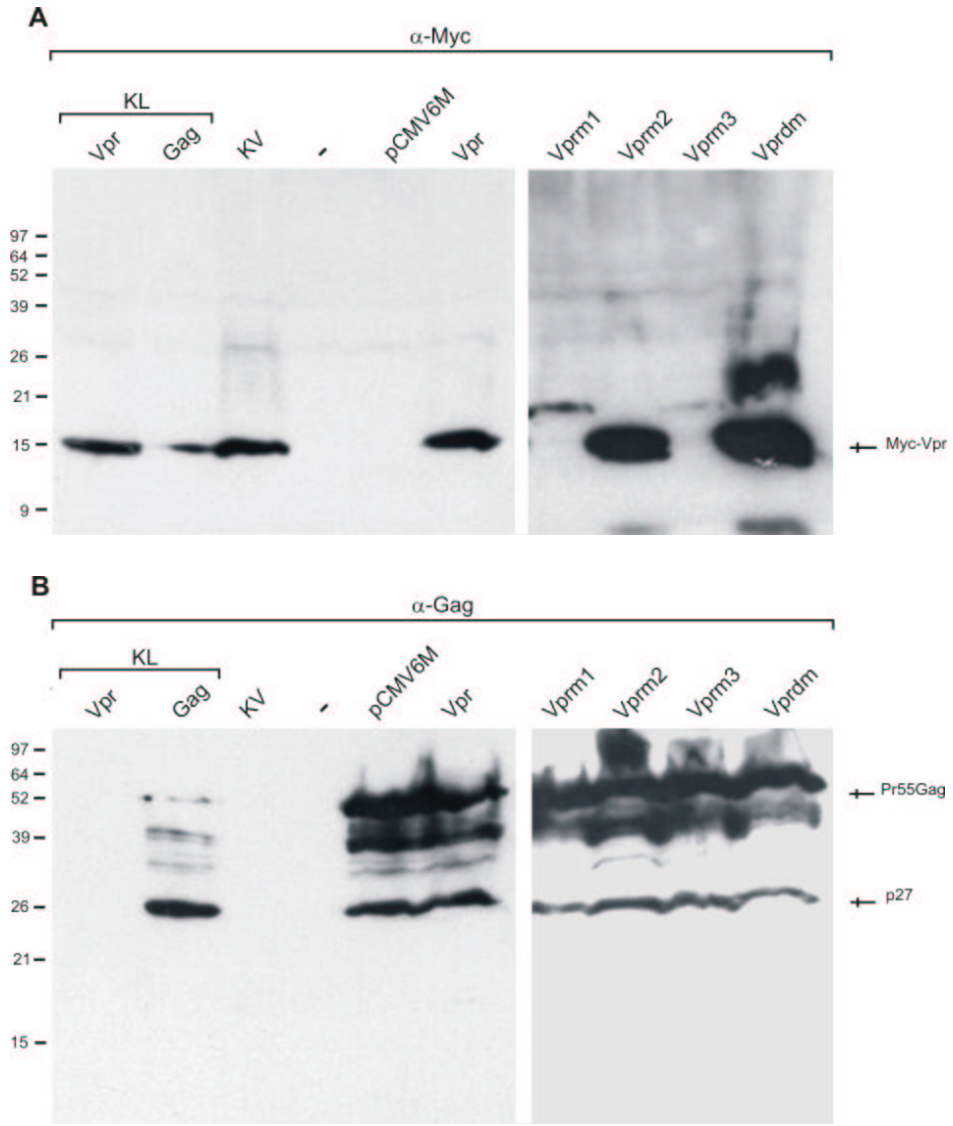


Abb. 15:Nachweis von Vpr- und Gag-Proteinen in COS-Zellysaten. (A) Expression von Vpr-Proteinen und (B) Expression von Gag-Proteinen in COS-Zellysaten. COS-Zellen wurden mit rekombinantem Vaccinia Virus infiziert und anschließend mit Expressionskonstrukten für Vpr bzw. für die Vpr-Mutanten und mit p2395´SpSpM131 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die gesamtzellulären Lysate über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Vpr- und Gag-Proteine wurden im Westernblot mit den Antikörpern α-Myc9E10 (α-Myc) und α-Gag55-2F12 (α-Gag) nachgewiesen. (-), nicht transfizierte Zellen. KV, mit pCMV6Mvpr und p2395´SpSpM131 transfizierte Zellen. KL, Kontrollysate, die nachweislich Vpr (Vpr) oder Gag (Gag) exprimieren. pCMV6M, mit dem leeren Vektor transfizierte Zellen. Vpr, Vprm1, Vprm2, Vprm3, Vprdm, mit den Expressionskonstrukten für Wildtyp-Vpr und für die Mutanten transfizierte Zellen. Größenangaben des Proteinstandards am linken Rand in kDa.

Myc-Vpr-Fusionsproteine oder Gag-Proteine enthielten. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte Zellen bzw. Zellen, die transfiziert, aber nicht mit $chTF_{7-3}$ infiziert waren. Der Expressionsnachweis für das Myc-fusionierte Vpr-Protein erfolgte im Westernblot mit Hilfe des monoklonalen Antikörpern α-Myc9E10 (Abb. 13A und 14A). Anschließend wurden die Antikörper von der Membran abgewaschen und der Nachweis mit dem monoklonalen Antikörper α-Gag55-2F12 durchgeführt, um die Expression der Gag-Proteine nachzuweisen. (Abb. 13B und 14B).

Im dem Versuchsansatz, in dem zuerst mit Vaccinia infiziert und anschließend transfiziert wurde, war die Expression von Vpr durch hohe Infektionsdosen vollständig inhibiert (Abb. 13A). Erst ab einer 16fachen Verdünnung war eine gleichmäßige Vpr-Expression nachweisbar, die kaum durch die Infektionsdosis beeinflußt wurde. Im Versuchsansatz, in dem erst die Transfektion und dann die Infektion erfolgte, wurde Vpr ab einer 4fach verdünnten Infektionsdosis exprimiert. Im Gegensatz dazu korrelierte die Expression von Gag direkt mit der für die Infektion eingesetzten Virusdosis. Nur bei den ersten beiden sehr hohen Infektionsdosen war eine verminderte Expression zu beobachten (Abb. 13B). In den nicht transfizierten Zellen war keine Protein-Expression nachweisbar (Abb. 13 und 14). Zellen, die nicht infiziert, aber transfiziert worden waren, zeigten Vpr- aber keine Gag-Expression.

In den entsprechenden Ansätzen mit sedimentierten virusähnlichen Partikeln konnte jedoch kein Vpr-Protein nachgewiesen werden (Abb. 14A). Somit war kein Vpr-Protein in Viruspartikel verpackt worden oder die Sensitivität des Tests war zu gering. Daß virusähnliche Partikel produziert wurden, geht deutlich aus dem Nachweis von Gag-Proteinen hervor (Abb. 14B). Auch hier nahm die Produktion Virus-ähnlicher Partikel mit zunehmender Verdünnung des Inokulums ab. In den Zellysaten war sowohl der Pr55gag-Vorläufer, als auch in geringem Umfang fertig prozessiertes p27-Kapsidprotein vorzufinden, während in den sedimentierten virusähnlichen Partikeln überwiegend das p27-Kapsidprotein nachweisbar war.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden COS-Zellen mit 16fach verdünntem Virusstock infiziert und anschließend mit Expressionskonstrukten für Myc-fusionierte Vpr-Mutanten bzw. mit Wildtyp-Vpr und mit p2395´SpSpM131 kotransfiziert. Als Negativkontrolle dienten zum einen nicht transfizierte Zellen, Zellen, die mit dem leeren Vektor pCMV6M transfiziert wurden und Zellen, die zwar transfiziert wurden, aber nicht infiziert waren. Da im Rahmen des beschriebenen Vorversuchs keine Verpackung von Vpr in virusähnliche Partikel nachgewiesen werden konnte, wurden für diesen Versuch jeweils drei Ansätze parallel infiziert und transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen und Zellkulturüberstände der parallelen Ansätze vereinigt und die Virus-ähnlichen Partikel sedimentiert. Der Expressionsnachweis erfolgte wiederum im Westernblot über spezifische Antikörper gegen

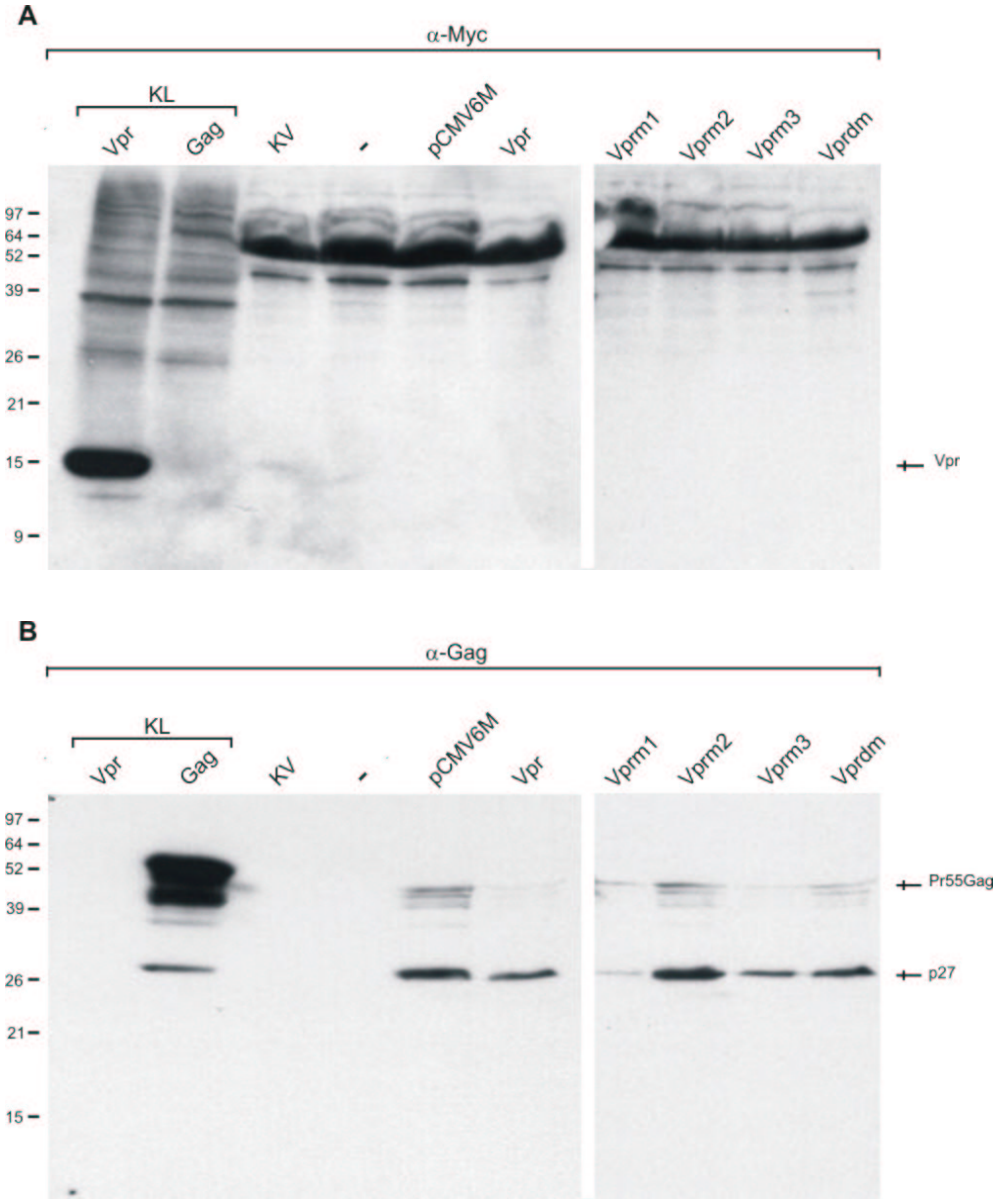


Abb. 16: Gag-vermittelte Verpackung von Vpr in Virus-ähnliche Partikel. (A) Nachweis von Vpr-Proteinen und (B) Nachweis von Gag-Proteinen in Virus-ähnlichen Partikeln. COS-Zellen wurden mit rekombinantem Vaccinia Virus infiziert und anschließend mit Expressionskonstrukten für Vpr bzw. für die Vpr-Mutanten und mit p2395´SpSpM131 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die aus dem Zellkulturüberstand sedimentierten Virus-ähnlichen Partikel über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Westernblot mit den Antikörpern α-Myc9E10 (α-Myc) und α-Gag55-2F12 (α-Gag) nachgewiesen. (-), nicht transfizierte Zellen. KV, mit pCMV6Mvpr und p2395´SpSpM131 transfizierte Zellen. KL, Kontrollysate, die nachweislich Vpr (Vpr) oder Gag (Gag) exprimieren. pCMV6M, mit dem leeren Vektor transfizierte Zellen. Vpr, Vprm1, Vprm2, Vprm3, Vprdm, mit den Expressionskonstrukten für Wildtyp-Vpr und für die Mutanten transfizierte Zellen. Größenangaben des Proteinstandards am linken Rand in kDa.

