

# Charakterisierung der angeborenen Immunantwort in SIV-infizierten Rhesusaffen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Bianka Mußil  
aus Mühlhausen

Göttingen, den 26.05.2009

D7

Referent: Prof. Dr. G. Hunsmann

Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Fritz

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XVII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Lentiviren der Primaten.....	1
1.1.1 Herkunft .....	1
1.1.2 Morphologie, Struktur und Replikation .....	2
1.1.3 Die Pathogenese der HIV-Infektion.....	6
1.2 Das SIV Rhesusaffen-Tiermodell für AIDS .....	8
1.3 Antivirale Strategien der Wirtszellen.....	10
1.3.1 Interferon.....	11
1.3.1.1 Antivirale Aktivitäten der Interferone.....	12
1.3.2 Virale Restriktionsfaktoren .....	13
1.3.2.1 Die APOBEC-Familie.....	13
1.3.2.1.1 Evolution .....	14
1.3.2.1.2 Struktur.....	14
1.3.2.1.3 Mechanismus der APOBEC3-vermittelten Restriktion .....	16
1.3.2.1.4 Die APOBEC3-Interaktion mit Vif.....	18
1.3.2.1.5 Die Regulation der APOBEC3-Transkription .....	19
1.3.2.1.6 Die Rolle von APOBEC3 im Krankheitsverlauf .....	20
1.4 Ziele der Arbeit .....	21
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1 Materialien .....	22
2.1.1 Verwendete Geräte.....	22
2.1.2 Arbeitsmittel.....	23
2.1.3. Chemikalien und Reagenzien.....	24
2.1.4. Medien, Stammlösungen und Puffer .....	26
2.1.5 Kits .....	27
2.1.6 Marker .....	27
2.1.7 Polyacrylamidgel (PAGE) und Western-Blot.....	28
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Versuchstiere.....	29

2.2.2	Schutzmaßnahmen .....	29
2.2.3	Aufarbeitung von Organen und Zellen .....	29
2.2.3.1	Isolation peripherer mononukleärer Zellen aus Vollblut (PBMCs) .....	29
2.2.3.2	Isolierung von Zellen aus den Lymphknoten.....	30
2.2.3.3	MACS (Magnetic associated cell sorter) .....	31
2.2.3.4	Zellzahlbestimmung nach Neubauer.....	32
2.2.3.5	Kryokonservierung.....	32
2.2.3.6	Auftauen kryokonservierter Proben .....	32
2.2.4	<i>In vitro</i> Stimulationsassay mit Monozyten .....	32
2.2.5	Durchflusszytometrie .....	33
2.2.5.1	Antikörpermarkierung zur Charakterisierung von Lymphozyten....	34
2.2.5.2	Fixierung .....	35
2.2.5.3	Datenanalyse .....	35
2.2.6	RNA-Extraktion .....	36
2.2.6.1	Arbeiten mit RNA .....	36
2.2.6.2	RNA-Extraktion aus Lymphozyten.....	36
2.2.6.3	Konzentrationsbestimmung.....	37
2.2.6.4	Gelelektrophorese .....	37
2.2.6.5	Qualitätskontrolle im Bioanalyser .....	38
2.2.7	Die cDNA-Synthese.....	39
2.2.8	Quantitative real-time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	40
2.2.8.1	Primerdesign .....	40
2.2.8.2	Real-time PCR .....	41
2.2.8.3	Bestimmung der Virus-RNA.....	44
2.2.8.4	Auswertung .....	45
2.2.9	Proteinbiochemische Methoden .....	45
2.2.9.1.	Lysierung der Zellen .....	45
2.2.9.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mit Bicinchinsäure (bicinchinic acid, BCA) .....	45
2.2.9.3	Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE).....	46
2.2.9.4	Western-Blot-Analyse mit enhanced chemiluminescence Nachweis (ECL-System).....	46
2.2.9.5	Coomassieblaufärbung .....	48
2.2.9.6	Ponceau-S-Färbung.....	48

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1	Die Ermittlung der PCR-Effizienz ..... 49
3.2	Charakterisierung der APOBEC3-Expression ..... 51
3.2.1	Die APOBEC3-Expression in uninfizierten Rhesusaffen..... 51
3.2.2	Die APOBEC3-Expression in infizierten Rhesusaffen..... 52
3.2.3	Die APOBEC3-Expression in Abhängigkeit von der Virusbeladung ..... 56
3.2.4	APOBEC3-Expression und Überlebensdauer..... 60
3.2.5	Nachweis der APOBEC3G-Proteinexpression ..... 63
3.2.6	Die APOBEC3-Expression im Zeitverlauf ..... 64
3.2.7	Krankheitsverlauf und APOBEC3-Expression ..... 67
3.2.8	Korrelation der A3G- und A3F-Expression ..... 68
3.3	Charakterisierung der MxA- und IP-10-Expression ..... 71
3.3.1	Die MxA- und IP-10-Expression in uninfizierten Rhesusaffen ..... 71
3.3.2	Die MxA- und IP-10-Expression in infizierten Rhesusaffen ..... 72
3.3.3	Die MxA- und IP-10-Expression in Abhängigkeit von der Virusbeladung ..... 75
3.3.4	Interferon-induzierte Gene und Überlebensdauer ..... 79
3.3.5	Die MxA- und IP-10-Expression im Zeitverlauf ..... 81
3.3.6	Korrelation der MxA- und IP-10-Expression ..... 84
3.4	Interferon-induzierte Gene und APOBEC3 ..... 85
3.5	Longitudinalstudie zur A3G- und MxA-Expression..... 90
3.5.1	Die zeitliche Entwicklung der Virusbeladung ..... 91
3.5.2	Der zeitliche Verlauf der A3G- und MxA-Expression ..... 92
3.5.3	Die Genexpression zum frühen Infektionszeitpunkt..... 94
3.5.4	Korrelation mit der Infektionsdosis ..... 94
3.6	Einfluss der Immunisierung auf die Genexpression ..... 95
3.6.1	Die Virusbeladung im Plasma..... 95
3.6.2	Die A3G- und MxA-Expression ..... 96
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>100</b>
4.1	Nach SIV-Infektion erhöht sich die APOBEC3-Expression in Rhesusaffen ..... 101
4.2	Die Regulation der APOBEC3-Expression ..... 106
4.2.1	Die APOBEC3-Expression kann durch Immunisierung erhöht werden ..... 115
4.2.2	Einfluss weiterer Faktoren auf die Überlebensdauer ..... 116
4.3	Abschließende Bewertung und Ausblick ..... 117

<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>121</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>123</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AAV .....	Adeno-assoziierte Viren
A3F .....	APOBECF
A3G.....	APOBEC3G
Abb.....	Abbildung
ADAR1 .....	RNA-abhängige Adenosin-Deaminase
AEBSF .....	4-(2-Aminoethyl)-Benzensulfonylfluorid Hydrochlorid
AGM .....	Afrikanische Grüne Meerkatzen
AID .....	engl. activation-induced cytidine deaminase
AIDS .....	engl. acquired immune deficiency syndrome
AK.....	Antikörper
AP-1 .....	Aktivatorprotein 1
APC.....	Allophycocyanin
APOBEC.....	engl. apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like
APS .....	Ammoniumperoxodisulfat
AS .....	Aminosäure
β-ME .....	Beta-Mercaptoethanol
BCA .....	Bicinchoninsäure
BD.....	Becton Dickinson
BLAST.....	engl. basic local alignment search tool
bp .....	Basenpaar
BSA.....	Bovines-Serum-Albumin
bzw.....	beziehungsweise
°C.....	Grad Celsius
CA .....	Kapsidprotein
CAF .....	CD8 antiviraler Faktor
CCR5 .....	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD.....	engl. cluster of differentiation
cDNA.....	komplementäre DNA

---

CO <sub>2</sub> .....	Kohlendioxid
CPZ.....	engl. chimpanzee
C-Terminus.....	carboxyterminales Ende von Proteinen
CTL.....	zytotoxische T-Zellen
C <sub>T</sub> -Wert.....	engl. cycle threshold
Cu <sup>+</sup> .....	Kupfer (I)-Ionen
Cu <sup>2+</sup> .....	Kupfer (II)-Ionen
Cul5.....	Cullin5
Cy.....	Cyanin
CXCR4.....	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
DNase.....	Desoxyribonuklease (DNA-spaltendes Enzym)
dNTP.....	Desoxynukleosid-5-triphosphat
DPZ.....	Deutsches Primatenzentrum
DR5.....	engl. death receptor 5
ds.....	doppelsträngig
DTT.....	Dithiothreitol
E.....	Effizienz
E-64.....	L-Transepoxy Succinyl-Leucylamido (4-Guanidino) Buton
ECL.....	engl. Enhanced chemiluminescence
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
EIAV.....	Virus der infektiösen Anämie der Pferde
eIF-2 $\alpha$ .....	eukaryotischer Initiationsfaktor-2 $\alpha$
engl.....	englisch
Env.....	engl. envelope
ER.....	Endoplasmatisches Retikulum
et al.....	und andere (lat. et alii bzw. et aliae)
FACS.....	engl. fluorescence activated cell sorting
FCS.....	Fetales Kälberserum
FDC.....	Follikuläre dendritische Zellen
FI.....	Fluoreszenzintensität

FITC.....	Fluoresceinisothiocyanat
FSC .....	Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter)
Fv1 .....	engl. friend virus susceptbility protein 1
g .....	Gramm; Erdbeschleunigung
GAF .....	engl. gamma activated factor
Gag.....	Gruppenspezifisches Antigen
GALT.....	engl. gut-associated lymphoid tissue
GAPDH.....	Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
GAS .....	engl. gamma activated sequence
GC-Gehalt.....	Guanin/Cytosin-Gehalt
gDNA.....	genomische DNA
gp .....	Glykoprotein
h .....	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> .....	zweifach destilliertes Wasser
HCL .....	Salzsäure
HEPES .....	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HIV .....	Humanes Immundefizienzvirus
HLA .....	engl. human leukocyte antigen
HMM .....	engl. high molecular mass
HRP.....	engl. horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
HTLV-I.....	humanes T-lymphotropes Virus 1
IFN.....	Interferon
IFNAR .....	Interferon alpha/beta-Rezeptor
IFNGR .....	Interferon gamma-Rezeptor
Ig.....	Immunglobulin
IL.....	Interleukin
IN .....	Integrase
IP-10/CXCL10.....	Interferon-gamma-induziertes Protein 10 kDa
IRF .....	engl. interferon regulatory factor
ISGs .....	interferonstimulierte Gene

---

ISRE.....	engl. interferon-stimulated response element
i.v. ....	intravenous
JAK .....	Januskinase
kb .....	Kilobasen
kDa.....	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	Kaliumhydrogenphosphat
l .....	Liter
LACV.....	LaCrosse Virus
lat. ....	Lateinisch
LDS.....	Lithiumdodecylsulfat
LMM.....	engl. low molecular mass
Ln ax .....	axiale Lymphknoten
Ln mes.....	mesenteriale Lymphknoten
Ln peri.....	periphere Lymphknoten
Log.....	Logarithmus
LTNP .....	engl. long-term non-progressors (Langzeitüberlebende)
LTR.....	engl. long terminal repeat
Lv1 .....	lentivirus susceptibility factor 1
m .....	Anstieg der Regressionsgerade
M.....	Molarität (= mol/l)
MA.....	Matrixprotein
Mac .....	Rhesusaffe ( <i>Macaca mulatta</i> )
MACS .....	engl. magnetic-associated cell separation
MACS-AK.....	MACS-Antikörper
mAK.....	monoklonaler Antikörper
Mamu .....	MHC für <i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe)
mg .....	Milligramm
Mg <sup>2+</sup> .....	Magnesium-Ionen
MgCl <sub>2</sub> .....	Magnesiumchlorid
MHC .....	engl. major histocompatibility complex
MID.....	engl. monkey infectious dose
min .....	Minuten

---

ml	.....	Milliliter
MLV	.....	Maus-Leukämie-Virus
M-MLV	.....	engl. moloney murine leukemia virus
mM	.....	Millimolar
mm <sup>3</sup>	.....	Kubikmillimeter
Mne	.....	Schweinsaffe ( <i>Macaca nemestrina</i> )
Mnd	.....	Mandrill ( <i>Mandrillus sphinx</i> )
MPBMC	.....	SIVmac251 Virusstamm
mRNA	.....	engl. messenger RNA
MxA	.....	engl. myxovirus resistance protein A
μ-	.....	mikro (1 x 10 <sup>-6</sup> )
n	.....	Stichprobenumfang
n-	.....	nano (1 x 10 <sup>-9</sup> )
NaCl	.....	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	.....	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	.....	Natriumazid
NaOH	.....	Natriumhydroxid
Nef	.....	engl. negative factor
NC	.....	Nukleokapsidprotein
NFAT	.....	engl. nuclear factor of activated T cells
NFκB	.....	engl. nuclear transcription factor κB
ng	.....	Nanogramm
NG	.....	Nachweisgrenze
NK-Zellen	.....	Natürliche Killerzellen
NTC	.....	engl. non template control
NP-40	.....	Nonylphenyl-polyethylenglycol
N-Terminus	.....	aminoterminales Ende von Proteinen
NZM	.....	Nitrozellulosemembran
OAS	.....	Oligoadenylatsynthetase
OD	.....	optische Dichte
p	.....	Wahrscheinlichkeitsindex
PAA	.....	Polyacrylamid
PAGE	.....	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

PBMC .....	engl. peripheral blood mononuclear cells
PBS .....	engl. phosphate buffered saline
PCP .....	<i>Pneumocystis carinii</i> Pneumonie
PCR.....	Polymerasekettenreaktion
PE.....	Phycoerythrin
PerCP .....	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
pH.....	-log[H <sup>+</sup> ]
PHA .....	Phytohämagglutinin
PIAS.....	engl. protein inhibitors of activated STAT
PKR .....	Proteinkinase R
PMA.....	Phorbolmyristataacetat
PMT .....	Photomultiplier
POD .....	Peroxidase
Pol .....	Polymerase
Poly-IC/LC.....	Komplex von Carboxymethylcellulose, Polyinosin- Polycytidylsäure und Poly-L-Lysine dsRNA
PR.....	Protease
qRT-PCR .....	quantitative real-time-PCR
Rbx 1 .....	engl. ring-box 1
rE.....	relative Expression
Rev .....	eng. regulator of expression of virion proteins
RIN.....	engl. RNA integrity number
RNA.....	Ribonucleinsäure
RNase.....	Ribonuklease (RNA-spaltendes Enzym)
Rn-Wert .....	engl. normalized reporter
rpm.....	Umdrehungen pro Minute
RPMI.....	Roswell Park Memorial Institute
RRE.....	engl. Rev-response element
rRNA.....	ribosomale RNA
RT .....	Reverse Transkriptase; real-time; Raumtemperatur
s.....	Sekunde
S .....	Svedberg Untereinheit
SDS .....	Natriumdodecylsulfat

---

SDS-Software .....	engl. sequence detection system
SIV .....	Affen (simian) Immundefizienzvirus
SMM .....	engl. sooty mangabey monkey, Rauchgraue Mangabe ( <i>Cercocebus atys</i> )
SOCS .....	engl. suppressors of cytokine signalling
SP-Transkriptionsfaktor .....	engl. specificity protein
SSC .....	Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter)
STAT .....	engl. signal transducers and activators of transcription
SU .....	engl. surface
Syk .....	Sykes Affe ( <i>Cercopithecus mitis</i> )
Tab. ....	Tabelle
TAE .....	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAR .....	engl. trans-activation response
Tat .....	Transaktivator der Transkription
TCR .....	T-Zellrezeptor
TEMED .....	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Th .....	T-Helferzelle
TLR .....	Toll-like Rezeptor
T <sub>m</sub> .....	Schmelztemperatur
TM .....	Transmembran
TNF .....	Tumornekrosefaktor
ton .....	tonsillär
TRAIL .....	engl. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRIM5alpha .....	Tripartite Motif 5 alpha
Tris-Base .....	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCL .....	Tris-Hydrochlorid
tRNA .....	transfer RNA
TSS .....	Transkriptionsstartstelle
TWEEN-20 .....	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u .....	engl. unit (aktive Einheit eines Enzyms)
UV .....	Ultraviolett

V.....	Volt, Volumen
VLP.....	engl. virus-like particle
Vif.....	engl. viral infectivity factor
Vpr.....	engl. viral protein R
Vpu.....	engl. viral protein U
Vpx.....	engl. viral protein X
v/v.....	engl. volume per volume (Volumenprozent)
WB.....	Western Blot
wpi.....	engl. weeks post infection
w/v.....	engl. weight per volume (Massenprozent)
ZAP.....	engl. zinc-finger antiviral protein
z.B.....	zum Beispiel

---

## Abkürzungen der DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

## Abkürzungen der Aminosäuren

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

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Phylogenie der Lentiviren.....	2
Abb. 1.2	Schema eines SIV-Partikels.....	4
Abb. 1.3	Genomstruktur bei drei Gruppen von Primatenlentiviren.....	5
Abb. 1.4	Zeitlicher Verlauf der HIV/SIV-Infektion.....	7
Abb. 1.5	Signaltransduktion der Typ-I-Interferone.....	11
Abb. 1.6	Strukturmodell des humanen A3G-Proteins basierend auf der Kristallstruktur des APOBEC2.....	14
Abb. 1.7	Darstellung der Domänenorganisation humaner APOBEC-Proteine.....	15
Abb. 1.8	Modell zur retroviralen Restriktion durch APOBEC3.....	17
Abb. 1.9	Modell der Vif-APOBEC3-Interaktion.....	18
Abb. 2.1	Ficoll-Gradient zur Auftrennung der Blutbestandteile.....	30
Abb. 2.2	MACS-Separation.....	31
Abb. 2.3	Auftrennung der Gesamt-RNA in 28 und 18 S rRNA.....	38
Abb. 2.4	a) Elektropherogramm und b) gelartige Ansicht.....	39
Abb. 2.5	Amplifikationsplot.....	43
Abb. 3.1	Ermittlung der Primereffizienz.....	50
Abb. 3.2	Die APOBEC3-Expression in den PBMCs uninfizierter Rhesusaffen.....	52
Abb. 3.3	Durchflusszytometrische Dotplot-Darstellung zur Ermittlung des Reinheitsgrades einer MACS-separierten Zellpopulation.....	53
Abb. 3.4	Die APOBEC3-Expression im peripheren Blut.....	54
Abb. 3.5	Die APOBEC3-Expression im Lymphknoten.....	55
Abb. 3.6	Korrelation der Virusbeladung im Plasma mit der Überlebensdauer.....	56
Abb. 3.7	Korrelation der APOBEC3-Expression mit der Virusbeladung im Plasma.....	58
Abb. 3.8	Die APOBEC3-Expression in Abhängigkeit von der Virusbeladung im Plasma.....	59
Abb. 3.9	Die APOBEC3-Expression in Tieren mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf im Blut.....	61
Abb. 3.10	Die APOBEC3-Expression in Tieren mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf in peripheren Lymphknoten (Ln peri).....	63
Abb. 3.11	Immunoblot-Detektion der A3G-Proteinexpression in den PBMCs.....	64
Abb. 3.12	Die APOBEC3-Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf im Blut.....	65
Abb. 3.13	Die APOBEC3-Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf im Lymphknoten.....	66

---

Abb. 3.14	Die APOBEC3-Expression im Krankheitsverlauf für die PBMCs.....	67
Abb. 3.15	Korrelation der A3G- und A3F-Expression.....	69
Abb. 3.16	A3G-Expression in Abhängigkeit von der Interferon- $\alpha$ Konzentration in Makrophagen .....	70
Abb. 3.17	Die MxA- und IP-10-Expression in den PBMCs uninfizierter Rhesusaffen.....	71
Abb. 3.18	Die MxA- und IP-10-Expression im peripheren Blut.....	73
Abb. 3.19	Die MxA- und IP-10-Expression im Lymphknoten .....	74
Abb. 3.20	Korrelation der MxA- und IP-10-Expression mit der Virusbeladung im Plasma .....	76
Abb. 3.21	Die MxA- und IP-10-Expression in Abhängigkeit von der Virusbeladung im Plasma .....	78
Abb. 3.22	Die Expression der Interferon-induzierten Gene in Tieren mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf im Blut .....	80
Abb. 3.23	Die Expression der Interferon-induzierten Gene in Tieren mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf im peripheren Lymphknoten (Ln peri) .....	81
Abb. 3.24	Die MxA- und IP-10-Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf im Blut.....	82
Abb. 3.25	Die MxA- und IP-10-Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf im Lymphknoten .....	83
Abb. 3.26	Korrelation der MxA- und IP-10-Expression .....	85
Abb. 3.27	Korrelation der A3G- mit der MxA-Expression.....	86
Abb. 3.28	Korrelation der A3F- mit der MxA-Expression.....	87
Abb. 3.29	Korrelation der APOBEC3- mit der IP-10-Expression im Lymphknoten .....	88
Abb. 3.30	Korrelation für die AIDS-Tiere in den PBMCs.....	89
Abb. 3.31	Korrelation für die AIDS-Tiere im Lymphknoten.....	90
Abb. 3.32	Die Anzahl viraler RNA-Kopien pro Milliliter Blutplasma im Zeitverlauf nach SIVmac251-Infektion .....	91
Abb. 3.33	Die longitudinale A3G- und MxA-Expression in den PBMCs .....	92
Abb. 3.34	Die A3G- und MxA-Expression der peripheren Lymphknoten im Zeitverlauf.....	93
Abb. 3.35	Korrelation der MxA- und der A3G-Expression zehn Tage nach Infektion in den PBMCs .....	94
Abb. 3.36	Korrelation der A3G- und MxA-Expression mit der SIVmac 251- Infektionsdosis zehn Tage nach Inokulation.....	95
Abb. 3.37	Anzahl der viralen RNA-Kopien pro Milliliter Blutplasma im Zeitverlauf bei immunisierten und nicht-immunisierten Rhesusaffen.....	96

Abb. 3.38	Die longitudinale A3G- und MxA-Expression bei immunisierten und nicht immunisierten Rhesusaffen in den PBMCs .....	97
Abb. 3.39	Die Genexpression immunisierter und nicht-immunisierter Rhesusaffen in den PBMCs .....	98
Abb. 3.40	Die Genexpression immunisierter und nicht-immunisierter Rhesusaffen in den peripheren Lymphknoten .....	99

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Übersicht über die verwendeten kreuzreaktiven Antikörper, das detektierte Antigen, die an sie gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe und die Herstellerfirma .....	34
Tab. 2.2	Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, ihre Absorptions- und Emissionsmaxima und die zur Messung im Durchflusszytometer verwendeten Filter und Laser .....	35
Tab.2.3	Liste der verwendeten Oligonukleotide .....	41
Tab. 2.4	Für den Western-Blot verwendete Antikörper.....	47

# 1. Einleitung

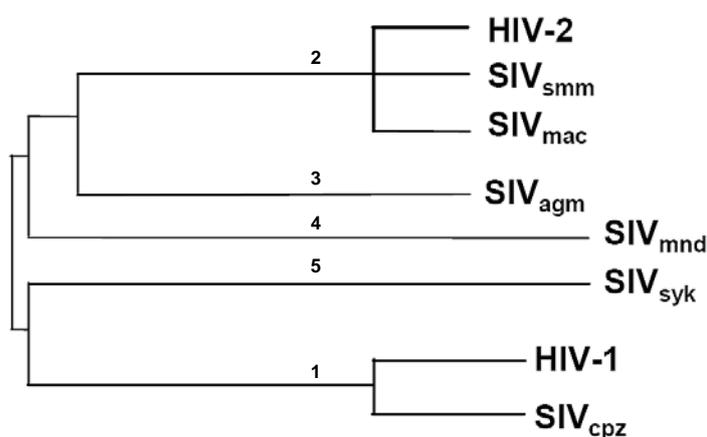
## 1.1 Die Lentiviren der Primaten

### 1.1.1 Herkunft

Mit derzeit zwischen 30 und 36 Millionen Infizierten weltweit stellt die HIV-Infektion nach wie vor ein großes Gesundheitsproblem dar (AIDS Epidemic update, UNAIDS, WHO; Stand vom Dezember 2007). 1981 wurde zum ersten Mal in den USA bei homosexuellen Männern ein Krankheitsbild beschrieben, wie es bisher nur bei Patienten mit angeborener Immunschwäche auftrat (Brennan and Durack, 1981; Gottlieb et al., 1981). Die beschriebenen Krankheitssymptome wurden 1982 vom Center for Disease Control in Atlanta unter dem Namen Acquired Immunodeficiency Syndrom (AIDS) zusammengefasst. Luc Montagnier und Robert Gallo identifizierten 1983 den Erreger dieser Immunschwäche (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983), der später als humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) bezeichnet wurde (Coffin et al., 1986). Kurz darauf wurde in den Blutlymphozyten westafrikanischer AIDS-Patienten ein zweiter HIV-Typ (HIV-2) gefunden (Barin et al., 1985; Clavel et al., 1986). Das erste simiane Immundefizienzvirus (SIVmac) wurde aus in Gefangenschaft gehaltenen Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) isoliert (Daniel et al., 1985). Inzwischen wurden in weiteren Affenarten verschiedene SIV-Stämme gefunden (Peeters, 2001).

HIV und SIV werden in die Familie der Retroviridae und aufgrund ihres charakteristischen langsamen Krankheitsverlaufs in die Unterfamilie der Lentiviren (lat.: lentus = langsam) eingeordnet. Eine weitere Einteilung erfolgte anhand der Genomstruktur und Sequenzhomologien des konservierten Polymerase (pol)-Leserahmens in fünf Hauptgruppen (siehe Abbildung 1.1; Desrosiers, 1990). Die humanen Immundefizienzviren sind wahrscheinlich durch Interspezies-Übertragung aus den simianen Immundefizienzviren hervorgegangen (Hahn et al., 2000). Die Sequenzanalogien lassen vermuten, dass HIV-1 aus SIVcpz (Gao et al., 1999) und HIV-2 aus SIVsmm hervorgegangen sind (Abbildung 1.1; Hirsch et al., 1989). In ihren natürlichen Wirten lösen die SIV-Infektionen in der Regel keine Erkrankung aus. So sind beispielsweise 30 bis 40% aller adulter Afrikanischer Grüner Meerkatzen (Gattung *Chlorocebus*) mit SIVagm infiziert, ohne AIDS zu bekommen (Cichutek und Norley, 1993). Man geht davon aus, dass sich während der Koevolution ein für beide Systeme

vorteilhafter, apathogener Krankheitsverlauf etabliert hat (Chakrabarti, 2004; Muller und Barre-Sinoussi, 2003). Bei der Übertragung von SIV aus natürlich infizierten Tieren auf andere Arten zeigt sich im neuen Wirt meistens ein pathogener Infektionsverlauf. Neben HIV-1 und HIV-2 stellt auch SIV<sub>mac</sub> ein Beispiel einer SIV-Transmission auf eine andere Spezies dar (Letvin et al., 1983). SIV<sub>mac</sub> gehört phylogenetisch in die Gruppe von SIV<sub>smm</sub> und wurde wahrscheinlich von Halsbandmangaben (*Cercocebus atys*) auf Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) übertragen, die beide zusammen in Gefangenschaft gehalten wurden. Des Weiteren ruft die Infektion mit SIV<sub>mac</sub> in der neuen Wirtsspezies AIDS hervor (Letvin und King, 1990).



**Abb. 1.1 Phylogenie der Lentiviren (nach Flint et al., 2000)**

Fünf Gruppen der Immundefizienzviren bei Primaten

<sup>1</sup> Isolate aus Schimpansen *Pan troglodytes* (SIV<sub>cpz</sub>, Huet et al., 1990), <sup>2</sup> Halsbandmangaben *Cercocebus atys* (SIV<sub>smm</sub>, Fultz et al., 1986), <sup>3</sup> Rhesusaffen *Macaca mulatta* (SIV<sub>mac</sub>, Daniel et al., 1985), <sup>4</sup> Schweinsaffen *Macaca nemestrina* (SIV<sub>mne</sub>, Henderson et al., 1988), <sup>5</sup> Afrikanische Grüne Meerkatzen Genus *Chlorocebus* (SIV<sub>agm</sub>, Ohta et al., 1988), <sup>6</sup> Mandrille *Mandrillus sphinx* (SIV<sub>mnd</sub>, Tsujimoto et al., 1988) und <sup>7</sup> Weißkehlmeerkatzen *Cercopithecus mitis albogularis* (SIV<sub>syk</sub>, Emau et al., 1991) verwendet.

### 1.1.2 Morphologie, Struktur und Replikation

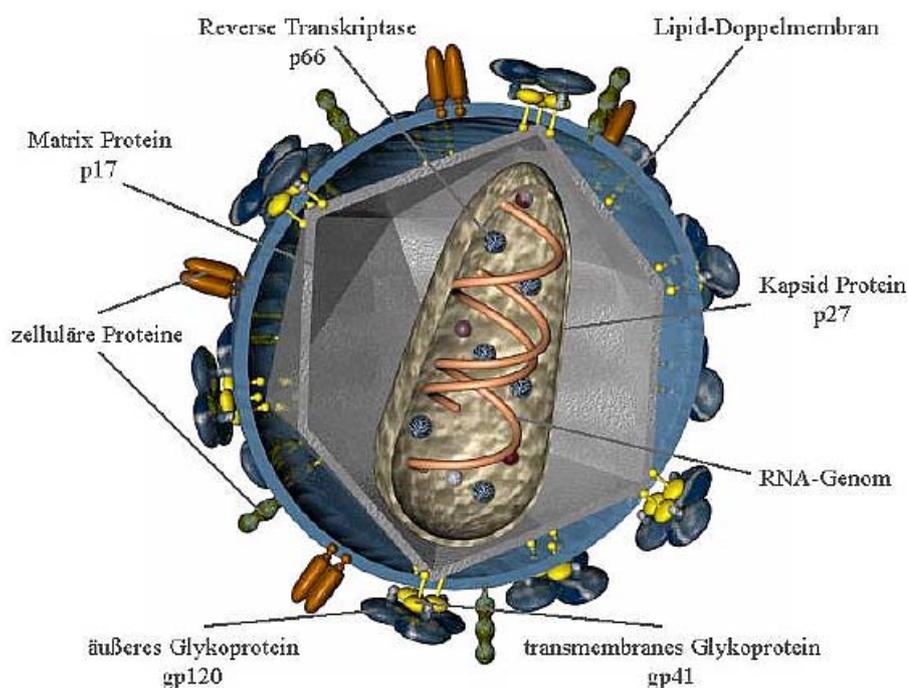
Die Lentiviren weisen einen Durchmesser von 80 bis 100 Nanometern (nm) auf und sind von einer Lipiddoppelmembran umgeben. Diese Hülle stammt von der Wirtszellmembran und in ihr sind virale Glykoproteine eingelagert. Im inneren Teil, der mit Matrixproteinen ausgekleidet ist, befindet sich das Kapsid (siehe Abbildung 1.2). Das retrovirale Genom besteht aus zwei einzelsträngigen Plusstrang-RNA-Kopien und liegt im Kapsid assoziiert mit Nukleokapsidproteinen vor. Die RNA-Kopien sind ungefähr 10 Kilobasen (kb) lang und besitzen wie zelluläre messenger RNAs (mRNAs) am 5'-Ende eine 7-Methyl-Guanidin-Kappe und am 3'-Ende eine Polyadenylierung. Das

Charakteristikum der Retroviren ist die Reverse Transkriptase. Dieses Enzym wurde zum ersten Mal 1970 beschrieben und katalysiert das Umschreiben des viralen RNA-Genoms in DNA (Temin und Mizutani, 1970). Im Kapsid befinden sich ebenfalls die Integrase und die Protease (Modrow et al., 1998). Ferner zeichnen sich alle Retroviren durch gag- (group-specific antigens), pol- (polymerase) und env- (envelope) Genbereiche aus (Abbildung 1.3). Die gag-Region kodiert für die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine. Bei der Translation wird ein Vorläuferprotein zur Assoziation mit der Zellmembran myristyliert (Bryant und Ratner, 1990). Der pol-Bereich enthält die Gene für die Reverse Transkriptase, RNase H, Integrase und Protease und wird als Gag-Pol-Fusionsprotein exprimiert. Die env-Region kodiert die viralen Glykoproteine gp120 und gp41, welche mit der Hüllmembran assoziiert werden. Dabei wird zunächst ein Gag-Pol-Vorläuferprotein (gp160) als Produkt eines ribosomalen Rasterwechsels gebildet (Jacks et al., 1988). Das gp160 wird anschließend durch eine zelluläre Protease in das transmembrane Glykoprotein gp41 und in das Oberflächenglykoprotein gp120 gespalten. Die kodierenden Bereiche der Retroviren werden beidseitig von repetitiven Sequenzen eingerahmt. Diese bilden auf der proviralen DNA die LTRs (long terminal repeats), welche Promotorbereiche enthalten und eine wichtige Rolle bei der Integration proviraler DNA in das Wirtsgenom spielen (Abbildung 1.3). Als komplexe Retroviren kodieren die Lentiviren für weitere Gene, die einen regulatorischen Einfluss auf die Virusreplikation haben (Cullen et al., 1992).

**Tat (transactivator of transcription)** kontrolliert die LTR-abhängige Transkription viraler Gene und benötigt dafür den TAR-Bereich (trans-activation response) auf der LTR-Region (Feng und Holland, 1988).

**Rev (regulator of expression of viral proteins)** reguliert als posttranskriptioneller Regulator die Translation viraler Proteine (außer Tat, Rev, Nef). Rev wird von komplett gespleißten mRNAs produziert und bindet das Rev-response Element (RRE) auf den gag-pol- und env-mRNAs. Dadurch fördert es den Transport ungespleißter oder einfach gespleißter viraler mRNAs aus dem Zellkern ins Zytoplasma (Heaphy et al., 1990).

Bei den Lentiviren sind weitere akzessorische Proteine als Virulenzfaktoren beschrieben. Bei HIV-1 sind es die Produkte der Gene nef, vif, vpr und vpu. Bei SIV tritt an die Stelle des vpu- das Produkt des vpx-Gens.

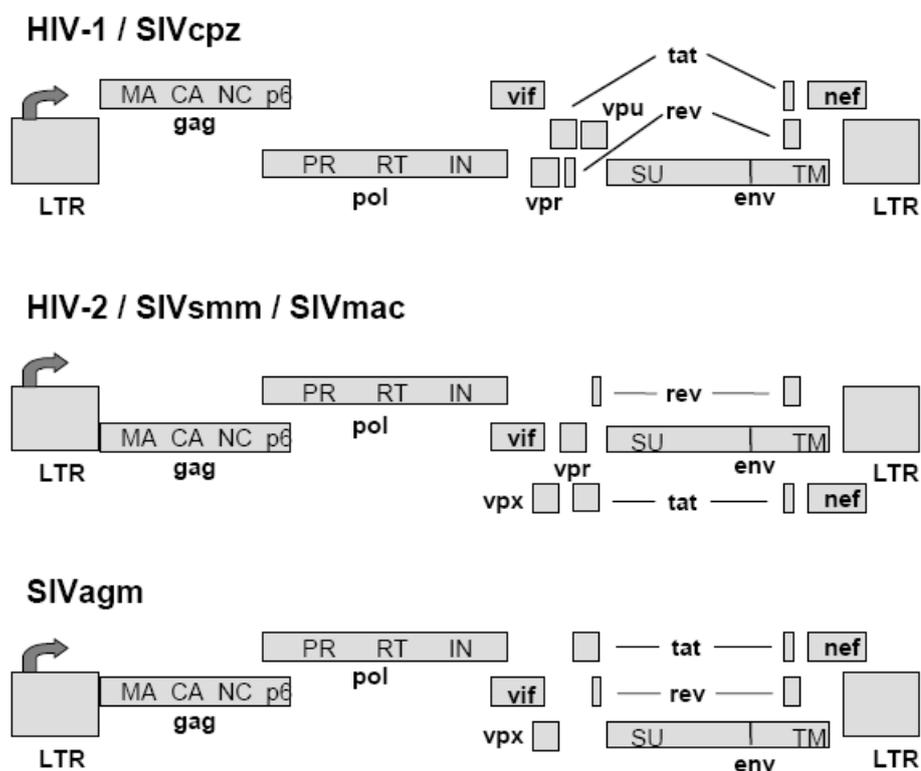


**Abb. 1.2** Schema eines SIV-Partikels (von Dr. S. Norley, RKI)

p: Protein; gp: Glykoprotein

**Nef (negative factor)** wird Rev-unabhängig von multiplen gespleißten mRNAs exprimiert und spielt während der Primärinfektion eine wesentliche Rolle für die Replikation (Kestler et al., 1991; Miller et al., 1994). Weiterhin reduziert Nef die Oberflächenexpression der CD4- und MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle, wodurch die Präsentation viraler Antigene erschwert wird. Zugleich wird die Freisetzung infektiöser Virionen erleichtert (Garcia und Miller, 1991). Ferner ist ein vom Nef induzierter aktivierender Einfluss auf die Wirtszellen beschrieben worden. So ist Nef in der Lage den LTR-Promotorbereich des HIV-1 über NFκB-Aktivierung zu stimulieren, wodurch die Replikation auch in nicht-proliferierenden Zellen möglich wird (Varin et al., 2003). Die Vpr, Vpu und Vif Genprodukte werden Rev-abhängig von unvollständig oder einfach gespleißten mRNAs spät im Infektionsverlauf exprimiert.

**Vif (viral infectivity factor)** ist essentiell für die Replikation (Strebel et al., 1987). Es hemmt die Wirkung zellulärer APOBEC3-Proteine, welche die Infektiösität neugebildeter Viren herabsetzen (Yu et al., 2003). Auf diese Interaktion wird im Kapitel 1.3.2.1.4 genauer eingegangen.



**Abb. 1.3 Genomstruktur bei drei Gruppen von Primatenlentiviren (nach Flint et al., 2000)**

LTR: long terminal repeat; MA: Matrixprotein; CA: Kapsidprotein; NC: Nukleokapsidprotein; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; IN: Integrase; gag: group specific antigen; pol: polymerase; env: envelope; vif: viral infectivity factor; vpr: viral protein rapid; vpx: viral protein X; vpu: viral protein U; rev: regulator of expression of viral proteins; tat: transactivator of transcription; nef: negative factor; SU: surface; TM: transmembrane

**Vpr (viral protein rapid)** wird für den Kerntransport des Präintegrationskomplexes benötigt und spielt eine Rolle bei der Infektion nichtteilender Zellen (Heinzinger et al., 1994).

**Vpu (viral protein U)** kommt nur bei HIV-1 und SIVcpz vor. Es hemmt die Bindung zwischen gp160 und dem CD4-Rezeptor und fördert die Spaltung von gp160 in gp120 und gp41 (Willey et al., 1992). Vpu ist weiterhin als Antagonist des zellulären Restriktionsfaktors Tetherin beschrieben (siehe Kapitel 1.3.3; Neil et al., 2007; Neil et al., 2008).

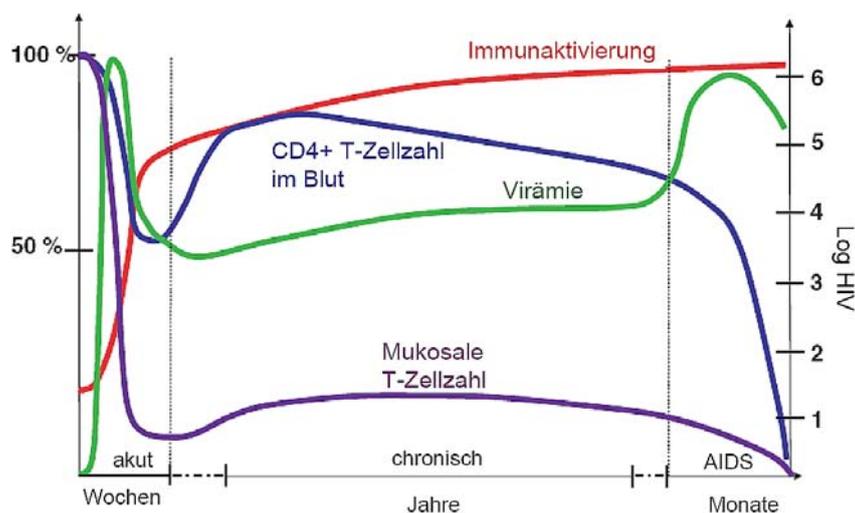
**Vpx (viral protein X)** entstand wahrscheinlich durch Genduplikation aus dem vpr-Gen und kommt nur bei HIV-2 und SIV (Abbildung 1.3) vor, wo es eine Rolle beim Kerntransport des Präintegrationskomplexes spielt (Pancio et al., 2000).

Primäre Zielzellen der Primatenlentiviren sind CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten sowie Monozyten/Makrophagen (Dittmar et al., 1997). Das virale Glykoprotein gp120 bindet dabei an den CD4-Rezeptor, wobei eine zusätzliche Interaktion mit zellulären Proteinen aus der Chemokinrezeptorfamilie, insbesondere CCR5 und CXCR4, von Bedeutung sind. Nach erfolgter Fusion zwischen Virushülle und Wirtszellmembran gelangt das Kapsid in die Zielzelle (Landau et al., 1998). Mit Hilfe der viralen Reversen Transkriptase wird das virale RNA-Genom in doppelsträngige DNA (dsDNA) umgeschrieben und über die virale Integrase ins Wirtsgenom integriert (Bushman et al., 1990). Dabei erfolgt die Integration bevorzugt in jene Genbereiche, die durch die Infektion aktiviert werden (Schroder et al., 2002). Die Expression viraler Gene durch zelluläre Enzyme wird über die Promotorbereiche in der LTR-Region reguliert. Dabei wird nach Aktivierung der Zelle die virale Replikation durch Bindung des NFκB-Transkriptionsfaktors initiiert (Faure et al., 1997). Aus den so entstandenen Genprodukten werden neue Viren zusammengesetzt, die ihre Lipidhülle beim Austritt aus der Zielzelle erhalten. Bei der anschließenden Reifung spaltet die virale Protease die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine in folgende Proteine: Matrix (MA, p17), Kapsid (CA, p24 (p27 bei SIV)), Nukleokapsid (NC, p9) und p6 (Abbildung 1.2 und 1.3). Im Anschluss daran können weitere Zielzellen infiziert werden (Modrow et al., 1998).

### 1.1.3 Die Pathogenese der HIV-Infektion

Eine HIV-Infektion wird in drei Phasen eingeteilt (Abbildung 1.4). Die erste (akute Phase) dauert zwischen zwei und sechs Wochen. In 50% der Fälle kommt es zu grippeähnlichen Erscheinungen (Cooper et al., 1987). Innerhalb weniger Tage wandert das Virus vom Infektionsort in die lymphatischen Gewebe (Pantaleo et al., 1998). Nach etwa zwei Wochen erreicht die Virusbeladung im Blut Spitzenwerte von  $10^5$  bis  $10^8$  RNA-Äquivalenten pro Milliliter Plasma. Zeitgleich fallen die CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen, steigen aber nach der akuten Phase wieder leicht an (Abbildung 1.4; Clark et al., 1991). Mit Einsetzen der antiviralen Immunantwort, vor allem mit der Entstehung HIV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen (CTLs), beginnt der Übergang in die asymptomatische Phase. Hier sinkt die Virusbeladung zunächst wieder und bleibt oft über Jahre hinweg auf einem Niveau von  $10^3$  bis  $10^5$  Partikeln pro Milliliter Plasma (Mellors et al., 1996). Im Gegensatz zum peripheren Blut bleibt die Viruslast in den lymphatischen Organen auch während der asymptomatischen Phase hoch und steigt

sogar stetig an (Pantaleo et al., 1993). Nach durchschnittlich acht bis zehn Jahren manifestiert sich die AIDS-Erkrankung (Abbildung 1.4). Hier erhöht sich der Anteil infektiöser Viruspartikel im Plasma wieder und es kommt zum drastischen Abfall der CD4+ T-Zellzahlen (< 200 Zellen pro Mikroliter Blut).



**Abb. 1.4 Zeitlicher Verlauf der HIV/SIV-Infektion (nach Grossmann et al., 2006)**  
Veränderung der T-Zellpopulation, der Virämie und der Immunaktivierung nach Infektion

Die Struktur der Lymphknoten wird zerstört, wodurch die Effektivität des Immunsystems weiter beeinträchtigt wird. Der Antikörpertiter und die Zahl der HIV-spezifischen CTLs sinken. Die zerstörten T-Zellen sind das Resultat unmittelbarer Zielzellinfektion (Mattapallil et al., 2005), sowie virus-induzierter Fas-vermittelter Apoptose (Li et al., 2005) und können nur bedingt wieder ersetzt werden. Darüber hinaus führt die Hyperaktivierung des Immunsystems zu den beobachteten Schäden. Vermutlich steht diese infektionsbedingte Aktivierung des Immunsystems im Zusammenhang mit der Depletion ruhender CD4+ T-Zellen und verursacht hierdurch die Krankheitsprogression (Grossman et al., 2006). Durch die stete Schwächung des Immunsystems kommt es zum Auftreten opportunistischer Infektionen. Häufige Vertreter sind beispielsweise *Pneumocystis carinii* Pneumonie (PCP), *Candida albicans* Infektionen und Tuberkulose (Levy, 1993). Ebenso sind Lymphome und neurodegenerative Prozesse beschrieben. Diese Erkrankungen können von dem stark geschwächten Immunsystem nicht mehr kontrolliert werden und führen schließlich zum Tod.

Die HIV-Infizierten lassen sich nach dem Krankheitsverlauf in drei Gruppen einteilen. Die Vertreter der ersten Gruppe zeigen innerhalb von acht bis zehn Jahren einen progressiven Verlauf zu AIDS und machen zirka 80% aller HIV-Infizierter aus. Eine weitere klinische Gruppe stellen Infizierte dar, die eine sehr schnelle Reduktion der CD4+ T-Zellzahlen zeigen und innerhalb von zwei bis fünf Jahren an AIDS erkranken. Diese „rapid progressors“ machen zirka 10% aller Infizierten aus und weisen über den gesamten Krankheitsverlauf eine hohe Virusbeladung auf (Haynes et al., 1996; Mellors et al., 1996). Etwa 5-8% aller HIV-Infizierten fallen in die Gruppe der sogenannten Langzeitüberlebenden (LTNPs, long-term non-progressors). Diese Individuen bleiben für mindestens zehn Jahre nach Primärinfektion asymptomatisch, weisen eine geringe Virusbeladung, normale CD4+ T-Zellzahlen und eine niedrige Immunaktivierung auf (Buchbinder et al., 1994).

## 1.2 Das SIV Rhesusaffen-Tiermodell für AIDS

Neben den *in vitro* Untersuchungen sind Tiermodelle für das Verständnis der HIV-Pathogenese von großer Wichtigkeit. Dabei werden verschiedene SIV-Stämme zur Infektion nicht-humaner Primaten verwendet.

HIV-1 besitzt ein eingeschränktes Wirtsspektrum. Neben der Infektion des Menschen kann es auch Schimpansen (*Pan troglodytes*; Nara et al., 1987) und Gibbons (*Hylobates lar*; Lusso et al., 1988) infizieren. Diese Tiere entwickeln eine Lymphadenopathie mit geringer viraler Replikation ohne Ausprägung von AIDS (Nara et al., 1987). Daher, und aufgrund ethischer Erwägungen sowie finanzieller Gründe, ist die Nutzung eines Schimpansenmodells für die Untersuchung der AIDS-Pathogenese des Menschen nicht durchführbar. Als geeignet hierfür erwies sich aber das SIV/Makakenmodell. SIV wurde 1985 als erstes nicht-humanes Primatenlentivirus aus in Gefangenschaft gehaltenen Rhesusaffen (*Macaca mulatta*; Daniel et al., 1985) isoliert und verursachte in diesen Tieren eine der HIV-1 Infektion des Menschen vergleichbare Erkrankung (Letvin et al., 1985; Letvin und King, 1990). Des Weiteren sind SIV und HIV evolutionär miteinander verwandt (Abbildung 1.1). Beide Viren haben die Reverse Transkriptase und zeigen einen Tropismus für Monozyten/Makrophagen sowie CD4+ T-Lymphozyten. Auch die genomische Organisation beider Lentiviren weist viele Ähnlichkeiten auf (Desrosiers, 1990).