den Myc-Fusionsanteil von Vpr und gegen Gag-Proteine. In den Zellysaten waren Vpr und die Vpr-Mutanten nachweisbar (Abb. 15A). Allerdings war das Expressionsniveau der einzelnen Vpr-Proteine äußerst variabel. Während die Mutanten Vprm2 und Vprdm ein

starkes Expressionsniveau besaßen, waren Vprm1 und Vprm3 nur bei längeren Expositionszeiten nachweisbar. Die Gag-Expression war in den Lysaten aller Proben vergleichbar gut (Abb. 15B). In den Ansätzen mit sedimentierten virusähnlichen Partikeln konnten auch bei längeren Expositionszeiten kein Vpr und keine Vpr-Mutanten nachgewiesen werden (Abb. 16A). Die Produktion virusähnlicher Partikel konnte über den Nachweis von Gag-Proteinen bestätigt werden, jedoch war die Produktion mäßig (Abb. 16B). Versuche das Kulturvolumen von 25 cm^2-Schalen auf 80 cm^2-Schalen hochzuskalieren zeigten eine sehr variable, nicht reproduzierbare Expression von Vpr- und Gag-Proteinen. Somit ist keine Aussage möglich, inwieweit die gesetzten Mutationen die Verpackung von Vpr in Viruspartikel beeinflussen.

5. Diskussion

Das *vpr*-Gen wird sowohl in Immundefizienzvirus-Isolaten des Menschen, als auch in Isolaten einer Vielzahl nichthumaner Primaten gefunden. Es gehört zu den am höchsten konservierten regulatorischen Proteinen der Immundefizienzviren (Wong-Staal *et al*., 1987). Aufgrund dieser hohen Konservierung dürfte das Vpr-Protein eine wichtige Funktion für das Virus haben. Für die virale Replikation in T-Zellen spielt das *vpr*-Gen nur eine untergeordnete Rolle, wogegen die Replikation in Makrophagen durch Vpr verstärkt wird (Balliet *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 1990b; Connor *et al.*, 1995; Dedera *et al.*, 1989; Ogawa *et al.*, 1989; Lang *et al.*, 1993; Heinzinger *et al.*, 1994). Das Vpr-Protein ist gut immunogen in AIDS-Patienten (Wong-Staal *et al*., 1987; Reiss *et al*., 1990) und in SIV_{mac}-infizierten Rhesusaffen (Yu *et al*., 1990). Um die Bedeutung des *vpr*-Gens für die virale Replikation und Pathogenität zu vestehen, wurden Infektionsstudien an Rhesusaffen mit *vpr*-Mutanten von SIV_{mac} durchgeführt. So konnte gezeigt werden, daß Punktmutationen im *vpr*-Gen innerhalb von sechs Wochen nach Inokulation bei 50% der Versuchstiere zum Wildtyp revertierten (Lang *et al.*, 1993). Diese Reversion zeigte, daß ein hoher Selektionsdruck für ein funktionelles *vpr in vivo* vorherrscht. Dennoch kann in Abwesenheit von *vpr* eine Progression zu AIDS in Rhesusaffen beobachtet werden, jedoch nur in Gegenwart eines funktionellen *vpx*-Gens (Gibbs *et al.*, 1995; Hoch *et al.*, 1995). Dies weist darauf hin, daß möglicherweise bei SIV_{mac}/HIV-2 die Gene *vpr* und *vpx* partiell redundante Funktionen erfüllen, die bei HIV-1 vom *vpr*-Gen übernommen werden. Trotz dieser offensichtlichen Relevanz des *vpr*-Gens ist die molekulare Funktionsweise von Vpr noch weitgehend unklar. In der Vergangenheit wurden eine Reihe von biochemischen Eigenschaften und Funktionen vor allem für das Vpr-Protein von HIV-1 beschrieben. Hierzu zählen die nukleäre Lokalisation von Vpr, die Verpackung in Viruspartikel, der nukleäre Import des Präintegrationskomplexes und der Zellzyklusarrest durch Vpr. Um die Bedeutung dieser Funktionen von Vpr bei SIV_{mac} besser einzuschätzen, wurde im Rahmen dieser Arbeit das *vpr*-Gen von SIV_{mac}239 mutiert und die Vpr-Mutanten funktionell charakterisiert. Die hier beschriebenen Analysen umfassen sowohl die Lokalisation von Vpr in der Zelle, als auch die Inkorporation von Vpr in virusähnliche Partikel. Es ist geplant unter Verwendung der charakterisierten Vpr-Mutanten die Bedeutung dieser Funktionen für die virale Replikation *in vivo* und die Pathogenese im Tiermodell zu überprüfen.

Für die geplanten biochemischen und funktionellen Untersuchungen war es nötig, den Expressionsnachweis des Vpr-Proteins und der von ihm abgeleiteten Mutanten zu ermöglichen. Vpr sollte mit Hilfe von eukaryonten Expressionsplasmiden als N-terminales Myc- oder als Hämagglutinin-Fusionsprotein exprimiert werden, und mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern gegen das Myc- oder das Hämagglutinin-Epitop nachgewiesen

werden. Ein solches Vorgehen ist sinnvoll, da nicht sichergestellt ist, daß die bisher verwendeten polyklonalen Kaninchenseren die zu erstellenden Vpr-Mutanten erkennen. Durch die eingeführten Punktmutationen könnte eine Konformationsänderung in Vpr hervorgerufen werden, die eine Detektion ohne Epitop-Markierung nicht mehr nachweisbar macht. Die N-terminale Epitop-Markierung wurde gewählt, da bereits in Publikationen anderer Gruppen für HA-Vpr-Fusionsproteine gezeigt werden konnte, daß sie keinen negativen Einfluß auf die Verpackungsfunktionen von HIV-1-Vpr hatten. So konnte nachgewiesen werden, daß N-terminale Fusionsproteine von Vpr in Viruskapside verpackt werden (Paxton *et al.*, 1993; Okui *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1995). Auch der von Vpr verursachte Zellzyklusarrest und die nukleäre Lokalisation wurden nicht negativ beeinflußt (DiMarzio *et al.*, 1995; Stivahtis *et al.*, 1997).

Nach Transfektion von COS-zellen mit Expressionskonstrukten für Myc- bzw. HA-Epitop-markiertes Vpr-Protein konnte das Myc-Vpr-Fusionsprotein sowohl mit α-Myc-Antikörpern als auch mit polyklonalen α-Vpr Kaninchenseren in Zellysaten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte keine Expression des HA-Vpr-Fusionsproteins beobachtet werden. Dies war überraschend, da aus Publikationen bekannt war, daß mit genau dem selben Antikörper (α-HA12CA5) der Nachweis von HA- Fusionsproteinen von HIV-1 Vpr gelungen war (Paxton *et al.*, 1993). Daß im Rahmen der hier durchgeführten Experimente HA-fusioniertes Vpr überhaupt nicht im Lysat nachweisbar war, könnte darauf hindeuten, daß entweder das SIV_{mac}-abgeleitete HA-Vpr-Protein in COS-Zellen instabil war und degradiert wurde, oder daß die antigenen Determinanten im Protein so sehr verändert waren, daß sowohl ein Nachweis des Vpr-Anteils, als auch der HA-Komponente nicht mehr möglich war. Daher wurde für die nachfolgende Mutagenese sowie für funktionelle Untersuchungen das Myc-Fusionsprotein von Vpr verwendet.

Die Untersuchungen zur Domänenstruktur des Vpr-Proteins von SIV_{mac} sollten durch die Identifizierung antigener Determinanten in Vpr abgerundet werden. Idealerweise sollten die durch monoklonale Antikörperbindung identifizierten Determinanten mit den später identifizierten funktionellen Domänen übereinstimmen. Die Überstände von 11 Hybridomen, die im Vorfeld der Arbeit durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit β-Galaktosidase-Vpr-Fusionsproteinen gewonnen wurden, wurden auf spezifische Reaktivität gegen Vpr überprüft. Unter Verwendung von prokaryont exprimiertem Glutathion-S-Transferase-Vpr-Fusionsprotein konnte die Produktion von Vpr-spezifischen Antikörpern für drei Hybridomzellinien nachgewiesen werden. Ein Antikörper-Isotypisierungstest ergab, daß es sich um IgM-Antikörper handelte, womit eine Aufreinigung über Protein A nicht möglich war. Der Nachweis von transient in COS-Zellen exprimierten Myc-Vpr-Fusionsproteinen war unter Verwendung der unaufgereinigten Hybridom-Überstände nicht möglich. Vermutlich ist die

Sensitivität des Nachweises auf Grund der geringen Antikörperkonzentration und der relativ geringen Menge an Vpr-Antigen zu schwach und liegt deshalb unter der Nachweisgrenze. Zukünftig ist geplant diese Antikörper aus den Zellkulturüberständen aufzureinigen, um die Untersuchungen zu den antigenen Determinanten in Vpr zu ermöglichen.

Unter Verwendung PCR-vermittelter Mutagenese sollten zwei konservierte Bereiche des $SIV_{mac}239$ Vpr mutiert werden, um in nachfolgenden funktionellen Analysen deren Bedeutung für die Kernlokalisation, die Verpackung in Viruspartikel und den Zellzyklusarrest aufzuklären. Die beiden zu untersuchenden Bereiche umfaßten die amphipathische α-Helix am aminoterminalen Ende und die beiden HxRxG-Motive am carboxyterminalen Ende von Vpr. Dabei wurden im Bereich der amphipathischen α-Helix an den Positionen 21 und 23 die Aminosäure Valin und an den Positionen 24 und 27 die Aminosäure Leucin gegen Alanin substituiert. Der Austausch gegen ähnliche Aminosäuren wurde gewählt, da bei HIV-1 beobachtet wurde, daß eine analoge Mutation die Verpackung von Vpr in Viruspartikel eliminiert (Mahalingam *et al.*, 1995). Die C-terminalen HxRxG-Motive wurden jeweils einzeln und in Kombination mutagenisiert. Für die Erzeugung der ersten HxRxG-Mutante wurden die drei Aminosäuren Histidin (72), Arginin (74) und Glycin (76) gegen Alanin substituiert. Zur Herstellung der zweiten C-terminalen Mutante wurden die Aminosäuren Histidin (79), Arginin (81) und Glycin (83) gegen Alanin substituiert. Alle sechs genannten Aminosäuren der HxRxG-Motive wurden wie beschrieben mutiert, um eine kombinierte HxRxG-Mutante zu erzeugen. Auch für Mutationen in diesem Bereich war für HIV-1 Vpr bereits publiziert, daß sie den Vpr-induzierten Zellzyklusarrest aufheben (DiMarzio *et al.*, 1995; Macreadie *et al.*, 1995). Nach vollständiger Sequenzanalyse aller Klone stellte sich heraus, daß sämtliche Mutanten außer den erwünschten Mutationen noch zwei zusätzliche Punktmutationen im C-terminalen Bereich an den Positionen 6692 und 6697 (bezogen auf das $SIV_{mac}239$-Genom) enthielten. Es zeigte sich, daß die Mutation an Position 6697 eine stille Mutation war und somit keinen Aminosäureaustausch nach sich zog. Die Mutation an Position 6692 dagegen verursachte auf Aminosäureebene einen Austausch von Prolin gegen Threonin. Da der Bereich dieses zusätzlichen Basenaustausches mit dem 3´-Oligonukleotid überlappt, ist hier mit großer Wahrscheinlichkeit ein Fehler bei der Synthese des Oligonukleotides unterlaufen. Hierauf wurden mit Hilfe eines neuen Oligonukleotides alle Mutanten nochmals amplifiziert, um diese Mutationen zu beheben. Nach erneuter Klonierung und Sequenzierung stellte sich heraus, das zwar die Mutation an Position 6697 behoben war, aber die eigentlich relevante zusätzliche Punktmutation immer noch erhalten war. Da für die Anfertigung dieser Arbeit nur ein begrenzter Zeitraum zur Verfügung steht, war es nicht möglich, diese zusätzliche Mutation zu beheben. Dies erschwerte es auch, eine Aussage darüber zu treffen, ob die beobachteten Ergebnisse dieser Arbeit nun auf dem Einwirken dieser Zusatzmutation oder auf den gewünschten Punktmutationen beruhen.

Für HIV-1 Vpr wurde beschrieben, daß es im Zellkern akkumuliert (Fouchier *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1993; Mahalingam *et al.*, 1997; Vodicka *et al.*, 1998). Es war aber bisher nicht möglich der nukleären Lokalisation ein Sequenzelement zuzuordnen, da in Vpr kein typisches basisches NLS (*nuclear localisation signal*) vorgefunden wurde. Die Anwesenheit in der nukleären Matrix könnte mit der Rolle von Vpr bei der Transaktivierung der viralen Genexpression zusammenhängen (Cohen *et al.*, 1990b). Außerdem könnte die Funktion von HIV-1 Vpr, den Import des viralen Präintegrationskomplexes in den Zellkern zu fördern, hiermit zusammenhängen (Heinzinger *et al.*, 1994). Mit dieser Funktion stimmt überein, daß Vpr nicht in sich teilenden Zellen benötigt wird, aber für die virale Replikation in Makrophagen nötig ist (Balliet *et al.*, 1994; Connor *et al.*, 1995; Heinzinger *et al.*, 1994). Die Untersuchungen zur Lokalisation von SIV_{mac} Vpr und den erstellten Vpr-Mutanten wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz an transfizierten COS-Zellen durchgeführt. Der Nachweis der Vpr-Proteine erfolgte über das N-terminale Myc-Epitop. Wildtyp-Vpr exprimirende Zellen, zeigten, vergleichbar zu HIV-1 Vpr, die Grünfluoreszenz überwiegend im Zellkern und nicht im Zytoplasma. Alle Vpr-Mutanten (Vprm1, Vprm2, Vprm3, Vprdm) wurden aufgrund ihrer Grünfluoreszenz im Zytoplasma und nur zu einem sehr geringen Teil auch im Zellkern nachgewiesen, wobei hier eine Überlagerung mit zytoplasmatischer Fluoreszenz nicht ausgeschlossen werden kann. Um diese Frage zu klären, sind Untersuchungen mittels eines konfokalen Mikroskops notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden. Die Sequenzmotive, die für die nukleäre Lokalisation von HIV-1 Vpr relevant sind, werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Übereinstimmend mit der hier beobachteten zytoplasmatischen Lokalisation von SIV_{mac}-Vpr-Mutanten in den C-terminalen HxRxG-Motiven, sind die letzten 19 Aminosäuren für die nukleäre Lokalisation von HIV-1 Vpr notwendig (Lu *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu SIV_{mac} Vpr weist der C-terminale Bereich von HIV-1 Vpr jedoch einen ausgesprochen basischen Charakter auf. Darüber hinaus wurde auch für die amphipathische α-Helix von HIV-1 Vpr eine Bedeutung für die Kernlokalisation beschrieben (Mahalingam *et al.*, 1997), was hier unter Verwendung der α-Helix-Mutante für SIV_{mac} Vpr bestätigt wurde. Schließlich gibt es auch Publikationen, die für eine sogenannte Leucin- und Isoleucin-reiche LR-Domäne, im zentralen Bereich von HIV-1 Vpr, eine Beteiligung an der Kernlokalisation beschreiben (DiMarzio *et al.*, 1995; Mahalingam *et al.*, 1997). Für diesen zentralen Bereich wurden allerdings im Rahmen dieser Arbeit keine Mutanten von SIV_{mac} Vpr produziert. Eine neuere Publikation schließlich bezeichnet sogar die C-terminalen Sequenzen als absolut nicht relevant für die Kernlokalisation von HIV-1 Vpr (Fouchier *et al.*, 1998). Die widersprüchlichen Ergebnisse zu Kernlokalisationsmotiven in HIV-1 Vpr könnten darauf beruhen, daß Mutationen in den sehr kleinen Vpr-Proteinen (ca. 100 Aminosäuren) zu Konformationsänderungen des gesamten Proteins führen. Der Verlust der Kernlokalisation würde dann eine generelle Konformationsänderung und Inaktivierung

des Proteins widerspiegeln und keine selektive Inaktivierung einer Funktion. Schwierig ist, mit Blick auf die widersprüchlichen Ergebnisse in den Publikationen abzuschätzen, inwiefern die Zusatzmutation am carboxyterminalen Ende der Mutanten Einfluß auf die hier beschriebenen Ergebnisse hatte.

Im Rahmen der Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von Wildtyp-Vpr wurde beobachtet, daß viele Vpr-exprimierende Zellen abgekugelt waren und nicht ausgespreitet auf den Kultur-Schalen angewachsen waren. Diese veränderte Morphologie wurde nicht für Zellen nachgewiesen, die Vpr mit Mutationen im α-Helix- oder den HxRxG-Motiven exprimierten. Eine mögliche Erklärung ist, daß durch den Vpr-vermittelten Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase die Abkugelung der Zellen bedingt wird. Dies würde bedeuten, daß alle untersuchten Vpr-Mutanten defekt für die Funktion des Zellzyklusarrestes sind. Leider war im Rahmen dieser Diplomarbeit keine Zeit mehr, um die geplanten Zellzyklusanalysen durchzuführen.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, Sequenzmotive in SIV_{mac}239 Vpr zu charakterisieren, die für die Verpackung in Viruskapside notwendig sind. Die Kapside der Immun-defizienzviren werden an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran aus dem Vorläufer-Protein Pr55gag zusammengebaut (Gelderblom *et al.*, 1987). Das Matrixprotein, das Kapsidprotein (p27), das Nukleokapsidprotein und das p6 entstehen durch proteolytische Spaltung des Pr55gag-Vorläufers im Verlauf der Virionreifung. Für den Einbau von HIV-1 Vpr in Viruspartikel ist sowohl das p6-Protein als auch die N-terminale αHelix in Vpr notwendig (Mahalingham *et al.*, 1995; Paxton *et al.*, 1993). Für die Expression von Gag und die Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln wurde der *gag*-Leserahmen in den eukaryonten Expressionsvektor pFJAE kloniert. Es gelang nicht, mit Hilfe dieses Plasmides Gag in COS-Zellen zu exprimieren. Auch mit Hilfe des Plasmides pBRmacΔ*env*2Δ*nfrxluc*, das eine Expression von Gag unter der Kontrolle des eigenen LTR und der regulatorischen Proteine Tat und Rev ermöglicht, konnte nur ein schlechtes Expressionsniveau erreicht werden. Deshalb wurde ein Expressionssystem unter Verwendung eines rekombinanten Vaccinia-Virus gewählt, das die T7-RNA-Polymerase exprimiert und die Transkription von T7-Promotoren in eukaryonten Zellen ermöglicht. Die Gag-Expression erfolgte unter Verwendung des Plasmides p2395´SpSpM131, das den T7-Promotor stromaufwärts von *gag* trägt. Für die simultane Expression von Vpr- und Gag-Proteinen wurden somit COS-Zellen mit Vaccinia infiziert und mit den Expressionskonstrukten für Vpr sowie für abgeleitete Mutanten und p2395´SpSpM131 kotransfiziert. Mit diesem Versuchsansatz konnte eine gute Expression der Gag-Proteine erzielt werden. Die Analysen der sedimentierten virusähnlichen Partikel zeigten, daß weder für Vpr noch für Vpr-Mutanten eine Verpackung nachgewiesen werden konnte. Die fehlende Verpackung von Wildtyp-Vpr ist nicht auf die Expression zurückzuführen, da die Expression von Wildtyp-Vpr sowie der vier Mutanten in den Lysaten

der transfizierten und infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Auch zeigten die produzierten Virus-ähnlichen Partikel eine normale Prozessierung der Gag-Proteine, da p27-Protein in den Partikeln und der Pr55gag-Vorläufer in Zellysaten nachgewiesen wurde. Die negativen Befunde für die Vpr-Verpackung beruhen möglicherweise auf experimentellen Schwierigkeiten. Bei vorheriger Infektion mit Vaccinia-Viren war das Expressionsniveau der Vpr-Proteine äußerst variabel, und es war nicht möglich, trotz einer äquivalenten Infektionsdosis eine gleichmäßige Infektionsrate zu erreichen. Limitierend für den Nachweis der Virioninkorporation von Vpr könnte auch die eingesetzte Menge an Zellkulturüberstand gewesen sein. Ansätze im großen Maßstab zeigten eine inhomogene Infektion mit Vaccinia-Virus und konnten aus Zeitgründen nicht mehr optimiert werden. Für HIV-1 Vpr war jedoch gezeigt worden, daß N- und C-terminale Vpr-Fusionsproteine immer noch in Viruskapside verpackt werden und die Infektosität der Viren nicht beeinträchtigt wird. (DiMarzio *et al.*, 1995; Okui *et al.*, 1998; Paxton *et al.*, 1993; Stivahtis *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1995). Daher ist es unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen, daß für SIV_{mac} die Vpr-Fusionsproteine schlechter in Viruspartikel inkorporiert werden als Wildtyp-Vpr. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die Mutagenese des *vpr*-Gens sehr vorsichtig durchgeführt werden muß, um pleiotrope Efekte zu vermeiden.

6. Material und Methoden

6.1 Biologisches Material

6.1.1 Viren

Für die Expression der Gag-Proteine von SIV_{mac} in COS-7-Zellen wurde der Virusstock $chvTF_{7-3}$ verwendet. Hierbei handelt es sich um ein rekombinantes Hühner-Pockenvirus, das das Gen für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 exprimiert (National Institute of Health, 1986).

6.1.2 Bakterien

Für Plasmidisolierungen und für die prokaryonte Expression von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen wurde der *E. coli* Stamm XL2-Blue (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

XL2-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F` proAB lacI* ^{q}*Z ΔM15* Tn *10* (Tet^{r}) Amy Cam^{r}]^{a}

6.1.3. Zellinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zellinien verwendet:

COS-1 und COS-7: Von der etablierten Affennieren-Zellinie CV1 abgeleitete Zellinie, die durch Transformation mit einer replikationsdefekten Mutante des Affenvirus [Simian Virus (SV)] 40 entstanden ist (Gluzman, 1981). COS-Zellen exprimieren das große T-Antigen von SV40. Somit können Plasmide, die den SV40-Replikationsursprung (ori) tragen, in diesen Zellen repliziert werden.

55-2F12: Mäuse-Hybridomzellinie, die IgG_{2b} monoklonale Antikörper produziert. Die Reaktivität der Antikörper ist spezifisch für die Kapsidproteine p27 und den Pr55gag-Vorläufer von SIV_{mac} (NIH AIDS Research and Reference Reagent Programm).