Erste klinische Symptome bei SIV-infizierten Rhesusaffen treten innerhalb von zwei bis sechs Wochen nach Inokulation auf. In dieser akuten Phase findet auch die maximale Virusreplikation im Plasma statt (siehe dazu Abbildung 1.4; Chakrabarti et al., 1991). Zeitgleich kommt es zum deutlichen Abfall der CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen, die aber während der chronischen Infektionsphase durch Einsetzen einer spezifischen Immunantwort wieder leicht ansteigen (Abbildung 1.4; Koup et al., 1994; Reimann et al., 1994). Innerhalb einer Woche nach Infektion repliziert das Virus in den Lymphknoten und man findet SIV-infizierte T-Zellen und Makrophagen in der Darmmukosa der Tiere (Heise et al., 1993). Zwei Wochen nach Infektion erreicht die Virusreplikation in den mukosalen Geweben bereits ihr Maximum. Hier kommt es zum massiven irreversiblen Verlust infizierter CD4<sup>+</sup> CD195<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen (Abbildung 1.4; Kewenig et al., 1999; Veazey et al., 1998). Später im Krankheitsverlauf steigt die Virusbelastung erneut an und es werden weitere CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie und in der Mukosa zerstört (Brenchley et al., 2004; Brenchley et al., 2006a). Der Versuch des Immunsystems diese Zellpopulation zu ersetzen führt zur chronischen Immunaktivierung, wodurch es zur Infektion weiterer Lymphozyten kommt (Sopper et al., 2003). Ebenso induziert die mikrobielle Translokation vom Darmlumen in die Zirkulation eine generalisierte Immunaktivierung (Brenchley et al., 2006b), die mit der Progression korreliert (Giorgi et al., 1999). Letztendlich ist das Immunsystem nicht mehr in der Lage, die Virusreplikation zu kontrollieren und es kommt zu opportunistischen Infektionen und zur Entwicklung von AIDS (Abbildung 1.4; Letvin et al., 1985). Hier liegt ein bedeutender Unterschied zu den apathogen verlaufenden SIV-Infektionen der natürlichen Wirte wie der grauen Halsbandmangaben und Afrikanischen Grünen Meerkatzen. Obwohl diese Tiere eine vergleichbar hohe Virämie aufweisen, kommt es nicht zur übersteigerten Immunaktivierung, die ein wesentliches Merkmal pathogener lentiviraler Infektionen in Primaten darstellt (Silvestri et al., 2003).

Die in Rhesusaffen induzierbare pathogene SIV-Infektion spiegelt somit in Übertragungsweise, Replikationsverlauf, klinischer Progression und Immunantwort die HIV-Infektion des Menschen wider und stellt damit ein geeignetes Tiermodell für HIV-Pathogenesestudien und vorklinische Vaccinierungsstrategien dar (Desrosiers, 1995; Letvin, 1990). Der bedeutsamste Unterschied zur HIV-Infektion ist der verkürzte Erkrankungsverlauf (Desrosiers und Ringler, 1989). Während HIV-Infizierte eine Latenzperiode von acht bis 12 Jahren haben können (Lemp et al., 1990), entwickeln

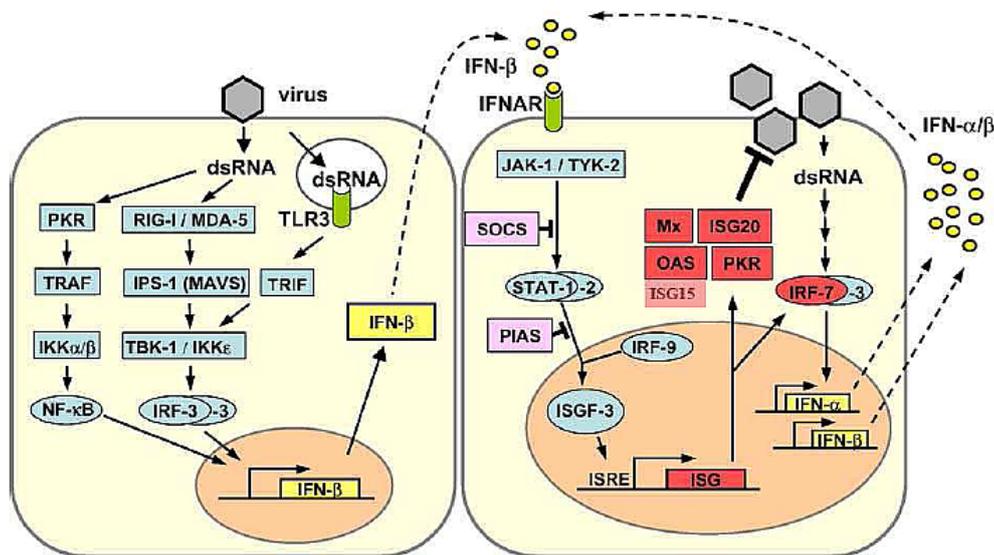
70% der Makaken AIDS innerhalb des ersten Jahres nach SIV-Infektion und sterben in der Regel im Zeitraum von zwei Jahren an den Folgen der Immundefizienz (Letvin und King, 1990). Ähnlich wie bei der HIV-Infektion treten bestimmte Variationen im Krankheitsverlauf auf, die u.a. durch Wirtsfaktoren bedingt sein können (Saueremann, 2001). So haben die meisten Makaken einen progressiven Verlauf und entwickeln das klinische AIDS-Bild innerhalb von weniger als drei Jahren nach Primärinfektion. Ein geringer Prozentsatz zeigt während der chronischen Phase keine Reduktion der Virusbeladung. Die CD4+ T-Zellzahlen dieser „rapid progressors“ sinken schnell und sie erkranken innerhalb weniger Monate an AIDS. Ein besonderer Fall stellen auch hier die LTNPs dar, die in der Lage sind die Virusreplikation über einen langen Zeitraum zu kontrollieren. Diese Tiere haben eine geringe Virusbeladung und normale CD4+ T-Zellzahlen. Sie bleiben für mindestens drei Jahre nach Primärinfektion asymptomatisch (Dittmer und Hunsmann, 1997; Spring et al., 1998). SIV-infizierte Makaken lassen sich somit in dieselben drei Gruppen wie HIV-infizierte Menschen einteilen. Der verkürzte Krankheitsverlauf SIV-infizierter Makaken erlaubt es, rasch Resultate zu erhalten und deren Übertragbarkeit auf die HIV-Infektion des Menschen zu prüfen.

### 1.3 Antivirale Strategien der Wirtszellen

Um sich gegen virale Infektionen zu schützen, haben die Wirtsorganismen im Laufe der Koevolution mit den Viren eine Reihe antiviraler Strategien entwickelt. Eine unspezifische Abwehr bildet das angeborene Immunsystem, bestehend aus Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, natürlichen Killerzellen, Komplementsystem, Akut-Phase-Proteinen, Zytokinen und Interferonen. Später leitet die adaptive Immunantwort eine spezifische T- und B-zellvermittelte humorale und zelluläre Immunabwehr ein. So werden Krankheitserreger und infizierte Zellen vom Immunsystem erkannt und zerstört. Darüber hinaus besitzen Zellen durch konstitutive Expression von Restriktionsfaktoren die Möglichkeit einer spezifischen angeborenen Abwehrstrategie. So reduzieren zelluläre Restriktionsfaktoren wie Tetherin und APOBEC3 die retrovirale Replikation (siehe Kapitel 1.3.2). Die Erforschung einer solchen Inhibition viraler Infektionen trägt zur Aufklärung von Virus-Wirts-Interaktionen bei und liefert neue Ansatzpunkte zur Entwicklung zielgerichteter antiviraler Therapien.

### 1.3.1 Interferon

Interferone sind Zytokine mit antiviralen, immunstimulierenden und tumorhemmenden Eigenschaften. Sie haben eine wichtige Funktion bei der Basisabwehr und blockieren die Virusausbreitung im Organismus. Die Einteilung der Interferone erfolgt in zwei Klassen. Interferone (IFN) vom Typ I werden von aktivierten Leukozyten (IFN- $\alpha$ ) oder von aktivierten Fibroblasten (IFN- $\beta$ ) freigesetzt (Pestka et al., 2004). Die Expression von IFN- $\alpha$  und - $\beta$  wird u.a. durch dsRNA ausgelöst, die als Zwischenprodukt bei der Virusreplikation entsteht. Die Untereinheiten des Rezeptors (IFNAR-1 und IFNAR-2) dimerisieren nach Bindung des Liganden und lösen die Signaltransduktionskaskade über den JAK/STAT-Weg aus (Novick et al., 1994). Entstandene STAT-1-/STAT-2-Heterodimere binden zusammen mit IRF-9 (interferon regulatory factor 9) an Interferon-Response Elemente (ISRE) im Promotor zahlreicher interferonstimulierter Gene (ISGs) und bewirken deren Induktion. Solche ISGs sind z.B. MxA (myxovirus resistance protein A), PKR (Proteinkinase R), Oligoadenylatsynthetase (OAS)/RNaseL (siehe Abbildung 1.5; Smith et al., 2005). IFN- $\beta$  induziert auch die IFN- $\alpha$ -Expression und wirkt in einer positiven Rückkopplung stimulierend auf die eigene Transkription (Erlandsson et al., 1998).



**Abb. 1.5 Signaltransduktion der Typ-I-Interferone (nach Haller et al., 2006)**

**Links:** Die dsRNA aktiviert NF $\kappa$ B und IRF-3, die zur IFN- $\beta$ -Expression führen.

**Rechts:** IFN- $\beta$  bindet an Typ-I-Interferon-Rezeptor (IFNAR) und es kommt zur Expression antiviraler Gene (MxA, OAS, PKR) über den JAK/STAT-Weg.

NF $\kappa$ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; IRF: interferon regulatory factor; ISGF3: interferon stimulated gene factor 3; ISRE: stimulated response element

Typ-II-Interferon IFN- $\gamma$  wird von Th1-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen produziert und trägt zur Bekämpfung intrazellulärer Pathogene und Virusinfektionen bei (Young, 1996). IFN- $\gamma$  aktiviert Makrophagen und induziert die Expression von zirka 200 Genen (Boehm et al., 1997). Nach Bindung des Liganden und Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten IFNGR-1 und IFNGR-2 kommt es zur Aktivierung der Jak-1-, Jak-2-assoziierten Kinasen und zur Phosphorylierung von STAT-1 (Bach et al., 1997). Phosphorylierte STAT-1-Moleküle dimerisieren zum Gamma-aktivierten Faktor (GAF) und binden im Zellkern an Gamma-aktivierte Sequenzen (GAS) im Promotorbereich IFN- $\gamma$ -induzierter Gene (Decker et al., 1997). Die induzierten ISGs vermitteln die antiviralen Effekte der Interferone (siehe Kapitel 1.3.1.1; Stark et al., 1998). Auf diese Weise erhöhen IFN- $\alpha$  und - $\beta$  die Antigenpräsentation über vermehrte MHC-Klasse-I-Expression (Biron, 1998). Auch IFN- $\gamma$  steigert die Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I und -II und bewirkt die Induktion des 10 kDa Interferon-gamma-induzierten Proteins IP-10 in Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. Dieses Protein, auch als Chemokin-(C-X-C Motiv)-Ligand 10 bekannt, gehört zur CXC-Chemokinfamilie und vermittelt seine antivirale Funktion nach Bindung an den CXCR3-Rezeptor (Booth et al., 2002). IP-10 wirkt als Chemoattraktant für Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen und bewirkt die Wanderung der Immunzellen in lymphatische Gewebe (Cheret et al., 1997; Dufour et al. 2002; Sanders et al., 1998).

#### 1.3.1.1 Antivirale Aktivitäten der Interferone

An dieser Stelle sollen die wichtigsten antiviralen Mechanismen der Interferone erläutert werden.

Die **Proteinkinase R (PKR)** wird von dsRNA aktiviert und phosphoryliert die  $\alpha$ -Untereinheit des Proteinsynthese-Initiationsfaktors eIF-2 $\alpha$ , wodurch es zu Hemmung der Translation kommt (Samuel et al., 1997).

Das **Oligoadenylatsynthetase/RNaseL-System** wird durch Intermediate des viralen Replikationszyklus aktiviert und führt zur Entstehung von 2'-5'-Oligoadenylat. Dadurch kommt es zur Aktivierung der RNaseL, die virale und zelluläre RNAs abbaut (Wreschner et al., 1981).

**ADAR1** ist eine Adenosin-spezifische Deaminase, die Adenosin zu Inosin auf der RNA deaminiert, wodurch die RNA-Helix destabilisiert wird (Bass, 1997).

**Mx-Proteine** gehören zur Superfamilie der großen GTPasen, besitzen antivirale Eigenschaften (Staehele et al., 1993) und werden durch IFN- $\alpha$  und - $\beta$  induziert (Simon et al., 1991). Der antivirale Mechanismus für das humane MxA wurde gegen das LaCrosse Virus (LACV) aufgeklärt. Durch Komplexbildung mit dem Kapsidprotein unterbricht es die Virusreplikation (Kochs et al., 2002). Des Weiteren sind MxA-vermittelte Schutzmechanismen gegen Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae und Togaviridae beschrieben worden (Haller et al., 1998).

### 1.3.2 Virale Restriktionsfaktoren

Eine Reihe zellulärer Proteine sind beschrieben, die zur angeborenen antiviralen Immunabwehr beitragen. So bindet ZAP (zinc-finger antivirale protein) über Zink-Fingermotive an virale mRNAs und bewirkt deren Degradation (Gao et al., 2002). Tetherin kann die Freisetzung Vpu-defizienter Viruspartikel von der Wirtszelloberfläche hemmen (Neil et al., 2008; Neil et al., 2009). Lv1 oder TRIM5 $\alpha$  sind für die HIV- und SIVmac-Restriktion in Rhesusaffen verantwortlich (Hatzioannou et al., 2003; Stremlau et al., 2004). Allerdings wurde für das humane TRIM5 $\alpha$  keine antivirale Aktivität gefunden. Eine bedeutende Rolle bei der viralen Restriktion spielen die Proteine der APOBEC-Familie, die in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

#### 1.3.2.1 Die APOBEC-Familie

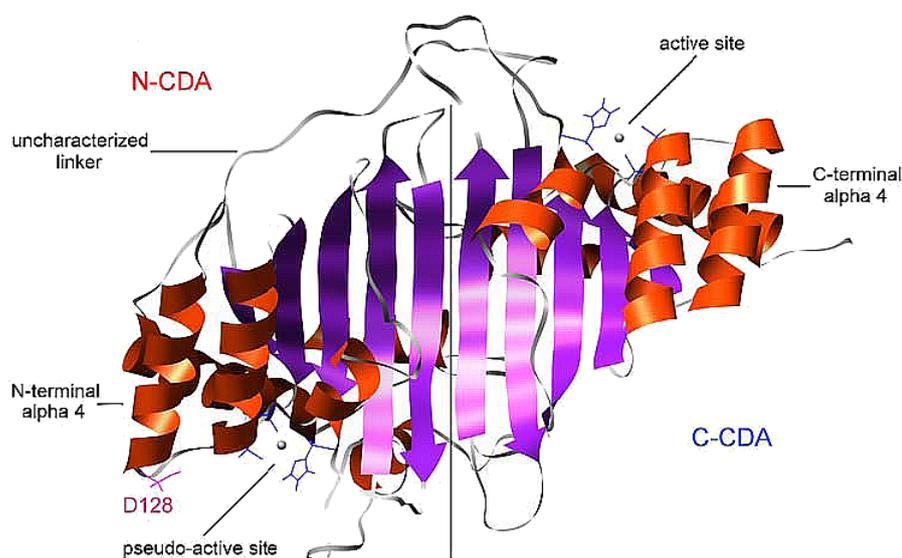
APOBEC-Proteine (apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide) sind Cytidineaminasen, die die Ausbreitung von Retroviren, Retrotransposons und einiger anderer Viren hemmen und damit einen wichtigen Beitrag zur angeborenen Immunantwort leisten (Jarmuz et al., 2002). Namensgebend ist das RNA-Editingenzym APOBEC1, welches im Dünndarm exprimiert wird und eine Rolle im Lipidstoffwechsel spielt (Powel et al., 1987). AID (activation induced deaminase) ist eine DNA-Deaminase, die in aktivierten B-Lymphozyten produziert wird und zur Diversifikation des Immunglobulinlokus beiträgt (Muramatsu et al., 1999; Muramatsu et al., 2000). APOBEC2 wird im Herz- und Skelettmuskel exprimiert. Seine Funktion ist bisher unbekannt (Liao et al., 1999). In einigen Zelltypen wurde ein weiterer zellulärer Faktor identifiziert, der die Replikation Vif-defizienter HIV-Partikel beeinträchtigt. Dieses Protein wurde zunächst CEM15 und später APOBEC3G (A3G) benannt

(Sheehy et al., 2002). Damit war A3G das zuerst beschriebene APOBEC-Protein, welches in der Lage ist HIV-1 zu inhibieren. Daraufhin wurden weitere APOBEC3-Enzyme mit ähnlichen antiviralen Eigenschaften entdeckt (Liddament et al., 2004 ; Zheng et al., 2004). Das im Hoden gebildete APOBEC4 hat eventuell eine Rolle bei der Spermatogenese (Rogozin et al., 2005).

### 1.3.2.1.1 Evolution

APOBEC1 und APOBEC3 sind aus einer Duplikation des AID-Lokus hervorgegangen (Conticello et al., 2005). Nagetiere besitzen nur ein APOBEC3-Gen, wohingegen in Primaten mindestens sieben verschiedene APOBEC3-Gene (A3A-H) bekannt sind (Jarmuz et al., 2002). Im Menschen sind folgende Vertreter beschrieben: Auf Chromosom 12 werden AID und APOBEC1 kodiert, auf Chromosom 6 liegt APOBEC2, auf Chromosom 22 befinden sich in Tandem angeordnete APOBEC3-Gene (Conticello et al., 2005) und auf Chromosom 1 liegt APOBEC4 (Rogozin et al., 2005). Die Expansion und Duplikation dieses Locus erfolgte bereits vor Radiation der Primaten. Während dieser Zeitspanne standen die APOBEC3 Gene unter positivem Selektionsdruck, was auf die Wichtigkeit ihrer Funktion verweist (Sawyer et al., 2004).

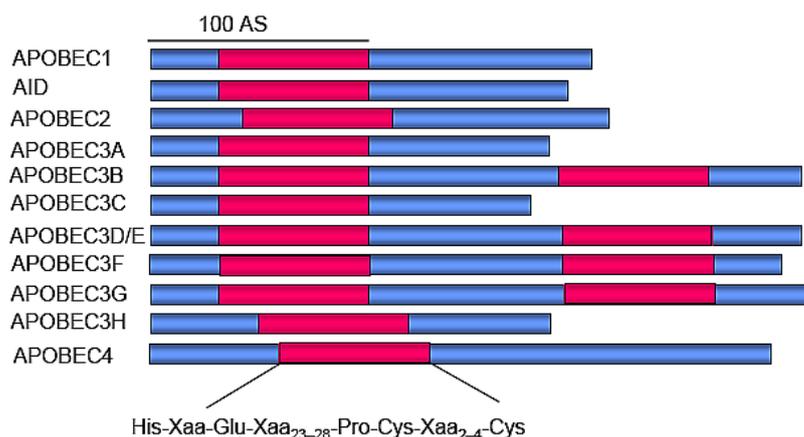
### 1.3.2.1.2 Struktur



**Abb. 1.6 Strukturmodell des humanen A3G-Proteins basierend auf der Kristallstruktur des APOBEC2 (nach Zhang et al., 2007)**

Alpha-Helices und beta-Faltblätter bilden jeweils ein aktives Zentrum N-terminal (N-CDA) und C-terminal (C-CDA). D128: Aspartat an Position 128 als kritischer Aminosäurerest für die artspezifische Interaktion mit Vif.

Aus den Strukturanalysen ergibt sich für A3G eine Anordnung aus Alphahelices und Betafaltblättern (siehe Abbildung 1.6; Zhang et al., 2007). Die C-terminale Deaminasedomäne setzt sich aus fünf Alphahelices ( $\alpha 1$ - $\alpha 5$ ) zusammen, die über fünf Betafaltblättern ( $\beta 1$ - $\beta 5$ ) angeordnet sind. Die Zinkbindestelle umspannt  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\beta 3$  (Chen et al., 2008). Die katalytische Domäne enthält ein konserviertes Motiv aus His-Xaa-Glu-(Xaa)<sub>23-28</sub>-Pro-Cys-Xaa<sub>2-4</sub>-Cys (Abbildung 1.7; Holmes, 2007a). Diese Konsensussequenz ermöglicht die Koordinierung von Zink-Ionen als Voraussetzung für die Enzymreaktion (Huthoff und Malim, 2005). Sie erfolgt in Form einer hydrolytischen Deaminierung zu Uracil an der C4-Position der Cytidinbase (Zhang et al., 2003). Diese Reaktion wird über die C-terminale Domäne des A3G vermittelt. Die N-terminale Domäne führt, trotz eines eigenen aktiven Zentrums, keine Deaminierungsreaktion aus. Dieser Teil des Proteins ist verantwortlich für die Verpackung des A3G in neue Viruspartikel (Hache et al., 2005).



**Abb. 1.7 Darstellung der Domänenorganisation humaner APOBEC-Proteine (nach Holmes, 2007a)**  
AS: Aminosäure; rote Balken: Cytidineaminase-Motive; unten: Konsensussequenz; X: beliebige AS

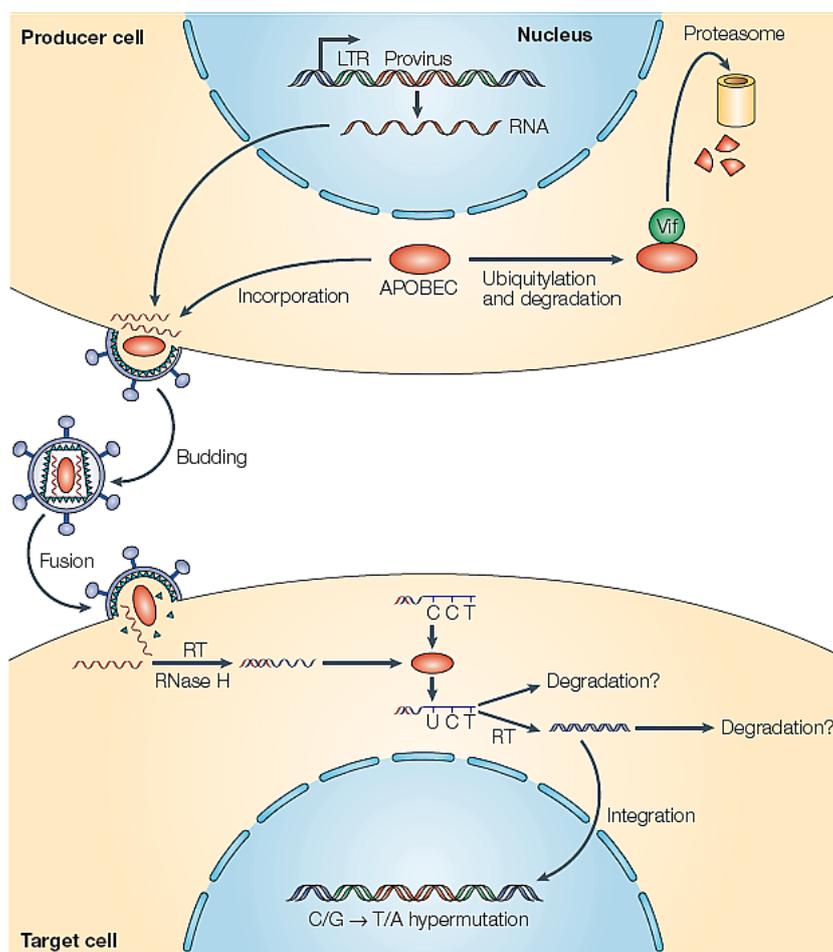
A3G und A3F Proteine können im Zytoplasma in zwei Formen vorliegen. Zum einen in einer > 700 kDa hochmolekularen (high molecular mass, HMM) und zum anderen in einer 46-100 kDa niedermolekularen (low molecular mass, LMM) Form. Bei der Entstehung der enzymatisch inaktiven HMM-Form ist die Bindung an RNA beteiligt (Iwatani et al., 2006; Kozak et al., 2006). Eine zelluläre Funktion der HMM-Komplexe besteht darin, Retrotranspositionereignisse zu limitieren. Damit helfen sie mit, die genomische Integrität der Zelle zu bewahren (Chiu et al., 2006). Eine enzymatische Aktivität von A3G und A3F wurde nur für die LMM-Form beschrieben. In dieser Form

können sie die virale Replikation bereits im Stadium des Präintegrationskomplexes (PIC) stoppen (Chiu et al., 2005).

### 1.3.2.1.3 Mechanismus der APOBEC3-vermittelten Restriktion

Zur Verpackung in neugebildete HIV-Viruspartikel binden die APOBEC3-Proteine, in Abwesenheit von Vif, über ihre N-terminale Domäne an die NC-Komponente des viralen Gag-Vorläuferprotein (Luo et al., 2004). Der Einbau in die Viren wird dabei unterstützt durch virale (Khan et al., 2005) und zelluläre RNA (Wang et al., 2007a). So enthalten aus der Zelle austretenden Viruspartikel drei bis 11 A3G-Kopien (Xu et al., 2007). Nach Infektion einer weiteren Zielzelle kommt es während der reversen Transkription auf dem Minusstrang der proviralen DNA zur Deaminierung von Cytosin (Yu et al., 2004b). Dabei editiert A3G im Kontext 5'-CC, wodurch auf dem Plusstrang GG-zu-AG-Hypermutationen entstehen (siehe Abbildung 1.8; Zhang et al., 2003). A3F deaminiert bevorzugt 5'-TC-Dinukleotide und induziert GA-zu-AA-Hypermutationen. Auf diese Weise hemmt A3F ähnlich wie A3G, wenn auch in geringerem Ausmaß, die HIV-Replikation (Liddament et al., 2004; Zheng et al., 2004). Nach Integration eines mitunter massiv mutierten Provirus können keine replikationsfähigen Viren mehr produziert werden (Mangeat et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit der APOBEC3-vermittelten retroviralen Restriktion ist der Abbau uracilhaltiger proviraler DNA durch zelluläre Reparaturenzyme noch vor Integration ins Wirtsgenom (Yang et al., 2007a). Neben A3G und A3F wurden für weitere APOBEC3-Proteine antivirale Mechanismen beschrieben. So vermag das in unreifen Monzyten exprimierte A3A auch die HIV-Infektion zu hemmen (Peng et al., 2007). A3C in CD4+ T-Zellen kann ebenfalls die HIV-Replikation inhibieren (Bourara et al., 2007). Des Weiteren ist eine Restriktion von SIVmac und SIVagm durch humanes A3B und A3C bekannt (Yu et al., 2004a). Dang et al. beobachteten eine A3DE-vermittelte Hemmung von HIV-1 (Dang et al., 2006). Darüber hinaus wurde unabhängig von der Enzymaktivität der APOBEC3-Proteine eine Hemmung retroviraler Infektionen beobachtet (Bishop et al., 2006; Newman et al., 2005). So verhindern A3G und A3F die Anlagerung des tRNA<sup>Lys3</sup>-Primers an die virale RNA, wodurch die Initiation der reversen Transkription beeinträchtigt wird (Guo et al., 2007; Yang et al., 2007b). Weiterhin beschrieben Li et al. eine Beeinträchtigung der Strangtransferreaktionen durch A3G (Li et al., 2007). So kann die Replikation von HIV-1, HIV-2 und eine Reihe weiterer Viren durch

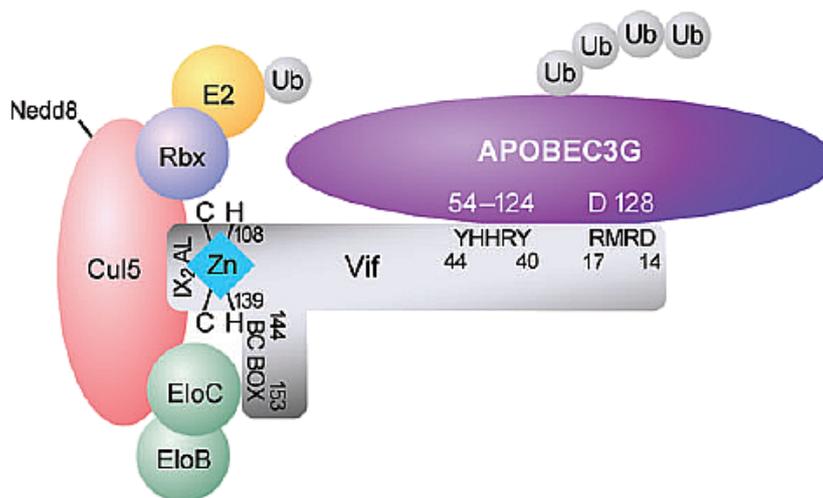
deaminaseabhängige sowie deaminaseunabhängige Funktionen der APOBEC3-Proteine inhibiert werden (Mangeat et al., 2003). Auch die Replikationszyklen von SIV, HTLV-I (Sasada et al., 2005), Hepatitis B (Suspene et al., 2005; Turelli et al., 2004), Foamyviren (Delebecque et al., 2006), sowie von Parvoviren AAV (Adenoassoziiertes Virus) (Chen et al., 2006a) können durch APOBEC3 gehemmt werden. Neben der viralen Restriktion ist die Einschränkung der Transposition endogener mobiler Retroelemente eine wichtige APOBEC3-vermittelte Funktion (Bogerd et al., 2006; Chiu et al., 2006; Esnault et al., 2005).



**Abb. 1.8 Modell zur retroviralen Restriktion durch APOBEC3 (nach Harris und Liddament, 2004)**  
A3G wird in Viruspartikel verpackt. In neuer Zielzelle kommt es zur Cytosindeaminierung des ersten proviralen DNA-Stranges bei der reversen Transkription (RT). Entstandene Uracilreste dienen als Template zum Einbau von Adenin auf dem komplementären Strang. Verursachte GG-zu-AG-Transitionen führen zur Integration mutierter proviraler DNA oder werden abgebaut. Retrovirales Vif führt A3G dem Abbau im Proteasom zu.

### 1.3.2.1.4 Die APOBEC3-Interaktion mit Vif

Im Laufe der Koevolution von Virus und Wirtszelle haben Lentiviren (außer EIAV) zum Umgehen der APOBEC3-vermittelten viralen Restriktion ein akzessorisches Vif Protein (virion infectivity factor) entwickelt (Gabudza et al., 1992). Vif ist ein 23 kDa Phosphoprotein, welches spät im Replikationszyklus aller Lentiviren exprimiert wird und essentiell für die Replikation in Zielzellen ist, in denen A3G exprimiert wird. Über die Vif-A3G-Interaktion wird die Menge an A3G-Molekülen, die in die viralen Partikel eingebaut wird, reduziert (siehe Abbildung 1.9; Simon et al., 1998). Diese Bindung ist artspezifisch und wird über eine Aminosäure in der 128. Position der  $\alpha 3$ -Helix des A3G vermittelt (siehe Kapitel 1.3.2.1.2 und Abbildung 1.6; Mangeat et al., 2004; Schrofelbauer et al., 2004). Beim Menschen befindet sich an dieser Stelle ein Aspartatrest (D) und bei Afrikanischen Grünen Meerkatzen (AGM) ein Lysinrest (L). Nach Mutation D128K ist das humane A3G resistent gegen Vif aus HIV-1 und sensitiv gegen Vif aus AGM. Damit wird die Möglichkeit einer Übertragung auf andere Arten eingeschränkt (Mariani et al., 2003).



**Abb. 1.9 Modell der Vif-APOBEC3-Interaktion (nach Chiu und Greene, 2008)**

Der N-terminale Vif-Bereich bindet an die N-terminale Region des humanen A3G (Aminosäurereste 54-124). Vif enthält SLQ(Y/L)LA-Motiv (Aminosäurereste 144-153) über den die Bindung an Elongin C (eine Komponente des E3-Ligasekomplexes) erfolgt. Das Zinkbindemotiv der HCCH-Region (Aminosäurereste 108-139) im Vif enthält zwei konservierte Cysteine, die mit der Cul5-Komponente des E3-Ligasekomplexes interagieren. Die Cul5-Vif E3-Ubiquitinligase bindet an A3G und leitet dessen Ubiquitylierung ein, die zum Abbau des A3G im Proteasom führt.

Cul5: Cullin5; ElonB/C: Elongin B/C; Rbx1: Ring-box 1; Ub: Ubiquitin; Zn:  $Zn^{2+}$ ; D128: Aspartat 128

Daneben sind weitere Aminosäurereste an der A3G-Vif-Interaktion beteiligt (Abbildung 1.9; Chiu und Greene, 2008; Huthoff und Malim, 2007). Die Bindung an A3G erfolgt über die SLQ(Y/F)LA-Sequenz. Diese Sequenz ähnelt der konservierten BC-Box der SOCS-Proteine (suppressors of cytokine signalling) und vermittelt die Bindung an Elongin C (Komponente des E3-Ubiquitinligasekomplexes) (Yu et al., 2003; Yu et al., 2004c). Über das konservierte H-X<sub>5</sub>-C-X<sub>17-18</sub>-C-X<sub>3-5</sub>-H-Motiv (HCCH) erfolgt die Interaktion mit Cullin 5 (Luo et al., 2005). Dabei spielen zwei Cysteinreste im HCCH-Motiv sowie die Bindung von Zink-Ionen eine Rolle (Mehle et al., 2006). HCCH- und SLQ(Y/F)LA-Motive befähigen Vif den Ubiquitin-Ligase-E3-Komplex, bestehend aus Elongin B, Elongin C, Cullin 5 und Rbx 1, zu rekrutieren (Yu et al., 2003; Yu et al., 2004c). Die Bindung dieses Komplexes führt zur Ubiquitylierung von A3G bzw. A3F und induziert den Abbau der Cytosindeaminasen im Proteasom. Dadurch stehen diese Enzyme nicht mehr zum viralen Einbau zur Verfügung und können ihre antivirale Aktivität nicht mehr ausüben (Sheehy et al., 2003). Unabhängig von dieser proteasomalen Degradation gibt es eine Vif-induzierte Beeinträchtigung der A3G *de novo* Synthese (Stopak et al., 2003). Eine Zerstörung der A3G-Vif-Interaktion könnte als Ansatzpunkt zur Entwicklung antiviraler Therapeutika dienen (Goila-Gaur und Strebel, 2008).

#### 1.3.2.1.5 Die Regulation der APOBEC3-Transkription

Humanes A3G wird über mehrere Transkriptionsstartstellen (TSS) exprimiert. Eine 180 Basenpaarregion vermittelt dabei die Basaltranskription (Muckenfuss et al., 2007). In den T-Zellen ist die Transkriptionsaktivität dieses Promotors abhängig von der GC-Box, die von SP1 und SP3 (specificity protein) Transkriptionsfaktoren erkannt wird (Muckenfuss et al., 2007). In der 5'-untranslatierten Region befinden sich Bindestellen für mitogenaktivierte Transkriptionsfaktoren, wie Ets-1, c-Myc und Elk-1 (Rose et al., 2004). Mitogene, wie PHA (Phytohämagglutinin) und PMA (Phorbolmyristataacetat) erhöhen daher die humane A3G-Expression (Rose et al., 2004; Stopak et al., 2003). Bei der Reifung dendritischer Zellen ist die A3G-Expression ebenfalls erhöht und wird in Makrophagen über Toll-like-Rezeptoren durch Interferone vom Typ I und II induziert (Peng et al., 2007; Sarkis et al., 2006; Stopak et al., 2007). In ruhenden T-Lymphozyten steigt die A3G-Transkription durch IL-2 und PHA (Stopak et al., 2003). Stopak et al. zeigten, dass auch IL-2, IL-7 und IL-15 die Expression von A3G und A3F in peripheren

Blutlymphozyten über den JAK/MAPK-Signalweg induzieren (Stopak et al., 2007). Diese Zytokine und Mitogene bewirken aber eine Umlagerung von der LMM- zur HMM-Form (Wang et al., 2007b). Damit weisen die aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und die Makrophagen eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer HIV-Infektion auf (Chiu et al., 2005; Stopak et al., 2007).

#### 1.3.2.1.6 Die Rolle von APOBEC3 im Krankheitsverlauf

Wie schon beschrieben, besitzen die APOBEC3-Proteine antivirale Aktivitäten gegen verschiedene Retroviren, u.a. gegen HIV und SIV (Bishop et al., 2004; Sheehy et al., 2002; Zheng et al., 2004). APOBEC3-induzierte Hypermutationen im retroviralen Genom beeinträchtigen dabei die Replikationsrate (Harris et al., 2003). So gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen APOBEC3-induzierten hypermutierten Sequenzen im HIV-Genom und einer geringeren Virusbeladung im Plasma (Pace et al., 2006). Weitere Untersuchungen zeigten einen langsameren Krankheitsverlauf bei HIV-Infizierten, die eine höhere genetische Variabilität im viralen Genom hatten (Roman et al., 2002; Ross und Rodrigo, 2002; Wang et al., 2000). Allerdings gibt es eine aktuelle Studie, die diesen Zusammenhang nicht bestätigt (Gandhi et al., 2008). Weiterhin konnte aber für HIV-Infizierte ein Zusammenhang zwischen der A3G-Expression und dem Infektionsstatus gefunden werden. Individuen mit der höchsten A3G-Expression hatten die geringste Virusbeladung und überlebten länger. Damit zeigt sich beim Menschen, dass eine hohe A3G-Transkriptionsrate mit abnehmender Virämie einhergeht und mit Langzeitüberleben assoziiert ist (Jin et al., 2005). Im Gegensatz dazu konnte eine andere Studie diesen Zusammenhang nicht zeigen. Hier kam es verglichen mit Uninfizierten sogar zur verringerten A3G/A3F-Expression bei HIV-Positiven (Cho et al., 2006).

## 1.4 Ziele der Arbeit

Aufgrund widersprüchlicher Resultate vorheriger Studien, war das Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung der angeborenen zellulären Restriktionsfaktoren A3G und A3F im Krankheitsverlauf SIV-infizierter Rhesusaffen *in vivo* zu charakterisieren. Als prognostischer Marker für die Progression diente hierbei die Virusbeladung, die gleichzeitig gemessen wurde. Neben der Quantifizierung der APOBEC3-Transkription mit real-time-PCR, wurde ein Nachweis auf Proteinebene im Western-Blot angestrebt. Weiterhin sollte herausgefunden werden, ob es einen Zusammenhang zwischen den für den Krankheitsverlauf bedeutsamen Interferonen und der APOBEC3-Expression gibt. Hierzu wurde zusätzlich die Expression von MxA (Typ-I-Interferon-induziertes Gen) und IP-10 (Typ-II-Interferon-induziertes Gen) mit real-time-PCR ermittelt. Die Untersuchungen erfolgten in der Peripherie zunächst für die PBMCs. Anschließend wurden auch die SIV-Zielzellen, CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD14<sup>+</sup> Monozyten, in die Analyse einbezogen. Ebenso wurde die Expression von A3G, A3F, MxA und IP-10 in den Lymphknoten gemessen.

In einer Longitudinalstudie wurde die Expression von A3G *in vivo* im Zeitverlauf beobachtet. Parallel dazu sollte auch der Einfluss der Interferone über die MxA-Expression bestimmt werden. Dazu wurden von einer Gruppe Rhesusaffen zunächst Vorinfektionsdaten erhoben. Nach SIV-Inokulation wurde die Expression von A3G und MxA in den PBMCs zu bestimmten Zeitpunkten ermittelt und in Bezug zu den Daten aus der Vorinfektion gesetzt. Die Messungen erfolgten mit real-time-PCR. Ziel dieser Zeitverlaufsstudie war, die durch die Infektion hervorgerufenen Auswirkungen auf die Expression beider Gene während der Primärinfektion, sowie in der frühen chronischen Phase zu verfolgen. Des Weiteren sollte auch der Einfluss einer Immunisierung auf den Krankheitsverlauf, sowie auf die A3G- und MxA-Expression im Zeitverlauf untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verwendete Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Inc.
CO <sub>2</sub> -Inkubator HeraCell240	Heraeus
Digital Monochrome Printer P91D	Mitsubishi
Durchflusszytometer BD LSRII	BD Biosciences
ELISA-Reader MR5000	Dynatech
Feinwaage supermicro	Sartorius
Filmentwickler „Elite Chrome 400“	Kodak
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Laborschüttler	Heidolph
Laborwaage LC2200	Sartorius
Macrodrive 1 Power Supply	LKB Bromma
Magnetrührer MR 2002	Heidolph
Mini Protean System	BioRad
Mini SubCell GT	BioRad
Inversmikroskop, Axiovert 25	Carl Zeiss GmbH
pH-Meter	HI110, HANNAinstruments
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe, elektrisch	Hischmann Laborgeräte
Power Pac Universal Power Supply	BioRad
Real Time Cycler “TaqMan <sup>®</sup> 7500“	Applied Biosystems
Spektralphotometer „NanoDrop“	PeqLab
Sterilwerkbank Gelaire	BioFlow Technik
Stickstofftank	Chronos Messer
Thermocycler “my cycler”	BioRad
Thermostat 5320	Eppendorf
Tiefkühlschrank (-20°C)	Liebherr

Tiefkühlschrank (-80°C)	New Brunswick Scientific
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf
UV-System	NTAS
Vortexer	Ernst Schütt jr.
Zentrifugen	
Multifuge 3S-R	Heraeus
Varifuge 3.0 R	Heraeus

## 2.1.2 Arbeitsmittel

Cryo Tube Vials	Nunc
Mini-Protean 3 Electrophoresis Module	BioRad
Filter-Spitzen, 1000 µl	Sarstedt
Freezing Container „Mr. Frosty“	Nalgene
Gel Loader Tips	Eppendorf
Hyperfilm	Amersham
Kanülen Microlane 3; 0,9 x 40 mm	BD Biosciences
Leucosep-Röhrchen, 12 ml; 50 ml	Greiner
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec
MACS Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotec
MACS Separation Columns MS	Miltenyi Biotec
MaxiSorp Mikrotiterplatte	Nunc
Micro Amp Optical Tubes 0,2 ml	Applied Biosystems
Micro Amp Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld Superior
Nitrozellulosemembran (Porenweite: 45 µm)	Schleicher und Schuell Bioscience
NORM-JECT-Einmalspritze, 5 ml	Henke Sass Wolf
Octo MACS Separation Unit	Miltenyi Biotec
Optical Caps (8 cap/strip)	Applied Biosystems

QIAshredder-Säulen	Qiagen
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym
Petrieschalen	Greiner
Pipetten, serologische, 1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen 10 µl; 200 µl; 1000 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1 ml, 5 ml; 2 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen "Safe Seal", 20 µl; 100 µl	Biozym
Sieb, Maschenweite 100 µm, Nylon	BD Biosciences
SOFT-JECT, 1 x 100	Henke Sass Wolf
Zellkulturplatte 6-Well	Greiner

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid 40% Solution	Fisher BioReagents
Agarose	Biozym
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka BioChemika
β-Mercaptoethanol	Roth
Bovines-Serum-Albumin (BSA)	PAA Laboratories
Bromphenolblau	Merck
Coomassie Brilliantblau R-250	SERVA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
DNA-Exitus-Plus	AppliChem
Essigsäure	Roth
Ethidiumbromid	Appllichem
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich
Ethanol (Rotipuran > 99,8%)	Roth

Ethanol, vergällt	Roth
Formaldehyd (37%)	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH
Grotanat Granulat	Schülke und Mayr GmbH
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm
HEPES	Roth
Human Interferon-Alpha A	PBL Biomedical Laboratories
Igepal (NP-40)	Sigma Aldrich
Isopropanol	Roth
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Kolloidales Brilliantblau G Konzentrat	Sigma Aldrich
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
NuPage LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
Penicillin (10000 U/ml)	PAN Biotech GmbH
Polyoxiethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Merck
Ponceus S	Roth
Proteinase Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich
RNase Zap	Ambion
Streptomycin (10 mg/ml)	PAN Biotech GmbH
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCL)	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Roth
Triton X-100	Merck

Trypanblau	Merck
Trypsin/EDTA	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid	Merck

### 2.1.4 Medien, Stammlösungen und Puffer

Einfriermedium	10% RPMI 1640 Medium , 70% FCS, 20% DMSO
Ethidiumbromid-Stammlösung	1 mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
FACS Flow, FACS Rinse, FACS Safe	BD Biosciences
Lymphocyte Separation Medium (Ficoll)	PAA Laboratories
MACS-Puffer auto MACS Rinsing Solution	Miltenyi Biotec
MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec
Phosphate Buffered Saline (PBS)	120 mM NaCl, 17 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
PBS <sub>FACS</sub>	PBS, 0,1% [w/v] BSA, 0,03% [w/v] Natriumazid, pH 7,2
PBST	0,1% [v/v] Tween 20 in PBS
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma)	104 mM AEBSF (4-(2-Aminoethyl)- Benzensulfonylfluorid Hydrochlorid); 0,008 mM Aproptin; 2,1 mM Leupeptin; 3,6 mM Bestatin; 1,5 mM Pepstatin; 1,5 mM E-64 (L-Transepoxysuccinyl-Leucylamido (4-Guanidino) Buton)
RNA-Ladepuffer	50% Glycerol; 1 mM EDTA; 0,4% Bromphenolblau
RNA Sample Buffer	10 ml Formamid; 3,5 ml 37% Formaldehyd, 2 ml 1 x TAE Puffer

RPMI 1640 Kulturmedium	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 mit L-Glutamin (PAN Biotech); supplementiert mit 10% [v/v] inaktiviertem FCS; 100 U/ml Penicillin (PAN Biotech); 100 µg/ml Streptomycin (PAN Biotech)
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris; 100 mM EDTA; 1 M Essigsäure
Trypanblaulösung	PBS; 1% [w/v] Trypanblau
Zell-Lysepuffer	50 mM HEPES; 150 mM NaCl; 0,1% [v/v] Igepal pro 100 µl jeweils 1 µl Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) zugeben

### 2.1.5 Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
RNA 6000 Nano Assay Kit	Agilent Technologies
Rneasy Plus Mini Kit	Qiagen
SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen
SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate Kit	Pierce

### 2.1.6 Marker

SeeBlue Plus 2	Invitrogen
1 kb DNA Ladder	Fermentas
PeqGOLD Protein Marker II	PeqLab

## 2.1.7 Polyacrylamidgel (PAGE) und Western-Blot

<b>Trenngel 12%</b>	3,4 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; 4 ml 30% Acrylamid; 2,5 ml 1,5 M Tris-HCL (pH 8,8); 0,1 ml 10% SDS; 50 µl 1% APS; 20 µl TEMED
<b>Sammelgel 4%</b>	3,4 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ; 4 ml 30% Acrylamid; 2,5 ml 0,5 M Tris-HCL (pH 6,8); 0,1 ml 10% SDS; 50 µl 1% APS; 20 µl TEMED
<b>LDS Probenpuffer (4x), Invitrogen</b>	106 mM Tris-HCl; 141 mM Tris-Base; 2% LDS, 10% Glycerol; 0,51 mM EDTA; 0,22 mM SERVA Blue G250; 0,175 mM Phenol Rot; pH 8,5
<b>10x Laufpuffer</b>	30,3 g Tris-Base; 144 g Glycin; 10 g SDS; auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>1x Transferpuffer</b>	200 ml Methanol; 100 ml 10x Transferpuffer; 700 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>Ponceus S Färbung</b>	0,1% in 5% Essigsäure
<b>Waschpuffer PBST</b>	0,1% [v/v] Tween-20 in PBS
<b>Fixierlösung für Gele</b>	40% [v/v] Ethanol; 10% [v/v] Essigsäure in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>Färbelösung für Gele</b>	20 ml Brilliantblau; 20 ml Methanol; 60 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>Waschlösung</b>	1% [v/v] Essigsäure in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>Blockpuffer (MPBST)</b>	5% [w/v] Milchpulver in 0,1% PBST
<b>Detektion</b>	Super Signal West Pico Chemoluminescence Kit (Pierce)
<b>Substratlösung 1</b>	2,5 M Luminol ; 0,4 M p-Cumarinsäure; 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0)
<b>Substratlösung 2</b>	0,09% [v/v] H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten adulte Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) indischer Herkunft. Die Tiere wurden im Deutschen Primatenzentrum (DPZ) gemäß der Richtlinien des Instituts und des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 in der derzeit geltenden Fassung gehalten. Die klinischen und pathologischen Untersuchungen wurden durch die Tierärzte, -pfleger und Pathologen der Abteilung Infektionsbiologie betreut. Mittels PCR-Analysen wurden die genetischen MHC-Konstellationen der verwendeten Tiere in der Arbeitsgruppe Immungenetik unter der Leitung von Frau Dr. Saueremann untersucht. Dabei sollten die Versuchstiere mit dem MHC-Klasse-I-Allel Mamu A\*01 möglichst gleichmäßig auf die einzelnen Versuchsgruppen verteilt werden.

Nach Immunisierung wurden die Tiere tonsillär mit dem SIV-Klon SIVmac239 (Kestler et al., 1990) oder intravenös mit SIVmac251 infiziert. Unter Narkose wurden Blut aus der Vena femoralis und axilläre bzw. mesenteriale Lymphknoten während der Sektion gewonnen. Ebenso wurden weitere Organe (Knochenmark, Leber, Lunge, Milz, Lymphknoten, Thymus, Darm und Keimdrüsen) entnommen.

### 2.2.2 Schutzmaßnahmen

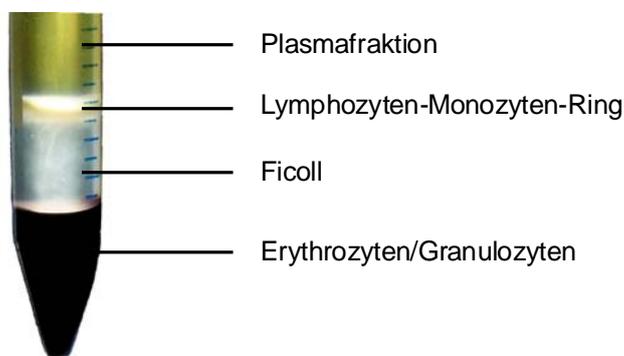
Aufgrund der Infektiösität der Proben wurden diese an einer Werkbank der biologischen Sicherheitsstufe II bearbeitet.

### 2.2.3 Aufarbeitung von Organen und Zellen

#### 2.2.3.1 Isolation peripherer mononukleärer Zellen aus Vollblut (PBMCs)

Die PBMCs des peripheren Blutes wurden durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Gradient (Dichte = 1,070 g/ml) isoliert. Ficoll ist ein hydrophiles Polymer zur Trennung von Zellen nach ihrer Dichte. Dazu wurden 3 ml bzw. 15 ml Ficoll (Lymphozytenseparationsmedium, PAA Laboratories) in 12 ml bzw. 50 ml Leukosep-Röhrchen (Greiner) vorgelegt. Anschließend wurden 6 ml bzw. 20 ml unverdünntes Vollblut auf die Leukosep-Membran aus Polyethylen überführt. Da eine Durchmischung mit dem Separationsmedium durch die Trennscheibe verhindert wird, entfällt zeitaufwendiges Übersichten des Probenmaterials. Nach Zentrifugation (2200 rpm, 20 min; Multifuge 3S-R, Heraeus) erkennt man die Auftrennung der

Zellsuspensionsbestandteile in einzelne Schichten (Abbildung 2.1). In der oberen Schicht befinden sich die Bestandteile des Plasmas. Darunter bilden die Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen einen weißen Ring über dem Ficoll, während sich Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens sammeln. Die Lymphozyten wurden abgenommen und zum Entfernen des Ficolls zweimal mit PBS gewaschen (1200 rpm, 10 min, 4°C) und in RPMI 1640 Medium (PAN Biotech) suspendiert. So gewonnene Lymphozyten konnten zur Isolation einer bestimmten Population mit entsprechenden Antikörpern inkubiert werden oder wurden für eine RNA- bzw. Protein-Isolation direkt lysiert.



**Abb. 2.1 Ficoll-Gradient zur Auftrennung der Blutbestandteile**

### 2.2.3.2 Isolierung von Zellen aus den Lymphknoten

Unter sterilen Bedingungen wurden mit Pinzette, Schere und Skalpell verbliebene Fett- und Bindegewebsreste entfernt. Anschließend wurden die Organe in einem Sieb (Cell Strainer, BD Biosciences) mit Hilfe eines Kolbens einer 5 ml Spritze mechanisch zerrieben und die Zellen in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) im RPMI Medium aufgefangen. Nach Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, 4°C) wurde die Zellsuspension mit PBS gewaschen und entstandene Zellaggregate durch einen Nylonfilter (Prä-Separationsfilter, Porenweite 30 µm, Miltenyi Biotec) entfernt. Da die gewonnenen Gesamtzellen aus den Lymphknoten im Allgemeinen Leukozyten repräsentieren, konnten diese zur Isolation einer bestimmten Population mit entsprechenden Antikörpern inkubiert werden oder wurden für eine RNA- bzw. Protein-Isolation direkt lysiert.

### 2.2.3.3 MACS (Magnetic-associated cell separation)

Zur Isolation CD4-positiver Lymphozyten bzw. CD14-positiver Leukozyten aus PBMCs und Lymphknotenzellen wurden die Zellen in MACS-Puffer (1:20 Verdünnung der MACS BSA Stock Solution mit autoMACS Rinsing Solution) von Miltenyi Biotec suspendiert. Zellpopulationen wurden über magnetische Zellsortierung (Magnetic Cell Separation, MACS) mit non-human primate CD4-MicroBeads (konjugiert an monoklonale Antikörper gegen humanes CD4) oder non-human primate CD14-MicroBeads (konjugiert an monoklonale Antikörper gegen humanes CD14) von Miltenyi Biotec über MS-Säulen isoliert. Die Kapazität einer MS-Säule erlaubt es bis zu  $2 \times 10^8$  Zellen einzusetzen, wobei maximal  $1 \times 10^7$  markierte Zellen in der Säule zurückgehalten werden.

Üblicherweise wurden  $1 \times 10^7$  PBMCs in  $80 \mu\text{l}$  MACS-Puffer aufgenommen und mit  $20 \mu\text{l}$  MicroBeads 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurden die Zellen gewaschen (1200 rpm, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ), in MACS-Puffer suspendiert und auf eine MS-Säule im magnetischem Feld appliziert. Zellen mit gebundenem anti-CD4- bzw. anti-CD14-Antikörper bleiben aufgrund der Magnetpartikel (Micro-Beads) in der Säule hängen, während unmarkierte Zellen die Magnetsäule passieren. Die Säule wurde dreimal mit  $500 \mu\text{l}$  MACS-Puffer gewaschen. Nach Entfernen des Magnetfeldes konnten CD4-positive Lymphozyten bzw. CD14-positiv Leukozyten mit 1 ml MACS-Puffer von der Säule eluiert werden (siehe Abbildung 2.2).

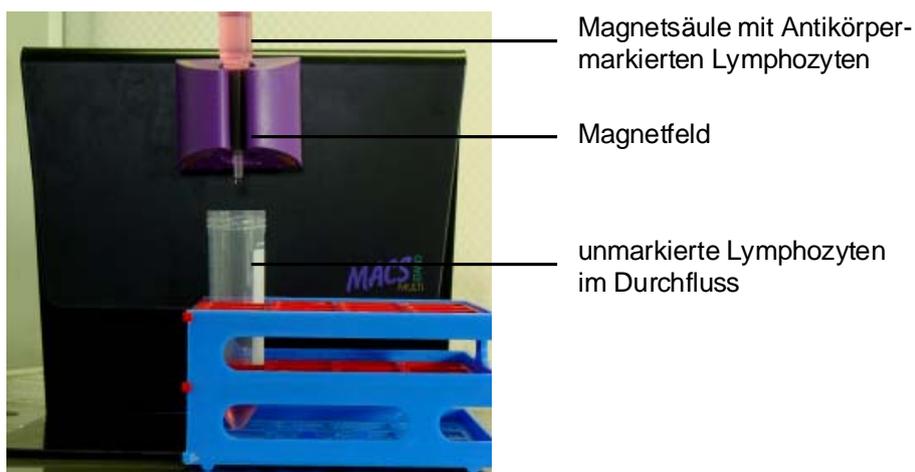


Abb. 2.2 MACS-Separation

#### 2.2.3.4 Zellzahlbestimmung nach Neubauer

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurden diese mit Trypanblau angefärbt. Der Farbstoff akkumuliert in toten Zellen und färbt diese spezifisch an. Anschließend wurde die Zellzahl nach Neubauer ermittelt. Diese basiert auf einem Objektträger mit einem Gitternetz (Neubauer-Zählkammer, Marienfeld), welches sich aus vier Großquadraten zusammensetzt, die wiederum in 16 Kleinquadrate eingeteilt sind. Nach Auflegen des Deckglases entsteht in der Zählkammer ein definiertes Volumen von  $1 \text{ mm}^3$ . Dadurch wird gewährleistet, dass die gezählten Zellen in Zusammenhang zu einem bestimmten Volumen stehen. Die Zellen wurden unter einem Inversmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss) gezählt und mit folgender Formel wurde die Zellzahl berechnet:

$$\text{Zellzahl [ml}^{-1}\text{]} = \text{Durchschnitt der Zellzahl in 16 Kleinquadraten} \\ \times 10^4 \times \text{Verdünnung}$$

#### 2.2.3.5 Kryokonservierung

Zur Langzeitlagerung wurden  $1-2 \times 10^7$  Zellen pelletiert (1200 rpm, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ), in 900  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium suspendiert und 1:2 mit Einfriermedium versetzt (Kapitel 2.1.4). Das enthaltene DMSO hemmt die Bildung von Eiskristallen und schützt dadurch die Zellen. Die Suspension wurde in Einfrierröhrchen (Cryo Tube Vials, Nunc) überführt und über Nacht in einem Einfrierkontainer mit Isopropanol (Freezing Container, Nalgene) auf  $-80^\circ\text{C}$  abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 2.2.3.6 Auftauen kryokonservierter Proben

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt und in 10 ml RPMI-Medium überführt. Nach Entfernen des zytotoxischen DMSO durch Zentrifugation (1200 rpm, 10 min) wurde das Pellet in RPMI Medium suspendiert.

#### 2.2.4 *In vitro* Stimulationsassay mit Monozyten

Nach Aufreinigung der PBMCs im Ficollgradient (Kapitel 2.2.3.1) wurden die Monozyten über Adhärenz isoliert. Dazu wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml RPMI 1640/10% FCS/Penicillin/Streptomycin in einer 6-Well-Kulturplatte 4 h unter sterilen Bedingungen bei  $37^\circ\text{C}$  in einer wasserdampfgesättigten  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre (5%) kultiviert. Während dieser Inkubationszeit heften sich die Monozyten mit Zellfortsätzen an die Oberfläche der Kulturplatte an. Anschließend wurden alle ungebundenen Zellen

(PBLs, peripheral blood lymphocytes) entfernt und adhärenente Zellen mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml Human IFN-Alpha (PBL Biomedical Laboratories) für 4 h im Inkubator stimuliert. Parallel dazu wurden unstimulierte Kontrollproben angesetzt. Danach konnten die Zellen mit 0,25% Trypsin/EDTA (Sigma) von der Oberfläche der Kulturplatte abgelöst werden. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und anschließend im RLT+ Puffer lysiert. Nach Umschreiben der isolierten RNA in cDNA (Kapitel 2.2.7) konnte die Quantifizierung der A3G-Expression in der real-time-PCR erfolgen (Kapitel 2.2.8).

### 2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen zur analytischen Charakterisierung heterogener Zellsysteme durch simultane Erfassung verschiedener Parameter einer Zelle. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch eine Messzelle geleitet und mit Laserlicht bestrahlt. Eine den Laser passierende Zelle streut das Licht in unterschiedliche Richtungen, wobei das nach vorne gestreute Licht den Großteil ausmacht. Dieses wird im Forward-Scatter (FSC) gemessen und liefert Informationen über die Zellgröße. Je größer die Zelle ist, desto größer ist die Streuung in Vorwärtsrichtung. Die Lichtstreuung wird auch von der intrazellulären Granularität und der Membranfaltung einer Zelle beeinflusst. Dieser seitlich gestreute Lichtstrahl wird vom Side-Scatter (SSC) gemessen, und ist umso höher, je größer die Granularität der Zelle ist. Zur Expressionsanalyse zellulärer Moleküle dienen fluoreszenzmarkierte Antikörper (Fluorochrome). Bei Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Durch strahlungslose Übergänge verlieren die Elektronen einen Teil ihrer Energie, bevor sie auf das ursprüngliche Energieniveau zurückfallen. Das dabei emittierte energieärmere Licht besitzt eine größere Wellenlänge als das energiereichere absorbierte Licht. Die Absorption des Lichts ist abhängig vom Laser, der Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert und vom Fluorochrom, dessen Absorptionsspektrum im selben Wellenlängenbereich liegen muss. Photodetektoren (PMT, photomultiplier tube) wandeln einfallende Photonen in elektrische Signale um und verstärken das intensitätsschwache Fluoreszenzlicht sowie seitwärts gestreutes Licht. Das hier verwendete Durchflusszytometer (LSR II, BD) ermöglicht die gleichzeitige Analyse

von zehn Fluorochromen. Zur Fluoreszenzanregung werden drei Laser verwendet: Zur Erzeugung von monochromatischem Licht einer Wellenlänge 405 nm wird ein Coherent Vioflame Diodenlaser, für die Wellenlänge 488 nm ein Argonionenlaser und für 635 nm ein JDS Uniphase Helium-Neon-Laser verwendet. Bei Markierung mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen muss beachtet werden, dass die Emissionsspektren sich voneinander unterscheiden. (Baumgarth und Roederer, 2000). Da eine Überlagerung der Emissionsspektren nicht komplett vermeidbar ist, muss vor jeder Messung eine Kompensationsmessung durchgeführt werden. Dazu werden Zellen oder Kügelchen mit jeweils einem Fluorochrom gefärbt und gemessen. Das entstehende Signal wird mit der FACS Diva (BD) Software in allen Detektoren ermittelt und der Teil der Überlappung elektronisch abgezogen. Die Daten werden als Histogramm, in dem die Anzahl der gemessenen Ergebnisse gegen die Signalintensität aufgetragen ist, oder als Zytogramm (dot plot), in dem jedes Ereignis durch zwei Werte beschrieben ist, dargestellt.

#### 2.2.5.1 Antikörpermarkierung zur Charakterisierung von Lymphozyten

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades isolierter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten bzw. CD14<sup>+</sup> Monozyten (Kapitel 2.2.3.3) wurden  $1-5 \times 10^5$  Zellen mit PBS gewaschen und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern in FACS-Röhrchen 30 min bei 4°C inkubiert. Dabei reagieren die hier verwendeten monoklonalen anti-humanen Antikörper mit den Leukozyten der Rhesusaffen kreuz (Sopper et al., 1997). In der Tabelle 2.1 sind die eingesetzten Antikörper und in Tabelle 2.2 die Fluoreszenzfarbstoffe aufgelistet.

**Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten kreuzreaktiven Antikörper, das detektierte Antigen, die an sie gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe und die Herstellerfirma**

Antigen	Antikörperklon	Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller
<b>CD3</b>	SP34-2	Alexa 700	BD Biosciences
<b>CD4</b>	SK3	Alexa 405	BD Biosciences
<b>CD14</b>	M5E2	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences
<b>CD20</b>	L27	PeCy7	BD Biosciences
<b>CD45</b>	MB4-6D6	FITC	Miltenyi Biotec
<b>CD56</b>	NCAM16.2	FITC	BD Biosciences

**Tab. 2.2 Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, ihre Absorptions- und Emissionsmaxima und die zur Messung im Durchflusszytometer verwendeten Filter und Laser**

<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Laser [nm]</b>	<b>Langpassfilter<sup>1</sup> [nm]</b>	<b>Bandpassfilter<sup>2</sup> [nm]</b>	<b>Absorptionsmaximum</b>	<b>Emissionsmaximum</b>
<b>FITC</b> (Fluorescein-Isothiocyanat)	488	505	530 / 30	495	519
<b>PE</b> (Phycoerythrin)	488	550	575 / 26	408 / 565	578
<b>PerCP-Cy5.5</b> (Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex)	488	635	695 / 20	482	695
<b>PE-Cy7</b>	488	735	780 / 60	480/565	785
<b>APC</b> (Allophycocyanin)	635		660 / 20	650	660
<b>Alexa 700</b>	635	685	725 / 25	696	720
<b>Alexa 405</b>	405		440 / 40	401	421

<sup>1</sup> Langpassfilter ermöglichen die Transmission von Licht längerer Wellenlänge als auf dem Filter angegeben.

<sup>2</sup> Bandpassfilter ermöglichen die Transmission von Licht der angegebenen Bandbreite um den Mittelwert.

### 2.2.5.2 Fixierung

Zur Konservierung gebundener Fluoreszenzfarbstoffe an die Oberflächenantigene und zum Ausschalten potentieller Infektiosität wurden die Zellen fixiert. Dazu wurden die Zellen mit 1,5 ml Formaldehyd (7% in PBS) und 1,5 ml PBS<sub>FACS</sub> 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach Waschen wurde das Zellpellet in 50 µl PBS<sub>FACS</sub> suspendiert und bis zur Messung bei 4°C unter Lichtausschluss aufbewahrt.

### 2.2.5.3 Datenanalyse

Nach Messung der Proben mit *BD FACSDiva Software* (BD Biosciences) wurden die Daten mit *FlowJo Version 6.4.7* (Tree Star Inc.) ausgewertet und die Zellpopulationen im Dot-Plot veranschaulicht. Logarithmisch skalierte Achsen geben die Fluoreszenzintensität (FI) wieder. Dabei kann man einfach positive, doppelt positive

und negative Zellen unterscheiden. Zur weiteren Untersuchung einer bestimmten Population grenzt man diese ein und kann die Expression weiterer Fluorochrome auf dieser Population analysieren.

## 2.2.6 RNA-Extraktion

### 2.2.6.1 Arbeiten mit RNA

Aufgrund ihrer chemischen Struktur ist RNA sehr anfällig für RNasen, die in den meisten biologischen Materialien allgegenwärtig sind. Daher wurde in dieser Arbeit auf folgendes besonders acht gegeben:

- zügiges Arbeiten mit RNA auf Eis,
- Handschuhe zum Vermeiden von Kontaminationen öfters wechseln,
- Verwendung von RNase-freien Reagenzien, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäßen und
- Reinigen des Arbeitsplatzes mit RNase Zap Spray (Ambion).

### 2.2.6.2 RNA-Extraktion aus Lymphozyten

Die Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mit RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen isoliert. Hierfür wurden die Proteine mit einem Guanidin-Isothiocyanat-haltigem Puffer denaturiert, der zugleich RNasen inaktiviert. Bei hoher Salzkonzentration bindet RNA an eine Silicagelmembran und wird durch mehrmaliges Waschen von Kontaminationen befreit. Mit einer Niedrig-Salzlösung wird die RNA wieder von der Membran eluiert.

In dieser Arbeit wurden  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen in 600 µl RLT+-Puffer (Guanidin-Isothiocyanat mit 1% β-Mercaptoethanol, Roth) lysiert. Durch Zentrifugation (Tischzentrifuge 5417 R, Eppendorf) in einer QIAshredder-Säule (Qiagen) wurde das Lysat homogenisiert. Alternativ dazu kann die Probe zum Zellaufschluss fünf- bis zehnmal durch eine RNase-freie Kanüle (Durchmesser 0,9 mm, BD) gezogen werden. Zum Entfernen genomischer DNA (gDNA) wurde das Lysat auf eine gDNA-Eliminator-Säule gegeben, wodurch eine Behandlung mit DNasen entfällt. Bei der Zentrifugation bindet gDNA an die Membran der Säule und lässt die RNA passieren. Das Zell-Lysat wurde 1:1 mit 70% Ethanol (Roth) vermischt und auf die RNeasy-Säule gegeben. Nach Zentrifugation bindet die RNA an die Membran der Säule. Nach Waschen der Säule mit RW1-Puffer (enthält u.a. Guanidin-Isothiocyanat) und RPE-Puffer (enthält u.a. Ethanol) wurde die RNA mit 35 µl RNase-freiem Wasser von der

Säule eluiert. Die RNA wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und in die cDNA-Synthese (Kapitel 2.2.7) eingesetzt.

### 2.2.6.3 Konzentrationsbestimmung

Zum Einsetzen vergleichbarer RNA-Mengen muss die RNA-Konzentration jeder Probe bestimmt werden. Da die aromatischen Ringe der Nukleinsäuren UV-Licht bei der Wellenlänge von 260 nm absorbieren, kann die Konzentration einer RNA-Lösung durch photometrische Messung mit dem Nanodrop (PeqLab) bestimmt werden. Eine optische Dichte von 1,0 entspricht einem RNA-Gehalt von  $40\ \mu\text{g/ml}$ . Als Referenzwert diente Wasser. Die Konzentration wurde über die Lambert-Beer'sche Gleichung berechnet:

$$\text{Konzentration } c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = \frac{\text{Extinktion } A \text{ (260 nm)} \times \text{Absorptionskoeffizient (40 } \mu\text{g/ml)}}{\text{Küvettenseitenlänge [0,01 cm]}}$$

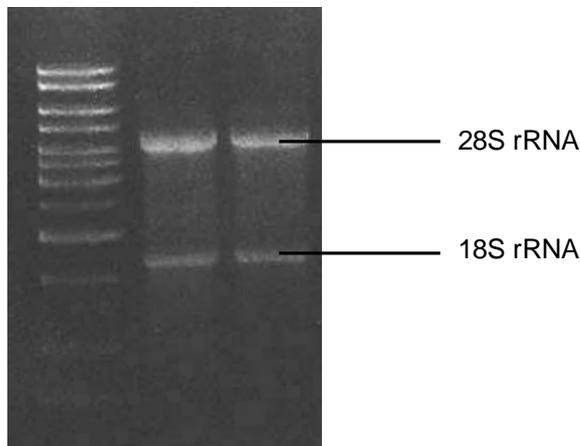
Das Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäurereste der Proteine liegt bei 280 nm. Aus dem Verhältnis der optischen Dichten  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  kann auf die Reinheit einer Nukleinsäurelösung geschlossen werden. Eine reine RNA-Lösung besitzt einen  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Wert von 1,8 bis 2,0. Sind die Lösungen durch Proteine verunreinigt wird dieses Verhältnis kleiner. Die hier verwendeten RNA-Proben lagen innerhalb dieses Intervalls.

### 2.2.6.4 Gelelektrophorese

Die visuelle Darstellung der RNA sowie die Überprüfung auf DNA-Kontaminationen und RNA-Abbauprodukte erfolgten in einer Gelelektrophorese. Dabei wandern negativ geladene Nukleinsäuren im elektrischen Feld zum Pluspol.

Gelkammern und Taschenformer wurden zur Entfernung von RNasen mit einer 3%igen  $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung behandelt. Ein 1%iges (w/v) Agarosegel in 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) wurde mit  $0,1\ \mu\text{g/ml}$  Ethidiumbromid versetzt (Kapitel 2.1.4). Nach Auspolymerisierung des Gels wurden  $2\ \mu\text{l}$  der RNA-Probe mit  $3\ \mu\text{l}$  Ladepuffer und  $18\ \mu\text{l}$  Probenpuffer vermischt, bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 10 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Der RNA-Ladepuffer enthielt Formaldehyd und Formamid, wodurch die Sekundärstrukturen der RNA aufgebrochen wurden. Als Größenstandard diente ein 1 kb DNA-Marker von Fermentas. Die Proben wurden bei 70 V eine Stunde im 1 x TAE-Puffer aufgetrennt. Die entstandenen Banden wurden anschließend unter UV-Licht ausgewertet. In Abbildung 2.3 ist eine unkontaminierte

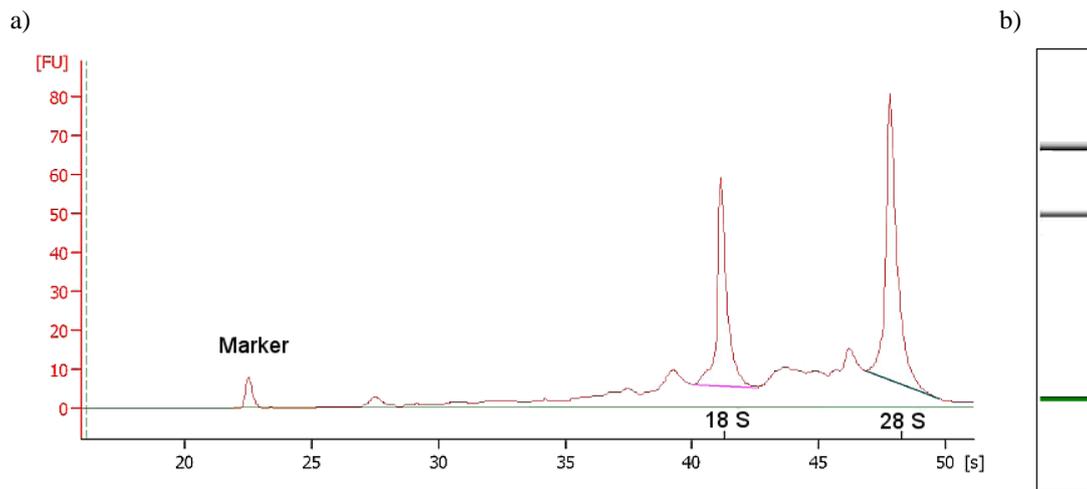
RNA-Probe mit deutlicher Auftrennung der Gesamt-RNA in 18 und 28 S (Svedberg-Einheit) ribosomale Untereinheiten (rRNA) zu sehen. Die analysierten RNA-Proben zeigten keine Abbauprodukte.



**Abb. 2.3 Auftrennung von Gesamt-RNA in 28 und 18 S rRNA**  
Linke Reihe: 1 kb DNA-Ladder (Fermentas)

#### 2.2.6.5 Qualitätskontrolle im Bioanalyzer

Die Qualität/Integrität einzelner RNA-Proben wurde mit RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies) am Agilent 2100 Bioanalyzer untersucht. Dabei können sowohl die Konzentration als auch die Größe von 12 RNA-Proben gleichzeitig gemessen werden. Die Proben wandern über Mikrokapillaren in eine zentrale Auftrennungskapillare, wo sie anhand ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Mit Hilfe des zuvor hinzugegebenen Fluoreszenzfarbstoffes werden die Fragmente von einem Detektor erfasst und deren Laufzeiten registriert. Mit Hilfe der *2100 Expert Software* (Agilent technologies, Inc.) werden von diesen Daten ein Elektropherogramm (Peak) und ein gelartiges Bild (Banden) erzeugt. Aus dem Verhältniss von 28 zu 18 S rRNA wird die Qualität der Gesamt-RNA über die RNA Integrity Number (RIN-Wert) angegeben. Der RIN-Wert wird durch die Software von 1 bis 10 ermittelt. Dabei stellt ein Wert von 10 die geringste Degradation der RNA dar. Abbildung 2.4 zeigt an einem Beispiel ein solches Elektropherogramm und die zugehörige Gelansicht einer RNA-Probe, die aus PBMCs isoliert wurde.



**Abb. 2.4 a) Elektropherogramm und b) gelartige Ansicht**

a) Abzisse: Molekülgröße, gemessen anhand der Laufzeit in der Mikrokapillare; Ordinate: Fluoreszenz  
 b) Zwei Banden für 28 und 18 S rRNA, RIN-Wert für diese PBMC-Probe: 8,0  
 S: Svedberg-Einheit

### 2.2.7 Die cDNA-Synthese

In einer PCR-Reaktion kann nur DNA amplifiziert werden. Um RNA quantitativ in einer PCR-Reaktion zu analysieren, wurde diese zuvor mit einer thermostabilen reversen Transkriptase (RT) in DNA umgeschrieben. Hierzu bedarf es eines PCR-Zyklus (Denaturierung der RNA, Anlagerung der Primer, Umschreiben in DNA). Damit ist die Menge an synthetisierter cDNA näherungsweise äquivalent zur eingesetzten RNA. Für die Synthese der cDNA wurde der SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit von Invitrogen verwendet. Die SuperScript III ist ein Derivat des Moloney Murine Leukämie Virus (M-MLV). Diese reverse Transkriptase zeichnet sich durch eine reduzierte RNaseH-Aktivität und größere Hitzestabilität aus. Für unsere Versuche wurden die Random-Hexamer-Primer verwendet und pro Reaktionsansatz wurden 100 ng RNA eingesetzt.

#### **Der RT-Reaktionsansatz:**

100 ng RNA

50 ng Random-Hexamer-Primer

10 mM dNTPs

Gegebenenfalls mit RNase-freiem Wasser auf 10  $\mu$ l auffüllen.

Zur Denaturierung von Sekundärstrukturen der RNA wurde der Reaktionsansatz 5 min bei 65°C inkubiert und 1 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der Mastermix

hinzugegeben. Zu jeder RNA-Probe wurde eine non-RT-Kontrolle mitgeführt, bei der alle Schritte gleich durchgeführt wurden. Aber statt der SuperScript III wurde Wasser hinzugegeben. Nach der PCR-Reaktion konnte die cDNA direkt in die real-time-PCR eingesetzt werden oder wurde bei -20°C gelagert.

**Mastermix:**

10 x RT-Puffer  
 25 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,1 M DTT  
 40 U RNase Out  
 200 U SuperScript III

**Temperaturprofil im Thermocycler (BioRad):**

10 min 25°C Hybridisierung  
 50 min 50°C Elongation  
 5 min 85°C Abstoppen

## 2.2.8 Quantitative real-time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

### 2.2.8.1 Primerdesign

Die Zielsequenzen, die für die Synthese der Oligonukleotide zur Amplifikation und Quantifikation bestimmter Gene in der real-time-PCR Verwendung fanden, wurden der Ensembl-Datenbank entnommen (<http://www.ensembl.org>). Im BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1997) wurde die Suche nach Homologien mit Hilfe der Funktion von „blastn“ (vergleicht eine Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Datenbank) ausgeführt. Die Schmelztemperatur  $T_m$  und der GC-Gehalt der Primer wurden mit *Primer Express Software v 3.0 (Application-based primer design software, Applied Biosystems)* ermittelt. Dabei lag die  $T_m$  einheitlich bei 59°C und der GC-Gehalt betrug 36-58%. Sekundärstrukturen oder Dimere konnten durch entsprechende Sequenzwahl eingeschränkt werden. Die Primersequenzen umspannten in den meisten Fällen die Exon-Intron-Grenzen. Die Längen der Amplikone lagen um die 80 Basenpaare. In Tabelle 2.3 sind die verwendeten Primersequenzen beschrieben. Alle Sequenzen wurden mit der „blastn“ Funktion auf Sequenzspezifität überprüft. Die Sequenzen für die GAPDH-Primer wurden der Publikation von Rodriguez-Jimenez et al., 2003 und die Sequenzen der MxA-Primer wurden der Veröffentlichung von Abel et al., 2001 entnommen. Die APOBEC3G-, APOBEC3F- und IP-10-Primer wurden wie oben beschrieben im Rahmen dieser Arbeit für *Macaca mulatta* konstruiert. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma

Aldrich bezogen und in nukleasefreiem Wasser gelöst, wobei eine Standardkonzentration von 100 pmol/µl eingestellt wurde.

**Tab.2.3 Liste der verwendeten Oligonukleotide**

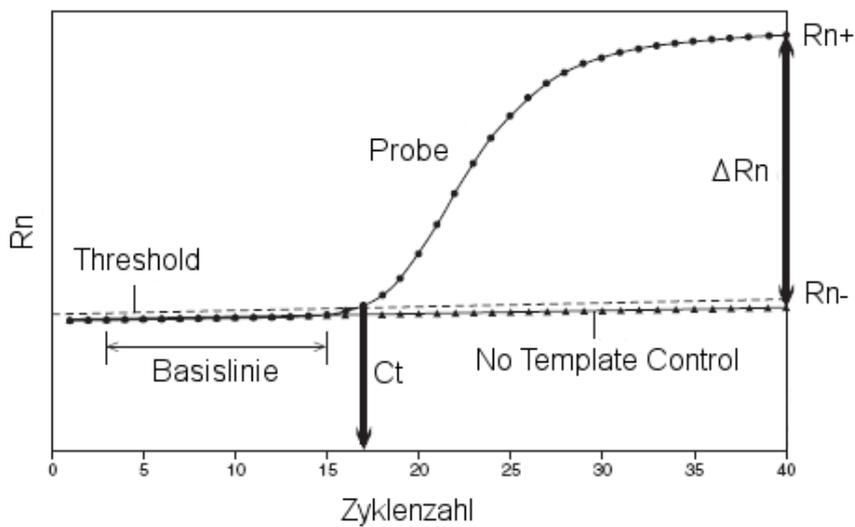
T<sub>m</sub>: Schmelztemperatur, bp: Basenpaare; A = Adenin; C = Cytosin, G = Guanin; T = Thymin

Primerpaar	Accession Nummer	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub> °C	GC %	Amplikon bp
APOBEC3G/F APOBEC3G/R	AY331716	TCT ACG CAA CCA GGC TCC A GGA ATC AGG TCC AGG AAG CA	59 59	58 55	78
APOBEC3F/F APOBEC3F/R	DQ514917	CAG TAA TGT GAA GCT CGC CAT C TGC TGG TAA TGT GTA TCC CAG AA	58,5 58,1	50 43	65
MxA/F MxA/R	EF101561	AGG AGT TGC CCT TCC CAG A TCG TTC ACA AGT TTC TTC AGT TTC A	58,3 59	58 36	76
IP10,CXCL10/F IP10,CXCL10/R	AY044446	GAT TTG CTG CCT TGT CTT TCT GA CAG GTA CAG CGT ACA GTT CTT GAG A	59,5 58,7	43 48	74
GAPDH/F GAPDH/R	CO774281	CCT GCA CCA CCA ACT GCT TA CAT GAG TCC TTC CAC GAT ACC A	58,4 58,5	55 50	74

### 2.2.8.2 Real-time-PCR

Die real-time-PCR stellt eine spezifische und sensitive Methode zur quantitativen Bestimmung der Genexpression eines Templates (DNA- bzw. cDNA-Probe) dar (Freeman et al., 1999; Wilhelm und Pingoud, 2003). Im Gegensatz zur konventionellen PCR, bei der die DNA-Produkte nach Beendigung aller Amplifikationszyklen durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden, ermöglicht die quantitative real-time-PCR (qRT-PCR) Aussagen über die Ausgangsmenge (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al. 1993). Die so entstehenden Kopien eines DNA-Abschnittes können in Echtzeit verfolgt werden. Anhand der Dauer, mit der die Zunahme der Kopien erfolgt, kann man auf die Ausgangskonzentration des Templates schließen. Technische Voraussetzung für die real-time-PCR ist die Zusammenführung eines PCR-Cyclers mit einer Fluoreszenz-Detektionseinheit in einem Gerät. Hier wurde das Abi Prism 7500 (Applied Biosystems) verwendet, das die zeitgleiche Fluoreszenzmessung von 96 PCR-Ansätzen ermöglicht. Als Lichtquelle dient ein Laser. Die Lichtemission wird mit einer CCD-Kamera aufgenommen und die Verarbeitung der gewonnenen Daten übernimmt die integrierte 7500 SDS-Software (Applied Biosystems).

In dieser Arbeit wurde die Genexpression mittels SYBR-Green-I (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen) in der real-time-PCR ermittelt. Beim SYBR-Green-I handelt es sich um einen Cyaninfarbstoff, der unspezifisch an dsDNA bindet (Morrison et al., 1998). Nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 494 nm kommt es zur Fluoreszenz bei 521 nm (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al. 1993). Aufgrund der unspezifischen Bindung von SYBR-Green-I an dsDNA, ist aber eine Unterscheidung zwischen Primerdimeren, Artefakten und spezifischem PCR-Produkt nicht möglich. Da jedoch jedes PCR-Produkt aufgrund seiner Länge und GC-Gehaltes bei einer bestimmten Temperatur schmilzt (denaturiert), kann anhand der Schmelzkurve zwischen verschiedenen PCR-Produkten differenziert werden (Wittwer et al. 2001). Dazu wird am Ende des PCR-Laufs die Temperatur schrittweise auf 95°C erhöht, so dass die DNA-Stränge wieder denaturieren und als Einzelstränge vorliegen. Daraus resultiert ein Abfall des Fluoreszenzsignals beim Schmelzpunkt. Durch Messung dieses Schmelzpunktes kann auf das amplifizierte Produkt geschlossen werden, da Artefakte in der Regel bei einer niedrigeren Temperatur denaturieren (Bustin, 2000). Die SDS-Software bestimmt für jede Probe den  $\Delta R_n$ -Wert (normalized reporter). Dieser ist die Differenz des  $R_n^+$ -Wertes einer Template-haltigen Probe und des  $R_n^-$ -Wertes einer Probe ohne DNA. Beide  $R_n$ -Werte errechnen sich aus der Emissionsintensität von SYBR-Green-I bezogen auf die Emissionsintensität der im SYBR-Green-I-Puffer enthaltenen passiven Referenz (ROX-Farbstoff). Zu Beginn der Reaktion findet beinahe keine Erhöhung des Fluoreszenzsignals statt und in diesem Bereich liegt die Basislinie. Ein Anstieg der Fluoreszenz über die Basislinie markiert den Eintritt der Reaktion in den exponentiellen Bereich und hier wird der Ct-Wert (threshold cycle) abgelesen (siehe Abbildung 2.5). Bei diesem handelt es sich um die Zyklenzahl, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporterfluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz auftritt. Je höher also der  $\Delta R_n$ -Wert, desto früher schneidet der Threshold die Funktion und desto niedriger ist der Ct-Wert oder anders ausgedrückt: Je mehr cDNA (Template) zu Beginn einer Reaktion vorhanden ist, desto geringer ist die erforderliche Zyklenzahl, die das Fluoreszenzsignal über dem Hintergrundrauschen erscheinen lässt (Gibson et al., 1996). Über den Ct-Wert wird somit die Anzahl der Kopien des Gens innerhalb der Probe definiert. Die Intensität des emittierten Lichtes ist dabei proportional zur Menge des gebildeten doppelsträngigen PCR-Produkts und wird am Ende eines jeden Elongationsschrittes gemessen.



**Abb. 2.5 Amplifikationsplot (nach ABI 7300/7500/7500 Fast Real-Time-PCR-System Absolute Quantification Getting Started Guide)**

Bei der relativen Quantifizierung wurde die Genexpression gegen eine endogene Kontrolle (Referenzgen) ermittelt. In dieser Arbeit diente dazu das Haushaltsgen Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Haushaltsgene werden ubiquitär exprimiert und ihre Transkription wird nicht von experimentellen Bedingungen beeinflusst (Weisser et al., 2004). Bei GAPDH handelt es sich um ein Enzym, welches die Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen, deren Kurvenverläufe im Idealfall gleich sind. Bei einer Differenz der Ct-Werte der Duplikate einer cDNA-Probe von  $> 0,5$  wurde die Messung wiederholt. Die relative Expressionsstärke wurde als Differenz zwischen den aus den Duplikaten ermittelten Mittelwerten der Ct-Werte des jeweiligen Zielgens und des Referenzgen GAPDH berechnet ( $\Delta Ct = \text{Mittelwert Ct}_{(\text{Zielgen})} - \text{Mittelwert Ct}_{(\text{GAPDH})}$ ). Dabei wurde die Expressionsrate des untersuchten Zielgens als prozentualer Anteil der GAPDH-Expression angegeben [ $rE = 1/(2^{\Delta Ct}) * 100$ ]. Dieses erfordert eine gleiche PCR-Effizienz, die durch entsprechende Verdünnungsreihen zuvor bestätigt wurde. Zur Berücksichtigung eventuell variierender Effizienzen wurden Regressionsgeraden für alle Gene sowie für GAPDH erstellt. Dazu wurde der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufen gegen den jeweiligen Ct-Wert aufgetragen. Anhand der Steigung der resultierenden Regressionsgeraden ( $m$ ) kann die Effizienz ( $E$ ) berechnet werden [ $(E) = 10^{-1/m}$ ]. Die Steigung der Regressionsgeraden repräsentiert die Amplifikationseffizienz

(Pfaffl, 2001) und ist abhängig von der Amplikonlänge, Sekundärstrukturen und von der Primerqualität. Für die untersuchten Genexpressionen wurde eine two-step-PCR durchgeführt, bei der die cDNA-Synthese (Kapitel 2.2.7) unabhängig von der qRT-PCR erfolgte. Als Maßeinheit für die relative Quantifizierung wurde die zugrundeliegende RNA-Äquivalentmenge benutzt. Die Zielgene wurden mit den in Tabelle 2.3 angegebenen Primersequenzen im Abi Prism 7500 (Applied Biosystems) analysiert. Der verwendete QuantiTect SYBR-Green-PCR-Kit von Qiagen enthält bis auf die Primer und die cDNA alle Komponenten für die real-time-PCR. Die Ansätze wurden in Reaktionsgefäßen (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate oder MicroAmp Optical Tubes der Firma Applied Biosystems) nach folgendem Schema pipettiert:

<b>Komponente</b>	<b>Volumen (µl/Reaktion)</b>
RNase-freies Wasser	8
2x Quanti Tect SYBR-Green PCR Master Mix	12,5
Forward Primer	1 µM (Endkonzentration)
Reverse Primer	1 µM (Endkonzentration)

Zu jedem Ansatz wurden jeweils 2 µl cDNA-Probe gegeben. Das Endvolumen eines jeden Ansatzes betrug 25 µl. Als Kontrolle wurde eine Negativkontrolle (non-template control, NTC) mit Wasser anstatt cDNA pipettiert. Ebenso wurde eine non-RT-Kontrolle eingesetzt, bei der während der reversen Transkription kein Enzym hinzugegeben wurde, um mögliche DNA-Verunreinigungen anzuzeigen. Die Kontrollen waren immer negativ. Die real-time-PCR erfolgte nach folgendem Temperaturprofil:

15 min 95°C	Aktivierung der Taq Polymerase	
15 s 94°C	Denaturierung	} 40 Zyklen
1 min 55°C	Annealing und Elongation	

### 2.2.8.3 Bestimmung der Virus-RNA

Zum Nachweis einer erfolgten Infektion der Versuchstiere ist die quantitative Bestimmung SIV-spezifischer RNA im Blutplasma durch reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) möglich. Diese Untersuchungen wurden von Frau Dr. Sauer mann in der Arbeitsgruppe Immungenetik der Abteilung Infektionsbiologie durchgeführt.

#### 2.2.8.4 Auswertung

Die Genexpression wurde mit *Microsoft Excel* und *GraphPad Prism v3.0* berechnet. Zur graphischen Darstellung wurden die Werte als Median angegeben. Für vergleichende Auswertungen zwischen zwei Gruppen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-(U)-Test (zweiseitig) und zwischen mehreren Gruppen der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Test verwendet. Verschiedene Zeitpunkte innerhalb einer Tiergruppe wurden mit nicht-parametrischen gepaartem Wilcoxon-Test (zweiseitig) ausgewertet. Für die Korrelationsanalysen wurde die Spearman-Korrelation (zweiseitig) verwendet. Das Konfidenzintervall betrug bei allen Auswertungen 95%. Das Kriterium für statistische Signifikanz wurde durch p-Wert < 0,05 gegeben.

### 2.2.9 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.9.1 Lysierung der Zellen

Die Lysierung der Lymphozyten erfolgte in einem Zell-Lysepuffer, der mit einer Proteaseinhibitorcocktail-Mischung (Sigma) versehen wurde (Kapitel 2.1.4). Dabei wurden  $2 \times 10^5$  Zellen mit 100  $\mu$ l Zell-Lysepuffer 60 min bei 4°C auf dem Rotor inkubiert. Danach wurde die Suspension 30 min zentrifugiert (13000 rpm, 4°C) und anschließend die Proteinkonzentration der Zytosolfraction über die Methode der Bicinchoninsäure bestimmt (2.2.9.2).

#### 2.2.9.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid, BCA)

Der Bicinchoninsäure-Kit von Pierce enthält eine BCA-Lösung und eine 4%ige [w/v] Kupfersulfatlösung. Die Proteinkonzentration wird über die Entstehung eines Protein-Kupfer-Komplexes und der folgenden Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  bestimmt. Dies hat zur Folge, dass sich ein chromogener  $\text{Cu}^+$ -BCA-Komplex bildet. Dabei korreliert die Konzentration dieses Komplexes mit der Proteinkonzentration (Smith et al., 1985).

Die Kupfersulfat- und die BCA-Lösung wurden im Verhältnis 1:50 eingesetzt. Eine Standardreihe mit BSA wurde durch serielle Verdünnung in Wasser hergestellt. Die Proben wurden entweder 1:5 und 1:2 in Zell-Lysepuffer verdünnt oder unverdünnt eingesetzt. Je 5  $\mu$ l der Standardreihe oder der Probe wurden mit 350  $\mu$ l des BCA-Kupfersulfatgemischs für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm (ELISA-Reader MR5000, Dynatech) in Triplikaten von je 100  $\mu$ l in einer

MaxiSorp™ Mikrotiterplatte (Nunc) ermittelt. Durch die Regressionsgerade aus der Standardreihe konnte die Konzentration mit der *Magellan V 6.4 Software* bestimmt werden.

### 2.2.9.3 Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### (LDS-PAGE)

Die LDS-PAGE ist eine abgewandelte Form der SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Die Proben werden dazu in einem Lithiumdodecylsulfat-haltigen-Puffer (LDS-Puffer) aufgenommen (NuPage, Invitrogen). LDS denaturiert die Proteine über Bindung an Aminosäurereste. Die Nettoladung der entstandenen LSD-Proteinkomplexe wird von den anionischen LDS-Molekülen bestimmt und somit wird eine Trennung der Proteine im elektrischen Feld nach Größe, unabhängig von der Eigenladung der Proteine erreicht. Die Laufstrecke ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes.

20 µg der Proteinproben wurden 4:1 mit LDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 2.1.7) versehen, 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Zur Trennung der Proteine wurde hier das Mini-Protean-3-System (BioRad) verwendet. Dieses System ermöglicht die Trennung der Proteine auf einer 1 mm dicken und 7 cm langen Gellaufstrecke. Die Gele bestanden aus einem Trenngel mit einer Acrylamidkonzentration von 12% und einem darüber liegendem Sammelgel von 4%. Zur Polymerisation der Gele wurde N,N,N,N-Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) verwendet. Die Proteingemische wurden zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (SeeBlue Plus 2, Invitrogen) im 1 x Laufpuffer getrennt. Dabei betrug die Spannung für das Sammelgel 200 V und für das Trenngel 100 V. So aufgetrennte Proteine wurden auf eine Membran transferiert und über Chemolumineszenz nachgewiesen (Kapitel 2.2.9.4).

### 2.2.9.4 Western-Blot-Analyse mit enhanced chemoluminescence Nachweis (ECL-System)

Zum Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran (NZM) transferiert und mit spezifischen Antikörpern dargestellt (Western-Blot; Towbin et al., 1979).

Für den Transfer wurden hier die Blot-Module von BioRad verwendet. Eine NZM mit 0,45 µm Porengröße (Schleicher und Schüll) wurde für 15 min in 1 x Transferpuffer

(Kapitel 2.1.7) äquilibriert. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die NZM gelegt und zwischen Schaumstoffpads und Filterpapieren (Whatman) als „Sandwich“ in die Blotkammer eingeklemmt. Im 1 x Transferpuffer wurden die Proteine von der Anode zur Kathode bei 150 V eine Stunde transferiert. Zum Absättigen unspezifischer Bindestellen wurde die NZM nach dem Transfer in 5%igem (v/v) Milchpulver in PBST (MPBST) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 0,1%igem PBST-Puffer gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation der NZM mit dem 1:1000 verdünnten murinen anti-humanen monoklonalen APOBEC3G-Antikörper (Primärantikörper, siehe Tabelle 2.4) in MPBST für 2 h bei RT. Nach dem Waschen wurde die NZM mit dem 1:1000 verdünnten Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugiertem Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (Sekundärantikörper, siehe Tabelle 2.4) in MPBST für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünfmal in 0,1%igem PBST-Puffer gewaschen und der Nachweis der Proteine konnte über Chemolumineszenz erfolgen. Durch Reaktion der Peroxidase des Sekundärantikörpers mit einem Luminol-Wasserstoffperoxid-Substrat (SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrat Kit, Pierce) wird Licht einer Wellenlänge von 428 nm emittiert, das auf einem Fotofilm (Amersham) sichtbar gemacht wird. Dazu wurde in der Dunkelkammer die Membran in eine Folientasche gelegt und mit 1 ml einer 1:1 Mischung beider Substratlösungen (Pierce) für 5 min inkubiert. Die überschüssige Substratlösung wurde entfernt, ein Fotofilm, je nach Signalstärke, für 5-30 min belichtet und automatisch entwickelt (Elite Chrom 400, Kodak). Die relativen Proteingewichte wurden mit Hilfe des Markers (SeeBlue Plus2, Invitrogen) abgeglichen. Die Western-Blots wurden gescannt (HP ScanJet 4890) und mit dem Programm *Scion Image* ausgewertet.