6.2 Nukleinsäuren

6.2.1 Plasmide

6.2.1.1 Erhaltene Plasmide

Die folgenden, im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide, enthalten ein Ampicillin-Resistenzgen:

p2395´SpSp: Die 5´-Hälfte der proviralen DNA von SIV_{mac}239 mit vollständigem 5´-LTR, *gag*, *pol*, *vif*, *vpx*, und *vpr* ist in den Vektor pBS (Stratagene, Heidelberg) inseriert (Kestler *et al*., 1990).

p2395´SpSpM131: Von p2395´SpSp abgeleitetes Plasmid, das die Mutation des *vpr*-Startkodons ATG zu TTG enthält. Der Promotor für die T7-RNA-Polymerase befindet sich stromaufwärts des 5´-LTRs und des *gag*-Leserahmens (Lang *et al.*, 1993).

pBRmacΔ*env*2Δ*nfrxluc*: Das SIV_{mac}239 Genom mit Deletionen in *env*, *nef*, *vif*, *vpr* und *vpx* ist in den Vektor pBR322 (Sutcliffe, 1979) inseriert. Zusätzlich ist das Gen für Luciferase in den *env*-Leserahmen inseriert (Klaus Überla, Erlangen).

pcDNA3Flagvpr: Von pcDNA3 abgeleitetes eukaryontes Expressionsplasmid, das den starken Enhancer-Promotor des humanen Cytomegalovirus enthält und die Expression eines Vpr-Fusionsproteins mit N-terminalem Flag-Epitop (Aminosäuresequenz: DYKDDDDK) ermöglicht (Jae Jung, Harvard Medical School, Boston).

pCMV6H-PTP: Von pCMV5 abgeleitetes Expressionsplasmid, das den starken Enhancer-Promotor des humanen Cytomegalovirus enthält und die transiente Expression eines Fusionsproteins der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) mit dem Hämagglutinin (HA)-Epitop (Aminosäuresequenz: YPYDVPDYA) in eukaryonten Zellen ermöglicht. (Jonathan Chernoff, Institute for Cancer Research, Philadelphia).

pCMV6M-MST2: Von pCMV5 abgeleitetes Expressionsplasmid, das den starken Enhancer-Promotor des humanen Cytomegalovirus enthält und die transiente Expression eines Fusionsproteins der Proteinkinase Ste20 aus Hefe mit dem Myc-Epitop (Aminosäuresequenz: EQKLISEEDL) ermöglicht (Jonathan Chernoff, Institute for Cancer Research, Philadelphia).

pFJAE: Von pcDL-SRα296 abgeleitetes Plasmid, das unter der Kontrolle eines Hybridpromotors aus der SV40 ori/early-Region und der R-U5 Region des

humanen T-Zell-Leukämievirus Typ I (HTLV-I) eine starke transiente Expression in Säugetierzellen ermöglicht (Jung *et al*., 1995)

pGEX2TK: Prokaryontes Expressionsplasmid, das unter der Kontrolle des Lac-Operators Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert und somit die Herstellung von GST-Fusionsproteinen ermöglicht (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

pEGFP-C1: Eukaryontes Expressionsplasmid, das das Gen für ein grünfluoreszierendes Protein GFP (Clonetech, Heidelberg) unter Kontrolle des CMV Immediate Early Promotors enthält und aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Chalfie *et al*., 1994).

6.1.2.1 Im Rahmen der Arbeit konstruierte Plasmide

Eukaryonte Expressionsplasmide:

pCMV6Hvpr: Erlaubt die transiente Expression von SIV_{mac}239 Vpr als Hämagglutinin-Fusionsprotein.

pCMV6Mvpr: Erlaubt die transiente Expression von SIV_{mac}239 Vpr als Myc-Fusionsprotein.

pCMV6Mvprm1: Von pCMV6Mvpr abgeleitetes Expressionsplasmid mit sechs *Missense*-Mutationen in den aminoterminalen Kodons 21, 23, 24 und 27.

pCMV6Mvprm2: Von pCMV6Mvpr abgeleitetes Expressionsplasmid mit fünf *Missense*-Mutationen in den carboxyterminalen Kodons 72, 74 und 76.

pCMV6Mvprm3: Von pCMV6Mvpr abgeleitetes Expressionsplasmid mit fünf *Missense*-Mutationen in den carboxyterminalen Kodons 79, 81 und 83.

pCMV6Mvprdm: Von pCMV6Mvpr abgeleitetes Expressionsplasmid mit zehn *Missense*-Mutationen in den carboxyterminalen Kodons 72, 74, 76, 79, 81 und 83.

pFJAE3516gag: Expressionskonstrukt für die Gag-Proteine von SIV_{mac}.

Prokaryontes Expressionsplasmid:

pGEX2TKvpr: Erlaubt die Expression des SIV_{mac}239 Vpr als GST-Fusionsproteins.

6.2.2 Oligonukleotide

Die für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentech (Seraing, Belgien) und ARK Scientific (Darmstadt) synthetisiert. Die angegebenen Positionen sind jeweils auf die Position im SIV_{mac}239 Genom bezogen. Zur Erleichterung von Klonierungen wurden mit den Primern am 5´-Ende Restriktionsschnittstellen für *BamH*I (SL80) und *EcoR*I (SL81) eingefügt (fett).

Name	Position	Sequenz (5´-3´)
SL80	6410/6428	CG**GGATCC**GAAGAAAGACCTCCAGAAA

SL81	6692/6709	CG**GAATTC**ATAGCATGCTTCTAGAGGG

Für die Sequenzanalyse wurden ebenfalls die Primer SL80 und SL81 verwendet.

Für die *in vitro*-Mutagenese der N-terminalen α-Helix von Vpr wurde das Oligonukleotid SL100 verwendet. Für die *in vitro*-Mutagenese der C-terminalen HxRxG-Motive wurden die Primer SL101 und SL102 verwendet. Fettgedruckte Buchstaben geben die A→G, T→C, Transitionen und G→C, T→G, C→G Transversionen wieder.

Name	Position	Sequenz
SL100	6458/6494	TTCTTCTTTC**GC**TTCTTCC**GC**A**G**CCTCC**G**CTACCCATTC
SL101	6610/6643	GCTCTTCATG**GC**TTTC**GC**AGGCG**C**ATGCATCCAC
SL102	6634/6670	ATGCATC**GC**CTCC**GC**AATCG**C**CCAACCTGGGGGAGGA

Zur Überprüfung der Primer wurde jeweils 1 µg der Oligonukleotide zusammen mit Vergleichs-Oligonukleotiden definierter Gößе in Oligo-Probenpuffer aufgenommen, 10 min bei 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden auf ein 15%iges denaturierendes Acrylamidgel (Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid 29:1) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 200 V in 1xTBE-Laufpuffer. Die Primer wurden durch *Shadow-casting* unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht.

6.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden von Sigma (München), Merck (Darmstadt) oder Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen, soweit dies hier nicht gesondert vermerkt ist.

6.3.1 Größenstandards für die Gelelektrophorese:

1 kb-DNA-Leiter (Gibco BRL, Eggenstein)

Rainbow-*Marker (Amersham, Braunschweig)*

Benchmark Protein ladder *(Gibco BRL, Eggenstein)*

6.3.2 Sonstige Chemikalien:

30% Acrylamid-Lösung (Roth, Karlsruhe)

2% Bisacrylamid-Lösung (Bio Rad, München)

Coomassie Brilliant Blue (Biomol, Hamburg)

DAPI (4´,6-Diamidino-2-Phenylindol, Alexis, Grünberg)

ECL+Plus (Amersham, Braunschweig)

Leupeptin (Biomol, Hamburg)

Lipofektamin (Gibco BRL, Eggenstein)

NF-Acrylamid (Roth, Karlsruhe)

Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Protein A/G-Agarose (Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg)

TEMED (N,N,N',N'Tetramethylethylendiamin, Bio Rad, Karlsruhe)

6.3.3 Enzyme:

Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Boe: Boehringer, Mannheim

Bio: New England Biolabs, Beverly, Mass., USA

Gib: Gibco BRL, Life Technologies, Neu.Isenburg

Restriktionsenzyme:

Enzym	**Organismus**	**Spaltstelle**	**Firma**
*Asp*718	Acinetobacter species	G/GTACC	Boe
*BamH*I	Bacillus amyloliquefaciens	G/GATCC	Gib/Bio
*EcoR*I	*Escherichia coli*	G/AATTC	Gib/Bio
*Hind*III	*Haemophilus influenzae*	A/AGCTT	Gib
*Kpn*I	*Klebsiella pneumoniae*	T/CTAGA	Gib
*Pst*I	*Providencia stuartii*	G/AATTC	Gib
*Sph*I	*Streptomyces phaeochromogenes*	CTGCA/G	Bio
*Xba*I	Xanthomonas badrii	GCATG/C	Gib

Tab. 2: Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme. Angegeben sind die Organismen, aus denen die Enzyme isoliert wurden, die entsprechenden Restriktionsschnittstellen und die Bezugsquellen.

Sonstige Enzyme:

Enzym	**Organismus**	**Firma**
DNA-Ligase	T4-Bakteriophage	Gib
Sap	*Saccharopolyspora species* GCTCTTC$(N)_1$	Bio
Vent DNA-Polymerase	*Thermococcus litoralis*	Bio
RNase A	Rinderpankreas	Boe

Tab. 3: Weitere Enzyme, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Aufgeführt sind die Organismen, aus denen die Enzyme isoliert wurden und die Firmen, von denen sie bezogen wurden.

6.3.4 Antikörper:

Antikörper	**Typ**	**Ursprung**
α-HA12CA5	Monoklonal/Maus	Boe
α-Gag55-2F12	Monoklonal/Maus	AIDS Reagent Depository
α-Myc9E10	Monoklonal/Maus	American Type Culture Colletion
α-Vpr #1-#11	Monoklonal/Maus	S. Lang
α-Vpr-KleoS5	Polyklonal/Kaninchen, β-gal-vpr	S. Lang
α-Vpr-S96S6	Polyklonal/Kaninchen, β-gal-vpr	S. Lang
α-Maus-HRP-Konjugat	Katze	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
α-Kaninchen-HRP-Konjugat	Katze	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
α-Maus-FITC-Konjugat	Ziege	DAKO, Glostrup

Tab. 4: Antikörper, Typ und Bezugsquellen

6.4 Biochemische und molekularbiologische Standardpuffer

Agarosegel-Auftragspuffer (10x): 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 25% (w/v) Ficoll type 400 in H_2O dest.

Agarosegel-Laufpuffer (TBE 1×): 89 mM Tris, 89 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA pH 8,3

Coomassiefärbung von Proteingelen:

Färbelösung: 0,1% Coomassie; 50% Methanol; 7% Eisessig in H_2O dest.

Entfärbelösung I: 50% Methanol; 7% Eisessig in H_2O dest.

EntfärbelösungII: 90% Methanol; 10% Eisessig in H_2O dest.

ECL-Lösungen:

Lösung A: 0,1 M Tris pH 8,6; 25% Luminol (Sigma A4685), 0,01% H_2O_2 in H_2O dest.

Lösung B: 0,11% Parahyroxycoumarinsäure (Sigma C9008) in DMSO

Lösungen für Plasmidaufreinigung:

Lösung 1: 50 mM Tris pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNAse A in H_2O dest.

Lösung 2: 1% SDS; 0,2 M NaOH in H_2O dest.

Lösung 3: 1,32 M Kaliumacetat pH 4,8 in H_2O dest.

PBSo (*phosphate buffered saline* ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}): 20 mM $NaH_2PO_4xH_2O$; 20 mM $Na_2HPO_4xH_2O$ und 2 mM $Na_4P_2O_8xH_2O$ in H_2O dest.

Oligo-Probenpuffer: 1xTBE in 90% Formamid

Protein-Transfer-Puffer für Semi-Phor™ (HOEFER): 25 mM Tris; 192 mM Glycin, 15% Methanol in H_2O dest.

Protein-Transfer-Puffer für Transblot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio Rad): 48 mM Tris, 39 mM Glycin; 20% Methanol in H_2O dest.

SDS-PAGE Laufpuffer (1×): 25 mM Tris; 250 mM Glycerin; 0,1% SDS in H_2O dest.

SDS-Probenpuffer (1×): 2% SDS; 5% ßME; 10% Glycerin; 1 mM EDTA; 0,005% Bromphenolblau; 62,5 mM Tris pH 6,8 in H_2O dest.

Strip-Puffer für Membranfilter: 100 mM βME; 2% SDS; 62,5 mM Tris pH 6,7 in H_2O dest.

TritonX-100: 0,2% TritonX-100 in PBSo

6.5 Medien

6.5.1 Medien für Bakterienkultur

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,8% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt; pH 7,2

Zur Selektion Ampicillin-resistenter Klone wurde dem Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Festmedien enthielten zusätzlich 1,5% Bacto-Agar. Für die Produktion von GST-Fusionsproteinen wurde dem Medium zusätzlich 0,2%

Glukose zugegeben, um die Repression des Promotors vor der Induktion mit 0,5 mM IPTG zu verbessern. Zur Lagerung wurden kleine Volumina von Übernachtkulturen 1:1 mit Glycerin gemischt und bei –80°C gelagert.

SOC-Medium: 2% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefe-Extract; 0,05% NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 20 mM Glucose; pH 7,0

6.5.2 Medien für die Zellkultur

Die Zellinien COS-1 und COS-7 wurden als adhärente Kulturen in DMEM (Dulbecco`s modified Eagle Medium; Gibco BRL, Eggenstein) kultiviert. Dem Medium wurde Glutamin (0,35 µg/ml), Streptomycinsulfat (0,12 µg/ml), Penicillin (0,12 µg/ml) und 10% fötales Kälberserum (FKS; Gibco BRL) zugegeben, dessen Komplementkomponenten durch 30minütige Inkubation bei 56°C inaktiviert wurden.

Für Transfektionen mit Lipofektamin wurde Opti-MEM der Firma Gibco BRL verwendet. Die Hybridomzellinie 55-2F12 wurde als Suspensionskultur unter Zusatz von Glutamin (0,35 µg/ml), Streptomycinsulfat (0,12 µg/ml), Penicillin (0,12 µg/ml) und 10% FKS in RPMI 1640 (Gibco BRL) gehalten.

6.6 Bakterienkultur

Die Anzucht von *E. coli*–Zellen erfolgte auf Festmedium im Brutschrank bei 37°C, Flüssigkulturen wurden bei 37°C auf einer geeigneten Schüttlerplattform inkubiert.

6.7 Zellkulturverfahren

Alle Zellkulturen wurden bei 7,0% CO_2, 80% relativer Luftfeuchtigkeit und 37°C inkubiert. Die Zellinien COS-1 und COS-7 wurden als adhärente Kulturen in Kunststofflaschen kultiviert. Bei Konfluenz der Adhäsionskultur wurden diese Kulturen mit Trypsin-EDTA (Gibco BRL) abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und 1:6 verdünnt. Die Hybridomzellinie 55-2F12 wurde als Suspensionskultur in Kunststofflaschen gehalten und alle 3 Tage ohne Zugabe von Trypsin in Medium resuspendiert und 1:10 verdünnt.

6.7.1 Infektion von Adhäsionskulturen mit chvTF7-3

COS-7-Zellen wurden in 6 well-Platten ausgesät, so daß sie am nächsten Tag zu ca. 80% konfluent waren. Um eine hohe Infektionsrate der Zellen zu erreichen, wurde eine geeignete Virusdosis über serielle Verdünnungsreihen in Opti-MEM ermittelt. Vor der Infektion wurde das Kulturmedium abgesaugt, und die Zellen mit 500 µl Virus in Opti-MEM überschichtet. Für den hier verwendeten Virusstock wurden 18 µl mit 482 µl Opti-MEM eingesetzt. Während der 30minütigen Inkubation wurden die Ansätze ca. alle 7 min kurz gemischt, um eine gleichmäßige Infektion der Zellen zu ermöglichen. Danach wurde der Infektionsansatz

abgesaugt, die Zellen mit 2 ml Opti-MEM versetzt und anschließend direkt unter Verwendung von Lipofektamin transfiziert (siehe unten).

6.7.2 Transfektion von Adhäsionskulturen:

Mit Hilfe der DEAE-Dextran-Methode wurden COS-1- und COS-7-Zellen transfiziert. Dazu wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion in 6 well-Platten ausgesät, so daß sie nach 24 h zu ca. 70% konfluent waren. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit 2 ml PBSo gewaschen. Pro Ansatz wurden 2 µg der zu transfizierenden DNA mit 200 µl einer DEAE-Dextran-PBSo-Lösung (DEAE-Dextran 500 µg/µl; Molekulargewicht 500000; Pharmacia, Freiburg) gemischt und gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurden 2 ml FKS-freies Medium mit Zusatz von Chloroquin (Endkonzentration 40 µg/ml Medium) zugegeben. Die Zellen wurden dann für 2,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das chloroquinhaltige Medium abgesaugt, und die Zellen wurden 2,5 min mit 1 ml einer 10%igen Dimethylsulfoxid-(DMSO)-Lösung in FKS-freiem Medium behandelt. Nach Entfernen der DMSO-Lösung wurden 3 ml frisches FKS-haltiges Medium zugegeben, und die Zellen wurden für 48 h im Brutschrank inkubiert.

Die mit $chvTF_{7-3}$ infizierten COS-7-Zellen wurden mit Hilfe von Lipofektamin (Gibco BRL, Neu-Isenburg) transfiziert. Hierzu wurden die Zellen 18-24 h vor der Transfektion in 6-well-Platten ausgesät, so daß sie zum Zeitpunkt der Transfektion 50-80% konfluent waren. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium durch 2 ml Opti-MEM ersetzt. Pro Transfektion wurde 1 µg DNA mit 200 µl Opti-MEM und 5 µl Lipofektamin versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Transfektionsansätzen wurden jeweils weitere 800 µl Opti-MEM pipettiert. Im Anschluß wurden die Ansätze vorsichtig auf die Zellen aufgetropft und für 5 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1 ml DMEM-Medium mit 20% FKS-Zusatz zugegeben, für 24 h inkubiert und anschließend das Medium durch normales Kulturmedium ersetzt.

6.7.3 Gewinnung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridoma-Zellen

Monoklonale Antikörper wurden aus dem Kulturüberstand konfluenter Kulturen gewonnen. Hierzu wurden Zellen und Zelltrümmer für 10 min bei 2000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde auf reaktive Antikörper im Westernblot getestet und bei 4°C gelagert.

6.8 DNA-Methoden

6.8.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Für präparative Plasmidaufreinigungen wurden 500 ml Übernachtkulturen angeimpft und die DNA mit Hilfe des *Wizard™ Plus Maxipreps* System von Promega (Mannheim) präpariert. Bis zur Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei 4°C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 258 nm mit folgender Formel ermittelt: 1 OD_{258} = 50 µg DNA/ml

Zusätzlich wurde die Konzentration in Agarose-Gelen durch Vergleich mit einem Größenmarker bekannter Konzentration überprüft.

Analytische Plasmidaufreinigungen wurden nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Hierzu wurden 5 ml Medium jeweils mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien bei 3000 rpm für 10 min abzentrifugiert, in 200 µl Lösung 1 resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 lysiert. Zur Neutralisation wurden 200 µl Lösung 3 zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurden die gefällten Proteine sowie die Protein-assoziierte chromosomale DNA durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) abgetrennt. Der klare Überstand wurde abgenommen, und die Nukleinsäure mit 450 µl Isopropanol für 5 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (15 min, 13000 rpm) wurde das Sediment mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, erneut 7 min zentrifugiert, getrocknet und anschließend in H_2O dest. gelöst.

6.8.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Alle präparierten Plasmide wurden anhand bekannter Spaltkarten bzw. neu erstellter Sequenzierungen durch einfache und multiple Restriktionsendonuklease-Spaltungen nach Standardmethoden (Sambrook *et al*., 1989), unter Verwendung der vom Hersteller für das Enzym empfohlenen Puffer, überprüft. Die Enzymkonzentration pro Ansatz betrug etwa 1 bis 2 U spezifische Aktivität pro µg DNA. Die Ansätze wurden für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Restriktionsspaltung wurde durch Zugabe von Agarosegel-Auftragspuffer gestoppt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über ein 0,8-1,5% Agarosegel [0,8 % bzw. 1,5% (w/v) Agarose; 1× TBE-Laufpuffer; 0,3 µg/ml Ethidiumbromid] bei einer Spannung von 120 V für 1 h. Zur Abschätzung der DNA-Fragmentgrößen wurde als Molekulargewichts-Standard die 1 kb-DNA-Leiter aufgetragen. Über eine Gelphotoanlage wurden die DNA-Banden durch UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht.

6.8.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen, Hilden) bzw. mit *Geneclean II* (Dianova, Hamburg).

6.8.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur in-vitro-Mutagenese

Alle Polymerase-Ketten-Reaktionen wurden nach dem Protokoll von Saiki *et al*. (1988) in dem Thermocycler OmniGene (MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte über 20 Zyklen unter folgenden Bedingungen: Zunächst wurde ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 60 sec durchgeführt. Dann erfolgte im zweiten Schritt für 60 sec bei 50°C bzw. bei 45°C (SL81 und SL101) die Anlagerung des Primers an die Matrize und schließlich im dritten Schritt die Elongation bei 72°C für 30 sec. Vent-Polymerase wurde, entsprechend dem Protokoll des Herstellers, zusammen mit 15 pmol Oligonukleotiden bzw. 5 µl „Mega-primer“ in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt. Alle Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet, um einen Verdunstungsverlust zu vermeiden. Für die Mutagenese und Amplifizierung des 300 bp großen *vpr*-Gens wurden 20 ng Plasmid-DNA als Matrize eingesetzt. Alle Reaktionen wurden auf Eis pipettiert. Die Mutagenese wurde in zwei aufeinanderfolgenden Polymerase-Ketten-Reaktionen durchgeführt.

PCR: Zunächst wurde mit dem Mutagenese-Oligonukleotid und einem Oligonukleotid vom näher gelegenen Ende ein „Megaprimer“ erstellt und durch Auftrennung in einem 5% Polyacrylamidgel kontrolliert. Als Matrize diente das Plasmid pCMV6Mvpr.

Mutation	**Eingesetzte Oligonukleotide**	**Synthetisierter „Megaprimer“**
N-terminale α-Helix	SL80 und SL100	A
Erstes HxRxG-Motiv	SL81 und SL101	B
Zweites HxRxG-Motiv	SL81 und SL102	C

Tab. 5: Darstellung der im vpr-Gen zu mutierenden Bereiche, der eingesetzten Oligonukleotide, und der synthetisierten „Megaprimer“.

PCR: Die Amplifikate aus der ersten PCR wurden dann als „Megaprimer“ zusammen mit dem Primer vom anderen Ende in der zweiten PCR-Runde zur Synthese der Volle-Länge-*vpr*-Mutanten eingesetzt.

Eingesetzte Oligonukleotide	Matrizen-DNA	Amplifiziertes Produkt
A + SL81	pCMV6Mvpr	Vprm1
B + SL80	pCMV6Mvpr	Vprm2
C + SL80	pCMV6Mvpr	Vprm3
C + SL80	pCMV6Mvprm2	Vprdm

Tab. 6: Darstellung der amplifizierten PCR-Produkte, der verwendeten Oligonukleotide und der eingesetzten Matrizen-DNA.

Für eine grobe Abschätzung der Anlagerungstemperatur wurde näherungsweise die theoretische Schmelztemperatur eines Primers berechnet. Hierbei wurden für die Nukleotide A und T je 2°C und für G und C je 4°C gesetzt. Nukleotide, die keine Basenpaarung ermöglichen, sowie die zwei flankierenden Nukleotide wurden für die Berechnung nicht berücksichtigt. Die Anlagerungstemperatur wurde mit 4°C unter der errechneten Schmelztemperatur gewählt. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte, nachdem das Mineralöl weitgehend abgezogen worden war. Die DNA wurde mit 300 mM NaCl und 2,5fachem Volumen an 100% Ethanol für 30 min bei –80°C gefällt. Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet.