**Tab. 2.4 Für den Western-Blot verwendete Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
<b>APOBEC3G (CEM15)</b> Monoclonal Antibody	Mensch	Maus-IgG1	ImmunoDiagnostics
<b>Anti-Maus-IgG-POD</b>	Maus-IgG	Ziege-IgG	Jackson Immuno Research

#### 2.2.9.5 Coomassieblaufärbung

Zum Überprüfen des vollständigen Proteintransfers wurden die Gele mit kolloidalem Brilliantblau G von Sigma angefärbt. Dabei bindet der Farbstoff an die Proteine, aber nicht an die Gelmatrix. Die Gele wurden nach dem Western-Blot für 1 h fixiert und für 2-12 h in der Färbelösung inkubiert. Nach Waschen mit der Waschlösung (Kapitel 2.1.7) zeigten sich verbliebene Proteine als blaugefärbte Banden auf dem Gel.

#### 2.2.9.6 Ponceau-S-Färbung

Hierbei handelt es sich um eine reversible Proteinfärbemethode auf der NZM zum Anzeigen des Proteintransfers vom Gel auf die NZM. Dazu wird die NZM in der Ponceau-S-Lösung (Kapitel 2.1.7) 3 min bei RT inkubiert und mehrmals mit  $H_2O_{\text{bidest}}$  gewaschen, bis nur noch die Proteinbanden rot gefärbt sind. Die gefärbten Banden zeigen den Proteintransfer an und können mit den Ergebnissen des Western-Blots verglichen werden.

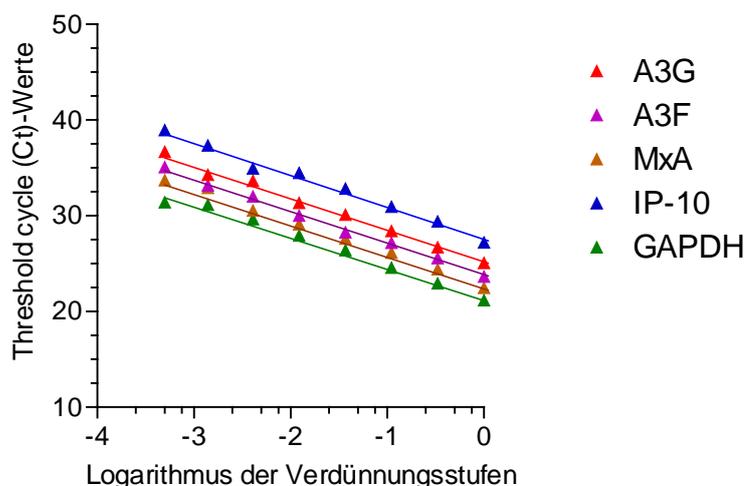
### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die APOBEC3G (A3G)- und APOBEC3F (A3F)-Expression in PBMCs, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD14<sup>+</sup> Monozyten und Lymphknoten uninfizierter sowie SIV-infizierter Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) mit real-time-PCR untersucht werden. Die Proben kamen von Tieren, die sich in unterschiedlichen Experimenten befanden. Die Zielgene wurden mit SYBR-Green-I-basierter real-time-PCR quantifiziert. Dabei wurde die relative Expression über Normalisierung gegen das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ermittelt. Im Western-Blot sollte auch die APOBEC3-Proteinexpression nachgewiesen werden. Da bei der Pathogenese retroviraler Infektionen Interferone eine große Bedeutung haben (Herbeuval and Shearer, 2007), wurde die Transkription von zwei Interferon-induzierten Genen ermittelt: Myxovirus Resistance 1 (MxA) und Interferon-induziertes Protein 10 kDa (IP-10/CXCL10). Korrelationsanalysen zwischen Transkription und Virusbeladung sollten einen möglichen Zusammenhang mit dem Erkrankungsverlauf aufzeigen.

#### 3.1 Die Ermittlung der PCR-Effizienz

Da die Daten als relative Expression des Zielgens zum Haushaltsgen GAPDH angegeben wurden [ $rE = 1/(2^{\Delta C_t})$ ], setzt die präzise Quantifizierung eine gleiche PCR-Effizienz beider Gene voraus. Dabei stellt die Effizienz den Anteil an Ziel-cDNA dar, der während der Annealing-Elongationsphase bei jedem Amplifikationszyklus vermehrt wird. Mathematisch lässt sich dies als exponentielle Funktion ausdrücken: Nach  $n$  Zyklen ist ein  $2^n$ -faches der Ausgangsmenge entstanden. Bei einer Effizienz von 2 findet pro Zyklus eine Verdoppelung statt. In der Realität kann jedoch von diesen theoretisch angenommenen Idealbedingungen nicht ausgegangen werden, vielmehr treten gewisse Abweichungen auf. Zu Beginn der Reaktion ist im Ansatz noch sehr wenig Matrize vorhanden, die Wahrscheinlichkeit, dass sich Primer und Matrizen-DNA treffen gering und daher der Ablauf der Reaktion verlangsamt. Erst danach kommt es zur exponentiellen Phase, gefolgt von einer Plateauphase, in der die Substrate weitgehend aufgebraucht sind und kaum noch Produkt synthetisiert wird. Daher liegt die reale Effizienz in der Regel unter zwei. Die tatsächliche Effizienz einer Reaktion wurde durch entsprechende Verdünnungsreihen ermittelt. Dabei werden mit

ansteigender Verdünnung mehr PCR-Zyklen benötigt, bis das PCR-Produkt mittels Fluoreszenz nachweisbar ist. Folglich steigt der Ct-Wert (threshold cycle). Nach Auftragen des Logarithmus der Verdünnungsstufen gegen den Ct-Wert ergibt sich eine Regressionsgerade, die Standardkurve. Aus ihrer Steigung ( $m$ ) wurde die Effizienz mit der Formel  $E = 10^{-1/m}$  berechnet. Hierzu ist es nicht notwendig, die Startkopienanzahl zu kennen, es genügt, die relativen Verdünnungsschritte anzugeben. Ausgehend von Verdünnungsreihen der Proben-cDNA um den Faktor drei wurden jeweils in Dreifachbestimmungen die Standardkurven für alle untersuchten Gene, sowie für das Haushaltsgen GAPDH in einem Vorversuch erstellt (siehe Abbildung 3.1). Die dazu verwendeten Primer für A3G, A3F und IP-10 wurden anhand vorhandener Gensequenzen aus der Ensembl-Datenbank selbst entworfen (siehe 2.2.8.1). Die Sequenzen für die MxA-Primer wurden aus der Publikation von Abel et al., 2001 und die Sequenzen für die GAPDH-Primer wurden aus der Veröffentlichung von Rodriguez-Jimenez et al., 2003 entnommen.



### Abb. 3.1 Ermittlung der Primereffizienz

Die Mittelwerte der Ct-Werte aus den Dreifachbestimmungen für A3G, A3F, MxA, IP-10 und GAPDH wurden gegen den Logarithmus der Verdünnungsstufen vom Faktor drei aufgetragen. Ermittlung der Regressionsgeraden und Berechnung der Primereffizienzen über den Anstieg. Der Korrelationskoeffizient für alle Primerkombinationen betrug  $> 0,98$ .

Für die in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare ergaben sich nach Berechnung mit obiger Formel folgende Effizienzen: A3G = 1,97; A3F = 1,99; MxA = 1,97; IP-10 = 1,98 und GAPDH = 1,99. Damit sind die Effizienzen der Primerpaare für die zu untersuchenden Zielsequenzen vergleichbar und konnten für nachfolgende Experimente eingesetzt werden. Auch die Ct-Werte des Haushaltsgens variierten nur geringfügig.

Diese homogene Genexpression, unabhängig von experimentellen Bedingungen, stellte eine wichtige Voraussetzung zur Auswahl eines Haushaltsgens dar. Für alle untersuchten Proben betrug die Variation im GAPDH-Zyklus maximal anderthalb Ct-Werte und konnten somit vernachlässigt werden. Damit wurde für die Genexpressionsstudien dieser Arbeit eine hinreichende Konstanz für die GAPDH-Expression gewährleistet. Weiterhin traten keine Unterschiede in den GAPDH-Zyklen zwischen den Zelltypen auf. Es gab keine Abhängigkeit zwischen der Höhe der GAPDH-Expression und der des zu untersuchenden Gens. Ferner konnte auch keine Korrelation zwischen den GAPDH-Zyklen und der berechneten Kopienzahl der Zielgenexpression festgestellt werden.

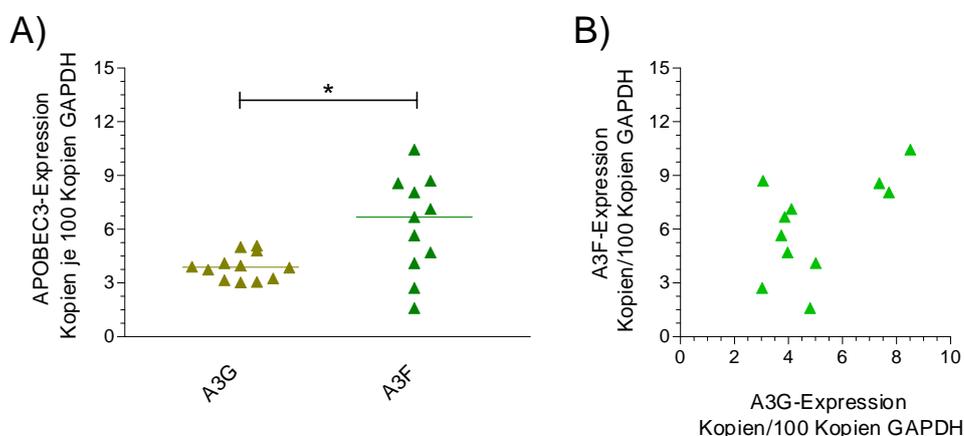
## 3.2 Charakterisierung der APOBEC3-Expression

### 3.2.1 Die APOBEC3-Expression in uninfizierten Rhesusaffen

Als Basis für die folgenden detaillierten Untersuchungen an infizierten Makaken sollte zunächst die A3G- und A3F-Expression in uninfizierten Rhesusaffen ermittelt werden. Aus den PBMCs des peripheren Blutes wurde die Gesamt-RNA isoliert (Kapitel 2.2.6) und nach reverser Transkription in cDNA (Kapitel 2.2.7) wurde die A3G- und A3F-Expression mit real-time-PCR im ABI Prism 7500 gemessen (Kapitel 2.2.8). Die APOBEC3-Expression wurde bezogen auf 100 GAPDH-Kopien angegeben (siehe Abbildung 3.2). Die APOBEC3-Expression wurde ebenfalls für CD4+ T-Lymphozyten und CD14+ Monozyten bestimmt. Der Reinheitsgrad dieser Zelltypen wurde zuvor mit Durchflusszytometrie geprüft (Kapitel 2.2.5). Auch in den peripheren und mesenterialen Lymphknoten sollte die Expression der APOBEC3-Gene untersucht werden. Für alle Zelltypen wurde stichprobenartig die Qualität und Integrität verwendeter RNA im Agilent 2100 Bioanalyzer ermittelt. Die durchschnittlichen RIN-Werte der in die cDNA-Synthese eingesetzten RNA-Proben von 8,0 bestätigten deren hohe Qualität (siehe Kapitel 2.2.6.5).

Für die uninfizierten Tiere konnte in allen Zelltypen eine gegenüber der A3G-Expression signifikant höhere A3F-Expression gefunden werden (Mann-Whitney-Test für PBMCs, CD4+ T-Zellen, CD14+ Monozyten jeweils  $p < 0,05$  [für PBMCs siehe Abbildung 3.2 A] und für periphere und mesenteriale Lymphknoten jeweils  $p < 0,001$ ). Für die A3F-Transkription wurden individuell höhere Schwankungen als für die A3G-Transkription beobachtet (Abbildung 3.2 A). Ferner gab es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Für die uninfizierten Makaken konnte kein

signifikanter Zusammenhang zwischen der A3G- und der A3F-Expression mit der Spearman-Korrelationsanalyse gefunden werden (Abbildung 3.2 B).



**Abb. 3.2 Die APOBEC3-Expression in den PBMCs uninfizierter Rhesusaffen**

A) Die A3G- und A3F-Expression im Vergleich

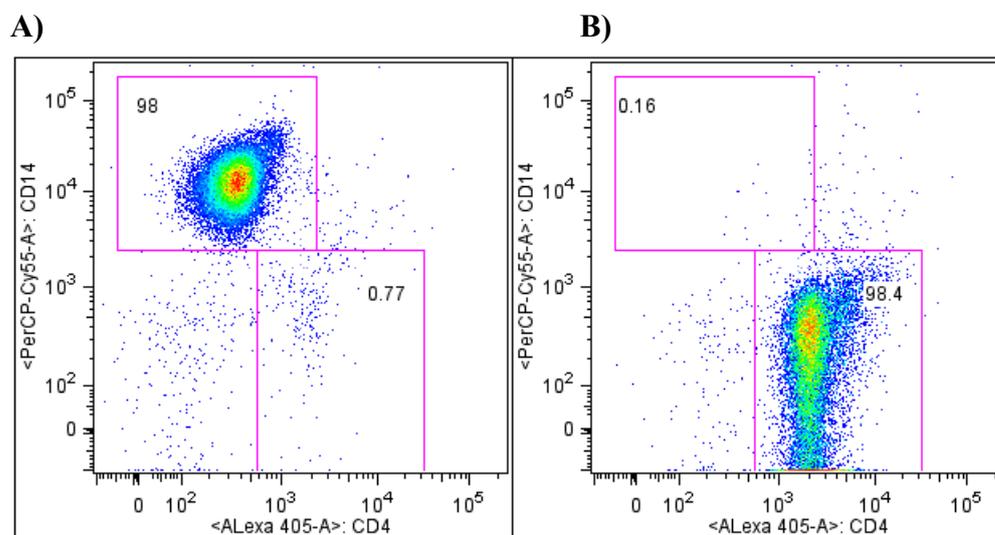
B) Korrelation zwischen der A3G- und A3F-Expression

Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier (n), für A3G n = 12 und für A3F n = 11. Der Querbalken und der Stern kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt nach dem Mann-Whitney-Test (\* p < 0,05). Angegeben ist der Medianwert.

### 3.2.2 Die APOBEC3-Expression in infizierten Rhesusaffen

Nach Charakterisierung der APOBEC3-Expression in uninfizierten Rhesusaffen wurde im Vergleich dazu die Expression für SIV-infizierte Makaken gemessen. Die Proben kamen von Tieren, die sich in verschiedenen unabhängigen Experimenten befanden. Sie waren entweder tonsilliar mit SIVmac239 oder intravenös mit SIVmac251 inokuliert und wiesen zum Zeitpunkt der Messung unterschiedliche Virusbeladungen im Plasma auf. Tiere mit AIDS sind immunologisch ein Sonderfall und wurden daher von der Gruppe der infizierten Makaken, die sich zum Zeitpunkt der Messung noch in der asymptomatischen Phase befanden, separat betrachtet. Die A3G- und A3F-Expression wurde zunächst für die PBMCs untersucht (Abbildung 3.3 A, B). Nach MACS-Separation konnte die APOBEC3-Transkription auch in CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten analysiert werden. Die Reinheit dieser Populationen wurde zuvor im FACS (siehe Abbildung 3.3) geprüft. Dabei lag der durchschnittliche Reinheitsgrad isolierter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten über 95% und die Reinheit der CD14<sup>+</sup> Monozyten betrug mindestens 90%. Leider war es nicht immer möglich, die zur Isolation von CD14<sup>+</sup> Monozyten nötigen Blutvolumina aus allen Tieren zu bekommen. Aus diesem Grund ist der Stichprobenumfang dieser Gruppe gering. Die APOBEC3-Expression wurde

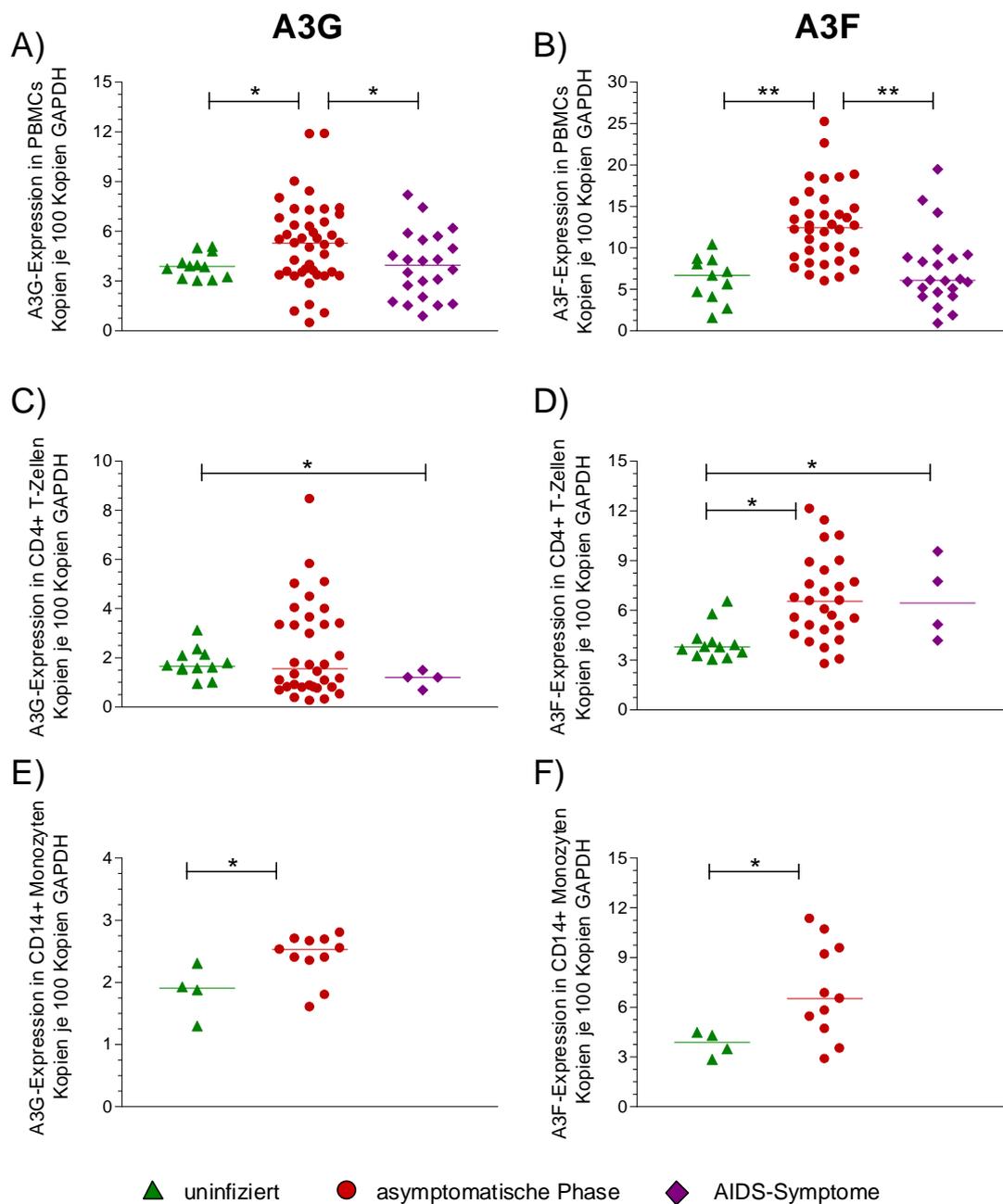
ebenfalls in den peripheren und mesenterialen Lymphknoten ermittelt (Abbildung 3.5 A-D). Die Qualität eingesetzter RNA-Proben wurde stichprobenartig im Agilent 2100 Bioanalyzer geprüft, wobei der durchschnittliche RIN-Wert 8,0 betrug (siehe Kapitel 2.2.6.5). Die APOBEC3-Expression wurde pro 100 Kopien GAPDH angegeben. Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-Test auf Signifikanz geprüft. Zum Ausschluss eines möglichen Einflusses inokulierter Virusstämme (SIVmac239 tonsilliar und SIVmac251 intravenös) wurde zunächst die A3G- und A3F-Expression für beide Virusisolate verglichen. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede. Ferner treten, wie schon für die uninfizierten Tiere gezeigt wurde, auch für die infizierten Rhesusaffen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auf. Die APOBEC3-Expression kann somit unabhängig vom inokulierten Virusstamm, Inokulationsweg und Geschlecht untersucht werden.



**Abb. 3.3 Durchflusszytometrische Dotplot-Darstellung zur Ermittlung des Reinheitsgrades einer MACS-separierten Zellpopulation**

A) Reinheitsgrad für die CD14<sup>+</sup> Monozyten 98% und B) für die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten 98,4 % isoliert aus den PBMCs

In unseren Versuchen konnten wir für die PBMCs SIV-infizierter Makaken aus der asymptomatischen Phase eine signifikante Erhöhung der A3G- und A3F-Expression im Vergleich zu den Uninfizierten beobachten (Abbildung 3.4 A und B; Mann-Whitney-Test  $p < 0,05$  für A3G;  $p < 0,001$  für A3F). Ferner zeigte sich in den Tieren mit AIDS eine deutliche Reduktion der A3G- und A3F-Expression verglichen mit Makaken aus der asymptomatischen Phase (Abbildung 3.4 A und B; Mann-Whitney-Test  $p < 0,05$  für A3G;  $p < 0,001$  für A3F).



### Abb. 3.4 Die APOBEC3-Expression im peripheren Blut

Vergleich zwischen Uninfizierten, SIVmac-infizierten Tieren mit oder ohne AIDS

A) A3G- und B) A3F-Expression in PBMCs

C) A3G- und D) A3F-Expression in CD4+ T-Lymphozyten

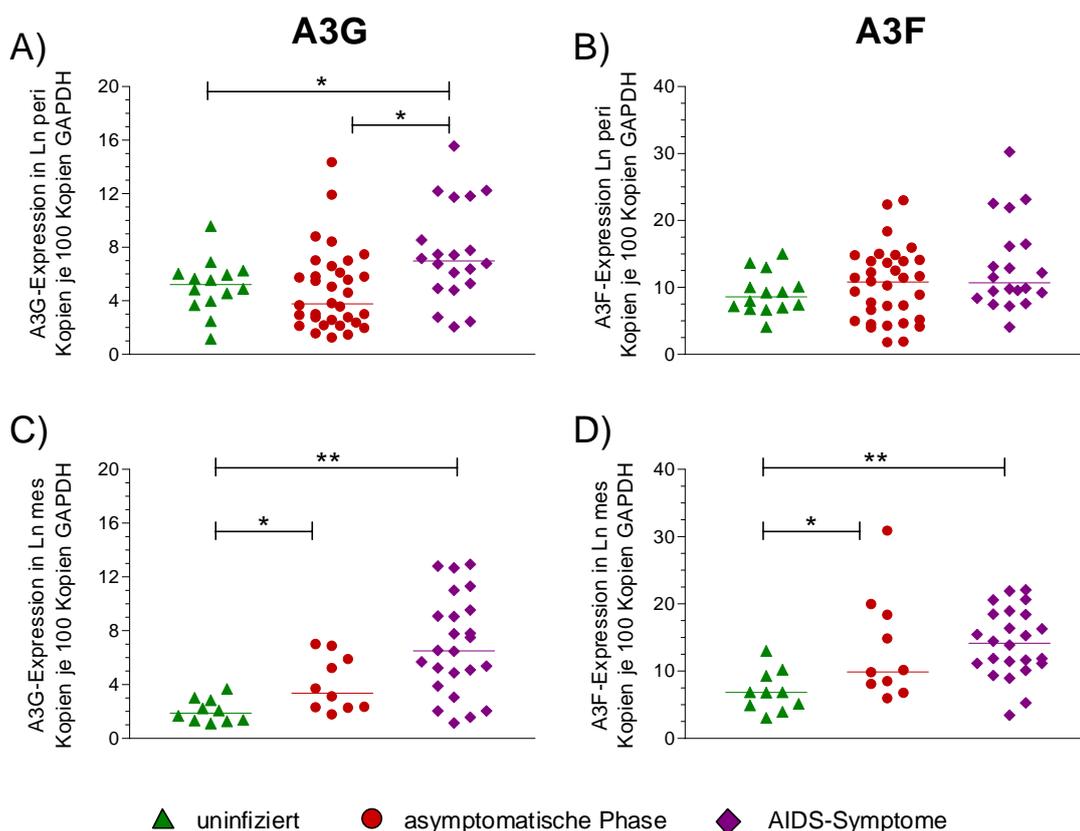
E) A3G- und F) A3F-Expression in CD14+ Monozyten

Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Der Querbalken und der Stern kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt nach dem Mann-Whitney-Test (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ). Angegeben ist der Medianwert.

Obwohl für die CD4+ T-Lymphozyten bei einigen der Versuchstiere ein Anstieg der A3G-Expression ermittelt wurde, gab es insgesamt keine signifikante Erhöhung (Abbildung 3.4 C). In diesen Zelltypen wurde aber eine erhöhte A3F-Expression bei

asymptomatischen und bei AIDS-Tieren beobachtet (Abbildung 3.4 D; jeweils  $p < 0,05$  im Vergleich zu Uninfizierten). Neben den CD4<sup>+</sup> T-Zellen stellen die CD14<sup>+</sup> Monozyten eine weitere wichtige Zielzellpopulation für das SI-Virus dar. Ähnlich wie bei den PBMCs stieg die Rate der A3G- und A3F-Expression auch in diesen Zelltypen an (Abbildung 3.4 E und F; jeweils  $p < 0,05$  im Vergleich zu Uninfizierten).

In den peripheren Lymphknoten jedoch erhöhte sich die A3G-Expression bei den AIDS-Tieren (Abbildung 3.5 A; jeweils  $p < 0,05$ ). Es gab keinen signifikanten Unterschied für die A3F-Expression (Abbildung 3.5 B). Auch in den mesenterialen Lymphknoten konnte ein Anstieg der A3G- und A3F-Expression in den Tieren mit AIDS beobachtet werden (Abbildung 3.5 C und D; jeweils  $p < 0,001$  im Vergleich zu Uninfizierten). Damit steht die in den Lymphknoten gemessene Erhöhung der A3G- und A3F-Expression im Kontrast zu den Ergebnissen des peripheren Blutes.



### Abb. 3.5 Die APOBEC3-Expression im Lymphknoten

Vergleich zwischen uninfizierten, SIVmac-infizierten Tieren mit oder ohne AIDS

A) A3G- und B) A3F-Expression in peripheren Lymphknoten (Ln peri)

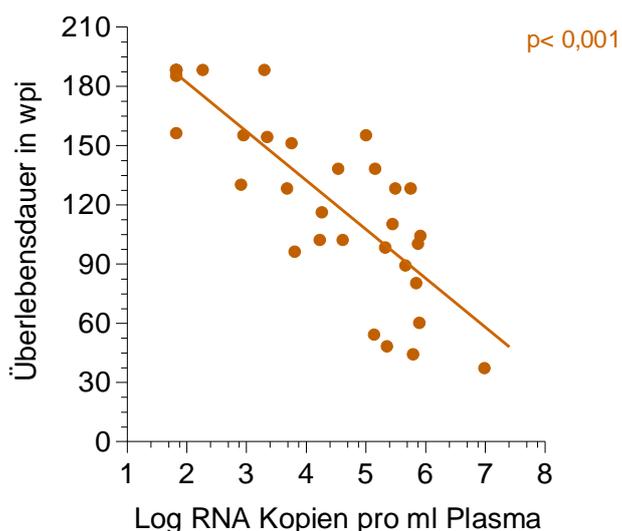
C) A3G- und D) A3F-Expression in mesenterialen Lymphknoten (Ln mes)

Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Der Querbalken und der Stern kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt nach dem Mann-Whitney-Test (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ). Angegeben ist der Medianwert.

Die Frage nach einer koordinierten APOBEC3-Expression zwischen Blut und Lymphknoten sollte über eine Korrelationsanalyse untersucht werden. Dabei konnte keine Korrelation für die A3G-Expression zwischen den PBMCs und den peripheren Lymphknoten gefunden werden. Für die A3F-Expression zeigte sich zumindest ein Trend, der auf eine koordinierte Genexpression in beiden Geweben verweisen könnte. Dieser war aber nicht signifikant.

### 3.2.3 Die APOBEC3-Expression in Abhängigkeit von der Virusbeladung

Die Anzahl der Viren im Plasma zu Beginn der asymptomatischen Phase ist der beste quantitative Indikator für den weiteren Verlauf der HIV-Infektion (Mellors et al., 1996). Dieses gilt auch für die SIV-Infektion. Zunächst sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob die Virusbeladung zum frühen Zeitpunkt im Infektionsverlauf mit der Überlebensdauer korreliert. Hierfür wurde die Virusbeladung in einem Zeitraum von elf bis 62 Wochen nach Inokulation für 32 Tiere ermittelt und als Logarithmus der RNA-Kopien gegen die jeweilige Überlebensdauer in Wochen nach Infektion (weeks post infection, wpi) aufgetragen (siehe Abbildung 3.6). Dabei schwankten die individuellen Werte zwischen  $6,75 \times 10^1$  und  $9 \times 10^6$  RNA-Kopien pro Milliliter Plasma. Keines der Tiere zeigte zum Zeitpunkt der Viruslastmessung Anzeichen einer Immundefizienz. Diese trat frühestens 30 Wochen später auf.

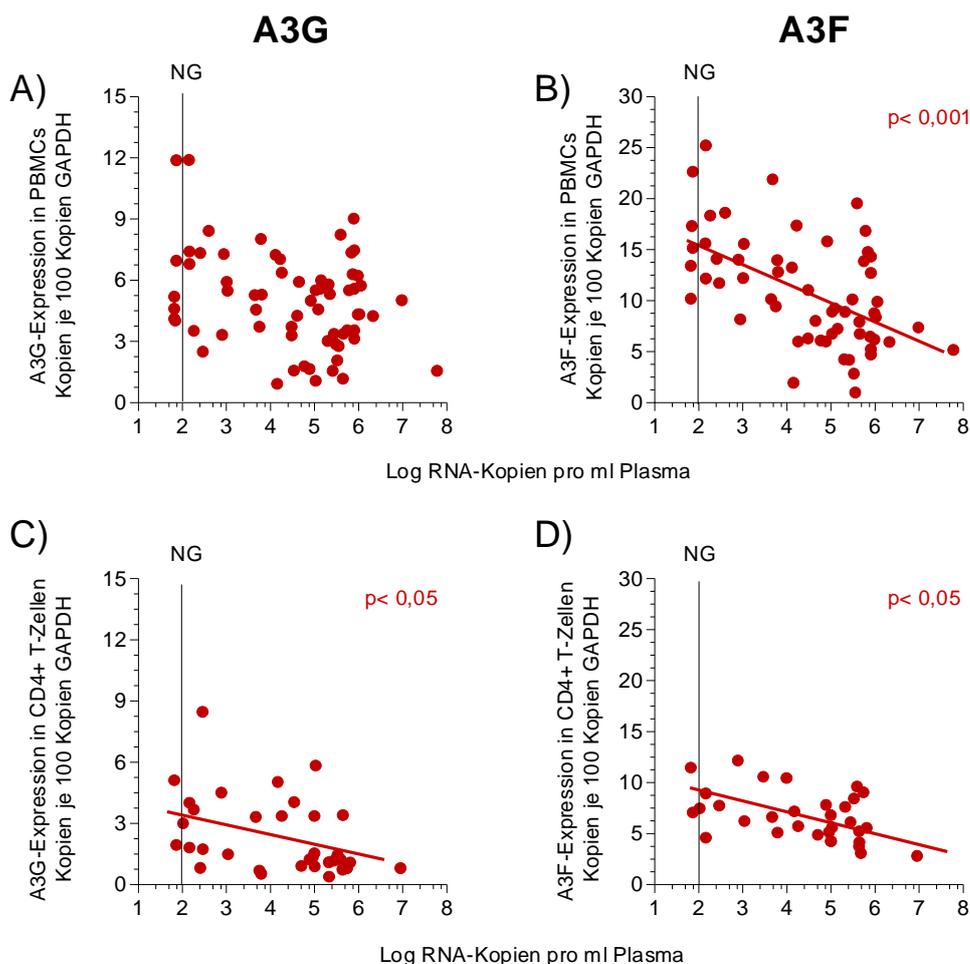


**Abb. 3.6 Korrelation der Virusbeladung im Plasma mit der Überlebensdauer**

Virusbeladung als Logarithmus (Log) der RNA-Kopien pro Milliliter (ml) Plasma zu einem relativ frühen Infektionszeitpunkt (11-62 wpi) für 32 Tiere in Bezug zur individuellen Lebensdauer. Progression zu AIDS frühestens nach 30 Wochen zum Bezugspunkt der Viruslast. Berechnung des Spearman-Korrelationskoeffizienten,  $p$  gibt das Signifikanzniveau an.

Aus der Spearman-Korrelationsanalyse errechnete sich eine signifikante negative Korrelation zwischen Virusbeladung und Überlebensdauer (Abbildung 3.6;  $p < 0,001$ ). Tiere, die früh im Erkrankungsverlauf eine hohe Virusbeladung aufwiesen, zeigten auch eine schnelle Progression zu AIDS. Im Vergleich dazu kam es bei den Versuchstieren, die zu Beginn der SIV-Infektion eine geringe Virusbeladung hatten, zu einem deutlich verlangsamten Krankheitsverlauf und damit zur erhöhten Überlebensdauer. Jedoch gab es innerhalb dieses frühen Zeitraumes keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der A3G- bzw. A3F-Expression und der Überlebensdauer.

Um Aussagen zu einem möglichen Zusammenhang zwischen dem Krankheitsverlauf und der APOBEC3-Expression treffen zu können, wurde die A3G- und A3F-Expression in Abhängigkeit von der Virusbeladung aufgetragen (Abbildung 3.7). Die Rhesusaffen befanden sich dabei in verschiedenen Phasen der Infektion mit Virusbeladungen zwischen  $1,46 \times 10^2$  und  $6,2 \times 10^7$  RNA-Kopien pro Milliliter Plasma. Hinzu kamen auch Tiere, die zum Zeitpunkt der Messung keine nachweisbare Virusbeladung aufwiesen ( $6,75 \times 10^1$  RNA-Kopien pro ml Plasma). Sowohl für die PBMCs als auch für die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten konnte eine negative Korrelation zwischen der A3G- bzw. A3F-Transkription und der Virusbeladung beobachtet werden. Obwohl dieser Zusammenhang in den PBMCs für A3G nicht signifikant war, zeichnete sich dennoch ein vergleichbarer Trend ab (Abbildung 3.7 A). Gleiches galt für die CD14<sup>+</sup> Monozyten. Im Gegensatz zu den Resultaten des peripheren Blutes, konnte für die Lymphknoten keine signifikante Korrelation gefunden werden. In der Peripherie zeigten also Makaken mit der höchsten APOBEC3-Expression eine geringere Virusbeladung. Diese wiederum ist mit einer längeren Überlebensdauer verbunden (Abbildung 3.6). Somit ist es wahrscheinlich, dass eine erhöhte APOBEC3-Expression zur Verringerung der Virusbeladung beiträgt und dadurch den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen kann. Das Geschehen in den Lymphknoten spiegelt dabei nicht unbedingt dieselben Verhältnisse wie in der Peripherie wider.



**Abb. 3.7 Korrelation der APOBEC3-Expression mit der Virusbelastung im Plasma**

A) Korrelation der A3G-Expression mit der Viruslast in PBMCs (n = 50)

B) Korrelation der A3F-Expression mit der Viruslast in PBMCs (n = 47)

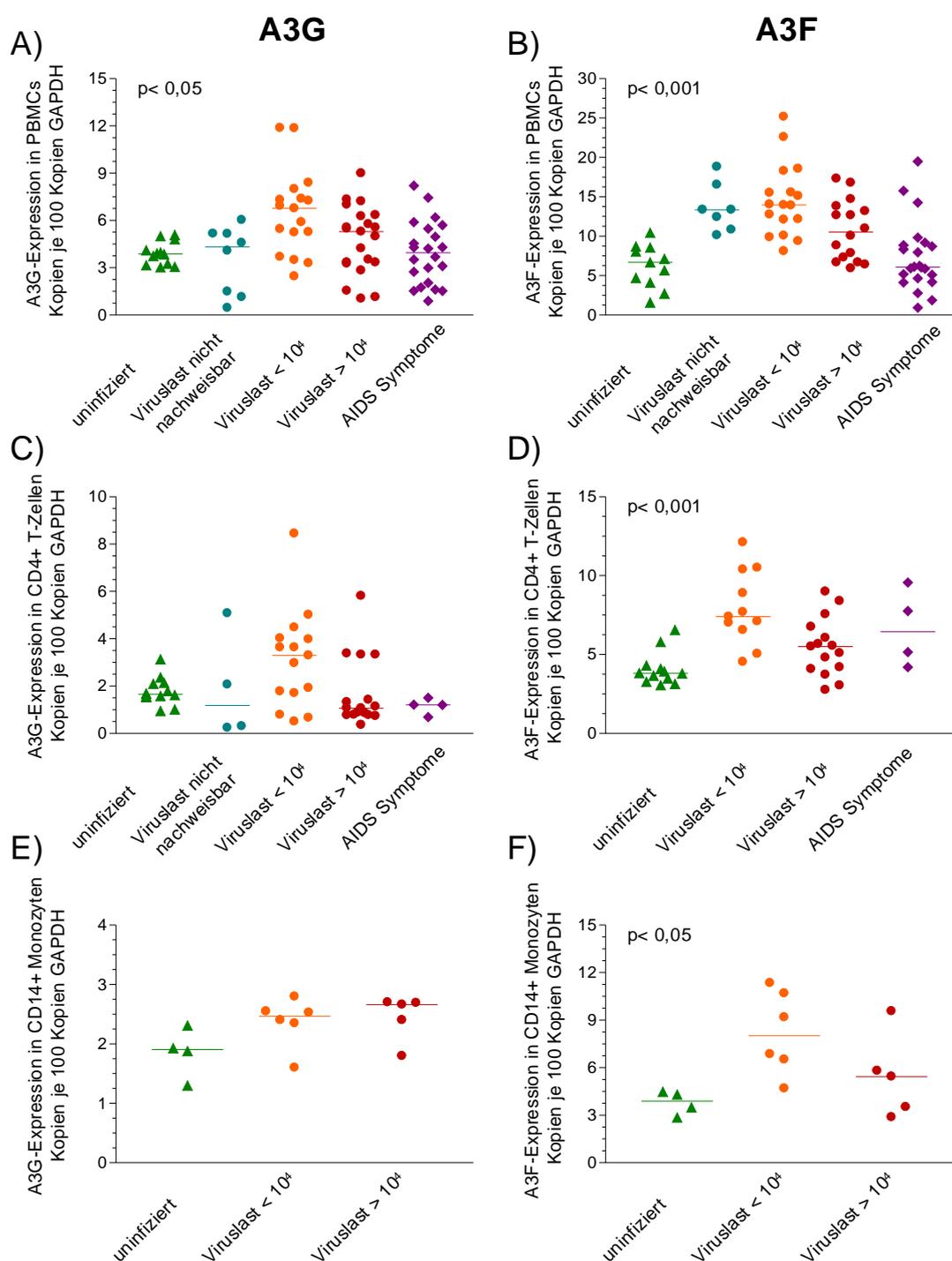
C) Korrelation der A3G-Expression mit der Viruslast in CD4+ T-Zellen (n = 34)

D) Korrelation der A3F-Expression mit der Viruslast in CD4+ T-Zellen (n = 30)

Die APOBEC3-Expression in Kopien pro 100 Kopien GAPDH, aufgetragen gegen den Logarithmus (Log) RNA-Kopien pro ml Plasma. NG = Nachweisgrenze für die Virusbelastung ( $> 6,75 \times 10^1$  RNA-Kopien pro ml Plasma). Spearman-Korrelationskoeffizienten, p gibt das Signifikanzniveau an

Um die APOBEC3-Expression bei einer bestimmten Virusbelastung genauer zu veranschaulichen, wurden die Versuchstiere in Gruppen entsprechend ihrer Virusbelastung zum Zeitpunkt der Messung eingeteilt. Dabei wurden für die PBMCs, CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten folgende Einteilung getroffen: inokulierte Tiere, die zum Zeitpunkt der Messung keine nachweisbare Viruslast aufwiesen ( $6,75 \times 10^1$  RNA-Kopien pro ml Plasma); Makaken mit einer Virusbelastung von  $< 10^4$  RNA-Kopien pro ml Plasma und solche mit einer Viruslast  $> 10^4$  RNA-Kopien pro ml Plasma. Separat als immunologischer Sonderfall wurden die AIDS-Tiere betrachtet (Abbildung 3.8). Die Lymphknoten wurden unter anderen Aspekten weiter untersucht

(siehe Kapitel 3.2.6). Hier betrug die durchschnittliche Virusbelastung  $> 10^4$  RNA-Kopien pro Milliliter Plasma.



**Abb. 3.8 Die APOBEC3-Expression in Abhängigkeit von der Virusbelastung im Plasma**

A) A3G- und B) A3F-Expression in PBMCs

C) A3G- und D) A3F-Expression in CD4+ T-Zellen

E) A3G- und F) A3F-Expression in CD14+ Monozyten

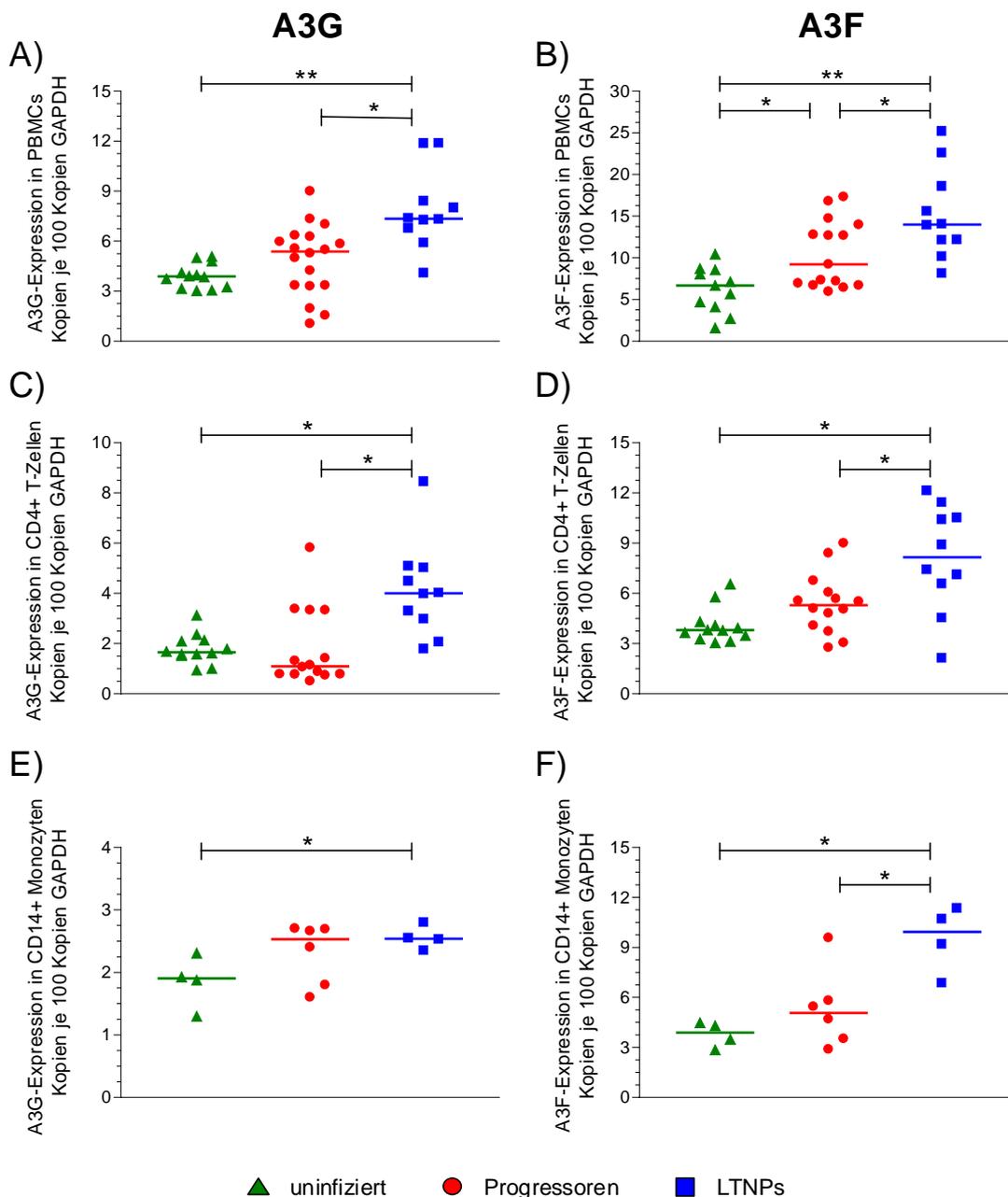
Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test und als Signifikanzniveau p dargestellt. Angegeben ist der Medianwert.

Zur statistischen Auswertung wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Test herangezogen. Obwohl die Mediane signifikant variierten (Kruskal-Wallis-Test), ergab die Varianzanalyse zwischen den einzelnen Gruppen keine statistische Signifikanz. In der Abbildung 3.8 zeigt sich, wie schon aus Abbildung 3.7 hervorging, eine tendenzielle Reduktion der A3G- und A3F-Expression mit ansteigender Viruslast. In den PBMCs kam es bei Tieren mit nicht mehr nachweisbarer Virusbelastung zum Anstieg der A3F-Expression. Dieses wurde für die A3G-Expression nicht gefunden (Abbildung 3.8 A und B). Die AIDS-Tiere, die eine sehr hohe Virusbelastung zum Zeitpunkt der Erkrankung hatten ( $1,5 \times 10^4$  bis  $6,2 \times 10^7$  RNA-Kopien pro ml Plasma) zeigten eine verringerte A3G- und A3F-Transkription. Abweichend von der allgemein beobachteten negativen Korrelation zwischen der APOBEC3-Expression und der Viruslast zeigten CD14+ Monozyten auch bei Tieren mit hoher Virusbelastung eine erhöhte A3G-Expression (Abbildung 3.8 E). Für A3F galt dies allerdings nicht (Abbildung 3.8 F). Für die meisten Zellpopulationen gab es also eine negative Korrelation zwischen Virusbelastung und APOBEC3-Expression.

### 3.2.4 APOBEC3-Expression und Überlebensdauer

Die oben gezeigte negative Korrelation zwischen APOBEC3-Expression und Virusbelastung lässt auf einen APOBEC3-vermittelten Effekt schließen, der zu einem verlangsamten Krankheitsverlauf führt und damit eine höhere Überlebensdauer zur Folge hat. Um nun einen Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der APOBEC3-Expression und dem Krankheitsverlauf zu bekommen, wurden die Versuchstiere anhand ihrer Überlebensdauer verglichen. Dabei wurden die beiden folgenden Gruppen definiert: Tiere, die sich zum Zeitpunkt der Messung noch in der asymptomatischen Phase befanden, Virusbelastungen zwischen  $8,2 \times 10^2$  und  $9,8 \times 10^6$  RNA-Kopien pro ml Plasma aufwiesen und innerhalb von drei Jahren nach Infektion AIDS entwickelten. Diese Gruppe repräsentiert die sogenannten Progressoren. Ihr gegenüber gestellt wurden jene Tiere, die zum Zeitpunkt der Messung bereits eine Überlebensdauer von über drei Jahren nach Infektion zeigten und Virusbelastungen zwischen  $1,5 \times 10^2$  und  $6,2 \times 10^3$  RNA-Kopien pro ml Plasma aufwiesen. Sie stellen die sogenannten Langzeitüberlebenden (long-term non-progressors, LTNPs) dar (Spring et al., 1998). Makaken, die zum Messzeitpunkt AIDS hatten, wurden bereits unter 3.2.2

mit asymptomatischen Tieren verglichen und daher aus den folgenden Betrachtungen herausgenommen.