6.8.5 Klonierungen

Die Ligation von linearisierter Vektor-DNA mit PCR-Fragmenten bzw. mit aufgereinigten DNA-Fragmenten erfolgte gemäß der Beschreibung des Herstellers mit dem *Ligation Kit Version 2* (Boehringer, Ingelheim). Hierzu wurden Fragment und Vektor im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Anschließend wurde der Ligationsansatz direkt in Bakterien des *E. coli* Stamms XL2-Blue transformiert. Dazu wurden 10 µl kompetente Zellen (Stratagene, Heidelberg) mit 1 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert und nach 40 sec Hitzeschock bei 42°C wiederum für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 900 µl vorgewärmtem SOC-Medium wurden die Ansätze für 1h bei 37°C im Eppendorf Thermomixer 5436 geschüttelt, dann auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

6.8.6 Sequenzier-PCR

Die Sequenzierreaktion wurde nach einer Variante der Ketten-Abbruchsreaktion von Sanger *et al*. (1977) durchgeführt. Als Sequenzierprimer wurden 20 pmol der Oligonukleotide SL80 und SL 81 verwendet. Als Terminatoren dienten Di-Desoxy-Nukleotide, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren und im Laser-Sequenzierautomaten

(ABI Prism 377 DNA-Sequencer, Applied Biosysthems, Weiterstadt) unterschieden werden konnten. Primer und 1 µg DNA wurden mit 4 µl des *Terminator Ready Reaction Mix* (Perkin Elmer, Überlingen) zu einem Gesamtvolumen von 8 µl versetzt. Dieser Mix enthält eine thermostabile DNA-Polymerase (ThermoSequenase™) und die Di-Desoxy-Nukleotide (ddATP, ddCTP,ddTTP, ddGTP). Die Reaktion wurde über 25 Zyklen in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Zunächst wurde ein initialer Denaturierungsschritt bei 96°C für 2min durchgeführt. Dann erfolgte der erste Schritt bei 96°C für 1 min, der zweite Schritt erfolgte bei 50°C für 20 sec und der dritte Schritt bei 60°C für 4 min. Die Proben wurden in Gegenwart von 0,3 M Natriumacetat (pH 4,6) mit 100% Ethanol gefällt und für 15-30 min bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Sediment mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Die Proben wurden getrocknet und bei –20°C aufbewahrt. Vor dem Auftragen auf ein 4,26%iges Harnstoff-Acrylamidgel (NF-Acrylamid:Bisacrylamid 30:1; 7 M Harnstoff, 1× TBE ad 50 ml H_2O, sterilfiltriert) wurden die Proben in 3 µl Proben-Puffer (80% (v/v) Formamid ; 20% (v/v) 50 mM EDTA pH 8.0; 50 mg/ml Dextranblau) resuspendiert und für 3 min bei 95°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis wurde pro Spur der halbe Ansatz (1,5 µl) geladen. Die Elektrophorese erfolgte über 10 h bei 2400 V in 1xTBE-Laufpuffer.

6.9 Proteinmethoden

6.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in eindimensionalen, diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelen (Laemmli, 1970; Ausubel *et al.*, 1987-1998). Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer (vgl. Kapitel 6.4) versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und zusammen mit einem Protein-Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1× SDS-Laufpuffer bei Minigelen für 1 h bei 150 V. Zur Anfärbung der Proteine wurden die Gele für 30 min mit Coomassie-Färbelösung behandelt und anschließend in Entfärber I und II entfärbt.

6.9.2 Westernblot-Analysen

Der Westernblot dient dem Nachweis von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper (Sambrook *et al.*, 1989). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine in einer Elektroblotkammer (Hoefer oder Biorad) nach Anleitung der Hersteller auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn) transferiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 0,4% Tween 20 und 5% Magermilchpulver in PBSo inkubiert. Hybridom-Überstände und alle anderen Antikörper wurden in PBSo mit 5% Magermilchpulver und 0,05% Tween 20 wie

angegeben verdünnt (siehe Tabelle 7). Vor jeder Antikörper-Inkubation wurde die Membran in PBSo/0,05% Tween 20 mit dreimaligem Pufferwechsel für insgesamt 15 min gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1,5-3 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Der sekundäre Antikörper, der kovalent mit Meerrettichperoxidase [*horse raddish peroxidase* (HRP)-Konjugat (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)] gekoppelt war, wurde 45 min auf der Membran belassen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe verstärkter Chemolumineszenz. Hierfür wurde die Membran für 1 min in Lösung A, der kurz zuvor 1/100 des Volumens Lösung B zugesetzt wurde, inkubiert. Für eine höhere Sensitivität wurde teilweise das ECL+ Plus-System verwendet. Anschließend wurde die Chemoluminiszenz durch Auflegen eines Röntgenfilmes (BIOMAX™, Kodak, Fernwald) nachgewiesen. Um gebundene Antikörperkomplexe von der Membran abzulösen, wurde die Membran für 30 min bei 51°C in *Strip-Puffer* inkubiert.

6.9.3 Antikörper:

Antikörper	Verdünnung
α-HA12CA5	1:1000
α-Gag55-2F12	1:20
α-Myc 9E10	1:50
α-Vpr #1 - #11	1:10
α-Vpr-KleoS5	1:1000
α-Vpr-S96S6	1:1000
α-Maus-HRP-Konjugat	1:3000
α-Kaninchen-HRP-Konjugat	1:1000

Tab. 7: Antikörper und Verdünnungen

6.9.4 Präparation von Virus-ähnlichen Partikeln und Zellysaten

Um die Verpackung von Vpr und von Vpr-Mutanten in Virus-Kapside zu untersuchen, wurden die Kapsid-Proteine (Gag) von SIV in COS-7-Zellen überexprimiert, und die Produktion von Virus-ähnlichen Partikeln analysiert. Da die Expression von Gag in COS-7-Zellen unter der Kontrolle von eukaryonten Promotoren sehr schlecht war, wurde die Expression mittels rekombinanter Vaccinia-Viren durchgeführt. Hierfür wurden COS-7-Zellen infiziert (siehe 6.7) und direkt anschließend mit Expressions-Konstrukten für Vpr bzw. für Vpr-Mutanten und dem

Plasmid p2395´SpSpM131, das den T7-Promotor stromaufwärts des *gag*-Gens enthält, transfiziert. Die Zellkultur-Überstände wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4°C von Zelltrümmerresten geklärt. Der Überstand wurde anschließend für 3 h bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert, um die Virus-ähnlichen Partikel zu sedimentieren. Diese wurden anschließend in 30 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen.

6.9.5 Prokaryonte Proteinexpression:

Die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* wurde durch Zugabe von 0,5 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert. Nach 2 h wurden die Bakterien bei 3000 rpm für 10 min abzentrifugiert und das Bakteriensediment in 2× SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Auftrennung der Proteine der gesamtzellulären Lysate erfolgte über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Anhand der Coomassie-Färbung konnte die Induktion überprüft werden.

6.10 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz dient zur Lokalisation von Proteinen in der Zelle. Hierzu wurden COS-1 oder COS-7-Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen durch dreimaliges Behandeln mit Trypsin abgelöst und in neue 6 well-Schalen, die jeweils ein Deckglas enthielten, ausgesäht. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 5 min mit 100% Methanol bei –20°C fixiert. Danach wurden die Zellen mit dreimaligem Pufferwechsel für 30 min mit PBSo bei Raumtemperatur gewaschen. Hierauf erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1,5 h in PBSo. Danach wurden die Zellen erneut für 30 min mit dreimaligem Pufferwechsel mit PBSo gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (α-Maus-FITC-Konjugat) erfolgte für 1 h in PBSo. Wiederum wurden die Zellen mit dreimaligem Wechsel des Puffers für 30 min mit PBSo gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit Evans Blue gefärbt, um unspezifische Fluoreszenzen abzuschwächen. Danach wurden die Zellen für 10 min mit PBSo gewaschen. Die Deckgläser mit den Zellen wurden dann auf Objektträger gegeben, die einen Tropfen Einbettmedium mit DAPI in einer Konzentration von 1,5 µg/µl enthielten. Die Deckgläser wurden mit Nagellack auf den Objektträgern fixiert, um ein Austrocknen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen unter UV-Bestrahlung mit verschiedenen UV-Filtern an einem Immunfluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Jena) photographiert. Die Zellen wurden jeweils im Phasenkontrast, mit einem Filter für DAPI, für FITC und für FITC/DAPI photographiert. Verwendet wurde hierfür der Diafilm Fujichrome Sensia II 400 Daylight.

6.11 Computeranalysen

Zur Bearbeitung von DNA-Sequenzen wurde das Programmpaket der GCG (Genetics Computer Group, Devereux et al., 1984) verwendet. Die hauptsächlich verwendeten Programme waren *Gap*, *Map*, *Pretty*, *Translate*, *Reverse* und *Pile up*.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
agm	Afrikanische Grüne Meerkatze
AIDS	*Aquired Immuno Deficiency Syndrom*
APS	Ammoniumperoxidisulfat
βME	β-Mercapto-Ethanol
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cpz	Schimpanse
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4´,6-Diamidino-2-Phenylindol
ddNTP	Di-Desoxy-Ribonukleotidtriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl-Ether
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle* Medium
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Ribonukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiotreitol
ECL	*enhanced chemoluminescence*, verstärkte Chemolumineszenz
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansolfonsäure]
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HRP	*horse raddish peroxidase*
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid

Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
LTR	*long terminal repeat*, Lange terminale Wiederholungssequenzen
m	Meter
M	Mol
mac	Makkaken
MEM	*Modiefied Eagle* Medium
min	Minuten
mnd	Mandrill
mne	Schweinsaffe
mRNA	Messenger RNA
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optischen Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBSo.	Phosphate Buffered Saline ohne zweiwertige Ionen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*revolutions per minute*; Umdrehungen pro Minute
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute´s Medium*
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SIV	*simian immunodeficiency virus*, Affenimmundefizienzvirus
smm	Halsbandmangabe
syk	Diademmeerkatze (*sykes` monkey*)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	*Unit*; Einheit

UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Westernblot
w/v	*weight per volume*
z.B.	zum Beispiel

8. Literaturverzeichnis

Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E., Trono, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. Cell **76**, 853-864.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1987-1998). Current portocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.

Balliet, J.W., Kolson, D.L., Eiger, G., Kim, F.M. (1994). Distinct effects in primary macrophages and lymphocytes of the human immunodeficiency virus type 1 accssory genes vpr, vpu, and nef; mutational analysis of a primary HIV-1 isolate. Virology **200**, 623

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrom (AIDS). Science **220**, 868-871.

Bartz, S.R., Rogel, M.E., Emmermann, M. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. J. Virol. **70**, 2324-2331.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7**, 1513-1523.

Borman, A.M., Quillent, C., Charneau, P., Dauguet, C., Clavel, F. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. J. Virol. **69**, 2058-2067.

Bukovsky, A.A., Dorfman, T., Weimann, A., Gottlinger, H.G. (1997). Nef association with human immunodeficiency virus type 1 virions and cleavage by the viral protease. J. Virol. **71**, 1013-1018.

Chakrabarti, L., Guyader, M., Alizon, M., Daniel, M.D., Desrosiers, R.C. (1987). Sequence of simian immunodeficieny virus from macaques and its relationship to other human and simian retroviruses. Nature **328**, 543-547.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science **263**, 802-805.

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C. (1986a). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science **233,** 343-346.

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

Cleves, A.E., Novick, P.J., Bankaitis, V.A.(1989). Mutations in the Sac 1 gene suppress defects in yeast Golgi and yeast actin function. J. Cell Biol. **109**, 2939-2950.

Cohen, E.A., Dehni, G., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A. (1990a). Human immondeficiency virus vpr product is a virion-associated protein. J. Virol. **64**, 3097-3099.

Cohen, E.A., Terwilliger, E.F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A. (1990b). Identification of HIV-1 vpr product and function. J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. **3**, 11-18.

Connor, I.B., Chen, B.K., Choe, S., Landau, N.R. (1995). Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in mononuclear phagocytes. Virology **206**, 936-944.

Cullen, B.R. (1990). The HIV-1 Tat protein: an RNA sequence-specific processivity factor? Cell **63**, 655-657.

Daniel, M.D., Letvin, N.L., King N.W., Kannagi, M., Sehgal P.K., Hunt, R.D. (1985). Isolation of a T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. Science **228**, 1201-1204.

Dedera, D., Hu, W., Vander-Heyden, N., Ratner, L. (1989). Viral protein R of human immunodeficiecy virus types 1 and 2 is dispensable for replication and cytopathogenicity in lymphoid cells. J. Virol. **63**, 3205-3208.

Desrosiers, R.C. (1990). A finger of the missing link. Nature **345**, 288-289.