**Abb. 3.9 Die APOBEC3-Expression in Tieren mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf im Blut**  
 Vergleich zwischen Uninfizierten, Progressoren und LTNPs

A) A3G-Expression in PBMCs, (n = 12 Uninfizierte; n = 18 Progressoren; n = 10 LTNPs)

B) A3F-Expression in PBMCs (n = 11 Uninfizierte; n = 15 Progressoren; n = 10 LTNPs)

C) A3G-Expression in CD4+ T-Zellen (n = 12 Uninfizierte; n = 14 Progressoren; n = 10 LTNPs)

D) A3F-Expression in CD4+ T-Zellen (n = 12 Uninfizierte; n = 14 Progressoren; n = 10 LTNPs)

E) A3G-Expression in CD14+ T-Zellen (n = 4 Uninfizierte; n = 6 Progressoren; n = 4 LTNPs)

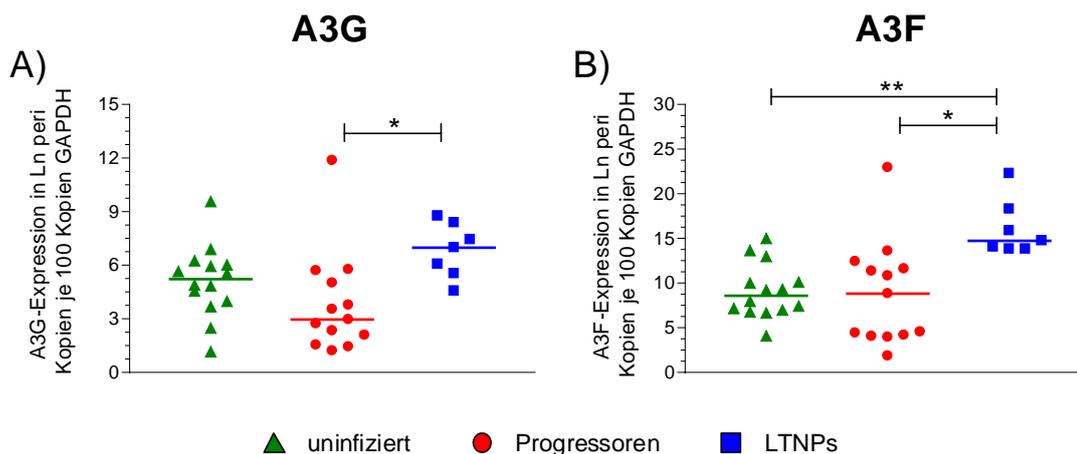
F) A3F-Expression in CD14+ T-Zellen (n = 4 Uninfizierte; n = 6 Progressoren; n = 4 LTNPs)

Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Die Querbalken und die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt nach dem Mann-Whitney-Test (\* p < 0,05; \*\* p < 0,001). Angegeben ist der Medianwert.

Der Vergleich zwischen Progressoren und LTNPs erfolgte für PBMCs, CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD14<sup>+</sup> Monozyten (Abbildung 3.9). Zur Berechnung des Signifikanzniveaus wurde der Mann-Whitney-Test herangezogen.

In den PBMCs kam es zum signifikanten Anstieg der A3G- und A3F-Expression bei den LTNPs (siehe Abbildung 3.9 A und B; Mann-Whitney-Test;  $p < 0,001$  zu den Uninfizierten;  $p < 0,05$  zu den Progressoren). Auch die Progressoren zeigten, verglichen mit den Uninfizierten eine erhöhte A3F-Expression (Abbildung 3.9 B;  $p < 0,05$ ). Ein solcher Unterschied wurde nicht für A3G gefunden (Abbildung 3.9 A). Ähnlich wie in den PBMCs kam es auch in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen zum Anstieg der A3G- und A3F-Transkription bei den LTNPs (Abbildung 3.9 C und D;  $p < 0,05$  für A3G und A3F jeweils im Vergleich zu Uninfizierten und zu Progressoren). Im Unterschied zu den PBMCs hatten die Progressoren im Vergleich zu den Uninfizierten keine signifikant erhöhte A3F-Expression. Tendenziell zeigte sich aber auch ein Anstieg (Abbildung 3.9 C). Ebenfalls kam es in CD14<sup>+</sup> Monozyten zur Erhöhung der A3F-Expression bei den LTNPs (Abbildung 3.9 F;  $p < 0,05$  jeweils zu Uninfizierten und zu Progressoren). Im Unterschied zu allen anderen untersuchten Zelltypen war die A3G-Expression in den CD14<sup>+</sup> Monozyten zwischen Progressoren und LTNPs nicht signifikant verschieden. Dennoch zeigten die LTNPs im Vergleich zu uninfizierten Tieren eine erhöhte A3G-Expression (Abbildung 3.9 E;  $p < 0,05$ ).

Als Repräsentanten des viralen Hauptreplikationsortes sollte die APOBEC3-Expression auch in den Zellen der Lymphknoten analysiert werden. Hier war die Untersuchung auf die peripheren Lymphknoten (Abbildung 3.10) begrenzt, da die mesenterialen Lymphknoten nur im Rahmen einer Sektion zugänglich waren. In den peripheren Lymphknoten wurde ebenfalls ein Anstieg der APOBEC3-Expression bei den LTNPs gefunden (Abbildung 3.10;  $p < 0,05$  jeweils für A3G und A3F im Vergleich zu Progressoren). Beim Vergleich zwischen LTNPs und Uninfizierten der peripheren Lymphknoten zeigte sich ein Anstieg der A3G-Expression bei den LTNPs, der aber nicht signifikant war (Abbildung 3.10 A). Im Unterschied dazu war A3F bei den LTNPs erhöht (Abbildung 3.10 B;  $p < 0,001$  im Vergleich zu Uninfizierten).



**Abb. 3.10 Die APOBEC3-Expression in Tieren mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf in peripheren Lymphknoten (Ln peri)**

Vergleich zwischen Uninfizierten, Progressoren und LTNPs

A) A3G-Expression, (n = 14 Uninfizierte; n = 13 Progressoren; n = 7 LTNPs)

B) A3F-Expression (n = 14 Uninfizierte; n = 13 Progressoren; n = 7 LTNPs)

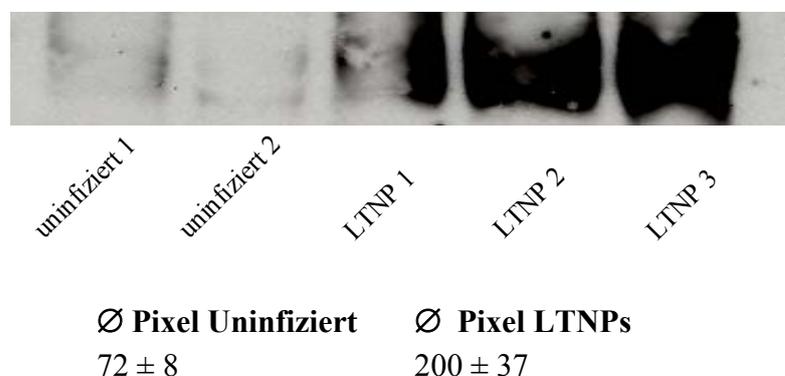
Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Die Querbalken und die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt nach dem Mann-Whitney-Test (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ). Angegeben ist der Medianwert.

Damit konnte für alle Zellpopulationen eine signifikant erhöhte APOBEC3-Expression bei den LTNPs gefunden werden. Diese Tiere hatten eine geringe Virusbelastung ( $< 10^4$  Kopien pro ml Plasma) und wiesen die längste Überlebensdauer auf. Folglich besteht eine deutliche Korrelation zwischen erhöhter APOBEC3-Expression und niedriger Virusbelastung. Diese Kombination trägt offensichtlich zu einem verlangsamten Krankheitsverlauf bei und verlängert die Überlebensdauer dieser Rhesusaffen.

### 3.2.5 Nachweis der APOBEC3G-Proteinexpression

Da sich die gefundene erhöhte APOBEC3-Expression der LTNPs auf die mRNA-Transkription bezieht, wurde ebenfalls ein Nachweis der APOBEC3-Proteinexpression im Western-Blot angestrebt. Dazu wurden PBMCs aus den peripheren Blutproben von zwei uninfizierten Kontrolltieren sowie von drei LTNPs isoliert (Kapitel 2.2.9). Nach Lyse der Zellen wurde die Proteinkonzentration der Zytosolfraktion im Überstand mit der Methode der Bicinchoninsäure ermittelt. Von dieser Fraktion wurden 20  $\mu$ g auf ein 12%iges Polyacrylamidgel geladen. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die A3G-Expression (46 kDa) mit den humanen monoklonalen A3G-Antikörper (ImmunoDiagnostics) nachgewiesen. Die Filme wurden gescannt und mit Hilfe des Programmes *Scion Image* ausgewertet. In der

Abbildung 3.11 ist die A3G-Proteinexpression in den PBMCs im Vergleich für die zwei uninfizierten Tiere und die drei LTNPs dargestellt. Aus den berechneten Pixelwerten geht bei den LTNPs ein Anstieg der A3G-Proteinexpression um das 2,7-fache im Vergleich zu den Uninfizierten hervor.



**Abb. 3.11 Immunoblot-Detektion der A3G-Proteinexpression in den PBMCs**

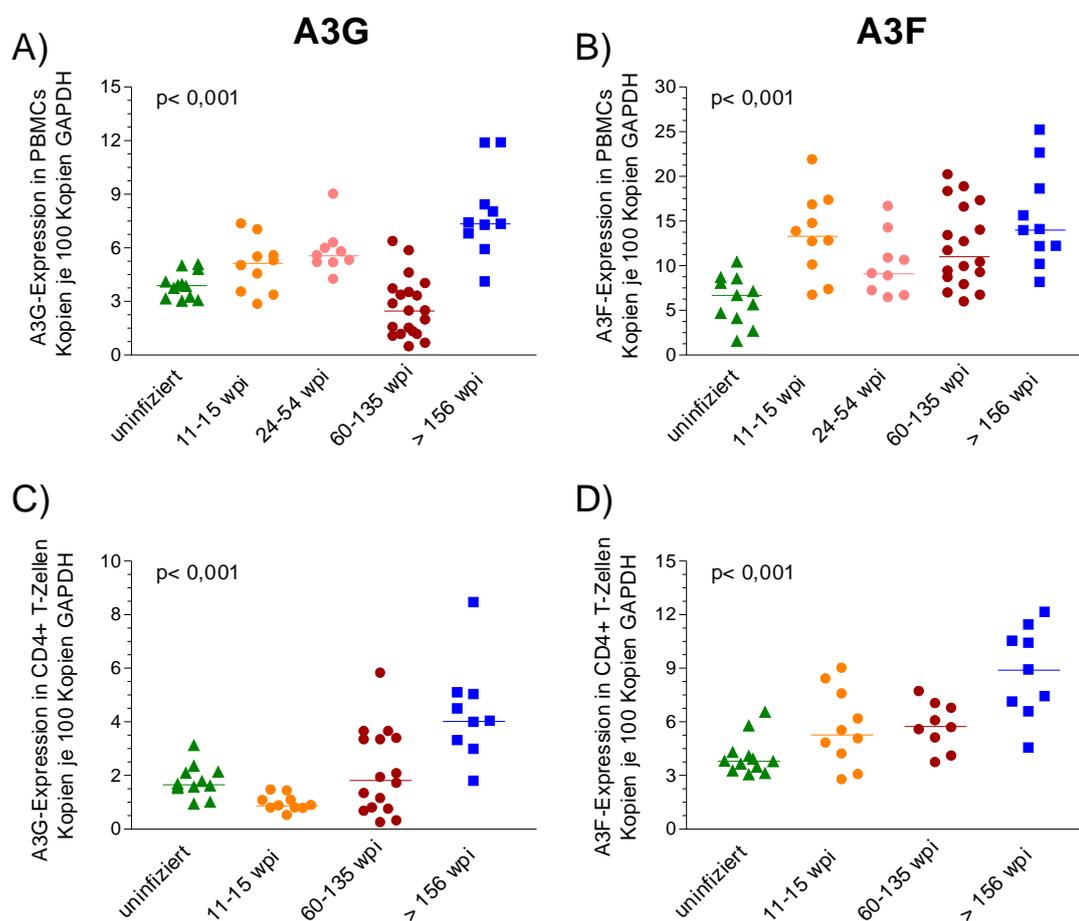
Zwei uninfizierte Kontrolltiere im Vergleich mit drei LTNPs. Dichtemessung der Banden und Berechnung der Pixel mit *Scion Image*. Pixelwerte als Durchschnitt für zwei uninfizierte Tiere und drei LTNPs mit Standardabweichung angegeben.

Die auf Transkriptionsebene gefundene hohe A3G-Expression bei den LTNPs (Kapitel 3.2.4) konnte in den PBMCs auch auf Ebene der Proteinexpression nachgewiesen werden (Abbildung 3.11). Da es allerdings keinen kommerziell erhältlichen A3F-Antikörper gibt, der mit Rhesusaffen A3F kreuzreagiert, war eine Untersuchung der A3F-Proteinexpression nicht möglich.

### 3.2.6 Die APOBEC3-Expression im Zeitverlauf

Im Kapitel 2.2.4 zeigten wir, dass die Tiere die am längsten überlebten (LTNPs) die höchste APOBEC3-Expression hatten. Um die Genexpression im zeitlichen Verlauf der Infektion zu untersuchen, wurden die Makaken aus der Querschnittsstudie in zeitlich definierte Gruppen eingeteilt. Für PBMCs, CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und peripheren Lymphknoten wurde dabei folgende Gruppierung getroffen: 11-15 wpi, 24-54 wpi, 60-135 wpi und > 156 wpi. In keiner Gruppe hatten die Tiere AIDS. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs war diese Untersuchung für die CD14<sup>+</sup> Monozyten nicht möglich. Die Gruppen wurden mit uninfizierten Kontrolltieren verglichen und aus der zu unterschiedlichen Zeiten im Infektionsverlauf ermittelten APOBEC3-Expression ergab sich ein Zeitverlauf. Mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn-Test wurden die Daten ausgewertet. Obwohl die Mediane signifikant variierten (Kruskal-Wallis-Test), ergab die Varianzanalyse (Dunn-Test) zwischen den Gruppen keinen signifikanten

Unterschied. Im Vergleich zu den Uninfizierten erhöhte sich tendenziell die A3G- und A3F-Expression früh im Infektionsverlauf (11-15 wpi) in den PBMCs (Abbildung 3.12 A und B). Ähnliches zeigte sich in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen für A3F (Abbildung 3.12 D), aber nicht für A3G (Abbildung 3.12 C).



**Abb. 3.12 Die APOBEC3-Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf im Blut**

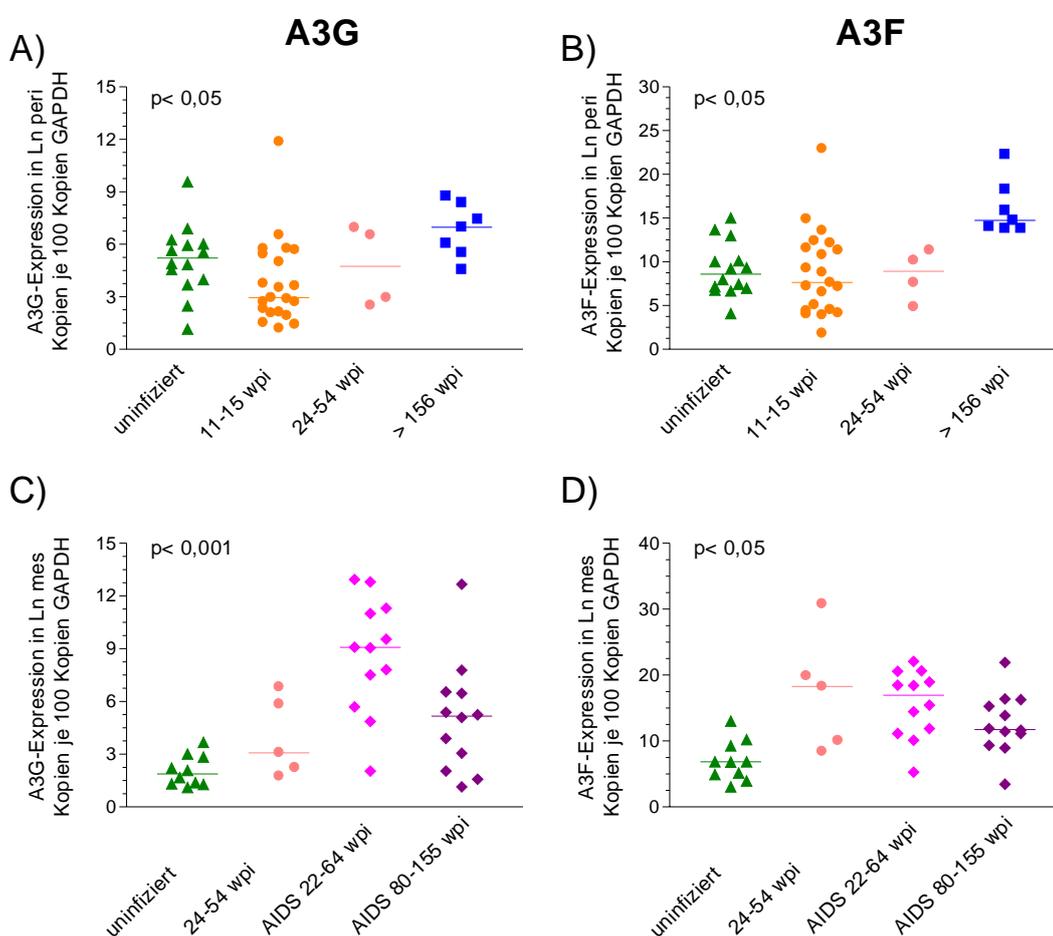
A) A3G- und B) A3F-Expression in PBMCs

C) A3G- und D) A3F-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Gruppierung in Wochen nach Infektion (wpi). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test als Signifikanzniveau p dargestellt. Angegeben ist der Medianwert.

Ähnlich wie in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen kam es in den peripheren Lymphknoten 11-15 wpi zur tendenziellen Reduzierung der A3G-Transkription im Vergleich zu uninfizierten Tieren (Abbildung 3.13 A). Innerhalb dieses Zeitraumes wurde keine erhöhte A3F-Expression beobachtet (Abbildung 3.13 B). Damit konnte der für die PBMCs gefundene Anstieg der A3G-Expression im frühen Krankheitsverlauf für die peripheren Lymphknoten nicht nachgewiesen werden. Nach 24-54 wpi kam es in den PBMCs tendenziell zur weiteren Erhöhung der A3G-Expression (Abbildung 3.12 A). In den

peripheren Lymphknoten dagegen gab es 24-54 wpi keine erhöhte A3G- und A3F-Transkription (Abbildung 3.13 A und B). Mit Fortschreiten des Krankheitsverlaufes (60-135 wpi) fiel in den PBMCs die A3G-Expression und näherte sich den Werten der AIDS-Tiere an (Abbildung 3.12 A und 3.4 A). Für die A3F-Expression konnte dieses nicht gefunden werden. Hier war die A3F-Expression im Zeitraum 60-135 wpi erhöht (Abbildung 3.12 B und 3.4 B). Auch die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zeigten während des späteren Verlaufes (60-135 wpi) erhöhtes A3F (Abbildung 3.12 D). Damit ist die A3F-Expression in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen und den PBMCs vergleichbar. CD4<sup>+</sup> T-Zellen hatten im Zeitraum von 60-135 wpi teilweise auch eine erhöhte A3G-Expression (Abbildung 3.12 C).



**Abb. 3.13 Die APOBEC3-Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf im Lymphknoten**

A) A3G- und B) A3F-Expression im peripheren Lymphknoten (Ln peri)

C) A3G- und D) A3F-Expression im mesenterialen Lymphknoten (Ln mes)

Gruppierung in Wochen nach Infektion (wpi). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test als Signifikanzniveau p dargestellt. Angegeben ist der Medianwert.

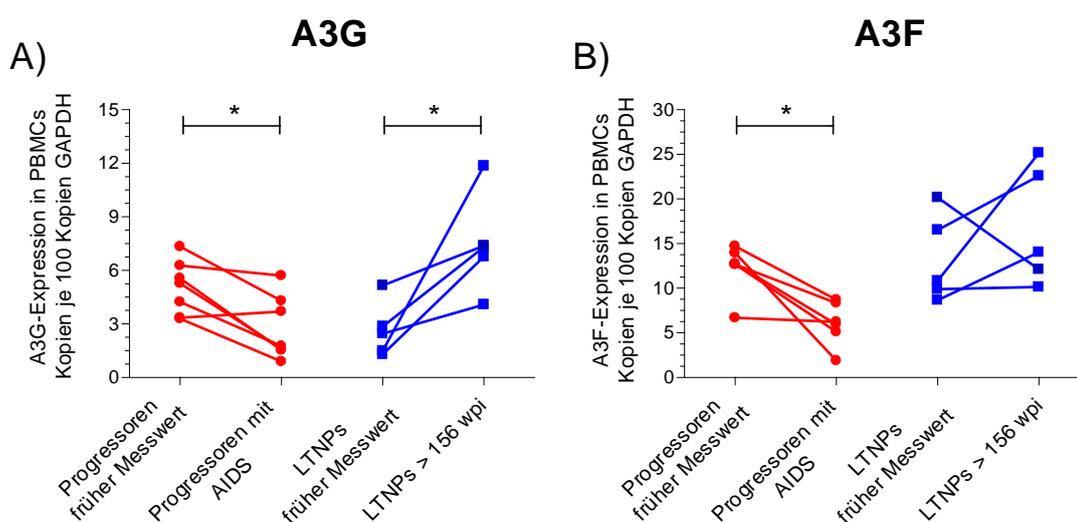
Da sich die Entnahmemöglichkeit der mesenterialen Lymphknoten auf die Sektion beschränkte, war eine APOBEC3-Expression bei den LTNPs nicht möglich und daher wurde hier ein anderes Gruppierungsschema vorgenommen: 24-54 wpi und Tiere, die im Infektionsverlauf früher (22-64 wpi) bzw. später (80-155 wpi) an AIDS erkrankten (Abbildung 3.13 C und D). Tendenziell erhöhte sich dort die APOBEC3-Expression in allen Gruppen im Vergleich zu den Uninfizierten. Tiere, die relativ frühzeitig (22-64 wpi) AIDS entwickelten zeigten dabei eine höhere A3G- und A3F-Expression als jene, die später im Infektionsverlauf an AIDS erkrankten (80-155 wpi) (siehe Abbildung 3.13 C und D).

### 3.2.7 Krankheitsverlauf und APOBEC3-Expression

Tiere mit einer hohen APOBEC3-Expression überlebten länger (LTNPs; siehe Kapitel 3.2.4). Daher stellte sich die Frage, ob die APOBEC3-Werte prognostisch nutzbar sind. Hierzu wurde die APOBEC3-Expression in den PBMCs von 13 Tieren zu einem relativ frühen Zeitpunkt im Infektionsverlauf (11-62 wpi) untersucht. Acht dieser Tiere entwickelten innerhalb von drei Jahren AIDS (Progressoren) und hier (80-130 wpi) wurde ebenfalls die APOBEC3-Expression gemessen. Die ersten AIDS-Symptome traten frühesten 48 Wochen nach der ersten Messung auf. Fünf der Makaken überlebten symptomfrei über drei Jahre mit einer geringen Virusbelastung ( $< 10^4$  RNA-Kopien pro ml Plasma) und sind damit typische Langzeitüberlebende (LTNPs). Hier erfolgte die zweite APOBEC3-Messung drei Jahre nach Infektion. Die zu späteren Zeiten ermittelte Transkription wurde mit den Werten aus der früheren Phase verglichen und in der Abbildung 3.14 dargestellt. Die Daten wurden mit Wilcoxon gepaartem T-Test ausgewertet.

Bei den Progressoren kam es zur Reduktion der A3G- und A3F-Expression zwischen beiden Messzeitpunkten (Abbildung 3.14 A und B; jeweils  $p < 0,05$ ). Makaken, die sich zu LTNPs entwickelten, zeigten dagegen eine signifikante Zunahme der APOBEC3-Transkription (Abbildung 3.14 A;  $p < 0,05$ ). Vergleicht man allerdings die APOBEC3-Expression bei AIDS-Tieren und LTNPs zu den frühen Messwerten, gab es keine signifikanten Unterschiede. Obwohl diese Tiere später einen so unterschiedlichen Krankheitsverlauf zeigten, konnte anhand dieses ersten Messwertes keine Vorhersage über das weitere Krankheitsgeschehen gemacht werden. Allerdings gab es frühzeitig bereits Unterschiede in der Virusbelastung. So hatten die Progressoren zum frühen

Messzeitpunkt (11-62 wpi) eine höhere Viruslast als die LTNPs. Später im Krankheitsverlauf kam es dann zu deutlichen Unterschieden in der A3G- und A3F-Expression zwischen den AIDS-Tieren und den LTNPs. Im Vergleich zu den LTNPs, wurde eine verringerte APOBEC3-Expression in immundefizienten Makaken gefunden (Abbildung 3.14 A und B). Wahrscheinlich kam es in einem nicht genauer abgrenzbaren Zeitintervall zwischen 62 und 156 Wochen nach Infektion zum Anstieg der APOBEC3-Expression bei den LTNPs. Im Unterschied dazu steht die beobachtete Reduktion der APOBEC3-Expression bei Progressoren.



**Abb. 3.14 Die APOBEC3-Expression im Krankheitsverlauf für die PBMCs**

A) A3G-Expression in 8 Affen, die AIDS entwickelten und in 5 Tieren, die LTNPs wurden

B) A3F-Expression in 6 Affen, die AIDS entwickelten und in 5 Tieren, die LTNPs wurden

Früher Messwert: 11-62 wpi; späterer Messwert: 80-130 wpi bei AIDS bzw. > 156 wpi bei LTNPs.

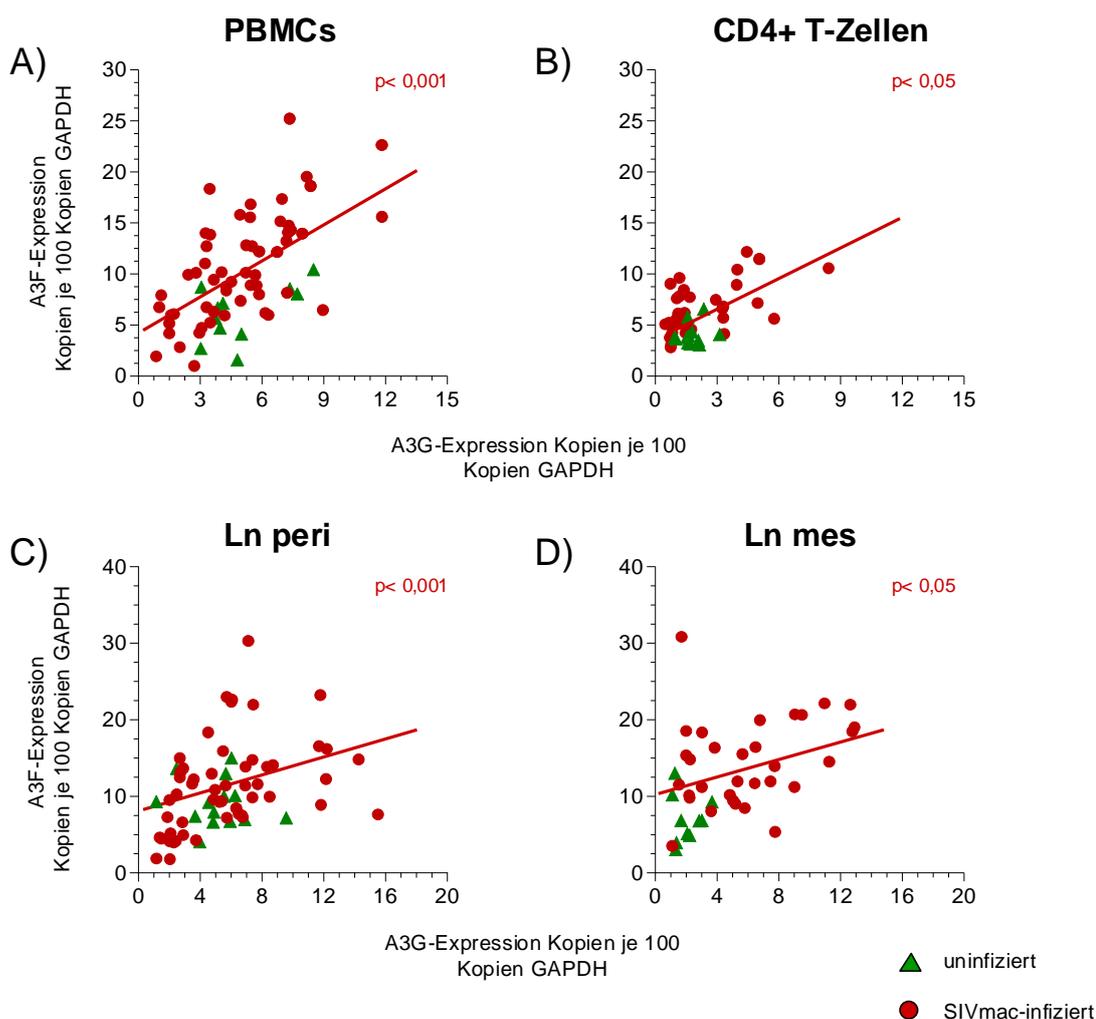
Frühester Zeitpunkt bis zum Auftreten ersten AIDS-Symptome 48 Wochen nach frühem Messwert.

Späterer Messwert bei den LTNPs mindestens 86 Wochen nach früher Messung

Die Querbalken und die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt nach Wilcoxon gepaartem T-Test (\*  $p < 0,05$ ). Angegeben ist der Medianwert.

### 3.2.8 Korrelation der A3G- und A3F-Expression

Die vergleichbaren Veränderungen der Expression von A3G und A3F in den infizierten Tieren legen eine gemeinsame Regulation der Transkription nahe. Einen Hinweis darauf liefert eine Korrelationsanalyse beider Gene. Dazu wurden am gleichen Tier die Expression beider APOBEC3-Gene in den peripheren Blutzellen sowie in den Lymphknoten verglichen (Abbildung 3.15).



**Abb. 3.15 Korrelation der A3G- und A3F-Expression**

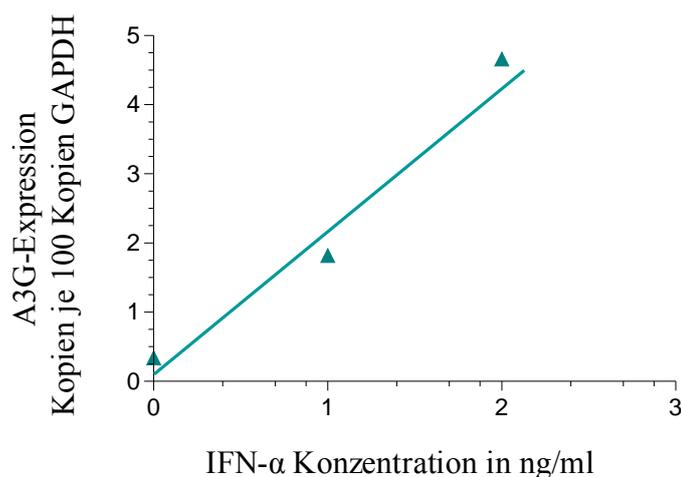
A) Korrelation in den PBMCs und B) in den CD4+ T-Lymphozyten

C) Korrelation in den peripheren (Ln peri) und D) in den mesenterialen (Ln mes) Lymphknoten

Signifikanzniveau  $p$  aus der Spearman-Korrelationsanalyse wurde für die infizierten Tiere angegeben.

In uninfizierten Rhesusaffen wurde keine Korrelation zwischen der A3G- und A3F-Expression gefunden. Bei Betrachtung infizierter Tiere zeigten Makaken mit erhöhter A3G-Expression auch eine höhere A3F-Expression. Eine positive Korrelation beider APOBEC3-Gene konnte für die infizierten Tiere in den PBMCs ( $p < 0,001$ ), CD4+ T-Lymphozyten ( $p < 0,05$ ) sowie in beiden Lymphknotenregionen (Ln peri  $p < 0,001$  und Ln mes  $p < 0,05$ ) beobachtet werden (Abbildung 3.15 A-D). Diese Korrelation könnte auf eine Regulation durch infektionsspezifische Faktoren hinweisen. So ein Faktor kann z.B. das im Infektionsverlauf produzierte Interferon (IFN) darstellen. Hinzu kommt, dass beide APOBEC3-Gene im Promotorbereich sogenannte Interferon-Response-Elemente (ISRE) aufweisen (Chen et al, 2006b). Des Weiteren bestätigten *in vitro* Analysen bereits einen Einfluss von Interferon auf die A3G-/A3F-Expression

(Chen et al., 2006b; Peng et al., 2006). Dieser Effekt von IFN- $\alpha$  auf die A3G-Expression sollte bei den Rhesusaffen bestätigt werden. Hierzu wurden adhärenente Monozyten (siehe Kapitel 2.2.4) mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml Human Interferon-Alpha für 4 h im Inkubator kultiviert. Parallel dazu wurde eine unstimulierte Kontrollprobe angesetzt. Die aus den Zellen gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 2.2.7) und die A3G-Genexpression im Bezug zum Haushaltsgen GAPDH mit real-time-PCR untersucht (siehe Kapitel 2.2.8).



**Abb. 3.16 A3G-Expression in Abhängigkeit von der Interferon- $\alpha$  Konzentration in Makrophagen**  
Adhärenente Monozyten aus Makaken wurden mit 0; 10 und 100 ng/ml IFN- $\alpha$  4 h im Inkubator kultiviert. Analyse der A3G-Expression mit real-time-PCR

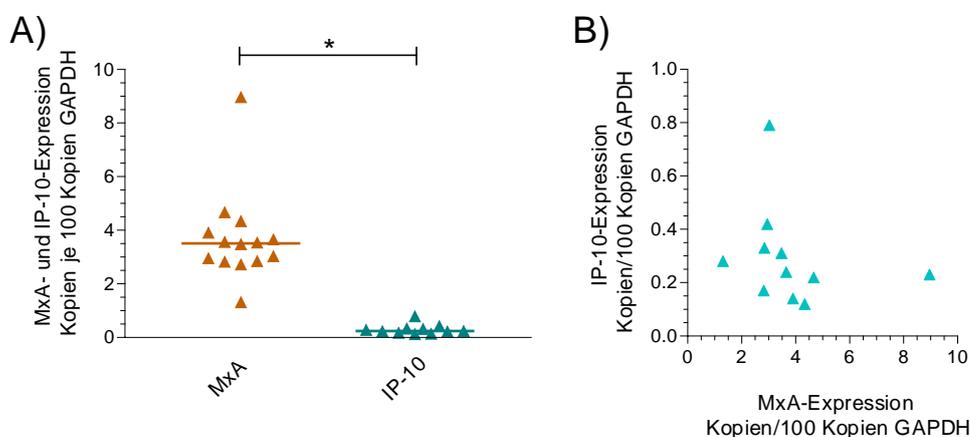
In der Abbildung 3.16 ist das Ergebnis eines solchen Stimulationsversuches dargestellt. Aufgetragen wurde die A3G-Expression gegen die IFN- $\alpha$  Konzentration für ein uninfiziertes Tier. Aus den Resultaten ergibt sich eine dosisabhängige Induktion der A3G-Expression. Damit konnte der *in vitro* Effekt von IFN- $\alpha$  auf die APOBEC3-Expression für Makaken bestätigt werden. Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, zwei interferonregulierte Gene zu quantifizieren und ihre Expression zusammen mit der APOBEC3-Expression *in vivo* während des Krankheitsverlaufs zu charakterisieren. Untersucht wurden hierzu das Typ-I-Interferon-induzierte Gen MxA (Myxovirus Resistance 1) sowie das Typ-II-Interferon-induzierte Gen IP-10/CXCL10 (Interferon-induced protein 10 kDa).

### 3.3 Charakterisierung der MxA- und IP-10-Expression

#### 3.3.1 Die MxA- und IP-10-Expression in uninfizierten Rhesusaffen

Die MxA- und IP-10-Genexpression wurde für die uninfizierten Makaken in PBMCs, CD4+ T-Zellen, CD14+ Monozyten sowie in den Zellen beider Lymphknotenregionen (Ln peri, Ln mes) gemessen. Das Expressionsniveau wurde auf 100 Kopien GAPDH bezogen.

Bei den uninfizierten Tieren konnte eine gegenüber der IP-10-Expression signifikant erhöhte MxA-Expression gefunden werden (Mann-Whitney-Test für die PBMCs, CD14+ Monozyten und beide Lymphknotenregionen jeweils  $p < 0,05$ ; für die CD4+ T-Lymphozyten  $p < 0,001$ ). Dieses Resultat ist in der Abbildung 3.17 A für die PBMCs veranschaulicht. Zum Ausschluss geschlechtsspezifischer Unterschiede wurde die Expressionsrate von männlichen und weiblichen Tieren verglichen. Dabei konnten keine Unterschiede in der MxA- und IP-10-Expression gefunden werden. Weiterhin gab es für die uninfizierten Tiere keine signifikante Korrelation zwischen der MxA- und der IP-10-Expression (siehe Abbildung 3.17 B).



**Abb. 3.17 Die MxA- und IP-10-Expression in den PBMCs uninfizierter Rhesusaffen**

A) Die MxA- und IP-10-Expression im Vergleich

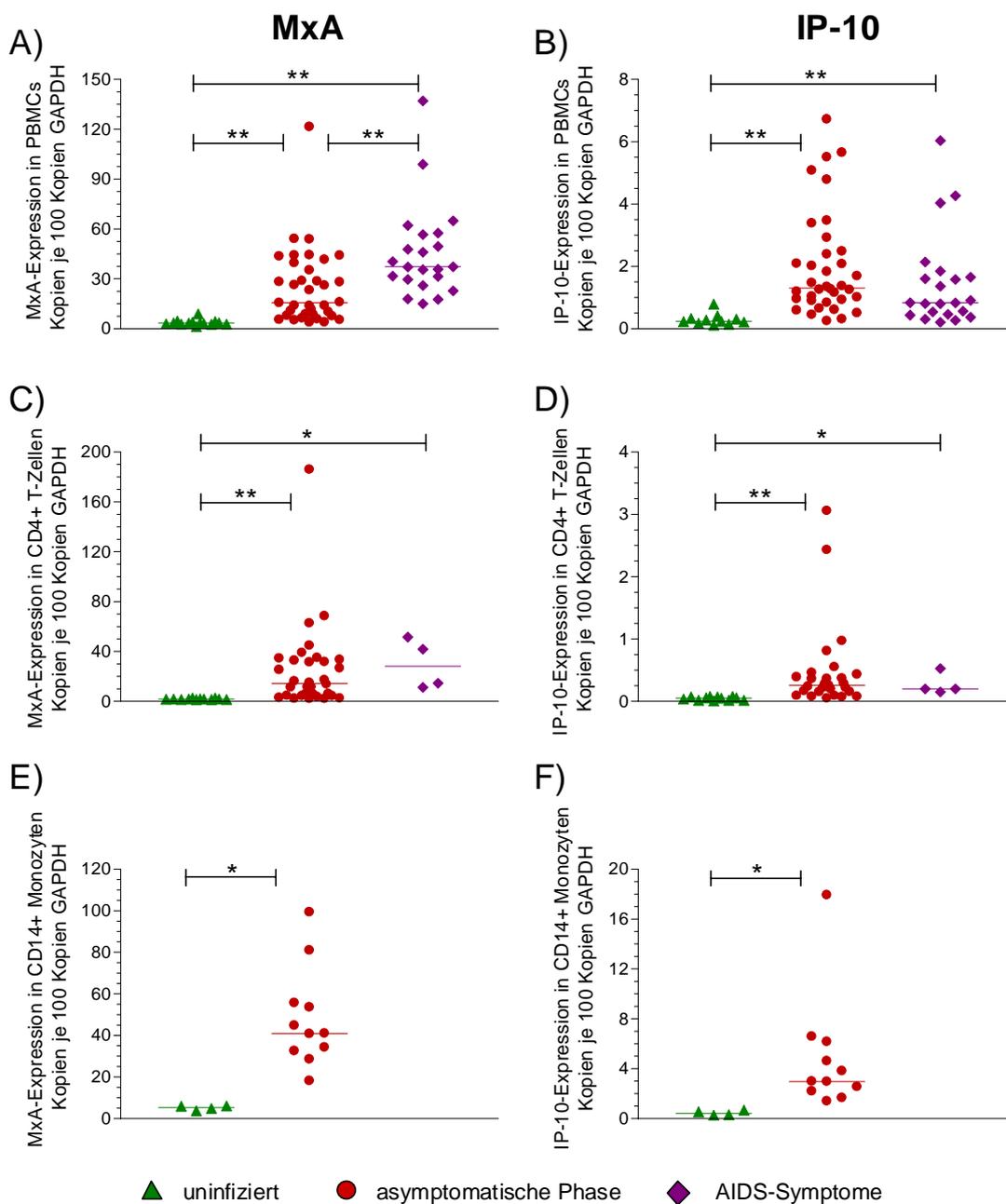
B) Korrelation zwischen der MxA- und IP-10-Expression

Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier, für MxA  $n = 14$  und für IP-10  $n = 11$ . Der Querbalken und der Stern kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt nach dem Mann-Whitney-Test ( $* p < 0,05$ ). Angegeben ist der Medianwert.

### 3.3.2 Die MxA- und IP-10-Expression in infizierten Rhesusaffen

Nach der Untersuchung beider Interferon-induzierter Gene für die uninfizierten Makaken erfolgte die Messung für die infizierten Tiere. Dabei handelte sich um dieselben Rhesusaffen, in denen zuvor die APOBEC3-Expression untersucht wurde (siehe Kapitel 3.2.2). Die MxA- und IP-10-Expression sollte in uninfizierten, asymptomatischen und AIDS-Tieren analysiert werden. Die Expression wurde zunächst für die PBMCs untersucht (Abbildung 3.18 A und B). Nach Isolation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten konnte die Expression auch in diesen Zelltypen bestimmt werden (Abbildung 3.18 C-F). Ebenso wurden die Transkription von MxA und IP-10 in den peripheren und mesenterialen Lymphknoten analysiert (Abbildung 3.19 A-D). Die Berechnung des Signifikanzniveaus erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. Es gab auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Virusisolaten. Die MxA- und IP-10-Transkription kann somit unabhängig vom inokulierten Virusstamm, Inokulationsweg und Geschlecht untersucht werden.

Bei den PBMCs kam es verglichen mit den Uninfizierten zum Anstieg von MxA und IP-10 in den asymptomatischen Tieren (Abbildung 3.18 A und B; jeweils  $p < 0,001$ ). Eine weitere Erhöhung der MxA-Expression im Vergleich zu den asymptomatischen Makaken wurde bei AIDS beobachtet (Abbildung 3.18 A;  $p < 0,001$ ). Ähnliche Resultate ergaben sich für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen und die CD14<sup>+</sup> Monozyten. Auch hier erhöhte sich die MxA- und IP-10-Transkription (Abbildung 3.18 C-F). Damit zeigten sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede zur APOBEC3-Expression. Vergleichbar mit den Ergebnissen der APOBEC3-Expression stieg die Expression Interferon-induzierter Gene bei SIV-infizierten Tieren in der asymptomatischen Phase an. Im Unterschied dazu kam es bei Tieren mit AIDS zur reduzierten APOBEC3-, aber zur erhöhten MxA-Expression. Die IP-10-Expression verhielt sich ähnlich (siehe dazu Abbildungen 3.4 und 3.18).



### Abb. 3.18 Die MxA- und IP-10-Expression im peripheren Blut

Vergleich zwischen uninfizierten, SIVmac-infizierten Tieren mit oder ohne AIDS Symptomen

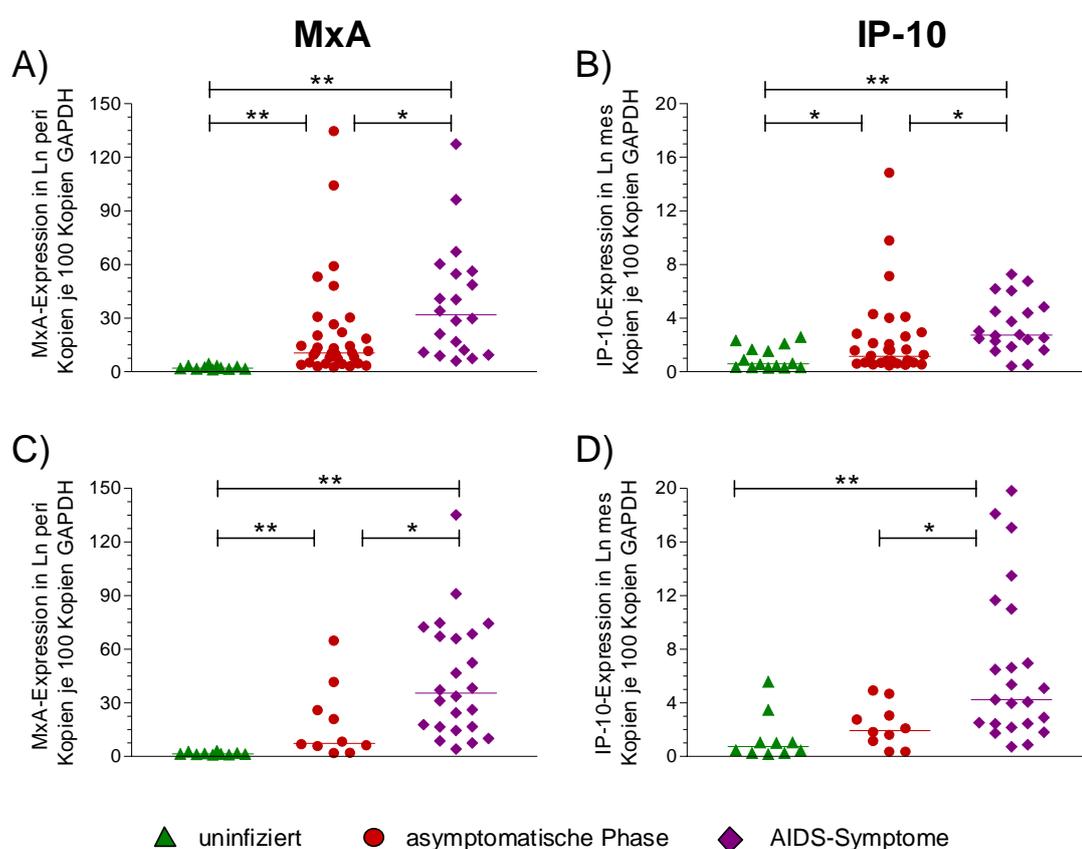
A) MxA- und B) IP-10-Expression in PBMCs

C) MxA- und D) IP-10-Expression in CD4+ T-Lymphozyten.

E) MxA- und F) IP-10-Expression in CD14+ Monozyten.

Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Der Querbalken und der Stern kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt nach dem Mann-Whitney-Test (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ). Angegeben ist der Medianwert.

Die Abbildung 3.19 veranschaulicht die Ergebnisse für die Lymphknoten. In diesen Regionen war analog zu den Blutzellen die MxA- und IP-10-Expression in den asymptomatischen Rhesusaffen erhöht. Ebenso stieg in diesen Zellen die MxA-Expression bei den AIDS-Tieren an (Abbildung 3.19, jeweils  $p < 0,05$ ). Damit ist die MxA-Expression in den peripheren Blutzellen und in den Lymphknoten vergleichbar. Im Unterschied zu den PBMCs zeigten die Lymphknoten eine erhöhte IP-10-Transkription bei AIDS ( $p < 0,05$ ; Abbildung 3.18 und 3.19). Die Expression der Interferon-induzierten Gene in den Lymphknoten ist mit der von APOBEC3 vergleichbar (siehe Abbildungen 3.5 und 3.19).



**Abb. 3.19 Die MxA- und IP-10-Expression im Lymphknoten**

Vergleich zwischen uninfizierten, SIVmac-infizierten Tieren mit oder ohne AIDS Symptomen

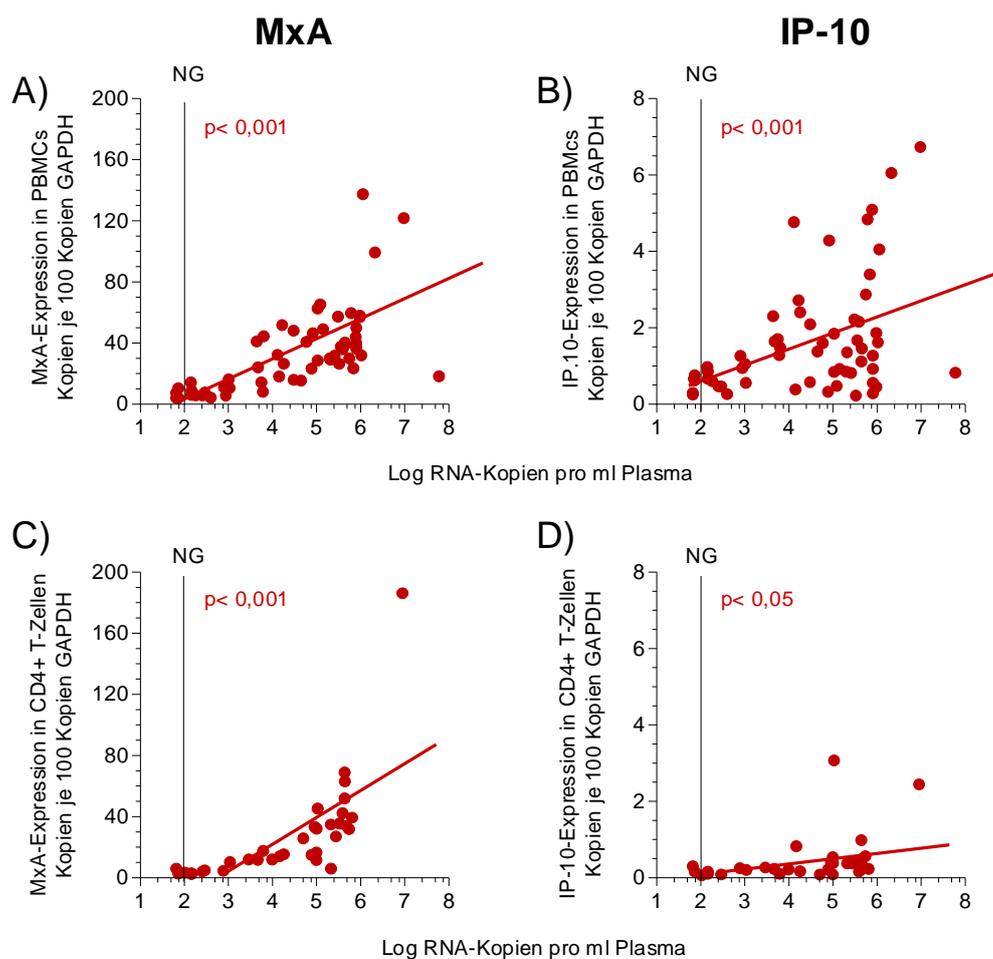
A) MxA- und B) IP-10-Expression in peripheren Lymphknoten (Ln peri).

C) MxA- und D) IP-10-Expression in mesenterialen Lymphknoten (Ln mes).

Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Der Querbalken und der Stern kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt nach dem Mann-Whitney-Test (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ). Angegeben ist der Medianwert.

### 3.3.3 Die MxA- und IP-10-Expression in Abhängigkeit von der Virusbeladung

Wie bereits im Kapitel 3.2.3 beschrieben, ist die Virusbeladung im Plasma ein aussagekräftiger prognostischer Marker für den Krankheitsverlauf. Sie korreliert negativ mit der Überlebensdauer der Tiere (siehe Abbildung 3.6). Da Interferone den Infektionsverlauf beeinflussen, sollte untersucht werden, ob die Virusbeladung von der Expression Interferon-induzierter Gene abhängt. Die Rhesusaffen befanden sich in verschiedenen Phasen der Infektion, einschließlich AIDS. Hinzu kamen auch Tiere, die zum Zeitpunkt der Messung keine nachweisbare Virusbeladung hatten ( $6,75 \times 10^1$  RNA-Kopien pro ml Plasma). Die individuellen Werte der Virusbeladung der restlichen Makaken lagen zwischen  $1,46 \times 10^2$  und  $6,2 \times 10^7$  RNA-Kopien pro Milliliter Plasma. Dabei handelte es sich wieder um die im Kapitel 3.2.3 beschriebenen Versuchstiere. Die Korrelation wurde für alle infizierten Tiere mit Spearman-Korrelationsanalyse ermittelt. Die Abbildung 3.20 zeigt die Korrelation zwischen MxA- bzw. IP-10-Expression und der Virusbeladung in PBMCs und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Für beide Zelltypen konnte eine positive Korrelation zur Virusbeladung gefunden werden (Abbildung 3.20 A-D), ebenso wie für CD14<sup>+</sup> Monozyten ( $p < 0,001$  für MxA), periphere Lymphknoten ( $p < 0,001$  für MxA und IP-10) und mesenteriale Lymphknoten ( $p < 0,001$  für MxA;  $p < 0,05$  für IP-10). Somit fanden sich bei Tieren mit einer hohen Virusbeladung eine erhöhte Expression von MxA und IP-10. Während eine negative Korrelation zwischen der APOBEC3-Expression und der Viruslast gefunden wurde (siehe Kapitel 3.2.3), ist die Expression von MxA- bzw. IP-10 parallel zur Virusbeladung erhöht und zeigt einen schnelleren Krankheitsverlauf zu AIDS an (Abbildung 3.20).



**Abb. 3.20 Korrelation der MxA- und IP-10-Expression mit der Virusbelastung im Plasma**

A) Korrelation der MxA-Expression mit der Viruslast in PBMCs n= 47

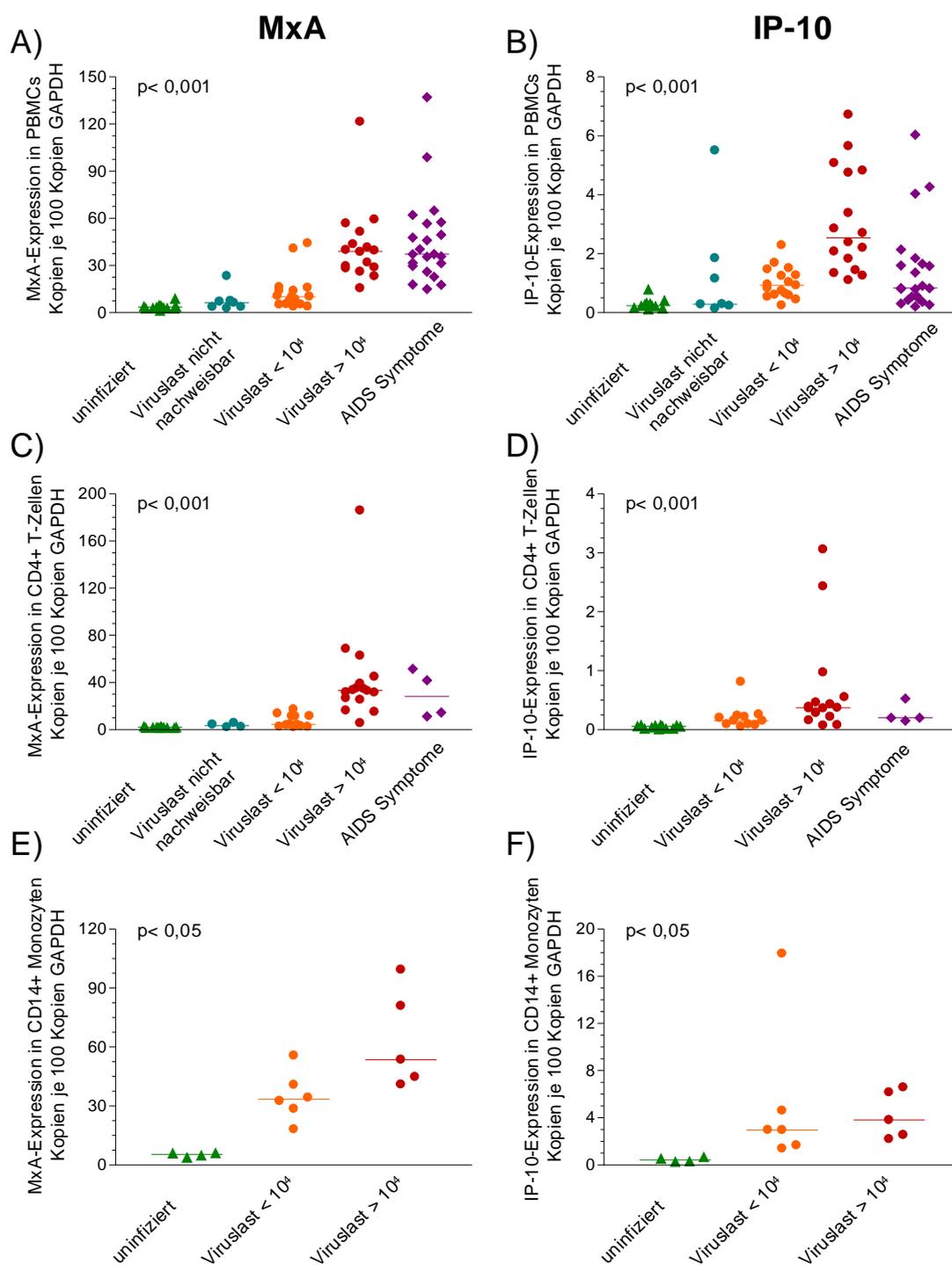
B) Korrelation der IP-10-expression mit der Viruslast in PBMCs n= 47

C) Korrelation der MxA-Expression mit der Viruslast in CD4+ T-Zellen n=32

D) Korrelation der IP-10-Expression mit der Viruslast in CD4+ T-Zellen n=30

Die Expression ermittelt in Kopien pro 100 Kopien GAPDH und aufgetragen gegen den Logarithmus der RNA-Kopien pro Milliliter (ml) Plasma. NG = Nachweisgrenze für die Virusbelastung ( $> 6,75 \times 10^1$  RNA-Kopien pro ml Plasma). Spearman-Korrelationskoeffizient, p gibt das Signifikanzniveau an.

Um die MxA- und IP-10-Expression bei einer bestimmten Virusbeladung genauer zu untersuchen, wurden die Tiere in Gruppen entsprechend ihrer Virusbeladung zum Zeitpunkt der Messung eingeteilt. Dabei wurde die Gruppierung aus Kapitel 3.2.3 für die PBMCs, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten übernommen: inokulierte Tiere, die zum Zeitpunkt der Messung keine nachweisbare Viruslast aufwiesen ( $6,75 \times 10^1$  RNA-Kopien pro ml Plasma), Makaken mit einer Virusbeladung von  $< 10^4$  RNA-Kopien pro ml Plasma und solche mit einer Viruslast  $> 10^4$  RNA-Kopien pro ml Plasma. Separat davon wurden die AIDS-Tiere betrachtet (Abbildung 3.21). Die Expression für die Lymphknoten wurde mit einer anderen Einteilung untersucht (siehe Kapitel 3.3.5). Die Ergebnisse wurden mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn-Test ausgewertet. Obwohl die Mediane signifikant variieren, ergab die Varianzanalyse zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Wie aus Abbildung 3.20 hervorgeht, zeigten Tiere mit einer hohen Virusbeladung tendenziell eine höhere MxA- und IP-10-Expression. Dieser Zusammenhang konnte in allen Zelltypen des peripheren Blutes gefunden werden (Abbildung 3.21). In den PBMCs der AIDS-Tiere fanden sich, vergleichbar mit asymptomatischen Makaken (Viruslast beider Gruppen  $> 10^4$  RNA-Kopien), eine erhöhte MxA-Expression (Abbildung 3.21 A). Für die asymptomatischen Tiere mit hoher Virusbeladung konnte auch eine hohe IP-10-Expression gefunden werden. Im Unterschied dazu zeigten AIDS-Tiere, die ebenfalls eine hohe Virusbeladung aufwiesen (zwischen  $1,5 \times 10^4$  und  $6,2 \times 10^7$  RNA-Kopien), eine niedrigere IP-10-Expression (Abbildung 3.21 B). Ein ähnliches Resultat ergab sich für die CD4<sup>+</sup> T-Zellen und für die CD14<sup>+</sup> Monozyten (Abbildung 3.21 C-F). Bei den AIDS-Tieren zeigten sich somit Unterschiede zwischen der MxA- und der IP-10-Expression. Die Werte für MxA waren in dieser Gruppe ähnlich hoch wie bei asymptomatischen Makaken mit einer hohen Virusbeladung ( $> 10^4$  RNA-Kopien pro ml Plasma). Im Unterschied dazu hatten die AIDS-Tiere eine verringerte Expression von IP-10 (Abbildung 3.21 A, B). Auch für APOBEC3 wurde eine reduzierte Expression für immundefiziente Rhesusaffen sowie für Makaken der asymptomatischen Phase mit hoher Virusbeladung gefunden (siehe Kapitel 3.2.3). Damit stehen die Resultate für die MxA- und IP-10-Expression im Kontrast zu den Daten der APOBEC3-Messungen (siehe Kapitel 3.2.3).



**Abb. 3.21 Die MxA- und IP-10-Expression in Abhängigkeit von der Virusbelastung im Plasma**

A) MxA- und B) IP-10-Expression in PBMCs

C) MxA- und D) IP-10-Expression in CD4+ T-Zellen

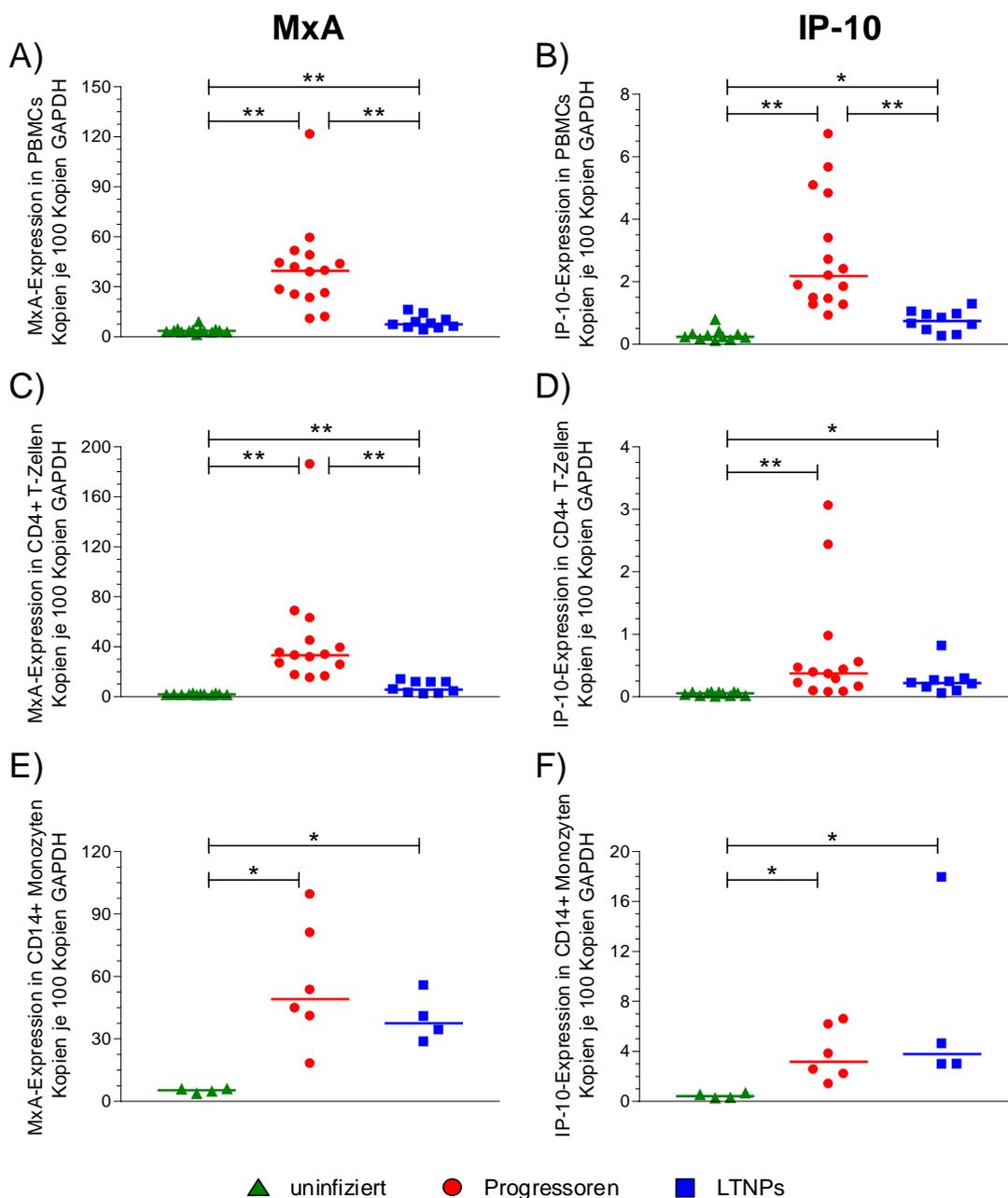
E) MxA- und F) IP-10-Expression in CD14+ Monozyten

Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test und als Signifikanzniveau  $p$  dargestellt. Angegeben ist der Medianwert.

### 3.3.4 Interferon-induzierte Gene und Überlebensdauer

Aufgrund der oben gezeigten positiven Korrelation zwischen MxA- bzw. IP-10-Expression und der Virusbeladung im Plasma entspricht eine hohe Expression dieser Gene einem prognostisch ungünstigen Krankheitsverlauf mit rascher Entwicklung zu AIDS. Um detaillierte Informationen über einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression der Interferon-induzierten Gene und dem Krankheitsverlauf zu bekommen, wurden die Versuchstiere anhand ihrer Überlebensdauer in Gruppen eingeteilt, wie unter 3.2.4 beschrieben. Es wurden Tiere aus der asymptomatischen Phase, die innerhalb von drei Jahren nach Infektion AIDS entwickelten (Progressoren) mit denen verglichen, die zum Zeitpunkt der Messung bereits länger als drei Jahre ohne Anzeichen einer Erkrankung überlebten (LTNPs). Die MxA- und IP-10-Expression wurde für die PBMCs, CD4+ T-Lymphozyten und CD14+ Monozyten (Abbildung 3.22), sowie für die Zellen der peripheren Lymphknoten (Abbildung 3.23) getrennt betrachtet. Die Progressoren zeigten einen signifikanten Anstieg der MxA- und IP-10-Transkription (siehe Abbildung 3.22 A und B; Mann-Whitney-Test; jeweils  $p < 0,001$ ). Dagegen war die Expression beider Interferon-induzierter Gene bei den LTNPs deutlich niedriger. Im Vergleich zu den Uninfizierten zeigten aber auch diese Tiere eine erhöhte MxA- und IP-10-Expression (Abbildung 3.22 A und B;  $p < 0,001$  für MxA;  $p < 0,05$  für IP-10). Ähnliche Resultate ergaben sich für die CD4+ T-Zellen und CD14+ Monozyten. In diesen Zelltypen wurde die höchste Expression auch bei den Progressoren gefunden und die Resultate bei den LTNPs sind mit denen der PBMCs vergleichbar (Abbildung 3.22 C-F).

Die Ergebnisse für die peripheren Lymphknoten sind in der Abbildung 3.23 veranschaulicht. Tiere mit progressivem Krankheitsverlauf hatten auch hier eine signifikant erhöhte MxA- und IP-10-Expression ( $p < 0,001$  für MxA;  $p < 0,05$  für IP-10). Die MxA-Expression bei den LTNPs war im Vergleich zu den Uninfizierten ebenfalls angestiegen (Abbildung 3.23 A;  $p < 0,05$ ). Für die IP-10-Expression war dieser Effekt bei den LTNPs aber nicht signifikant (Abbildung 3.23 B).



**Abb. 3.22 Die Expression der Interferon-induzierten Gene in Tieren mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf im Blut**

Vergleich zwischen Uninfizierten, Progressoren und LTNPs

A) MxA-Expression in PBMCs, (n = 14 Uninfizierte; n = 15 Progressoren; n = 10 LTNPs).

B) IP-10-Expression in PBMCs (n = 11 Uninfizierte; n = 15 Progressoren; n = 10 LTNPs).

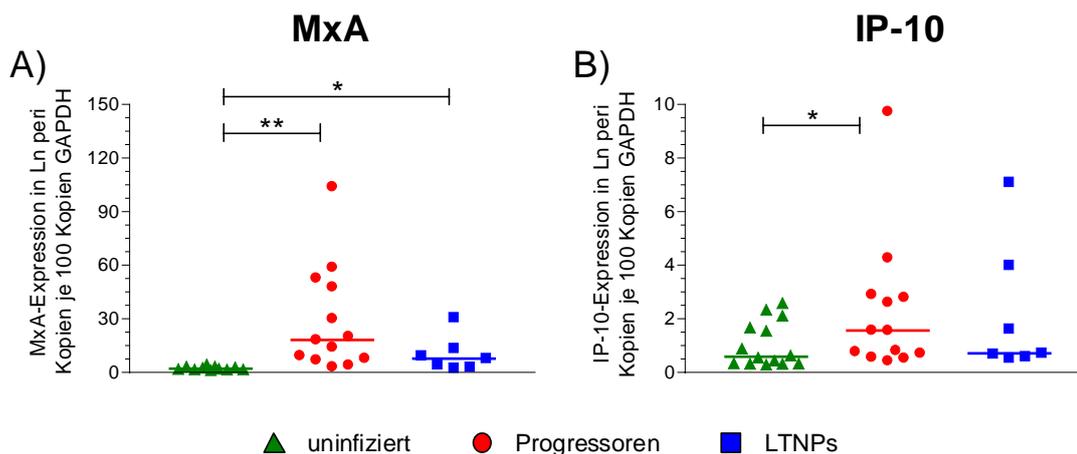
C) MxA-Expression in CD4+ T-Zellen (n = 12 Uninfizierte; n = 14 Progressoren; n = 10 LTNPs).

D) IP-10-Expression in CD4+ T-Zellen (n = 12 Uninfizierte; n = 14 Progressoren; n = 10 LTNPs).

E) MxA-Expression in CD14+ T-Zellen (n = 4 Uninfizierte; n = 6 Progressoren; n = 4 LTNPs).

F) IP-10-Expression in CD14+ T-Zellen (n = 4 Uninfizierte; n = 6 Progressoren; n = 4 LTNPs).

Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Die Querbalken und die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt nach dem Mann-Whitney-Test (\* p < 0,05; \*\* p < 0,001). Angegeben ist der Medianwert.



**Abb. 3.23 Die Expression der Interferon-induzierten Gene in Tieren mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf im peripheren Lymphknoten (Ln peri)**

Vergleich zwischen Uninfizierten, Progressoren und LTNPs

A) MxA-Expression, (n = 11 Uninfizierte; n = 13 Progressoren; n = 7 LTNPs).

B) IP-10-Expression (n = 14 Uninfizierte; n = 13 Progressoren; n = 7 LTNPs).

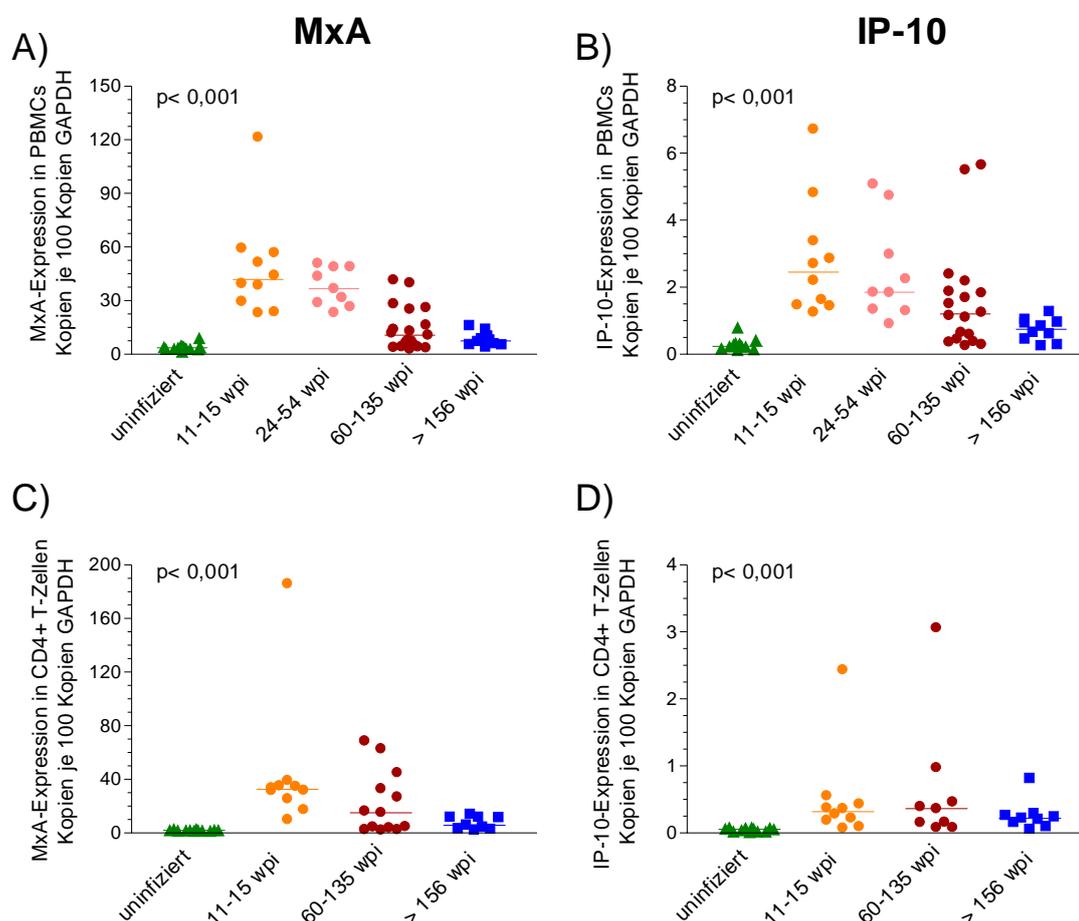
Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Die Querbalken und die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt nach dem Mann-Whitney-Test (\* p < 0,05; \*\* p < 0,001). Angegeben ist der Medianwert.

Es gab keine Unterschiede bei der MxA- und IP-10-Expression in den peripheren Blutzellen und in den Zellen der Lymphknoten. Die Ergebnisse für die MxA- und IP-10-Expression verdeutlichen allerdings noch einmal den Gegensatz zur A3G- und A3F-Expression. Letztere war für alle untersuchten Zelltypen bei den LTNPs deutlich erhöht und stand im Zusammenhang mit einer niedrigeren Virusbeladung in diesen Tieren (siehe Kapitel 3.2.4). Im Unterschied dazu zeigten Rhesusaffen, die AIDS entwickelten (Progressoren) eine erhöhte MxA- und IP-10-Expression. Dagegen war die Expression beider Interferon-induzierter Gene bei den LTNPs deutlich reduziert.

### 3.3.5 Die MxA- und IP-10-Expression im Zeitverlauf

Im Kapitel 3.3.4 wurde gezeigt, dass die MxA- und IP-10-Expression in den Progressoren am höchsten ist. Hier sollte nun die MxA- und IP-10-Genexpression im zeitlichen Verlauf der Infektion untersucht werden. Dazu wurden wieder alle Versuchstiere aus der Querschnittsstudie in zeitlich definierte Gruppen eingeteilt. Die Tiere befanden sich zum Zeitpunkt der Messung noch in der asymptomatischen Phase und wurden genauso gruppiert wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben. Für PBMCs, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und periphere Lymphknoten: 11-15 wpi, 24-54 wpi, 60-135 wpi und > 156 wpi. Mesenteriale Lymphknoten: 24-54 wpi, Tiere, die früher (22-64 wpi) bzw. später AIDS (80-155 wpi) bekamen. Zusammen mit den uninfizierten Kontrolltieren ergab sich ein

Zeitverlauf. Die Ergebnisse wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn-Test ausgewertet. Obwohl die Mediane signifikant variierten (Kruskal-Wallis-Test), ergab die Varianzanalyse mit Dunn-Test keine Signifikanz zwischen den Gruppen.



**Abb. 3.24 Die MxA- und IP-10-Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf im Blut**

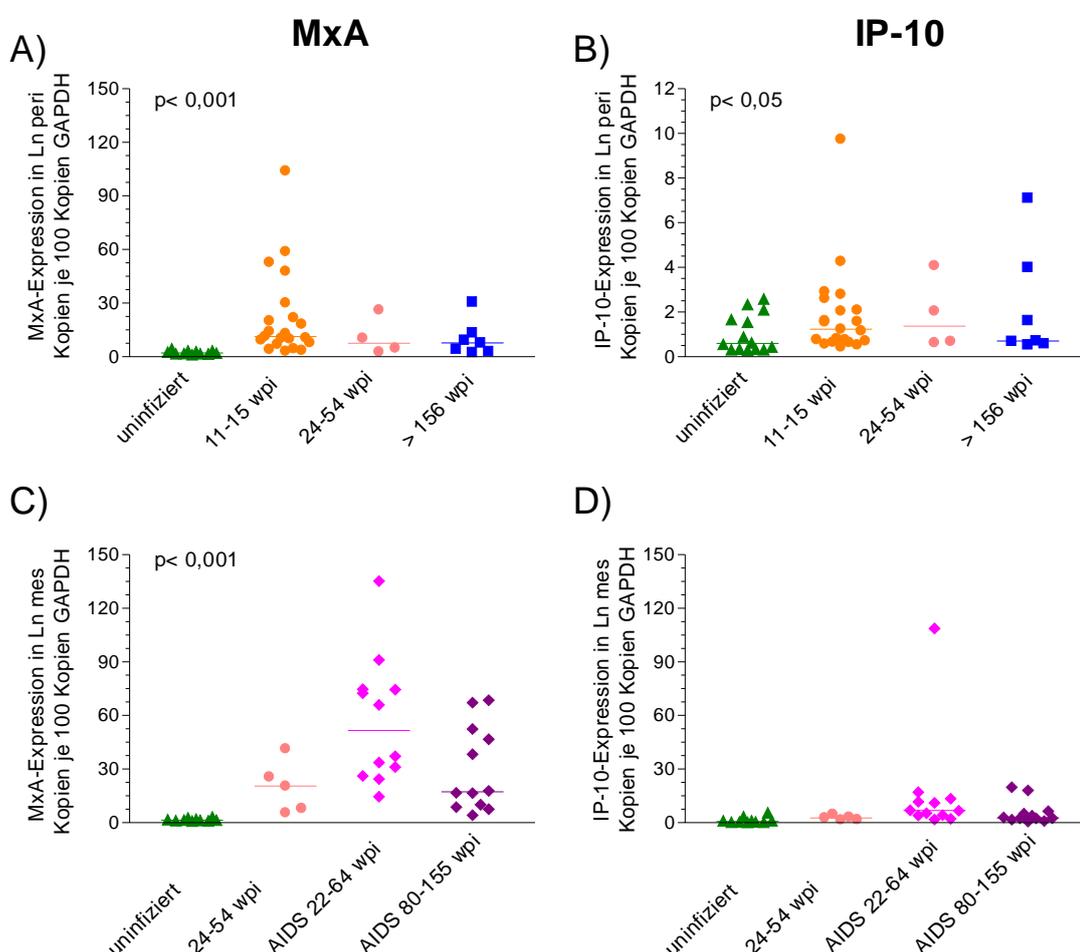
A) MxA- und B) IP-10-Expression in den PBMCs

C) MxA- und D) IP-10-Expression in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Gruppierung in Wochen nach Infektion (wpi). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test als Signifikanzniveau  $p$  dargestellt. Angegeben ist der Medianwert.

Für die PBMCs (siehe Abbildung 3.24) zeigte sich tendenziell früh nach Infektion (11-15 wpi) ein Anstieg der MxA- und IP-10-Expression. Ähnliches wurde für A3G und A3F zuvor gezeigt (siehe Kapitel 3.2.6). Über den gesamten Infektionsverlauf ergibt sich dann ein Trend zur Abnahme der MxA- und IP-10-Expression bei länger Infizierten, aber noch nicht erkrankten Makaken (24-54 wpi; 60-135 wpi). Auch in den Tieren, die im Zeitraum 60-135 wpi untersucht wurden, zeigte sich im Vergleich zu jenen aus früheren Infektionsphasen eine verringerte APOBEC3-Expression

(Abbildung 3.12 A). Die geringste MxA- und IP-10-Expression findet sich in den Tieren, die zu Zeitpunkt der Messung bereits über 156 wpi überlebten (Abbildung 3.24 A und B). Diese Tiere zeigten wiederum die höchste APOBEC3-Expression (Abbildung 3.12). Vergleichbare Resultate fanden sich bei den Messungen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und peripheren Lymphknoten (Abbildung 3.24 C und D; Abbildung 3.25 A und B). Hiermit sei erneut auf die unterschiedliche Expression von APOBEC3 und Interferon-induzierten Genen bei den LTNPs verwiesen. Auch in den AIDS-Tieren gab es Unterschiede. So zeigten diese immundefizienten Makaken eine erhöhte MxA-Expression (siehe Abbildung 3.18 A), aber eine reduzierte IP-10- und APOBEC3-Expression (Abbildung 3.18 B und Abbildung 3.4).



**Abb. 3.25 Die MxA- und IP-10-Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf im Lymphknoten**

A) MxA- und B) IP-10-Expression im peripheren Lymphknoten (Ln peri).

C) MxA- und D) IP-10-Expression im mesenterialen Lymphknoten (Ln mes).

Gruppierung in Wochen nach Infektion (wpi). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Tier. Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test als Signifikanzniveau p dargestellt. Angegeben ist der Medianwert.

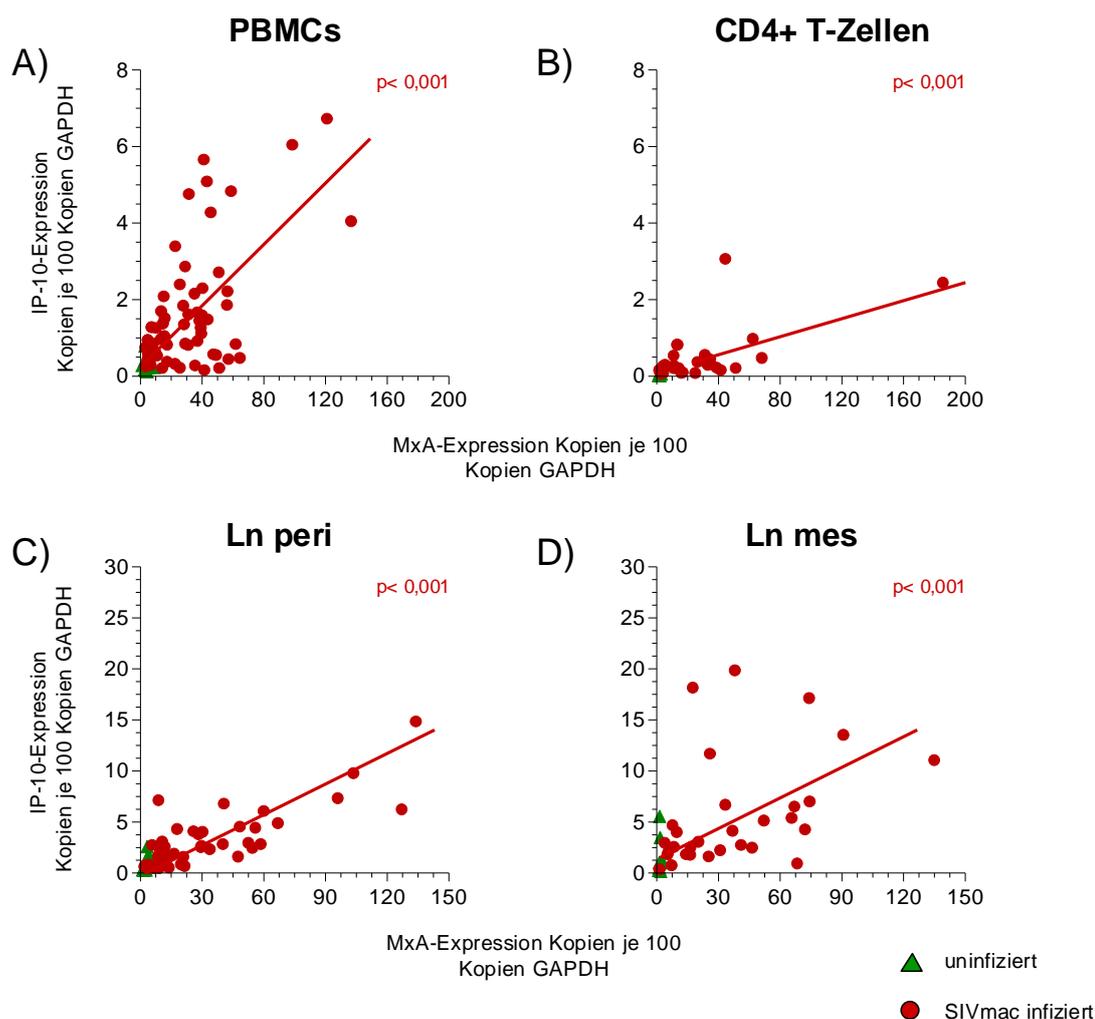
Da die Entnahmemöglichkeit mesenterialer Lymphknoten auf die Sektion begrenzt war, konnte hier keine Untersuchung der MxA- und IP-10-Expression bei den LTNPs erfolgen. Ähnlich, wie für die APOBEC3-Expression (Abbildung 3.13 C und D) zeigten Tiere, die relativ früh AIDS bekamen (22-64 wpi) eine höhere MxA-Expression als solche, die später erkrankten (80-155 wpi). Für die IP-10-Expression wurde ein solcher Unterschied nicht gefunden (Abbildung 3.25 D).

### 3.3.6 Korrelation der MxA- und IP-10-Expression

Sowohl die MxA- als auch die IP-10-Expression stiegen mit der Virusbeladung an. Eine Korrelationsanalyse kann einen Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen beiden Interferon-induzierten Genen geben. Dazu wurden die Expressionsniveaus der MxA- und der IP-10-Gene verglichen und die Signifikanz durch den Spearman-Korrelationskoeffizienten angegeben.

Bei den uninfizierten Makaken konnte keine Korrelation gefunden werden. Bei Betrachtung der infizierten Rhesusaffen ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression beider Interferon-induzierter Gene. Somit zeigten Tiere mit ansteigender MxA-Expression auch eine erhöhte IP-10-Expression (Abbildung 3.26). Die Korrelation konnte für die infizierten Tiere in den PBMCs ( $p < 0,001$ ), CD4+ T-Lymphozyten ( $p < 0,001$ ) und in den beiden Lymphknotenregionen ( $p < 0,001$ ) gezeigt werden (Abbildung 3.26 A-D). Ebenso gab es einen signifikanten Zusammenhang in den CD14+ Monozyten ( $p < 0,05$ ). Mit ansteigender Virusbeladung erhöhte sich auch die Expression der Interferon-induzierten Gene. Dieses zeigte, dass die Transkription des MxA-Gens und des IP-10-Gens ähnlich reguliert wird.

Korreliert man die MxA- bzw. IP-10-Expression zwischen den PBMCs und den peripheren Lymphknoten, ergab sich sogar für diese unterschiedlichen Regionen ein direkter Zusammenhang (Spearman-Korrelationskoeffizient  $p < 0,05$ ), der auf eine koordinierte Expression Interferon-induzierter Gene in beiden Geweben hinweist.



**Abb. 3.26 Korrelation der MxA- und IP-10-Expression**

A) Korrelation in PBMCs und B) in CD4+ T-Lymphozyten

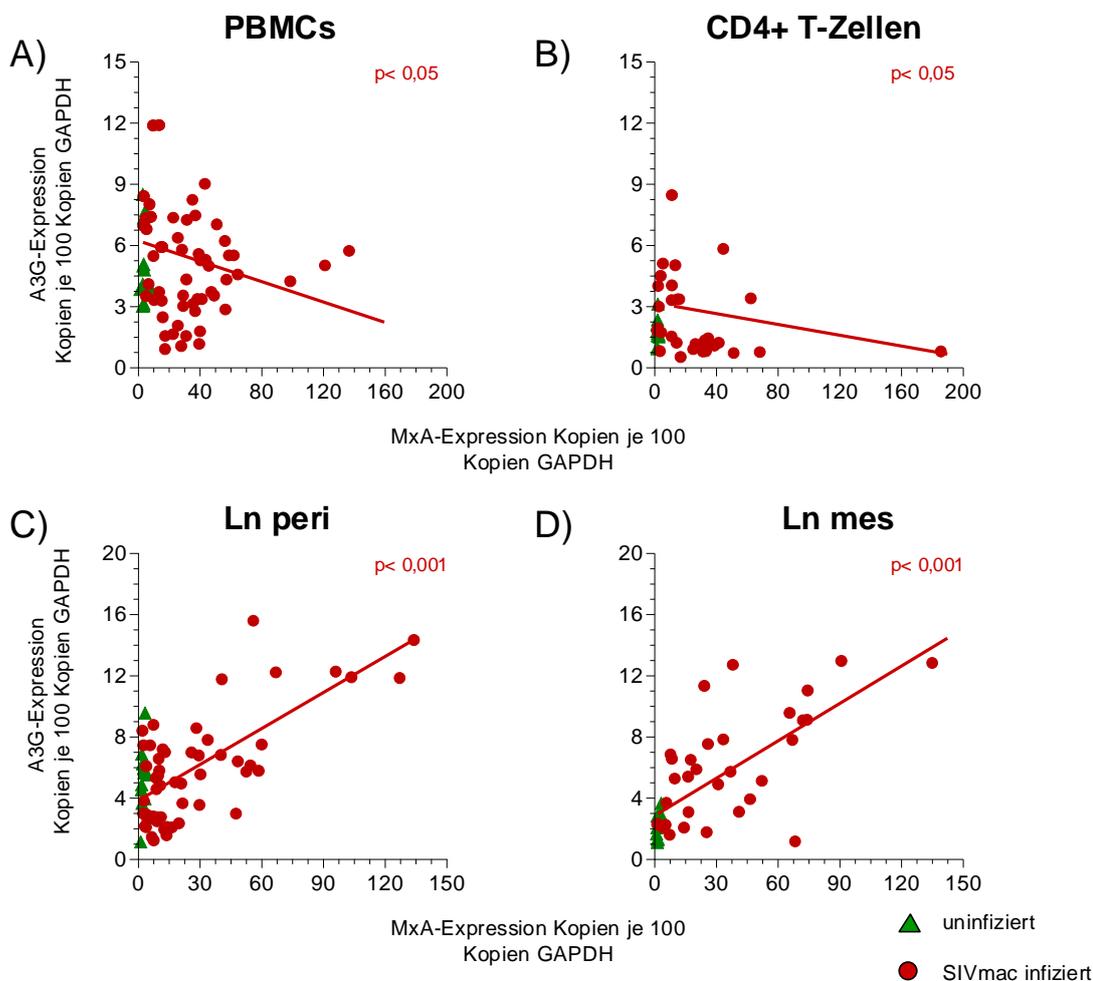
C) Korrelation in peripheren (Ln peri) und D) in mesenterialen Lymphknoten (Ln mes)

Signifikanzniveau  $p$  aus der Spearman-Korrelationsanalyse wurde für die infizierten Tiere angegeben.

### 3.4 Interferon-induzierte Gene und APOBEC3

Um nun den Zusammenhang zwischen Typ-I-Interferonen und APOBEC3 darzustellen, wurde die MxA-Expression mit der A3G-Expression korreliert. In der Abbildung 3.27 sind die Ergebnisse für die PBMCs, die CD4+ T-Zellen und die Zellen peripherer und mesenterialer Lymphknoten veranschaulicht. Dabei gab es für die peripheren Blutzellen eine signifikante negative Korrelation zwischen der MxA- und der A3G-Expression (Abbildung 3.27 A und B; jeweils  $p < 0,05$ ). In den Lymphknoten dagegen zeigten Tiere mit höherer A3G-Expression auch eine erhöhte MxA-Expression (Abbildung 3.27 C und D; jeweils  $p < 0,001$ ). In der Abbildung 3.28 sind die Resultate der Korrelationsanalysen zwischen der A3F- und der MxA-Expression dargestellt. Ähnlich wie zuvor für A3G gezeigt, gab es auch zwischen der A3F- und der MxA-Expression

eine negative Korrelation für die PBMCs und die CD4+ T-Lymphozyten (Abbildung 3.28 A und B; jeweils  $p < 0,05$ ). Auch hier hatten Makaken mit hoher A3F-Expression eine erhöhte MxA-Expression in beiden Lymphknotenregionen (Abbildung 3.28 C und D; jeweils  $p < 0,001$ ). Dieser direkte Zusammenhang steht im Kontrast zu dem Geschehen im peripheren Blut.

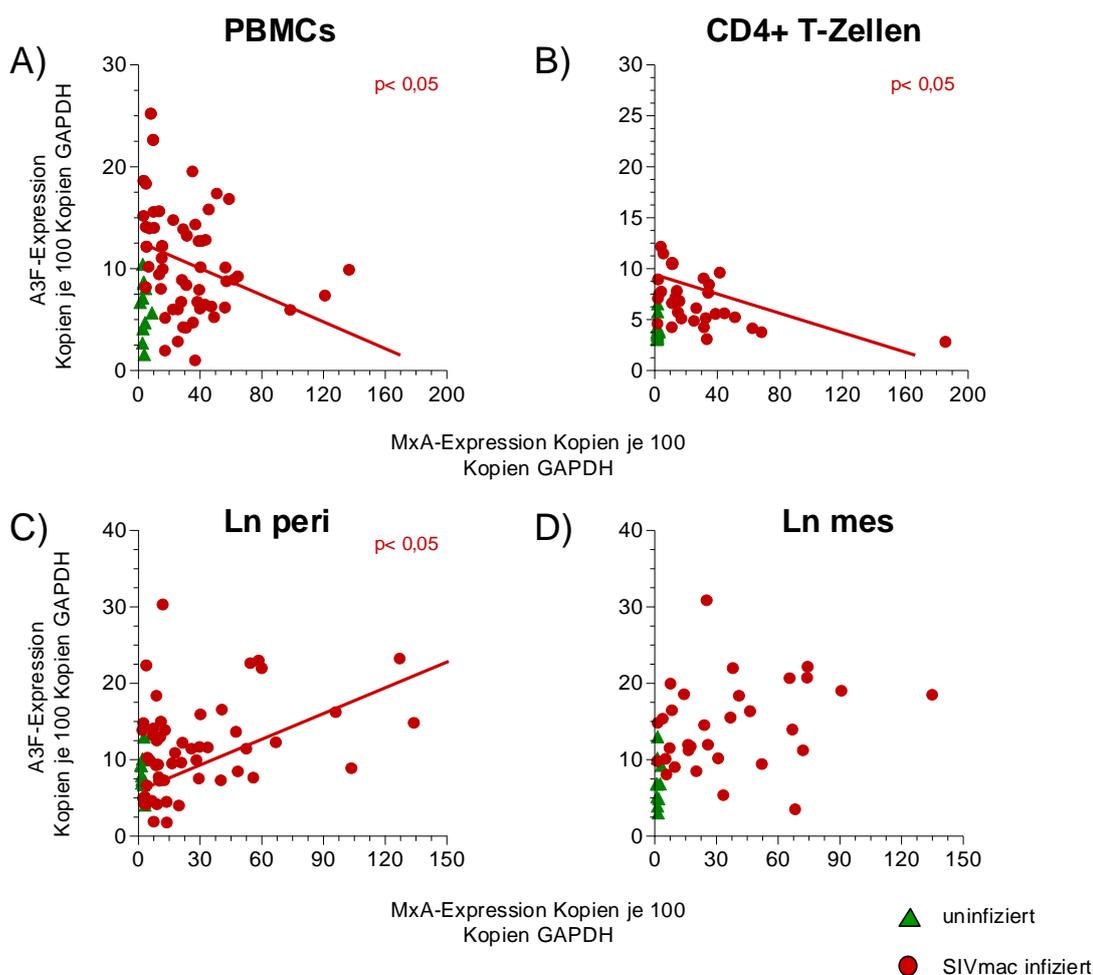


**Abb. 3.27 Korrelation der A3G- mit der MxA-Expression**

A) Korrelation in PBMCs und B) in CD4+ T-Lymphozyten

C) Korrelation in peripheren (Ln peri) und D) in mesenterialen Lymphknoten (Ln mes)

Signifikanzniveau  $p$  aus der Spearman-Korrelationsanalyse wurde für die infizierten Tiere angegeben.