Desrosiers, R.C., Lifson, J.D., Gibbs, J.S., Czajak, S.C., Howe, A.Y., Arthur, L.O., Johnson, R.P. (1998). Identification of highly attenuated mutants of simian immunodeficiency virus. J. Virol. **72**, 1431-1437.

Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic. Acids Res. **12**, 387-395.

DiMarzio, P., Choe, S., Elbright, M., Knoblauch, R., Landau, N.R. (1995). Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization, and virion packaging of human immunodeficiecy virus type 1 Vpr. J. Virol. **69**, 7909-7916.

Du, Z., Lang, S.M., Sasseville, V., Lackner, A.A., Daniel, M.D., Ilijski, P., Jung, J.U., Desrosiers, R.C. (1995). Identifaction of a nef allel that causes lymphocyte activation and acute disease in a macaque monkey. Cell **82**, 665-674

Emau, P., McClure, H.M., Isahakia, M., Else, J.G., Flutz, P.N. (1991). Isolation from African Sykes‘ monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human or simian immunodeficiency viruses. J. Virol. **65**, 2135-2140.

Felber, B.K., Derse, D., Athanassopoulos, A., Campbell, M., Pavlakis, G.N. (1989). Cross-activation of the Rex proteins of HTLV-I and BLV and of the Rev protein of HIV-1 and nonreciprocal interactions with their RNA responsive elements. New Biol. **1**, 318-328.

Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Lührmann, R., Rautmann, G. (1994). Evidence that HIV-1 rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. EMBO **13**, 4105-4112.

Fletcher, T.M. 3rd, Brichacek, B., Sharova, N., Newman, M.A., Stivahtis, G., Sharp, P.M., Emerman, M., Hahn, B.H., Stevenson, M. (1996). Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM). EMBO **15**, 6155-6165.

Fouchier, R.A.M., Meyer, B.E., Simon, J.H.M., Fischer, U., Albright, A.V., Gonzales-Scarano, F., Malaim, M.H. (1998). Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. J. Virol. **72**, 6004-6013.

Fukasawa, M., Miura, T., Hasegawa, A., Morikawa, S., Tsujimoto, H., Miki, K., Kitamura, T., Hayami, M. (1988). Sequence of simian immunodeficiency virus from african green monkeys, a new member of the HIV/SIV group. Nature **333**, 457-461.

Fultz, P.N., McClure, H., Anderson, D.C., Swenson, R.B., Anand, R., Srinivasan, A. (1986). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercucebus atys*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 5286-5290.

Fultz, P.N., Gordon, T.P., Anderson, D.C., McClure, H.M. (1990). Prevalence of natural infection with simian immunodeficiency virus and simian T-cellleukemia virus type I in a breeding colony of sooty mangabey monkeys. AIDS **4(7)**, 619-625.

Gao, F., Yue, L. White, A.T., Pappas, P.G., Barchue, J., Hanson, A.P., Greene, B.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Hahn, B.H. (1992). Human infection by genetically diverse SIVsm-related HIV-2 in west Africa. Nature **358**, 495-499.

Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H., Ozel, M., Pauli, G., Koch, M.A. (1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. Virology **156**, 171-176.

Gibbs, J.S., Regier, D.A., Desrosiers, R.C. (1994). Construction and in vitro properties of SIVmac mutants with deletions in "nonessential" genes [corrected and republished article originally printed in AIDS Res Hum Retroviruses (1994) 10,:333-342]. AIDS Res. Hum. Retroviruses. **10**, 607-616.

Gibbs, J.S., Lackner, A.A., Lang, S.M., Simon, M.A., Sehgal, P.K., Daniel, M.D., Desrosiers, R.C. (1995). Progression to AIDS in the absence of a gene for vpr or vpx. J. Virol. **69**, 2378-2383.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell **23**, 175-182.

Goh, W.C., Rogel, M.E., Kinsey, C.M., Michael, S.F., Fultz, P.N., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Emmermann, M. (1998). HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. Nat. Med. **4 (1)**, 65-71

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., 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.

Guyader, M., Emerman, M., Montagnier, L., Peden, K. (1989). VPX mutants of HIV-2 are infectious in established cell lines but display a severe defect in peripheral blood lymphocytes. EMBO **8**, 1169-1175.

He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D.O., Landau, N.R. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G_2 phase of the cell cycle by inhibiting $p34^{cdc2}$ activity. J.Virol. **69**, 6705-6711.

Heinzinger, N.K., Bukinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramani, V., Lee, M.A., Gendelman, H.E., Ratner, L., Steveson, M., Emerman, M. (1994). The Vpr protein of the human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 7311-7315.

Henderson, L.E., Benveniste, R.E., Sowder, R., Copeland, T.D., Schultz, A.M., Oroszlan, S. (1988). Molecular characterization of gag proteins from simian immunodeficiency virus (SIV_{mne}). J. Virol. **62**, 2587-2595.

Hendry, R.M., Wells, M.A., Phelan, M.A., Schneider, A.L., Epstein, J.S., Quinnan, G.V. (1986). Antibodies to simian immunodeficiency virus in African green monkeys in Africa in 1957-62. Lancet **2**, 455.

Herrmann, C.H. und Rice, A.P. (1995). Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. J. Virol. **69**, 1612-1620.

Hirsch, V.M., Olmstedt, R.A., Murphey-Crob, M., Purcell. R.H., Johnson, P.R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. Nature **339**, 389-392.

Hirsch, V.M., Dapolito, G.A., Goldstein, S., McClure, H., Emau, P., Fultz, P.N., Isahakia, M., Lenroot, R., Myers, G., Johnson, P.R. (1993). A distinct African lentivirus from Sykes' monkeys. J. Virol. **67**, 1517-1528.

Hoch, J., Lang, S.M., Weeger, M., Stahl-Hennig, C., Coulibaly, C., Dittmer, U., Hunsmann, G., Fuchs, D., Muller, J., Sopper, S., Fleckenstein, B., Überla, K.T. (1995). Vpr deletion mutant of simian immunodeficiency virus induces AIDS in rhesus monkeys. J. Virol. **69**, 4807-4813.

Huet, T., Chenyier, A., Meyerhans, A., Roelants, G., Wain-Hobson, S. (1990). Genetic Organisation of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. Nature **345**, 356-358.

Jin, M.J., Rogers, J., Phillips-Conroy, J.E., Allan, J.S., Desrosiers, R.C., Shaw, G.M., Sharp, P.M., Hahn, B.H. (1994). Infection of a yellow baboon with simian immunodeficiency virus from African green monkeys: evidence for cross-species transmission in the wild. J. Virol. **68**, 8454-8460.

Jolly, C.J., Phillips-Conroy, J.E., Turner, T.R., Broussard, S., Allan, J.S. (1996). SIV_{agm} incidence over two decades in a natural population of Ethiopian grivet monkeys (*Cercopithecus aethiops aethiops*). J. Med. Primatol. **25**, 78-83.

Jowett, J.B.M., Planelles, V., Poon, B., Shah, N.P., Chen, M.-L., Chen, I.S.Y. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 *vpr* gene arrests infected T cells in the G_2+M phase of the cell cycle. J. Virol. **69**, 6304-6313.

Jung, J.U., Lang, S.M., Friedrich U., Jun, T., Roberts, T.M., Desrosiers, R.C., Biesinger B. (1995). Identification of Lck-binding elements in Tip of Herpes Virus Saimiri. J. of Biological Chemistry **270**, 20660-20667.

Kaminchik, J., Margalit, R., Yaish, S., Drummer, H., Amit, B., Sarver, N., Gorecki, M., Panet, A. (1994). Cellular distribution of HIV type 1 Nef protein: identification of domains in Nef required for association with membrane and detergent-insoluble cellular matrix. AIDS Res. Hum. Retroviruses **10**,1003-1010.

Kanki, P.J., McLane, M.F., King, N.W. Jr, Letvin, N.L., Hunt, R.D., Sehgal, P., Daniel, M.D., Desrosiers, R.C., Essex, M., (1985). Serological identification and characterisation of a macaque T-lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III. Science **228**, 1199-1201.

Kashanchi, F., Piras, G., Radonovich, M.F., Duvall, J.F., Fattaey, A., Chiang, C.M., Roeder, R.G., Brady, J.N. (1994). Direct interaction of human TFIID with the HIV-1 transactivator tat. Nature **367**, 295-299.

Kestler, H.-W, Kodama, T., Ringler, D., Marthas, M., Pedersen, N., Lackner, A., Regier, D., Sehgal, P., Daniel, M., King, N., Desrosiers, R. (1990). Induction of AIDS in rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus. Science **248**, 1109-1112.

Kewalramani, V.N., Park, C.S., Gallombardo, P.A., Emerman, M. (1996). Protein stability influences human immunodeficiency virus type 2 Vpr incorporation and cell cycle effect. Virology **218**, 326-334.

King, N.W., Chalifoux, L.V., Ringler, D.J., Wyand, M.S., Sehgal, P.K., Daniel, M.D., Letvin, N.L., Desrosiers, R.C., Blake, B.J., Hunt, R.D. (1990). Comparative biology of natural and experimental SIV_{mac} infection of macaque monkeys. (Review). J. Med. Primatol. **19**, 109-118.

Klatzmann, D., Barre-Sinoussi, F., Nugeyre, M.T., Danguet, C., Vilmer, C., Griscelli, C., Brun-Vezinet, F., Rouzinout, C., Gluckman, J.C., Cherman, J.C., Montagnier, L. (1984). Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-induced T-lymphocytes. Science **225**, 59-63.

Kondo, E., Göttlinger, H.G.,(1996). A conserved LXXLF sequence is the major determinant in $p6^{gag}$ required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. J. Virol. **70**, 159-164.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of becteriophage T4. Nature **227**, 680-685.

Lang, S.M., Weeger, M., Stahl-Hennig, C., Coulibaly, C., Hunsmann, G., Müller, J., Müller-Hermelink, H., Fuchs, D., Wachter, H., Daniel, M.M. (1993). Importance of vpr for infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. J. Virol. **67**, 902-912.

Lang, S.M., Iafrate, A.J., Stahl-Hennig, C; Kuhn, E.M., Nisslein, T., Kaup, F.J., Haupt, M., Hunsmann, G., Skowronski, J., Kirchhoff, F. (1997). Association of simian immunodeficiency virus Nef with cellular serine/threonine kinases is dispensable for the development of AIDS in rhesus macaques. Nat. Med. **3**, 860-865.

Letvin, N.L., Eaton, K.A., Aldrich, W.R., Sehgal, P.K., Blake, B.J., Schlossman, S.F., King, N.W., Hunt R.D. (1983). Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **80**, 2718-2722.

Levy, D.N., Fernandes, L.S., Williams, W.V., Weiner, D.B. (1993). Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus 1 *vpr*. Cell **72**, 541-550.

Lowenstine, N.L., Pedersen, M.C., Higgins, J., Pallis, K.C., Uyeda, A., Marx, P., Lerche, N.W., Gardner, M.B. (1986). Seroepidemiologic survey of captive old world primates for antibodies to human and simian retrovirus and isolation of a lentivirus from sooty mangabeys (*Cercucebus atys*). Int. J. Cancer **38**, 563-575.

Lu, Y.L., Spearman, P., Ratner, L. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. J. Virol. **67**, 6542-6550.

Luciw, P.A., Shaw, K.S., Unger, R.E., Planelles, V., Stout, M.W., Lackner, J.E., Prat-Lowe, E., Leung, N.J., Banapour, B., Marthas, M.L. (1992). Genetic and biological comparisons of pathogenic and nonpathogenic molecular clones of simian immunodeficiency virus (SIV_{mac}). AIDS Res. Hum. Retroviruses **8**, 395-402.

Macreadie, I.G., Castelli, L.A., Hewish, D.R., Kirkpatrick, A., Ward, A.C., Azad, A.A.(1995). A domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr containing repeated H(S/F)RIG amino acid motifs causes cell growth arrest and structural defects. Proc. Natl. Sci. **92**, 2770-2774.

Mahalingam, S., Khan, S.A., Murali, R., Jabbar, M.A., Monken, C.E., Collman, R.G., Srinivasan, A. (1995a). Mutagenesis of the putative α-helical domain of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1: effect on stability and virion incorporation. Proc. Natl. Acad. Sci. **92**, 3794-3798.