**Abb. 3.28 Korrelation der A3F- mit der MxA-Expression**

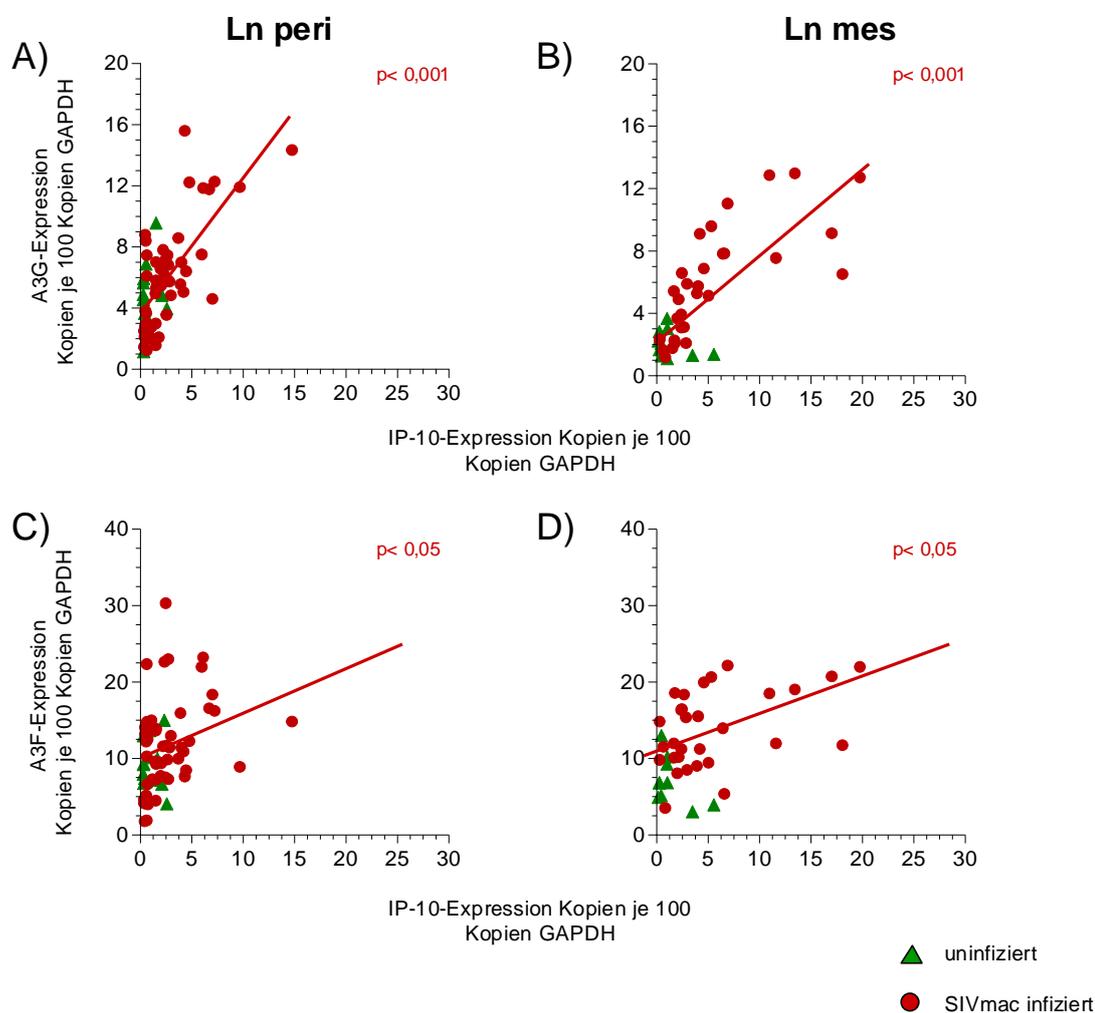
A) Korrelation in PBMCs und B) in CD4+ T-Lymphozyten

C) Korrelation in peripheren (Ln peri) und D) in mesenterialen Lymphknoten (Ln mes)

Signifikanzniveau  $p$  aus der Spearman-Korrelationsanalyse wurde für die infizierten Tiere angegeben.

Um einen Zusammenhang zwischen den Typ-II-Interferonen und APOBEC3 zu untersuchen, wurde die IP-10-Expression mit der A3G- bzw. A3F-Expression korreliert. Für alle infizierten Tiere zusammen konnte keine signifikante Korrelation in den PBMCs und den CD4+ T-Lymphozyten gefunden werden. Schließt man aber die AIDS-Tiere aus dieser Betrachtung aus, zeigte sich in den PBMCs eine negative Korrelation zwischen der IP-10- und der APOBEC3-Expression. Damit konnte zumindest für die PBMCs ein ähnlicher Zusammenhang zwischen IP-10 und APOBEC3 gefunden werden, wie zwischen MxA und APOBEC3 (Kapitel 3.4). In der Abbildung 3.29 sind die Ergebnisse dieser Korrelationsanalyse für die Lymphknoten dargestellt. Dabei konnte für beide Regionen eine positive Korrelation zwischen der IP-10- und der A3G-Expression gezeigt werden (Abbildung 3.29 A und B; jeweils  $p < 0,001$ ). Ebenfalls wurde eine solche Korrelation zwischen der IP-10- und der A3F-Expression gefunden

(Abbildung 3.29 C und D; jeweils  $p < 0,05$ ). Somit zeigten in den Lymphknoten die Interferon-induzierten Gene IP-10 und MxA ein im Bezug auf APOBEC3 ähnliches Verhalten.

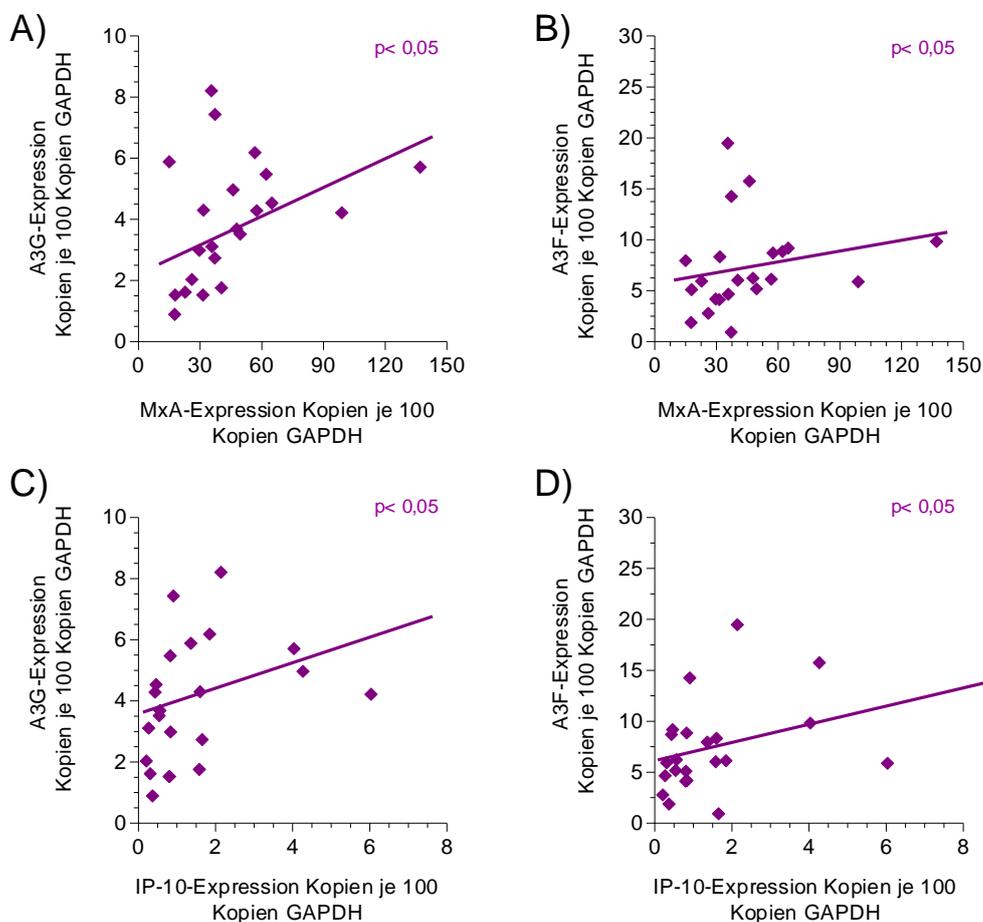


**Abb. 3.29 Korrelation der APOBEC3- mit der IP-10-Expression im Lymphknoten**

A) Korrelation mit der A3G-Expression in peripheren und B) in mesenterialen Lymphknoten  
 C) Korrelation mit der A3F-Expression in peripheren und D) in mesenterialen Lymphknoten  
 Signifikanzniveau  $p$  aus der Spearman-Korrelationsanalyse wurde für die infizierten Tiere angegeben.

Da Tiere, die zum Zeitpunkt der Messung bereits AIDS hatten, immunologisch einen Sonderfall darstellen, wurden die Korrelationsanalysen für diese Makaken hier noch einmal separat betrachtet (Abbildung 3.30 und 3.31). Dabei konnte für die AIDS-Tiere in den PBMCs ein direkter Zusammenhang zwischen der MxA- und der APOBEC3-Expression gefunden werden (Abbildung 3.30 A und B; jeweils  $p < 0,05$ ). Ebenfalls wurde eine direkte Korrelation zwischen der IP-10- und der APOBEC3-Expression beobachtet (Abbildung 3.30 C und D; jeweils  $p < 0,05$ ). Diese Resultate stehen im

Gegensatz zu der bereits gezeigten negativen Korrelation zwischen A3G und MxA, betrachtet für alle infizierten Rhesusaffen (Abbildung 3.27).



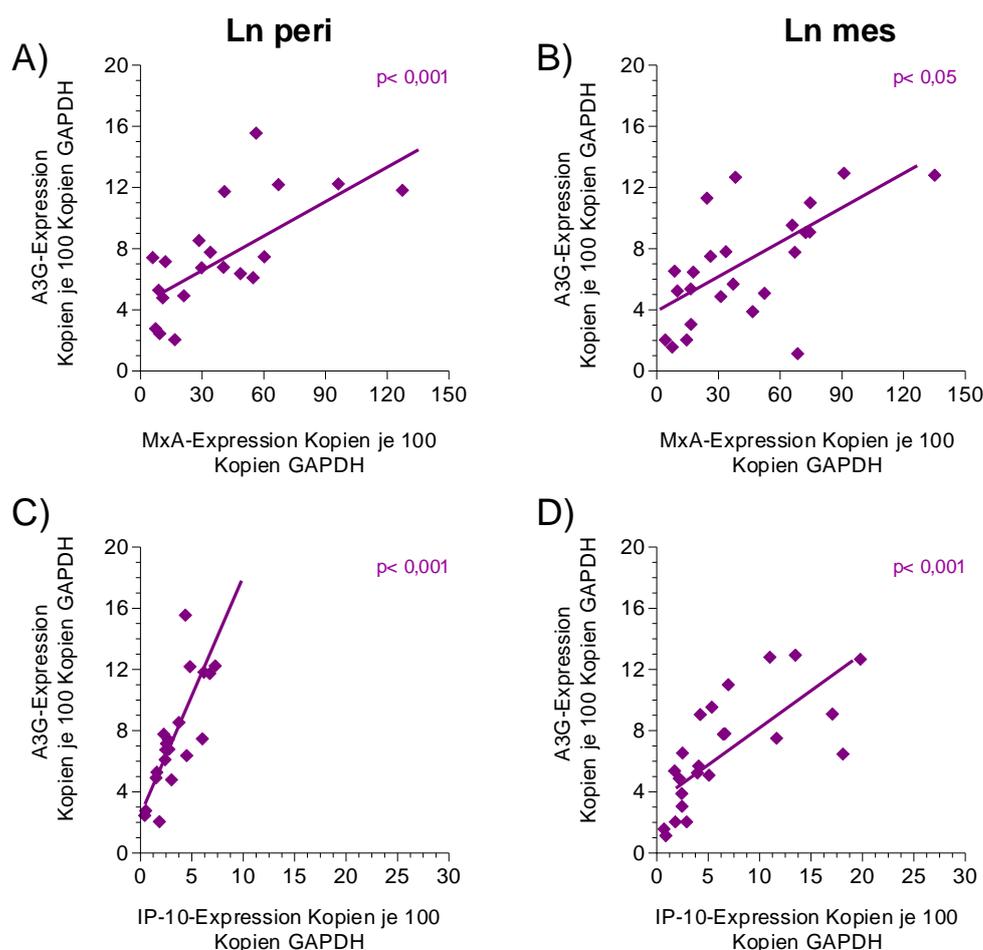
**Abb. 3.30 Korrelation für die AIDS-Tiere in den PBMCs**

A) Korrelation der MxA-Expression mit der A3G- und B) mit der A3F-Expression

C) Korrelation der IP-10-Expression mit der A3G- und D) mit der A3F-Expression

Signifikanzniveau  $p$  aus der Spearman-Korrelationsanalyse wurde für die AIDS-Tiere angegeben.

In den Lymphknoten konnte auch für die erkrankten Tiere eine positive Korrelation zwischen den Interferon-induzierten Genen und A3G berechnet werden (Abbildung 3.31), wobei die Messpunkte für die mesenterialen Lymphknoten im Wesentlichen bereits die AIDS-Tiere darstellten (siehe Abbildung 3,29 B und D). Für A3F konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden. Dennoch zeichnete sich eine vergleichbare Tendenz ab.



**Abb. 3.31 Korrelation für die AIDS-Tiere im Lymphknoten**

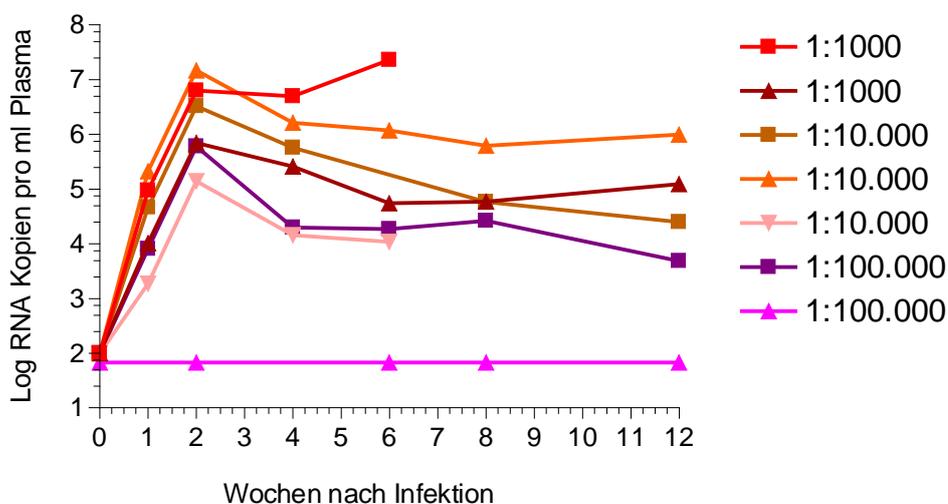
A) Korrelation der MxA- mit der A3G-Expression in peripheren und B) in mesenterialen Lymphknoten  
 C) Korrelation der IP-10- mit der A3G-Expression in peripheren und C) in mesenterialen Lymphknoten  
 Signifikanzniveau  $p$  aus der Spearman-Korrelationsanalyse wurde für die AIDS-Tiere angegeben.

### 3.5 Longitudinalstudie zur A3G- und MxA-Expression

Aus den Ergebnissen ergeben sich für die weiteren Untersuchungen folgende Fragen: Welche Mechanismen führen zum beobachteten Anstieg der APOBEC3-Expression bei den LTNPs? Besitzen diese Tiere schon von vornherein erhöhte Expressionsniveaus oder werden diese durch bestimmte infektionsspezifische Faktoren induziert? Wie verhält sich die APOBEC3-Expression über die Zeit und welche Rolle spielen dabei die Interferone? Um diesen Fragen nachzugehen, wurde in einer Zeitverlaufstudie die A3G-Expression vor und zu bestimmten Zeitintervallen nach Infektion zusammen mit der MxA-Expression untersucht.

### 3.5.1 Die zeitliche Entwicklung der Virusbeladung

Zur longitudinalen Untersuchung der A3G- und MxA-Expression wurden sieben Tiere intravenös mit SIVmac251 inokuliert. Dabei handelte es sich um eine *in vivo* Titrationsstudie. Zwei der Versuchstiere wurden mit einer hohen SIVmac251-Dosis 1:1000, drei Tiere mit 1:10.000 und zwei Tiere mit 1:100.000 inokuliert. Die Viruslast der Rhesusaffen wurde quantitativ als Anzahl viraler RNA-Kopien im Blutplasma durch die Arbeitsgruppe Immungenetik der Abteilung Infektionsbiologie unter Anleitung von Frau Dr. Sauermann ermittelt (Abbildung 3.32).



**Abb. 3.32 Die Anzahl viraler RNA-Kopien pro Milliliter Blutplasma im Zeitverlauf nach SIVmac251-Infektion**

Die virale RNA wurde aus 200  $\mu$ l Blutplasma isoliert und mittels QuantiTect Probe PCR-Kits (Qiagen) amplifiziert und detektiert. Auf diese Weise wurde der virologische Status der Makaken nach SIV-Inokulation ermittelt.

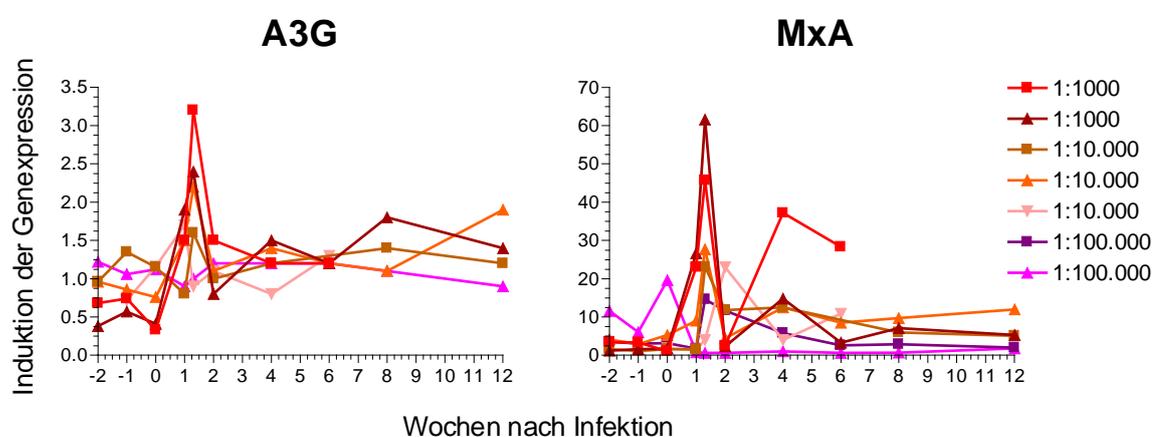
Bis auf ein Tier waren alle Versuchstiere nach Inokulation produktiv infiziert. Die Makaken wiesen zwei Wochen nach Infektion eine mittlere Viruslast von  $4,3 \times 10^6$  viralen Kopien pro Milliliter Blutplasma auf. Diese Virusbeladung reduzierte sich zur vierten Woche auf  $1,2 \times 10^4$  RNA-Kopien pro Milliliter Plasma. Der anschließende Verlauf der Viruslast war individuell unterschiedlich. 12 Wochen nach Inokulation lag die mittlere Virusbeladung bei  $2,9 \times 10^5$  viralen Kopien pro Milliliter Blutplasma.

Die Rhesusaffen wurden innerhalb von 30 Wochen nach Infektion euthanasiert. Keines der Tiere entwickelte bis zu diesem Zeitpunkt AIDS. Des Weiteren konnte keine Abhängigkeit zwischen der Inokulationsdosis und der Virusreplikation gefunden werden. Das nicht produktiv infizierte Versuchstier wurde mit der geringsten SIV-Dosis

inokuliert und es konnte zu keinem Zeitpunkt virale RNA im Blutplasma detektiert werden.

### 3.5.2 Der zeitliche Verlauf der A3G- und MxA-Expression

Aus der RNA von zu verschiedenen Zeiten isolierten PBMCs wurde die A3G- und MxA-Expression mit real-time-PCR ermittelt. Als Vergleichsproben dienten zu drei unabhängigen Terminen gewonnene PBMCs vor der Infektion. Die Expressionen beider Gene wurden longitudinal zu folgenden Zeitpunkten nach intravenöser SIVmac251-Applikation untersucht: eine Woche, zehn Tage, zwei, vier, sechs, acht und zwölf Wochen.



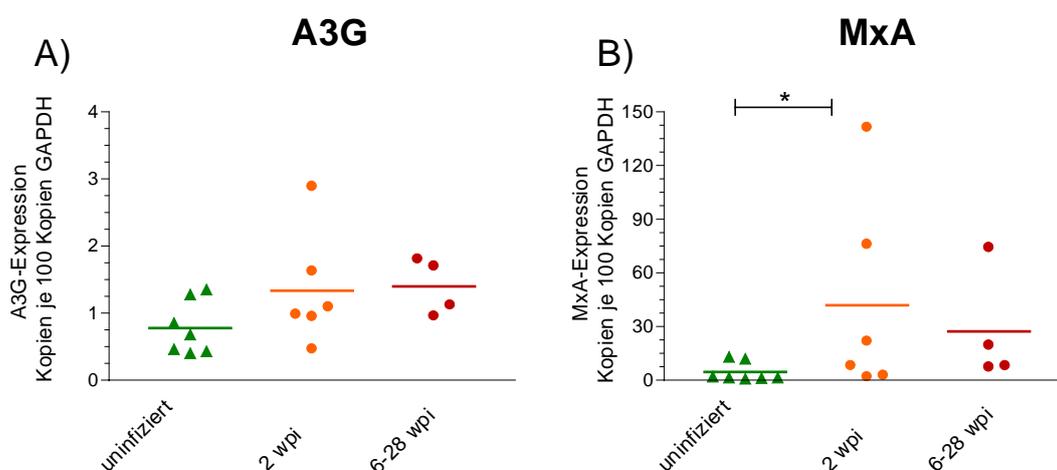
**Abb. 3.33 Die longitudinale A3G- und MxA-Expression in den PBMCs**

Die A3G-Expression (linkes Diagramm) und die MxA-Expression (rechtes Diagramm) betrachtet im Zeitverlauf. Die Normalisierung der Messwerte nach Inokulation erfolgte jeweils auf den Mittelwert der drei Vorinfektionswerte und ist als Induktion der Genexpression angegeben.

In Abbildung 3.33 sind neben den drei Vorinfektionswerten die Ergebnisse nach Inokulation gezeigt, jeweils auf den Mittelwert der Vorinfektionsdaten normalisiert und als Induktion der Genexpression angegeben. Dabei wurde auch das nicht infizierte Tier in die Auswertung eingeschlossen. Eine Woche nach Infektion konnte bei den infizierten Tieren, nicht aber bei den uninfizierten Makaken, ein Anstieg der A3G- und MxA-Expression beobachtet werden. Signifikant wurde dieser Unterschied allerdings erst nach zehn Tagen (Wilcoxon paariger T-Test,  $p < 0,05$ ). Die maximale Expression für beide Gene (Abbildung 3.33) zeigte sich kurz vor der Spitzenvirämie (zwei Wochen nach Infektion) (siehe Abbildung 3.32). Zwei Wochen nach Inokulation sank die Expression beider Gene wieder. Es gab keinen signifikanten Unterschied für die A3G-Expression zwischen den Vorinfektionswerten und den infizierten Tiere zwei Wochen bzw. vier bis 30 Wochen nach Infektion. Die MxA-Expression zu diesen Zeitpunkten

blieb allerdings im Vergleich zu den Uninfizierten erhöht (Wilcoxon paariger T-Test; jeweils  $p < 0,05$  zwei Wochen, sowie vier bis 30 Wochen nach Infektion). Betrachtet für die einzelnen Tiere ergeben sich somit in Abhängigkeit vom Infektionsverlauf und des Einflusses individueller Faktoren Unterschiede für die Genexpression nach Inokulation von SIVmac251.

Für einzelne Tiere konnte zu bestimmten Zeitpunkten im Krankheitsverlauf auch eine Analyse der A3G- und MxA-Expression in den peripheren Lymphknoten erfolgen (Abbildung 3.34). Unter Einbezug der Vorinfektionsdaten ergab sich hier ebenfalls ein Zeitverlauf. Im Vergleich zu diesen Vorinfektionswerten kam es zwei Wochen nach Infektion, um den Zeitraum der Spitzenvirämie, zum Anstieg der A3G- und der MxA-Expression (Wilcoxon gepaarter T-Test; jeweils  $p < 0,05$ ). Später im Infektionsverlauf (6-28 wpi) fiel die MxA-Transkription tendenziell wieder (Abbildung 3.34 B), wobei die A3G-Expression keine Änderung zu den zwei Wochen Werten zeigte (Abbildung 3.34 A). Innerhalb dieser frühen Zeitpunkte entsprachen damit die Resultate der peripheren Lymphknoten im Wesentlichen denen der PBMCs.

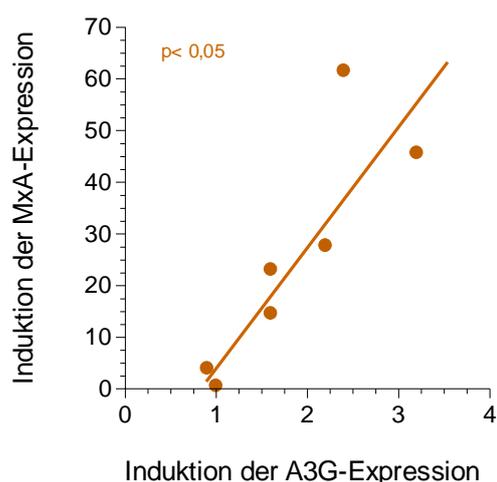


**Abb. 3.34 Die A3G- und MxA-Expression der peripheren Lymphknoten im Zeitverlauf**

A) A3G- und B) MxA-Expression jeweils vor Infektion ( $n = 7$ ); 2 wpi ( $n = 6$ ) und 6 bis 28 wpi ( $n = 4$ ) Berechnung der Signifikanz im Mann-Whitney-Test ( $* p < 0,05$ ). Angegeben ist der Medianwert.

### 3.5.3 Die Genexpression zum frühen Infektionszeitpunkt

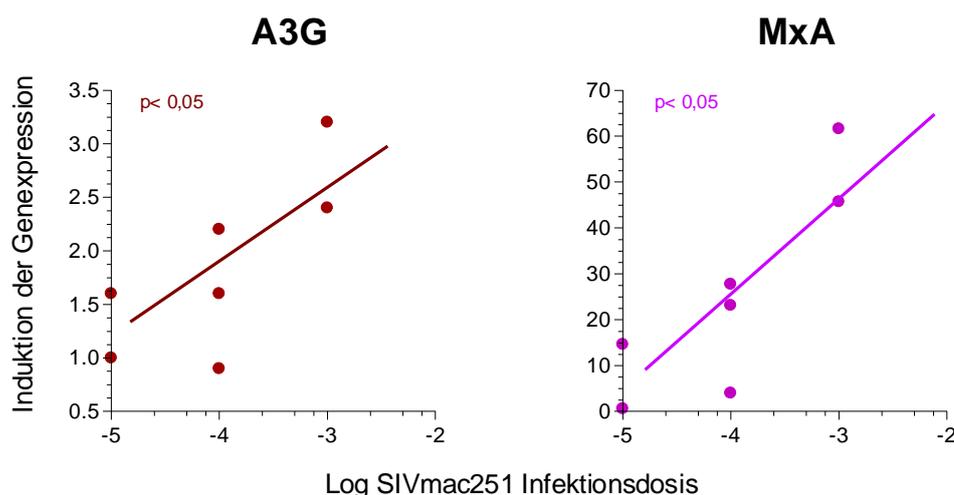
Der, kurz vor der Spitzenvirämie auftretender Anstieg in der A3G- und der MxA-Genexpression lässt auf einen möglichen Zusammenhang beider Gene zu einem frühen Zeitpunkt im Krankheitsverlauf der SIV-Infektion schließen (siehe Abbildungen 3.33). Dazu wurde in einer Korrelationsanalyse zehn Tage nach Inokulation die Expression von A3G und MxA verglichen und der Spearman-Korrelationskoeffizient ermittelt (Abbildung 3.35). Im Unterschied zu den Resultaten der Querschnittstudie, die zu späteren Zeitpunkten im Infektionsverlauf erhoben wurden und eine negative Korrelation zwischen der Expression beider Gene zeigten (siehe Kapitel 3.4), konnte hier zu einem frühen Zeitpunkt im Krankheitsverlauf (zehn Tage) eine positive Korrelation zwischen der A3G- und der MxA-Expression gefunden werden (Abbildung 3.35;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.35 Korrelation der MxA- und der A3G-Expression zehn Tage nach Infektion in den PBMCs** Normalisierung auf den Mittelwert der Vorinfektionswerte. Berechnung des Spearman-Korrelationskoeffizienten  $p$ .

### 3.5.4 Korrelation mit der Infektionsdosis

Im Gegensatz zur Virusreplikation, die unabhängig von den Infektionsdosen war (siehe Abbildung 3.32), konnte eine Korrelation zwischen den A3G- und MxA-Transkriptionsraten und der inokulierten Infektionsdosis gefunden werden. Zehn Tage nach Inokulation gab es eine positive Korrelation zwischen der A3G- bzw. der MxA-Expression und der inokulierten Infektionsdosis (Abbildung 3.36;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.36 Korrelation der A3G- und MxA-Expression mit der SIVmac251-Infektionsdosis zehn Tage nach Inokulation**

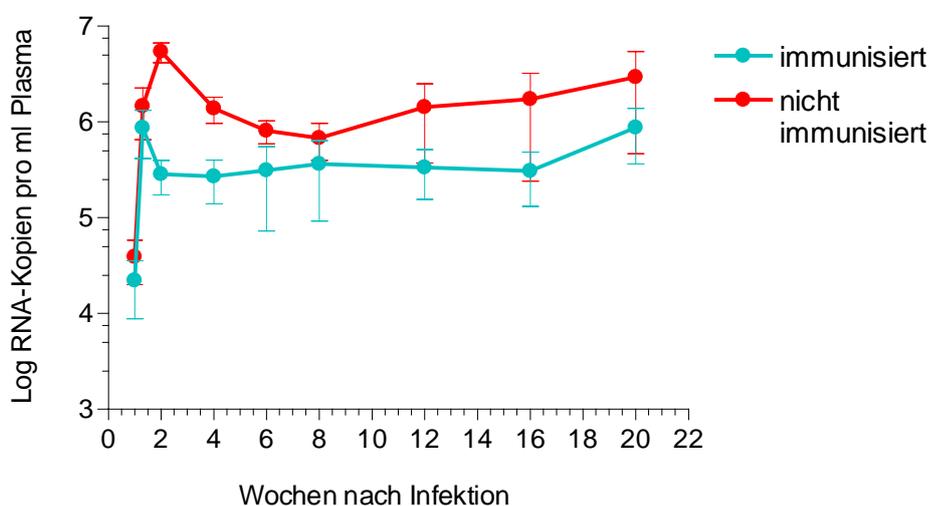
Korrelation mit der A3G-Expression (linkes Diagramm) und mit der MxA-Expression (rechtes Diagramm). Die Normalisierung der Messwerte erfolgte jeweils auf den Mittelwert der drei Vorinfektionswerte und ist als Induktion der Genexpression angegeben. Berechnung des Spearman-Korrelationskoeffizienten  $p$ .

## 3.6 Einfluss der Immunisierung auf die Genexpression

### 3.6.1 Die Virusbeladung im Plasma

In einer weiteren longitudinalen Studie sollte der Einfluss der Immunisierung auf die A3G- und MxA-Genexpression untersucht werden. Fünf Rhesusaffen wurden mit virus-like particles (VLPs) sowie den Adjuvanzen CpG-C und Poly IC/LC subkutan jeweils zum Zeitpunkt Null und acht Wochen immunisiert. Nach 24 und 32 Wochen wurden die Tiere mit jeweils  $3 \times 10^{11}$  Adenovirus5-SIV-Partikeln tonsilliär immunisiert. Nach 40 Wochen wurden die Makaken intravenös mit 20 MID50 SIVmac251 MPBMC (Aubertin) belastet. Elf nicht-immunisierte Rhesusaffen dienten als Kontrollgruppe, die ebenfalls mit SIVmac251 infiziert wurden. Die Bestimmung der Viruslast erfolgte quantitativ als Anzahl viraler RNA-Kopien im Blutplasma durch die Arbeitsgruppe Immungenetik der Abteilung Infektionsbiologie unter Anleitung von Frau Dr. Saueremann. In der Abbildung 3.37 ist der zeitliche Verlauf der Virusbeladung für die Mittelwerte immunisierter und nicht-immunisierter Tiere dargestellt (Abbildung 3.37). Sowohl die immunisierten Tiere als auch die Kontrolltiere waren nach intravenöser SIVmac251-Applikation produktiv infiziert. Die nicht-immunisierte Gruppe wies zwei Wochen nach Infektion eine Spitzenvirämie mit einer mittleren Virusbeladung von  $5,4 \times 10^6$  viralen Kopien pro Milliliter Blutplasma auf. Diese Viruslast reduzierte sich

bis zur Woche acht kurzfristig auf  $6,8 \times 10^5$  RNA-Kopien pro Milliliter, um anschließend wieder auf  $2,9 \times 10^6$  Kopien pro Milliliter bis Woche 20 anzusteigen. Im Unterschied dazu trat bei der immunisierten Gruppe die Spitzenvirämie bereits zehn Tage nach Infektion auf und die mittlere Virusbeladung betrug  $8,7 \times 10^5$  RNA-Kopien pro Milliliter Plasma. Die Virämie von  $2,8 \times 10^5$  RNA-Kopien pro Milliliter Blutplasma in der Woche zwei war im Vergleich zur nicht-immunisierten Kontrollgruppe signifikant reduziert. Im weiteren Infektionsverlauf stieg diese im Mittel bis zur Woche 20 wieder auf  $8,7 \times 10^5$  RNA-Kopien pro Milliliter Plasma an. Dennoch lag die durchschnittliche Viruslast immunisierter Tiere bei allen Messungen im Infektionsverlauf unter der mittleren Virusbeladung nicht-immunisierter Kontrolltiere.



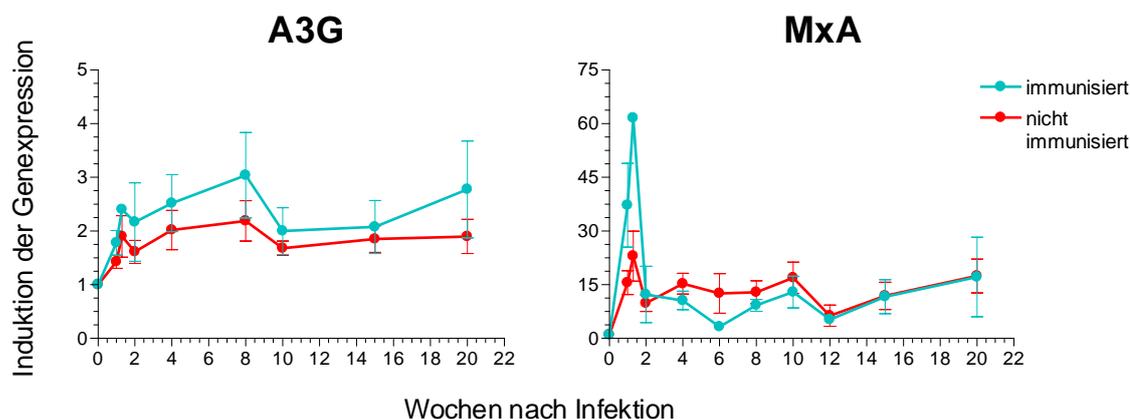
**Abb. 3.37 Anzahl der viralen RNA-Kopien pro Milliliter Blutplasma im Zeitverlauf bei immunisierten und nicht-immunisierten Rhesusaffen**

Die virale RNA wurde aus 200  $\mu$ l Blutplasma isoliert und mittels QuantiTect Probe PCR-Kits (Qiagen) amplifiziert und detektiert. Auf diese Weise wurde der virologische Status der Makaken nach SIV-Inokulation ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte für die immunisierten ( $n = 5$ ) und die nicht-immunisierten Tiere ( $n = 11$ ). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

### 3.6.2 Die A3G- und MxA-Expression

Als Ausgangsmaterial dienten, die zu verschiedenen Zeiten während des Infektionsverlaufs isolierten PBMCs. Aus der RNA dieser Zellen wurde die A3G- und MxA-Expression mit real-time-PCR bestimmt. Zu folgenden Zeitpunkten wurden die Expressionsspiegel beider Gene in Abhängigkeit des Immunisierungszustandes longitudinal untersucht. Die ersten messbaren Virusbeladungen im Plasma traten eine Woche nach Infektion auf. Zur Normalisierung dienten die Vorinfektionswerte. Da es drei Tage nach Inokulation noch keine Änderung in der Virusbeladung gab und die

gemessenen Werte sich nicht von jenen uninfizierter Tiere unterscheiden, konnten bei einigen Tieren hierfür auch die Dreitageswerte verwendet werden. In der Abbildung 3.38 A sind die Resultate der A3G-Expression als berechnete Mittelwerte aus den elf nicht-immunisierten und aus den fünf immunisierten Tieren für die einzelnen Zeitpunkte dargestellt.



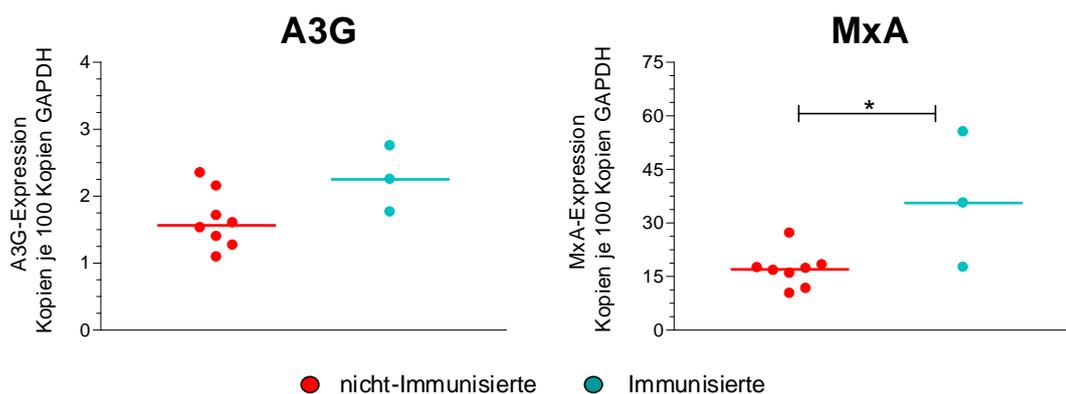
**Abb. 3.38 Die longitudinale A3G- und MxA-Expression bei immunisierten und nicht-immunisierten Rhesusaffen in den PBMCs**

Die A3G-Expression (linkes Diagramm) und die MxA-Expression (rechtes Diagramm) betrachtet im Zeitverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte für die immunisierten ( $n = 5$ ) und die nicht-immunisierten Tiere ( $n = 11$ ), jeweils normalisiert auf den Dreitageswert nach SIVmac251-Inokulation und angegeben als Induktion der Genexpression. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Nach einer Woche stieg die A3G-Transkription aller Tiere an und erreichte ihr Maximum nach zehn Tagen, kurz vor der Spitzenvirämie (2 wpi) (Wilcoxon paariger T-Test; jeweils  $p < 0,05$  zu den Vorinfektionsdaten). Nach zwei Wochen ist die A3G-Expression wieder reduziert. Dabei lagen tendenziell die A3G-Werte bei immunisierten Tieren über denen nicht-immunisierter Makaken. Allerdings konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Immunisierungsstatus gefunden werden. Die Abbildung 3.38 B veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der MxA-Expression zwischen immunisierten und nicht-immunisierten Tieren. Hier stieg die MxA-Expression auch nach einer Woche an und erreichte nach zehn Tagen, kurz vor der Spitzenvirämie, die höchste Expression (Wilcoxon paariger T-Test; jeweils  $p < 0,001$  zu den Vorinfektionswerten). Zwei Wochen nach Infektion fiel die MxA-Transkription wieder ( $p < 0,05$ ), blieb aber im Vergleich zu den Vorinfektionswerten signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ). Im weiteren Verlauf traten individuelle Unterschiede hervor. Dabei exprimierten die immunisierten Tiere von der vierten bis zur zwölften

Woche durchschnittlich weniger MxA als nicht-immunisierte Makaken. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant.

Um den Einfluss der Immunisierung auf die Genexpression zu bestimmten Zeitintervallen im Infektionsverlauf zu ermitteln, wurde für die akute Phase (1-2 wpi) und die post-akute Phase (ab 4 wpi) die Fläche unter der Kurve berechnet. Die Einzelwerte der beiden Zeitpunkte wurden gegeneinander aufgetragen und eine Signifikanz für die unterschiedlichen Zeitintervalle im Mann-Whitney-Test geprüft (Abbildung 3.39).

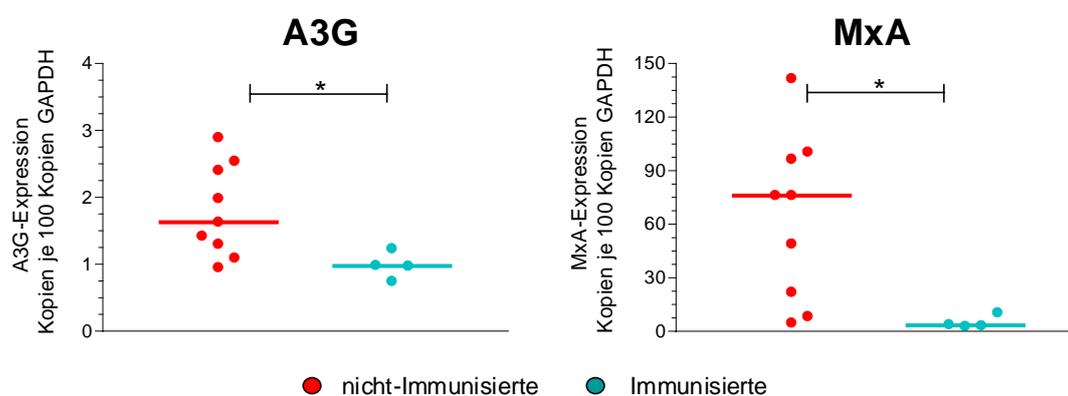


**Abb. 3.39 Die Genexpression immunisierter und nicht-immunisierter Rhesusaffen in den PBMCs**  
Die A3G- Expression (rechtes Diagramm) und die MxA-Expression (linkes Diagramm). Ermittlung der Fläche unter der Kurve innerhalb der akuten Phase (1-2 wpi) und Darstellung der Einzelwerte. Berechnung der Signifikanz im Mann-Whitney-Test (\*  $p < 0,05$ ). Angegeben ist der Medianwert.

In den PBMCs zeigten die immunisierten Tiere im Vergleich zu nicht-immunisierten Makaken einen Anstieg der A3G-Expression innerhalb der akuten Infektionsphase. Eine Signifikanz konnte hierfür aber nicht gefunden werden. Dieses ist wahrscheinlich auf den geringen Stichprobenumfang zurückzuführen. Ebenfalls erhöhte sich in der akuten Phase die MxA-Expression in immunisierten Makaken (Abbildung 3.39; Mann-Whitney-Test;  $p < 0,05$ ). Während der post-akuten Phase hatten die immunisierten Rhesusaffen weiterhin eine tendenziell erhöhte A3G-Transkription im Vergleich zu nicht-immunisierten Tieren. Die MxA-Expression war in diesen Makaken während der post-akuten Phase tendenziell verringert.

Für die peripheren Lymphknoten standen nicht ausreichend Daten für die einzelnen Zeitpunkte zur Verfügung. Daher war eine Auftrennung in akute und post-akute Phase zur Berechnung der Fläche unter der Kurve nicht möglich. Aus diesem Grund wurden zum Vergleich der A3G- und MxA-Transkriptionsraten zwischen immunisierten und nicht-immunisierten Tieren die Einzelwerte direkt aufgetragen. Im Unterschied zu den

PBMCs reduzierte sich in den peripheren Lymphknoten die A3G- und MxA-Expression bei den immunisierten Tieren zehn Tage bis zwei Wochen nach Infektion (Abbildung 3.40; Mann-Whitney-Test; jeweils  $p < 0,05$ ). Später im Infektionsverlauf (12 wpi) blieb eine verringerte A3G-Expressionsrate bei den immunisierten Tieren bestehen, wenn auch nicht signifikant. Für MxA allerdings gab es zwölf Wochen nach Infektion keine Differenzen zwischen immunisierten und nicht-immunisierten Rhesusaffen. Damit zeigte sich in den Lymphknoten eine von den PBMCs abweichende A3G- und MxA-Expression zwischen immunisierten und nicht-immunisierten Tieren.



**Abb. 3.40 Die Genexpression immunisierter und nicht-immunisierter Rhesusaffen in den peripheren Lymphknoten**

Links A3G- und rechts MxA-Expression für 10 Tage bis zwei Wochen nach Infektion. Berechnung der Signifikanz im Mann-Whitney-Test (\*  $p < 0,05$ ). Angegeben ist der Medianwert.

## 4. Diskussion

Bei der Familie der APOBEC3-Proteine handelt es sich um zelluläre antiretrovirale Faktoren, die entstehende reverse Transkripte deaminieren und die Replikation von Retroviren inhibieren. Eine besondere Bedeutung bei der Vermittlung dieser angeborenen intrazellulären Abwehr spielen die beiden Cytidineaminasen A3G und A3F (Bishop et al., 2004; Sheehy et al., 2002; Zheng et al., 2004). Beide Enzyme werden unter anderem in CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und Makrophagen, den eigentlichen Zielzellen von HIV, exprimiert und in retrovirale Partikel verpackt. Auf diese Weise gelangen sie in weitere Zielzellen, wo sie während der reversen Transkription die Deaminierung von Cytosin zu Uracil verursachen. Die entstandene uracilhaltige virale DNA wird entweder über zelluläre Reparaturenzyme abgebaut oder als hypermutierte Form in das Wirtsgenom integriert. In beiden Fällen kann das zu Beeinträchtigung der Replikationsrate führen (Harris et al., 2003). Lentiviren haben daher eine Strategie entwickelt dieser angeborenen antiviralen Abwehr zu entgehen. Über die Expression des Vif-Proteins wird der Einbau von A3G und A3F in neue Viruspartikel verhindert (Kao et al., 2003; Stopak et al., 2003; Yu et al., 2003). Vif ist damit für eine produktive HIV-Infektion unentbehrlich (Gabuzda et al., 1992). Eine wesentliche Rolle hierbei spielt das Verhältnis von Vif zu APOBEC3. So ist bei vermehrter A3G- bzw. A3F-Expression die Vif-vermittelte Hemmung unvollständig und die Überexpression von A3G inhibiert auch die Wildtyp HIV-Infektion (Mangeat et al., 2003; Sheehy et al., 2002).