Mahalingam, S., Collman, R.G., Patel, M., Monken, C.E., Srinivasan, A. (1995b). Functional analysis of HIV-1 Vpr : identification of determinants essentiel for subcellular localization. Virology **212**, 647-652.

Mahalingam, S., Ayyavoo, V., Patel, M., Kieber-Emmons, T., Weiner, D.B. (1997). Nuclear import, virion incorporation and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. J. Virol. **71**, 6339-6347.

Marx, P.A., Li, Y., Lerche, N.W., Sutjipto, S., Gettie, A., Yee, J.A., Brotman, B.H., Prince, A.M., Hanson, A., Webster, R.G., Desrosiers, R.C. (1991). Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a West African pet Sooty mangabey. J. Virol. **65**, 4480-4485.

Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onorato, I., Stouwe, R.A., Holzman, R.S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H.W., Cunningham-Rundles, S. (1981). An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. N. Engl. J. Med. **305**, 1431-1438.

Murphy-Corb, M., Martin, L.N., Rangan, S.R.S., Baskin, G.B., Gormus, B.J., Worf, R.H., Andes, W.A., West, M., Montelaro, R.C. (1986). Isolation of an HTLV-III related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys. Nature **321**, 435-437.

Otha, Y., Msauda, T., Tsuijmoto, H., Ishikawa, K., Kodama, T., Morikawa, S., Nakai, M., Honjo, S., Hayami, M. (1988). Isolation of a simian immunodeficiency virus from African green monkeys and seroepidemiologic survey of the virus in various non-human primates. Int. J. Cancer **41**, 115-122.

Ogawa, K., Shibata, R., Kiyomasu, T., Higuchi, I., Kishida, Y., Ishimoto, A., Adachi, A. (1989). Mutational analysis of human immunodeficiency virus vpr open reading frame. J. Virol. **63**, 4110-4114.

Okui, N., Kobayashi, N., Kitamura, Y. (1998). Production of uninfectious human immunodeficiency virus type 1 containing viral protein R fused to a single-chain antibody against viral integrase. J. Virol. **72**, 69690-6964.

Paxton, W., Connor, R.I., Landau, N.R.(1993). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement of the p6 region of *gag* and mutational analysis. J. Virol. **67**, 7229-7237.

Planelles, V., Bachelerie, F., Jowett, J.B.M., Haislip, A., Xie, Y., Peymann, B., Masuda, T., Chen, S.Y. (1995). Fate of human immunodeficiency virus type 1 provirus in infected cells: a role for *vpr*. J. Virol. **69**, 5883-5889.

Re, F., Braaten, D., Franke, ,E.K., Luban, J. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G_2 by inhibiting the activation of $p34^{cdc2}$-cyclin B. J. Virol. **69**, 6859-6864.

Refaeli, Y., Levy, D.N., Weiner, D.B. (1995). The glucocorticoid receptor type II complex is a target of HIV-1 vpr gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 3621-3625.

Reiss, P.J., Lange, M.A., de Ronde, A., de Wolf, F., Dekker, J., Danner, S.A., Debouck, C., Goudsmit, J. (1990). Antibody response to viral proteins U (vpu) and R (vpr) in HIV-1-infected individuals. J. Aquired immune Defic. Syndr. **3**, 115-122.

Rhee, S.S. and Marsh, J.W. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. J. Virol. **68**, 5156-5163.

Sakai, H., Shibata, R., Sakuragi, J., Kiyomasu, T., Kawamura, M., Hayami, M., Ishimoto, A., Adachi, A.(1991) Compatibility of rev gene activity in the four groups of primate lentiviruses. Virology **184**, 513-520.

Saksela, K., Cheng, G., Baltimore, D (1995). Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required fpr enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. Embo J. **14**, 484-?

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring Habor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci USA **74**, 5463-5467.

Sawai, E.T., Baur, A., Struble, H., Peterlin, B.M., Levy, J.A., Cheng-Mayer, C. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 1539-1543.

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.

Sharp, P.M., Bailes, E., Stevenson, M., Emmeraman, M., Hahn, B.H. (1996). Gene acquisition in HIV and SIV. Nature **383**, 586-587.

Sutcliffe, J.G. (1979). Complete nucleotide sequence of Escherichia coli plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **43**, 77-90.

Tsujimoto, H., Cooper, R.W., Kodama, T., Fukasawa, M., Miura, T., Otha, Y., Ishikawa, K., Nakai, M., Frost, E., Roelants, G.E., Roffi, J., Hayami, M. (1988). Isolation and characterisation of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. J. Virol. **62**, 4044-4050.

Tsujimoto, H., Hasegawa, A., Maki, N., Fukasawa, M., Miura, T., Speidel, S., Cooper, R.W., Moriyama, E.N., Gojobori, T., Hayami, M. (1989). Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild.caught African mandrill. Nature **341**, 539-541.

Tomonaga, K., Katahira, J., Fukasawa, M., Hassan, M.A., Kawamura, M., Akari, H., Miura, T., Goto, T., Nakai, M., Suleman, M., Isahaki, M., Hayami, M.(1993). Isolation and characterisation of simian immunodeficiency virus from African white-crowned mangabey monkeys (Cercocebus torquatus lunulatus). Arch. Virol. **129**, 77-92.

Tristem, M., Marshall, C., Karpas, A., Hill, F. (1992). Evolution of the primate lentiviruses: evidence from *vpx* and *vpr*. EMBO **11**, 3405-3412.

Veschambre, P., Roisin, A., Jalinot, P. (1997). Biochemical and functional interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator with the general transcription factor TFIIB. J. Gen. Virol. **78**, 2235-2245.

Vodicka, M.A., Koepp, D.M., Silver, P.A., Emermann, M. (1998). HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage interaction. Genes **12**, 175-185.

von Schwedler, U., Song, J., Aiken, C., Trono, D. (1993). Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. J. Virol. **67**, 4945-4955.

Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., Jones, K.A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. Cell **92**, 451-462.

Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H.R., 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.

Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A., Strebel, K. (1992a). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. J. Virol. **66**, 7193-7200.

Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A., Strebel, K. (1992b). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. J. Virol. **66**, 226-234.

Wong-Staal, F., Chanda, P.K., Ghrayeb, J. (1987). Human immunodeficiency virus: the eighth gene. AIDS Res. Hum. Retroviruses **3**, 33-39

Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Kim, J., Seshaiah, P., Natsoulis, G., Boeke, J.D., Hahn, B.H., Kappes, J.C. (1995). Targeting foreign proteins to human immunodeficiency virus particles via fusion with Vpr and Vpx. J. Virol. **69**, 3389-3398.

Yao, X.J., Subbramanian, R.A., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D., Cohan, E.A. (1995). Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha helical structure in Vpr nuclear lacalization and virion incorporation. J. Virol. **69**, 7032-7044.

Yao, X.J., Mouland, A.J., Subbramanian, R.A., Forget, J., Rougeau, N., Bergeron, D., Cohan, E.A. (1998). Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1-infected dividing Jurkat T cells. J. Virol. **72**, 4686-4693.

Yu, G., and Felsted, R.L. (1992). Effects of myrisoylation on p27*nef* subcellular distribution and suppression of HIV-LTR transcription. Virology **187**, 46-55.

Yu, X.-F., Matsuda, M., Essex, M., Lee, T.-H. (1990). Open reading frame of *vpr* of simian immunodefincy virus encodes a virion associted protein. J. Virol. **64**, 5688-5693.
Yuan, X., Matsuda, Z., Matsuda, M., Essex, M., Lee, T.H. (1990). Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion associated protein. AIDS Res. Hum. Retroviruses **11,** 1265-1271.

Zhao, L.-J., Mukherjee, S., Narayan, O. (1994). Biochemical mechanisms of HIV-1 vpr function. J. Biol. Chem. **269**, 15577-15582.

9. Anhang

9.1.1 Nukleinsäuren

Die angegebenen Positionen beziehen sich jeweils auf die Positionen im $SIV_{mac}239$ Genom.

```
           6407                                                6456
..vpr.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm1.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm2.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm3.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprdm.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Consensus  ATGGAAGAAA GACCTCCAGA AAATGAAGGA CCACAAAGGG AACCATGGGA

           6457                                                6506
  vpr.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm1.seq  ********** *c*****c*g c*******gc ********** **********
Vprm2.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm3.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprdm.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Consensus  TGAATGGGTA GTGGAGGTTC TGGAAGAACT GAAAGAAGAA GCTTTAAAAC

           6507                                                6556
  vpr.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm1.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm2.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm3.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprdm.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Consensus  ATTTTGATCC TCGCTTGCTA ACTGCACTTG GTAATCATAT CTATAATAGA

           6557                                                6606
  vpr.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm1.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm2.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm3.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprdm.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Consensus  CATGGAGACA CCCTTGAGGG AGCAGGAGAA CTCATTAGAA TCCTCCAACG

           6607                                                6656
  vpr.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm1.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm2.seq  ********** ***gc****g c*****c*** ********** **********
Vprm3.seq  ********** ********** ********** ****gc**** gc*****c**
Vprdm.seq  ********** ***gc****g c*****c*** ****gc**** gc*****c**
Consensus  AGCGCTCTTC ATGCATTTCA GAGGCGGATG CATCCACTCC AGAATCGGCC
```

```
           6557                                                6706
  vpr.seq  ********** ********** ********** *****c**** **********
Vprm1.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm2.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm3.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Vprdm.seq  ********** ********** ********** ********** **********
Consensus  AACCTGGGGG AGGAAATCCT CTCTCAGCTA TACCGACCTC TAGAAGCATG

           6707
  vpr.seq  ***taa
Vprm1.seq  ***~~~
Vprm2.seq  ***~~~
Vprm3.seq  ***~~~
Vprdm.seq  ***~~~
Consensus  CTA---
```

9.1.2 Aminosäuresequenzen

```
           1                                                    50
  vpr.pep  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm1.pep  ********** ********** a*aa**a*** ********** **********
Vprm2.pep  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm3.pep  ********** ********** ********** ********** **********
Vprdm.pep  ********** ********** ********** ********** **********
Consensus  MEERPPENEG PQREPWDEWV VEVLEELKEE ALKHFDPRLL TALGNHIYNR

           51                                                  100
  vpr.pep  ********** ********** ********** ********** *****p****
Vprm1.pep  ********** ********** ********** ********** **********
Vprm2.pep  ********** ********** *a*a*a**** ********** **********
Vprm3.pep  ********** ********** ********a* a*a******* **********
Vprdm.pep  ********** ********** *a*a*a**a* a*a******* **********
Consensus  HGDTLEGAGE LIRILQRALF MHFRGGCIHS RIGQPGGGNP LSAIPTSRSM

           101
  vpr.pep  *
Vprm1.pep  *
Vprm2.pep  *
Vprm3.pep  *
Vprdm.pep  *
Consensus  L
```

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 1997 bis November 1998 unter Betreuung von Dr. rer. nat. Sabine Lang und Prof. Dr. B. Fleckenstein am Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt.

Ich versichere, daß ich die Arbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen angefertigt habe. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Nürnberg, im Oktober 1998

.....

Alexander von Homeyer

Bei Herrn Prof. Dr. B. Fleckenstein möchte ich mich für die Möglichkeit, diese Diplomarbeit am Institut für Klinische und Molekulare Virologie durchführen zu können, bedanken.

Herrn Prof. Dr. G. Fey danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten der Naturwissenschaftlichen Fakultät II zu betreuen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Sabine Lang für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit durch zahlreiche Anregungen und Gespräche.

Besonderer Dank geht auch an meine Kollegen aus der Arbeitsgruppe „Lang“, Jadranka Koehn, Sandra Müller und Daniel Romaker, die mir bei Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Des weiteren möchte ich mich auch bei meinen anderen Laborkolleginnen Ute Friedrich, Christine Reiss, Athina Kallipolitou und Sigrid Weiler für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Außerdem danke ich Tobias Ruckes, Alexander Birkmann, Thomas Grunwald, Svenja Yaguboglu, Thomas aus dem Siepen und Jan Münch für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, meiner Familie und Monika Hübner.