Weitere Studien beobachteten einen Zusammenhang zwischen der A3G- bzw. A3F-Expression und dem HIV-Infektionsstatus (Biasin et al., 2007; Cho et al., 2006; Jin et al., 2005; Ulenga et al., 2008). Diese Untersuchungen führten jedoch zu widersprüchlichen Resultaten. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Bedeutung der zellulären Restriktionsfaktoren A3G und A3F im SIV-Makakenmodell für AIDS *in vivo* zu charakterisieren und über die Virusbeladung einen Bezug zum Krankheitsverlauf herzustellen. Hierzu wurde mittels real-time-PCR die A3G- und A3F-Transkription in PBMCs, CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD14<sup>+</sup> Monozyten analysiert. Um einen direkten Vergleich zwischen uninfizierten und SIV-infizierten Rhesusaffen zu treffen, sowie das Geschehen bei der Primärinfektion genauer zu untersuchen, wurde in einer weiteren Studie die Expression *in vivo* über die Zeit verfolgt. Neben den peripheren Blutzellen

wurde die A3F- und A3G-Transkription auch für die Lymphknoten ermittelt. Damit konnten zwei für die Pathogenese der SIV-Infektion bedeutsame Regionen, periphere Blutzellen und lymphatische Gewebe, genauer betrachtet werden. Als wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen zeigte sich eine erhöhte Expression von A3G- und A3F bei den Langzeitüberlebenden, auf deren Bedeutung für den Krankheitsverlauf im ersten Kapitel der Diskussion detaillierter eingegangen wird. In einem zweiten Kapitel werden die Mechanismen erläutert, die einen Einfluss auf die Regulation der APOBEC3-Expression im Verlauf der SIV-Infektion haben können.

#### 4.1 Nach SIV-Infektion erhöht sich die APOBEC3-Expression in Rhesusaffen

Für die hier untersuchten Zellpopulationen konnte die in der Literatur beschriebene Transkription des humanen A3G und A3F in Rhesusaffen bestätigt werden. Die Expression des A3G in den PBMCs, CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten des Menschen (Chiu et al., 2005; Peng et al., 2006) wurde für diese Zelltypen damit auch in den Makaken nachgewiesen. Ähnliches gilt für A3F (Wiegand et al., 2004). In dieser Arbeit wurde die APOBEC3-Transkription im Vergleich für uninfizierte und SIV-infizierte Rhesusaffen mit oder ohne AIDS für die PBMCs, CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD14<sup>+</sup> Monozyten, sowie für zwei Lymphknotenregionen untersucht. Studien dieser Art sind bisher weder für die CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD14<sup>+</sup> Monozyten des peripheren Blutes, noch für die Lymphknoten beschrieben. Im Lymphknoten befindet sich eine höhere Zahl infizierbarer Zellen als im Blut. Des Weiteren stellen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und CD14<sup>+</sup> Monozyten im Wesentlichen jene Zellen dar, die infiziert werden und damit eine große Rolle bei der HIV/SIV-Infektion spielen. Daher sollten diese Zelltypen in die Untersuchungen zur APOBEC3-Expression eingeschlossen werden. In dieser Arbeit konnte in den infizierten Rhesusaffen ein Anstieg der A3F- und A3G-Expression gefunden werden. Dabei zeigten asymptomatische Makaken im Vergleich zu uninfizierten Kontrolltieren eine erhöhte APOBEC3-Transkription. Diese Befunde stehen allerdings im Kontrast zu einer Expressionsstudie im Menschen. Hier wurde eine im Vergleich zu Uninfizierten reduzierte Transkription des humanen A3G und A3F in HIV-Infizierten gefunden (Cho et al., 2006). Weitere Studien stehen aber mit unseren Resultaten in Einklang. Dort wurde ebenfalls eine erhöhte Expression des humanen A3G in HIV-Seropositiven beobachtet (Biasin et al., 2007; Jin et al., 2007).

Ebenso wiesen Ulenga et al. einen Anstieg der APOBEC3-Expression in den PBMCs bei HIV-1-Infizierten nach (Ulenga et al., 2008). Allerdings muss man auch beachten, dass die Mehrzahl der HIV-Infizierten antiretroviral behandelt wird. Wie sich diese Therapie auf die APOBEC3-Expression auswirkt ist bisher ungeklärt. Mit Fortschreiten der Erkrankung und der Entwicklung von AIDS kommt es bei den erkrankten Tieren zur Verringerung der APOBEC3-Expression in den peripheren Blutzellen. Im Gegensatz dazu kam es aber in beiden Lymphknotenregionen (peripher und mesenterial) im Vergleich zu den asymptomatischen Makaken zum Anstieg der APOBEC3-Transkription bei den AIDS-Tieren. Diese Unterschiede der APOBEC3-Expression bei den AIDS-Tieren zwischen peripheren Blutzellen und Lymphknotenregionen könnte unter anderem auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der Lymphozytenpopulationen bzw. auf ein von der Peripherie abweichendes Aktivierungsprofil zwischen den beiden Kompartimenten zurückzuführen sein. So ist beispielsweise bekannt, dass die SIV-Infektion die zelluläre Zusammensetzung der Lymphknoten ändert. Es kommt zur Umverteilung von Lymphozyten aus dem Blut in die lymphatischen Gewebe, was mit einer Reduktion der CD4+ T-Zellen im Blut verbunden ist. So beschrieben Pantaleo et al., dass sich 98% aller CD4+ T-Lymphozyten in den lymphatischen Geweben befinden (Pantaleo et al., 1993). Parallel dazu steigt die Anzahl der B-Zellen im Lymphknoten und erreicht ihr Maximum in der AIDS-Phase. Ebenso ist der Anteil der CD8+ T-Zellen, die den frühen Aktivierungsmarker CD69 exprimieren, im Lymphknoten gegenüber dem Blut erhöht und führt zur Aktivierung weiterer Zellen (Halbach et al., 2000). Auch Virusantigene, die über follikuläre dendritische Zellen (FDCs) im Lymphknoten den B-Zellen präsentiert werden, induzieren Immunaktivierungen (Chakrabarti, 1994). Antigenpräsentation und Lymphozytenaktivierung in den Lymphknoten sind bereits als kritische Faktoren für die Virusreplikation und Pathogenese beschrieben worden (Levy, 1993). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die APOBEC3-Expression in den Lymphknoten über Zytokine aktivierter Zellen beeinflusst werden kann.

Ein weiterer wichtiger Befund ergab sich aus dem Zusammenhang zwischen der APOBEC3-Expression und der Virusbeladung infizierter Makaken. Als bedeutender prognostischer Marker korreliert die Virusbeladung im Plasma mit dem HIV-Krankheitsverlauf (Mellors et al., 1996). Watson et al., beschrieben einen solchen Zusammenhang auch für SIV-infizierte Rhesusaffen. Anhand der Viruslast im Plasma

sechs Wochen nach Infektion kann man Aussagen über den zukünftigen Krankheitsverlauf treffen (Watson et al., 1997). So konnten auch wir zeigen, dass die Überlebensdauer infizierter Rhesusaffen indirekt mit deren Virusbeladung, gemessen zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion, zusammenhängt. Tiere, die etwa ein Jahr nach Infektion geringe virale RNA-Kopienzahlen aufwiesen, hatten einen verlangsamten Verlauf. Dagegen zeigten Makaken mit hohen RNA-Kopienzahlen eine schnellere Progression zu AIDS. Bei einem Vergleich zwischen der APOBEC3-Expression und der Plasmavirusbeladung konnte eine negative Korrelation in den peripheren Blutzellen gefunden werden. In diesen Zellpopulationen hatten Tiere mit einer niedrigeren Virusbeladung eine höhere APOBEC3-Transkription und wiesen einen langsameren Krankheitsverlauf auf. Ein ähnliches Resultat wurde für HIV-Infizierte gezeigt. So fanden Jin et al. auch eine negative Korrelation zwischen der humanen A3G-mRNA-Expression und der Virusbeladung HIV-Infizierter. Darüber hinaus stellt neben der Virusbeladung die CD4-Zellzahl ein wichtiger prognostischer Marker für den HIV-Krankheitsverlauf dar und korreliert direkt mit der humanen A3G-Expression. Damit ist für das humane System gezeigt, dass die mRNA des humanen A3G mit abnehmender Virämie und Langzeitüberleben assoziiert ist (Jin et al., 2005). Allerdings konnten andere Studien diesen Zusammenhang nicht bestätigen (Cho et al., 2006). In unseren Experimenten beobachteten wir die höchste A3G- und A3F-Expression bei den Langzeitüberlebenden (LTNPs). Diese Makaken hatten in den PBMCs, sowie in den SIV-Zielzellen (CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten) eine, gegenüber Tieren mit progressiven Krankheitsverlauf, erhöhte APOBEC3-Expression. Diese Resultate stehen in Einklang mit der Studie von Jin et al., die ebenfalls die höchste A3G-Expression in langzeitüberlebenden HIV-Patienten nachwies (Jin et al., 2005). Des Weiteren kam es auch bei Makaken mit einem progressiven Krankheitsverlauf zum Anstieg der APOBEC3-Expression im Vergleich zu den uninfizierten Kontrolltieren. Diese Beobachtungen stehen wiederum im Kontrast zu der Studie von Jin et al., wo bei den Uninfizierten eine höhere A3G-Transkription als bei den HIV-infizierten Progressoren gemessen wurde (Jin et al., 2005). Neueste Untersuchungen wiesen aber einen Anstieg der APOBEC3-Expression in den PBMCs bei HIV-Infizierten nach (Ulena et al., 2008) und decken sich mit unseren Ergebnissen für die SIV-infizierten Rhesusaffen. An AIDS erkrankte Tiere zeigten dagegen die höchste virale Replikation ( $1,5 \times 10^4$  bis  $6,2 \times 10^7$  RNA-Kopien) und die geringste APOBEC3-Transkription in den peripheren Blutzellen.

Damit ergab sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Überlebensdauer und APOBEC3-Expression. Es ist denkbar, dass eine gesteigerte APOBEC3-Expression zur Reduktion der Viruslast beiträgt und somit die Progression zu AIDS verlangsamt, welches die Überlebensdauer infizierter Makaken erhöht. Im Gegensatz zum peripheren Blut konnte die gefundene negative Korrelation zwischen APOBEC3-Expression und Virusbeladung bei den Lymphknoten nicht beobachtet werden. Dennoch zeigten die LTNPs hier im Vergleich zu den Progressoren auch eine signifikant erhöhte APOBEC3-Transkription. Diese war aber auch in den AIDS-Tieren ähnlich erhöht. Somit war das Geschehen in den Lymphknoten deutlich verschieden von dem des peripheren Blutes.

Weiterhin konnten für die PBMCs auch Tiere untersucht werden, deren Viruslast im Plasma zum Zeitpunkt der Messung nicht nachweisbar war, die aber nach erfolgter Inokulation eine vorübergehende Virämie aufwiesen. Für diese Gruppe fand sich ein deutlicher Unterschied zwischen der A3G- und A3F-Expression. Während sich die A3G-Expression hier nicht wesentlich von den Uninfizierten abhob, konnte ein Anstieg der A3F-Expression verzeichnet werden. Damit hatten Makaken in der Latenzperiode ohne produktive Virusreplikation eine, durch die Infektion verursachte, erhöhte A3F-Expression. Ein ähnlicher Fall ist für HIV-Exponierte, aber seronegative Individuen beschrieben, wo ein Anstieg des humanen A3G beobachtet werden konnte (Biasin et al., 2007). Möglicherweise findet eine geringe Replikation in den lymphatischen Geweben statt, die aber zu keiner messbaren Änderung der Virusbeladung im Plasma führt. Weiterhin wurde für solche Individuen eine erhöhte Produktion antiviraler Proteine gefunden, die an der angeborenen Immunantwort gegen HIV beteiligt sind (Misse et al., 2007).

Eine andere Frage, die sich aus den Resultaten stellte ist, inwiefern anhand der APOBEC3-Expression eines Tieres zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion eine Vorhersage über den zukünftigen Krankheitsverlauf gemacht werden kann. Der Vergleich der APOBEC3-Transkription zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion zwischen Progressoren und LTNPs ergab aber, dass eine solche Prognose nicht möglich ist. So zeigten sowohl zukünftige Progressoren als auch LTNPs zirka ein Jahr nach SIV-Infektion eine ähnliche Expression von APOBEC3. Mit Fortschreiten des Krankheitsverlaufes verringerte sich diese bei Progressoren und erhöhte sich bei LTNPs. Somit war zum Zeitpunkt, an dem die Makaken an AIDS erkrankten die APOBEC3-Expression geringer als zu einem früheren Zeitpunkt, als die Tiere noch

asymptomatisch waren. Bei Rhesusaffen, die mindestens drei Jahre überlebten, fand sich dagegen ein deutlicher Anstieg von APOBEC3. Dieser trat aber frühestens ein Jahr nach Infektion auf. Für genauere Aussagen hierzu ist es wichtig, die Expression über einen definierten Zeitverlauf zu verfolgen. Eine solche Studie wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Für eine longitudinale Analyse der A3G-Genexpression wurden zu bestimmten Zeitpunkten im Infektionsverlauf PBMCs, sowie Lymphozyten peripherer Lymphknoten aus SIV-infizierten Rhesusaffen isoliert. Durch Erhebung von Vorinfektionsdaten konnte auch ein direkter Vergleich vor und nach Infektion für dieselben Tiere erfolgen. Unsere Ergebnisse für die Zeitverlaufsstudien zeigten, dass es parallel mit Ansteigen der Virusbeladung zu erhöhter A3G-Expression eine Woche nach SIVmac251-Infektion kam. Die Spitzenvirämie trat zirka zwei Wochen nach Inokulation auf. Zehn Tage nach Infektion, also kurz vor der Spitzenvirämie kam es zur höchsten A3G-Expression. Ab zirka zwei Wochen nach Infektion fiel die A3G-Transkription, blieb dabei aber über den Werten aus der Vorinfektionsphase. Später im Infektionsverlauf kam es individuell zu unterschiedlicher A3G-Expression, möglicherweise in Abhängigkeit genetischer und immunologischer Einflüsse. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die A3G-Transkription vor und nach Infektion unterscheidet. Tiere, die sich zu Langzeitüberlebenden entwickeln, besitzen höchstwahrscheinlich vor der Infektion ähnliche A3G-Werte wie Makaken, die eine rasche Progression zu AIDS aufweisen. Daher ist eine Vorhersage über den Krankheitsverlauf anhand früh ermittelter A3G-Werte nicht möglich. Die Zeitverlaufsstudie für die peripheren Lymphknoten zeigte, ähnlich wie für die PBMCs, einen Anstieg der A3G-Expression nach Infektion parallel zur Virämie und war zeitgleich mit der im Plasma. Später allerdings kann die Virusbeladung im Plasma und in den Lymphknoten verschieden sein (Chakrabarti, 1994). Auch unterschied sich die A3G-Expression beider Regionen nach der Primärinfektion. Ein weiteres Ergebnis dieser Untersuchung war, dass es um den Zeitpunkt der Spitzenvirämie zur positiven Korrelation zwischen der A3G-Expression und der Virusbeladung kam. Im Gegensatz dazu zeigte sich später im Krankheitsverlauf ein inverses Verhalten. Diese Effekte deuten darauf hin, dass durch infektionsspezifische Faktoren die A3G-Expression um den Zeitraum der Spitzenvirämie in allen Makaken zunächst ähnlich reguliert wird. Später im Infektionsverlauf spielen für die Induktion von A3G und für die Entwicklung eines Tieres zu einem LTNP oder Progressor womöglich andere Einflüsse eine Rolle.

## 4.2 Die Regulation der APOBEC3-Expression

In unseren Experimenten fanden wir einen Anstieg der A3G- und der A3F-Expression nach SIV-Infektion. Aus den Korrelationsanalysen zwischen der Transkription beider APOBEC3-Gene zeigte sich in den peripheren Blutzellen und in den Lymphknoten ein direkter Zusammenhang bei infizierten Rhesusaffen. In keiner der untersuchten Zellpopulationen wurde eine Korrelation bei uninfizierten Makaken gefunden. Beide APOBEC3-Gene sind aus Genduplikations- und Rekombinationsereignissen hervorgegangen, besitzen nahezu gleiche N-terminale Regionen und haben dieselbe Core-Promotorstruktur (Muckenfuss et al., 2007). Es ist ferner bekannt, dass sie in vielen Geweben zusammen exprimiert werden, wobei auch ihre antiviralen Aktivitäten koordiniert werden könnten (Chiu et al., 2005; Liddament et al., 2004; Zheng et al., 2004). Unsere Resultate zeigten zumindest für die A3F-Expression eine vergleichbare Transkription zwischen PBMCs und Lymphknoten. Der beobachtete Anstieg für A3G und A3F nach SIV-Infektion, sowie deren positive Korrelation deuten auf einen Regulationsmechanismus beider Gene über infektionsspezifische Faktoren hin. Ein solcher Faktor könnte das im Infektionsverlauf produzierte Interferon sein. Es ist bekannt, dass Interferone über die Induktion antiviral wirkender Proteine eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese von HIV und SIV spielen (Samuel, 2001). Auch wird für die Therapie verschiedener viraler Infektionen, inklusive HIV, teilweise IFN- $\alpha$  eingesetzt (Gutterman, 1994; Hatzakis et al., 2001; Stylianou et al., 2000). Das Interferone eine Bedeutung bei der Induktion von A3G- und A3F haben könnten, wurde durch die Entdeckung von Interferon-response Elementen (ISRE) in den Promotorregionen beider Gene vermutet (Chen et al., 2006b; Tanaka et al., 2006). So konnte gezeigt werden, dass durch IFN- $\alpha$  und - $\beta$  die A3G- und A3F-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen, Hepatozyten und dendritischen Zellen induziert werden kann (Bonvin et al., 2006; Chen et al., 2006b; Peng et al., 2006; Sarkis et al., 2006; Tanaka et al., 2006). Für die Rhesusaffen konnten wir ebenfalls nachweisen, dass es durch die Gabe von IFN- $\alpha$  dosisabhängig zum Anstieg der A3G-Expression kommt. Ebenso wurde ein Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die APOBEC3-Expression belegt. So verursacht IFN- $\gamma$  die A3G-Transkription in der Blut-Hirn-Schranke (Argyris et al. 2007) und in humanen kapillaren Endothelzellen der Retina (Lin et al., 2009). Damit stellen A3F und A3G Komponenten des Interferonsignalweges dar. Ferner beschrieben Sarkis et al. eine A3G-Induktion über IFN- $\alpha$  unabhängig vom

STAT1, aber abhängig vom STAT2 und IRF9 in einer Leberzelllinie (Sarkis et al., 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass Interferone über die Förderung der APOBEC3-Expression, die virale Replikation hemmen können (Chen et al, 2006b; Okeoma et al., 2009; Peng et al, 2006). Um der Frage nachzugehen, warum die APOBEC3-Expression in bestimmten Tieren erhöht war und inwiefern die im Infektionsverlauf gebildeten Interferone die APOBEC3-Transkription beeinflussen, wurde die Expression von zwei Interferon-induzierten Genen (MxA und IP-10) zusammen mit der APOBEC3-Expression *in vivo* ermittelt. Nach Infektion kam es in allen untersuchten Zelltypen zum Anstieg der MxA-Expression. Makaken mit AIDS wiesen im Vergleich zu den Tieren in der asymptomatischen Phase eine weitere Erhöhung der MxA-Transkription auf. Auch in HIV-Infizierten wurde eine erhöhte MxA-Expression gefunden, die mit dem Erkrankungsverlauf korreliert (von Wussow et al., 1990). Der Anstieg von MxA geht vermutlich auf eine hohe IFN- $\alpha$  Produktion zurück. In der akuten HIV-1-Infektion und auch in der AIDS-Phase finden sich im Plasma hohe IFN- $\alpha$  Werte, die mit einer schlechten Prognose zusammenhängen (von Sydow et al., 1991). So wurde gezeigt, dass IFN- $\alpha$  zur TRAIL/DR5-induzierten Apoptose bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt (Brenchley et al., 2004). Bei AIDS treten vermehrt opportunistische Infektionen auf, die weitere Immunaktivierungen und eine damit verbundene erhöhte IFN- $\alpha$  Bildung zur Folge haben (Guterman, 1994; Iwasaki et al., 2004; Schacker et al., 2001). Dies könnte den weiteren Anstieg der MxA-Expression bei symptomatischen Tieren, sowohl in den PBMCs als auch in den Lymphknotenzellen erklären. Eine ähnliche Immunpathogenese durch IFN- $\alpha$  für die lymphatischen Gewebe und für peripheres Blut wurde auch in der Literatur beschrieben (Herbeuval et al., 2005; Stylianou et al., 2000). Darüber hinaus konnten auch bei HIV-Infizierten ohne erhöhte IFN- $\alpha$  Konzentration ein MxA-Anstieg verzeichnet werden (von Wussow et al., 1990). So kann die Produktion der Typ-I-Interferone transient sein, dennoch wird MxA kontinuierlich gebildet (Baca et al., 1994; Jakschies et al., 1990). Neben IFN- $\alpha$  kann die MxA-Expression auch durch Virusproteine induziert werden (Capobianchi et al., 1992; Hug et al., 1988). Genauere Aussagen über eine Änderung der MxA-Expression im Verlauf der SIV-Infektion ergaben sich aus der longitudinalen Untersuchung. Unsere Ergebnisse zeigten, dass es in den PBMCs parallel mit Ansteigen der Virusbelastung zur erhöhten MxA-Expression eine Woche nach SIVmac251-Inokulation kam. Um den Zeitpunkt der Spitzenvirämie nach zehn Tagen fanden sich die höchsten MxA-Werte. Ab zwei Wochen, wenn die

Virämie zurückgeht, fiel auch die MxA-Expression wieder, blieb aber im Vergleich zu den Werten vor der Infektion erhöht. Im weiteren Verlauf der Infektion traten dann individuelle Schwankungen auf, die vermutlich durch eine Reihe weiterer Faktoren bedingt war. Tendenziell reduzierte sich die MxA-Expression über die Zeit und die geringste Expression fand sich in Tieren, die über drei Jahre überlebten. Damit standen die Resultate im Einklang mit einer anderen Studie zur MxA-Expression im Zeitverlauf bei SIV-infizierten Rhesusaffen. Hier konnte ebenfalls ein Anstieg der MxA mRNA in den PBMCs um den Zeitraum der Spitzenvirämie detektiert werden. Als frühe Wirtsabwehr ging eine vermehrte IFN- $\alpha$  Expression voraus, die vermutlich für die erhöhte MxA-Expression verantwortlich war. Im weiteren Verlauf konnte auch hier eine Reduktion der MxA-Expression beobachtet werden (Abel et al., 2002). Im Vergleich dazu zeigten unsere, parallel zur MxA-Expression ermittelten A3G-Werte für die PBMCs auch einen Anstieg in der akuten Phase um den Zeitraum der Spitzenvirämie. Dieser Befund spricht für eine vergleichbare Regulation der A3G- und der MxA-Expression während der Primärinfektion. Dies wird wahrscheinlich durch die in dieser Phase erhöhte IFN- $\alpha$  Konzentration bewirkt. In den peripheren Lymphknoten kam es ebenfalls zum MxA-Anstieg um den Zeitraum der Spitzenvirämie. Anschließend fiel die MxA-Expression, blieb aber auch im Vergleich zu den Vorinfektionswerten erhöht. Abel et al. konnten eine erhöhte mRNA Expression von IFN- $\alpha$  in den Lymphknoten SIV-infizierter Makaken schon nach drei Tagen feststellen, wobei parallel dazu die Expression des MxA-Gens anstieg (Abel et al., 2002; Abel et al., 2005). Unsere Experimente zeigten auch während der akuten Phase eine erhöhte MxA-Expression parallel zum Anstieg der A3G-Expression. Damit führte die primäre SIV-Infektion zunächst zu einer vergleichbaren A3G- und MxA-Transkription in den PBMCs und in den peripheren Lymphknoten. Nach der akuten Phase verringerte sich die MxA-Expression, blieb aber im Vergleich zu den Uninfizierten weiterhin signifikant erhöht und stand dabei im Bezug zum weiteren Krankheitsverlauf. Ebenfalls reduzierte sich die A3G-Expression nach der Primärinfektion. Bei bestimmten Tieren aber, vermutlich bedingt durch individuelle bzw. virale Faktoren, kam es im Infektionsverlauf zur erhöhten APOBEC3-Expression, die mit einer erhöhten Überlebensdauer verbunden war. In der AIDS-Phase stieg über die vermehrte Interferonproduktion die MxA-Expression wieder an und es konnte eine positive Korrelation mit der A3G-Expression beobachtet werden. Auch IP-10 erhöhte sich nach SIV-Infektion in allen Zelltypen. Dies

ist für infizierte Makaken bereits durch mehrere Untersuchungen in der Literatur belegt. So kam es nach SIV-Infektion zum Anstieg der IP-10-Expression in PBMCs (Cheret et al., 1999), lymphatischen Geweben (Cheret et al., 1997) und Makrophagen der Lunge (Sui et al., 2005). Ferner ist IFN- $\gamma$  im lymphatischen Gewebe infizierter Rhesusaffen assoziiert mit einer IP-10-Expression und geht mit einer erhöhten Entzündung sowie einer stärkeren Virusreplikation einher (Reinhart et al., 2002). Auch die IFN- $\gamma$  Expression steigt während der SIV/HIV-Infektion im Blut und in den lymphatischen Geweben an (Breen et al. 1997; Orandle et al., 2001). Ähnlich wie MxA kann auch IP-10 über virale Proteine induziert werden (Asensio et al., 2001). Mit dem beobachteten Zusammenhang zwischen Progression und erhöhter Interferonproduktion bzw. verstärkter Expression Interferon-induzierter Gene kommen Zweifel an der antiviralen Aktivität der Interferone auf, deren Wirkung auf den Krankheitsverlauf nach wie vor kontrovers diskutiert wird (Herbeuval et al., 2006). Eine Ausnahme stellen die mesenterialen Lymphknoten dar. In unseren Versuchen konnten wir hier keinen Anstieg von IP-10 bei asymptomatischen Rhesusaffen feststellen. Eine Erklärung hierfür könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der Zellpopulationen zwischen den lymphatischen Geweben liefern. So weisen die mesenterialen Lymphknoten im Vergleich zu den peripheren Lymphknoten eine geringere Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die den Aktivierungsmarker CD69 exprimieren, auf und haben eher ein Th2-typisches Zytokinprofil (Halbach et al., 2000). Die Bildung von IP-10 aber ist vor allem von der IFN- $\gamma$  Produktion abhängig (Luster and Ravetch, 1987), welches von aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder NK-Zellen sezerniert wird. Im Lymphknoten machen die NK-Zellen nur zirka 1% aller Lymphozyten aus (Halbach et al., 2000; Sopper et al., 1997). Daher muss hier der Hauptteil der IFN- $\gamma$  Produktion auf aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen zurückgehen. Dass die mesenterialen Lymphknoten weniger aktivierte CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> T-Lymphozyten als andere Gewebe aufweisen (Halbach et al., 2000), könnte zur reduzierten IFN- $\gamma$  Sezernierung führen, was wiederum die geringe IP-10-Transkription bei den asymptomatischen Makaken erklärt. Vergleicht man aber die IP-10- und auch die MxA-Transkription zwischen peripheren und mesenterialen Lymphknoten bei asymptomatischen Tieren, ergab sich eine positive Korrelation. Damit könnte der beobachtete signifikante Anstieg der IP-10-Expression bei peripheren Lymphknoten lediglich auf einen größeren Stichprobenumfang zurückzuführen sein. Aus unseren Ergebnissen zeigte sich für Makaken mit AIDS ein unterschiedliches IP-10-

Expressionsprofil zwischen peripheren Blutzellen und Lymphknoten. Während es in den PBMCs keinen Unterschied zwischen asymptomatischen Makaken und AIDS-Tieren gab, konnte für die letztere Gruppe ein weiterer Anstieg in beiden Lymphknotenregionen verzeichnet werden. Das kann damit zusammenhängen, dass es in diesem Krankheitsstadium vermehrt zu opportunistischen Infektionen kommt, die weitere Immunaktivierungen verursachen. So aktivierte Immunzellen wandern in die Lymphknoten ein (Abel et al., 2005; Schaefer et al., 2006) und geben Interferone ab, die unter anderem zur erhöhten Expression Interferon-stimulierter Gene über den JAK/STAT-Signalweg führen. (Gutterman, 1994). So stellt IFN- $\gamma$ -induziertes IP-10 eines der am meisten hochregulierten Gene in der AIDS-Phase dar (Schaefer et al., 2006) und verursacht eine weitere Rekrutierung inflammatorischer Immunzellen in die lymphatischen Gewebe, was zur verstärkten Virusreplikation führt (Lane et al., 2003). Die vermehrte IP-10-Expression wurde mit Krankheitssymptomen bei SIV-infizierten Rhesusaffen, wie z.B. Pneumonie und Enzephalitis (Schaefer et al., 2006; Sui et al., 2003; Sui et al., 2005) assoziiert. Diese Reaktionen verdeutlichen die schädlichen Auswirkungen einer exzessiven Immunantwort und verschlechtern die Prognose (Schaefer et al., 2006).

Aus den Resultaten wird ersichtlich, dass es bei SIV-infizierten asymptomatischen Rhesusaffen parallel zur APOBEC3-Expression auch zum Anstieg Interferon-induzierter Gene kommt. Diese Erhöhung wurde in den peripheren Blutzellen und in den Lymphknoten beobachtet. Damit ist es wahrscheinlich, dass die SIV-Infektion über Typ I/II-induzierte Interferonantworten einen Anstieg von APOBEC3 bewirkt. Dieser vollzieht sich höchstwahrscheinlich über den JAK/STAT-Signalweg, ausgelöst über die Bindung der Interferone an ihre jeweiligen Rezeptoren. Auf diese Weise werden die Gene für MxA, IP-10, A3G und A3F aktiviert. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass Tiere mit AIDS eine reduzierte APOBEC3-Expression in den PBMCs, aber eine erhöhte Transkription dieser Gene in den Lymphknoten aufwiesen. Im Gegensatz dazu wurde für beide Kompartimente ein Anstieg für MxA gefunden. IP-10 war bei den AIDS-Tieren im Lymphknoten ebenfalls erhöht. Damit konnte für die Lymphknoten eine bessere Übereinstimmung zwischen der APOBEC3- und der IP-10-Expression gefunden werden. Dieses spricht hier eher für eine Regulation von APOBEC3 über IFN- $\gamma$ . In den PBMCs wurde dagegen keine weitere Erhöhung von IP-10 gefunden. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass es zumindest während der AIDS-Phase

zwischen beiden Geweben unterschiedliche Regulationsstrategien zur APOBEC3-Expression gibt. Es ist möglich, dass bei AIDS aufgrund stark limitierter oder gar fehlender zytotoxischer T-Zellantwort, die APOBEC3-Expression in den PBMCs zurückgeht. In dieser Phase fehlt der Großteil, der für die CD8<sup>+</sup> T-Zellaktivierung wichtigen CD4<sup>+</sup> Helferzellen, wodurch auch die IFN- $\gamma$  Produktion reduziert ist (Abel et al., 2005). Außerdem wandern viele periphere Lymphozyten in die lymphatischen Gewebe ein (Halbach et al., 2000). Trotz Reduktion der APOBEC3-Expression fand sich bei den AIDS-Tieren eine erhöhte MxA-Expression. Das kann zum einen auf einen Interferon-Typ-I-unabhängigen Signalweg deuten, der an der APOBEC3-Expression beteiligt ist. Andererseits ist es denkbar, dass die MxA-Transkription zu diesem Zeitpunkt auch durch zusätzliche Faktoren reguliert wird. So ist auch eine erhöhte MxA-Transkription beschrieben worden, obwohl kein IFN- $\alpha$  mehr nachweisbar war (Jakschies et al., 1990). Es ist bekannt, dass MxA auch durch Virusproteine induziert werden kann, die besonders zur AIDS-Phase wieder in erhöhter Konzentration im Plasma vorkommen (Hug et al., 1988). Endgültig kann dies nur durch eine Messung der Interferone selbst herausgefunden werden. Dies stellt aber hohe experimentelle Anforderungen, da Interferone in geringerer Konzentration vorliegen und von weniger Zellen exprimiert werden als die Interferon-stimulierten Gene. Im Kontrast zu den PBMCs standen die Ergebnisse der Lymphknoten. Hier wurde in den AIDS-Tieren ein Anstieg von APOBEC3 zusammen mit einer erhöhten MxA- und IP-10-Expression beobachtet. Eventuell übt der gleichzeitige Einfluss von IFN- $\alpha$  und - $\gamma$  einen stärkeren Effekt auf die APOBEC3-Genexpression aus, als dieses durch jedes Interferon allein bewirkt wird (Peng et al., 2006). Eine andere Möglichkeit ist, dass APOBEC3 durch lösliche Faktoren im Lymphknoten stimuliert wird. So konnten Stopak et al. eine A3G-Expression durch IL-2 und IL-15 beobachten (Stopak et al., 2007). Des Weiteren ist bekannt, dass auch Mitogene die Transkription von A3G über den MAPK-Kinaseweg erhöhen (Rose et al., 2004). Am Ende dieses Signaltransduktionsweges steht die Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren (Lee and McCubrey, 2002), die an die 5' untranslatierte Region des A3G-Gens binden und so dessen Transkription verstärken (Rose et al., 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass Zelltyp und Aktivierungszustand der Zellen einen Einfluss auf die Induktion des A3G-Promotors haben können (Muckenfuss et al., 2007). Auch in einer anderen Studie konnte die APOBEC3-Expression in bestimmten Zellen über IFN- $\alpha$  induziert werden. In

Abhängigkeit vom Zelltyp können somit unterschiedliche Faktoren an der APOBEC3-Transkription beteiligt sein (Ying et al., 2007).

Die Korrelation mit der Virusbeladung sollte nun den Bezug der Interferon-induzierten Gene zum Erkrankungsverlauf verdeutlichen. Es zeigte sich für alle Zelltypen ein direkter Zusammenhang zwischen der Virusbeladung und der MxA- bzw. IP-10-Expression. Makaken mit der höchsten Virusbeladung wiesen eine erhöhte MxA- und IP-10-Transkription auf. Da die Virusbeladung im Plasma als prognostischer Marker Aussagen über den Krankheitsverlauf erlaubt, kann man über eine direkte Korrelation mit den Interferon-induzierten Genen einen Hinweis über die zukünftige Prognose eines Tieres erhalten. Auch von Wussow et al. konnten zeigen, dass bei HIV-Infizierten die MxA-Expression mit der Erkrankung korreliert (von Wussow et al., 1990). Für SIV-infizierte Rhesusaffen wurde der Zusammenhang zwischen der MxA-Transkription und der Virusbeladung für PBMCs und lymphatische Gewebe bereits gezeigt. Damit kann erhöhtes MxA als Marker für die Virusreplikation dienen und ist ein Hinweis für eine schlechte Prognose (Abel et al., 2002). Auch eine erhöhte IP-10-Produktion deutet auf einen ungünstigen Verlauf. So wurde für infizierte Makaken eine erhöhte IP-10-Expression mit einer verstärkten Entzündungsreaktion assoziiert. Über IP-10 angelockte Immunzellen kann die Virusreplikation durch Infektion dieser Zellen verstärkt werden. Dabei korreliert die Virusbeladung im Lymphknoten auch direkt mit der IP-10-Transkription (Reinhart et al., 2002). Dieser Befund steht damit in Einklang mit unseren Resultaten, die darüber hinaus eine direkte Korrelation zwischen MxA- und IP-10-Expression bei infizierten Makaken aufzeigten. So tragen im Infektionsverlauf Interferone sowohl vom Typ I als auch vom Typ II zur Immunpathogenese bei. Eine starke Expression von MxA und IP-10 sind dabei weniger mit einer effektiven zellulären Immunantwort verbunden, als eher mit schädlichen Auswirkungen, die zur Verschlechterung der Prognose beitragen. Ein Hinweis hierauf lieferten Untersuchungen zu natürlichen Wirten der SIV-Infektion. Die SIV-Infektion dieser Tiere zeichnet sich trotz hoher Virusbeladung durch einen apathogenen Verlauf mit einer nur geringen oder fehlenden Immunaktivierung aus (Silvestri et al., 2003). Die positive Korrelation zwischen Virusbeladung und MxA- bzw. IP-10-Expression stand auch im Gegensatz zu der gefunden negativen Korrelation mit der APOBEC3-Expression, was die protektive Rolle von A3G und A3F in der SIV/HIV-Pathogenese erneut unterstreicht. So zeigten unsere Ergebnisse eine geringere APOBEC3- und eine

höhere MxA- und IP-10-Expression bei den Progressoren. Auch HIV-Infizierte mit einem progressiven Verlauf hatten eine erhöhte Transkription von MxA (von Wussow et al., 1990). Im Vergleich zu den Progressoren wiesen die LTNPs in unseren Experimenten hohe APOBEC3- und niedrige MxA- und IP-10-Expression auf. Aber auch für diese Tiere wurde eine signifikant erhöhte Transkription beider Interferon-induzierter Gene im Vergleich zu den Uninfizierten berechnet. Dennoch begünstigt eine limitierte Immunaktivierung im Rahmen einer SIV/HIV-Infektion während der chronisch asymptomatischen Phase und eine dadurch begrenzte Interferonproduktion einen milden Infektionsverlauf. In den peripheren Lymphknoten allerdings zeigte sich ein Anstieg der APOBEC3-Expression nicht nur bei den LTNPs, sondern auch bei den AIDS-Tieren. Diese Diskrepanz ist möglicherweise auf ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Immunzellen sowie deren Aktivierungszustand und ein dadurch bedingtes abweichendes Zytokin- und Interferonprofil in den Lymphknoten bei der AIDS-Phase zurückzuführen. Während dieser Zeit kommt es, beeinflusst durch vermehrt auftretende Infektionen, zur Wanderung und Aktivierung von Immunzellen im Lymphknoten. Diese verursachen eine verstärkte Produktion von Zytokinen und Interferonen, die zum Anstieg von APOBEC3 führen. Diese erhöhte APOBEC3-Expression hat aber keinen günstigen Einfluss mehr auf den Krankheitsverlauf und geht vermutlich auf eine vermehrte Induktion der hochmolekularen enzymatisch inaktiven A3G/A3F-Form (high molecular mass, HMM) zurück. Diese HMM-Form wird in aktivierten Zellen durch Mitogene, IL-2, IL-15 sowie Interferone induziert und ist nicht in der Lage die HIV-Replikation zu inhibieren (Chiu et al., 2005; Rose et al., 2004; Stopak et al., 2007). Eine mögliche zelluläre Funktion dieser APOBEC3-Form ist die Hemmung von Retrotranspositionseignissen, die in aktivierten Zellen vermehrt stattfinden. Auf diese Weise wird die genomische Integrität erhalten (Stopak et al., 2007). Damit kann APOBEC3 aber nicht mehr als Restriktionsfaktor gegen HIV/SIV fungieren. So ist auch bekannt, dass HIV bevorzugt aktivierte Zellen infiziert, in denen eher die HMM-Form präsent ist (Chiu et al., 2005). Ferner ist beschrieben, dass auch in naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Lymphknoten durch IL-2 und IL-15 die HMM-Form induziert werden kann, womit die Zellen sensitiv für HIV werden. Im Gegensatz dazu sind periphere inaktive T-Zellen nicht infizierbar (Chou et al., 1997), da diese über die niedermolekulare enzymatisch aktive Form des APOBEC3 (LMM) effektiv die Replikation eintretender Viren inhibieren (Kreisberg et al., 2006). Chen et al. zeigten,

dass über IFN- $\alpha$  die LMM-Form des APOBEC3 in ruhenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten ansteigt und diese Zellen vor einer HIV-Infektion schützt (Chen et al., 2006b). Warum CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Blutes und des Lymphknoten verschieden infizierbar sind, ist soweit noch ungeklärt (Kreisberg et al., 2006). In unserem Fall könnte es sein, dass in den Lymphknoten der LTNPs über ein bestimmtes Zytokinprofil das Gleichgewicht eher zur aktiven LMM-Form verschoben ist. Bei den AIDS-Tieren dagegen ist es denkbar, dass es in den Lymphknoten durch die starken Immunaktivierungsprozesse vermehrt zur Induktion der HMM-Form kommt. In den peripheren Blutzellen ist die erhöhte APOBEC3-Expression bei den LTNPs möglicherweise auf eine nur milde Immunstimulation zurückzuführen, die eine Expression der LMM-Form begünstigt. So liegt APOBEC3 in inaktivierten T-Zellen der Peripherie von vornherein in der LMM-Form vor (Kreisberg et al., 2006). In welcher Form APOBEC3 *in vivo* vorliegt, wurde bisher noch nicht untersucht. Dieses ist methodisch schwierig, da dafür große Proteinmengen notwendig sind.

Ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von APOBEC3 und MxA bzw. IP-10 in den einzelnen Phasen einer SIV-Infektion konnte aus Korrelationsanalysen gewonnen werden. In der akuten Infektionsphase (zehn Tage) gab es eine positive Korrelation zwischen der A3G- und der MxA-Expression. Das könnte darauf hinweisen, dass APOBEC3 früh in der Infektion durch Interferone induziert wird. Später im Infektionsverlauf, während der chronischen Phase, zeigten Makaken mit geringer MxA-Expression dagegen eine höhere APOBEC3-Expression in den Blutzellen. Die höchste APOBEC3-Expression wiesen dabei die LTNPs auf. In dieser Phase sind neben den Interferonen wahrscheinlich eher andere Faktoren an der Regulation von APOBEC3 beteiligt. Einen positiven Einfluss auf die APOBEC3-Expression könnten dabei individuell genetische sowie virale Faktoren ausüben. Entwickelten die Tiere AIDS, fand man, wie während der akuten Phase, eine positive Korrelation zwischen MxA bzw. IP-10 und den APOBEC3-Genen. Dies galt sowohl für das Blut als auch die Lymphknoten. Während dieser Phase fanden sich, wie bei der Primärinfektion, erhöhte Virusbeladungen im Plasma. Im Infektionsverlauf kommt es sowohl in der akuten Phase als auch bei AIDS mit dem Ansteigen der Viruslast zur vermehrten IFN- $\alpha$  Produktion, welche zur A3G-Expression beiträgt. Damit spiegelten die Ereignisse der Primärinfektion das Geschehen während der die Tiere an AIDS erkrankten, wider. Auch ist zu beiden Zeiten die Immunantwort limitiert. Während der

Primärinfektion ist noch keine Immunantwort aufgebaut und in der AIDS-Phase ist diese größtenteils zerstört. Auch wenn anhand der APOBEC3-Expression zu frühen Zeitpunkten innerhalb der chronischen Phase im Krankheitsverlauf keine Vorhersagen zur Prognose gemacht werden können, zeigten die Ergebnisse einen Unterschied der MxA-Transkription zwischen den zukünftigen AIDS-Tieren und den LTNPs. So zeigten spätere LTNPs nach zirka einem Jahr eine durchschnittlich geringere MxA-Expression als jene, die an AIDS erkrankten. Dies ist wahrscheinlich Ausdruck einer unterschiedlichen Virusbeladung beider Gruppen. Als die Makaken AIDS bekamen, zeigten sie ähnlich hohe MxA-Werte wie zum früheren Zeitpunkt. Im Unterschied dazu hatten Rhesusaffen, die über drei Jahre überlebten von vornherein eine geringere MxA-Expression. Damit ist es eventuell möglich anhand der MxA-Induktion zu einem frühen Zeitpunkt der chronischen Infektionsphase eine Prognose über den Krankheitsverlauf abzugeben. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der Korrelation der MxA-Expression und dem Krankheitsverlauf sowie mit der Virusbeladung (Abel et al., 2002; von Wussow et al., 1990).

#### 4.2.1 Die APOBEC3-Expression kann durch Immunsisierung erhöht werden

Ziel einer weiteren Untersuchung war es, einen möglichen Einfluss der Immunsisierung auf die APOBEC3-Expression zu verfolgen. Die immunisierten Tiere zeigten im Vergleich zu den nicht-immunisierten Makaken eine Reduktion der durchschnittlichen Virusbeladung und eine geringere Spitzenvirämie. Immunsisierungsschemata können die Virusbeladung bei Rhesusaffen verringern (Schulte et al., 2009). Bei immunisierten Tieren zeigte sich im Vergleich zu nicht-immunisierten Affen eine erhöhte Transkription sowohl für A3G als auch für MxA in den PBMCs während der akuten und der post-akuten Infektionsphase. Ein solcher Anstieg der A3G-Expression bei immunisierten Rhesusaffen ist in einer aktuellen Studie beschrieben (Wang et al., 2009). Dort wurde durch die Immunsisierung eine starke A3G-Induktion in den PBMCs und den CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen hervorgerufen. Diese steht im Einklang mit der antiviralen A3G-Funktion (Wang et al., 2009). Im Unterschied zu den PBMCs zeigten unsere Daten in den Lymphknoten eine Reduktion von A3G bei immunisierten Makaken. Grund für diesen Unterschied war höchstwahrscheinlich der verschiedene Zeitpunkt der Messung nach zehn Tagen bzw. nach 14 Tagen. Die nach Immunsisierung

unterschiedliche Reaktion der A3G-Expression zwischen Blut und Lymphknoten wurde bisher nicht beschrieben. Später im Infektionsverlauf war die MxA-Transkription bei den immunisierten Tieren verringert. Dieses spricht wiederum für eine Reduktion der IFN- $\alpha$  Konzentration bei immunisierten Makaken. Im Gegensatz dazu blieb das Niveau der A3G-Expression über dem der nicht-immunisierten Tiere. Immunisierte Rhesusaffen hatten also eine geringere Virusbeladung, zeigten eine reduzierte MxA-Expression und eine höhere A3G-Expression. Dieses spricht für eine Beteiligung von APOBEC3 an der durch die Vakzine induzierten Schutzwirkung.

#### 4.2.2 Einfluss weiterer Faktoren auf die Überlebensdauer

Neben der erhöhten APOBEC3-Expression gibt es eine Reihe weiterer Faktoren, die ebenfalls zum Langzeitüberleben beitragen können. So hemmt beispielsweise das antivirale IFN- $\alpha$ -induzierte Protein Tetherin die Abgabe Vpu-defizienter HIV-Viren (Neil et al., 2007; Neil et al., 2008). Bei der klinischen Latenz von HIV-Infizierten spielen genetische (Cameron et al., 1990), immunologische (Buchbinder et al., 1994) und virale Einflüsse (Deacon et al., 1995) eine Rolle. Ähnliche Zusammenhänge sind für SIV-infizierte Makaken beschrieben worden (Sauermaun et al., 2000; Sauermaun, 2001). SIV-infizierte Rhesusaffen produzieren früh im Infektionsverlauf virus-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten gegen verschiedene Polypeptide des SIV (Miller et al., 1990). Diese T-Zellantwort ist an der Reduktion der Viruslast beteiligt (Reimann et al., 1994). Allerdings kann anhand dieser T-Zellantwort in der frühen Infektionsphase keine Aussage zur Prognose gemacht werden (Dittmer und Hunsmann, 1997). Ferner ist ein von zytotoxischen T-Zellen produzierter löslicher Faktor (CAF) beschrieben, dessen Identität bis heute ungeklärt ist, der aber hohe antivirale Aktivität bei den Langzeitüberlebenden zeigte (Levy et al., 1996; Walker et al., 1986). Auch besitzen die CD8<sup>+</sup> T-Zellen der LTNPs allgemein eine stärkere zytotoxische Aktivität als die anderer HIV-Infizierter (Saksena et al., 2007). Eine besondere Bedeutung für den Krankheitsverlauf werden ebenfalls den MHC-Molekülen zugeschrieben. Mehrere Studien belegten, dass Mamu-A\*01- und -B\*17-Allele mit einem längeren Überleben SIV-infizierter Makaken einhergehen, vermutlich über Induktion stärkerer antiviraler T-Zellantworten (Muhl et al., 2002). Allerdings sind auch Tiere mit diesen Allelen beschrieben, die einen variablen Infektionsverlauf zeigten. Somit ist das Vorhandensein solcher Allele nicht zwangsläufig mit einem Langzeitüberleben assoziiert (Yant et al.,

2006; Wojcechowskyj et al., 2007). Die LTNPs aus unseren Versuchen hatten die höchste APOBEC3-Expression und besaßen zu 90% die protektiven Mamu-Allele. Über diese Allele wird in diesen Tieren eine starke antivirale Immunantwort induziert, die sich z.B. in einer hohen IFN- $\gamma$  Produktion äußert. Neben einer erhöhten APOBEC3-Expression ist somit auch eine effektive zytotoxische T-Zellantwort für eine günstige Prognose des Infektionsverlaufes von Bedeutung.

### 4.3 Abschließende Bewertung und Ausblick

In unseren Untersuchungen wurde ein wichtiger Beitrag zum Langzeitüberleben der Rhesusaffen durch eine erhöhte APOBEC3-Expression gezeigt. Ulenga et al. wiesen auch einen Anstieg der APOBEC3-Expression bei HIV-Infizierten mit geringer Virusbeladung nach (Ulenga et al. 2008). Diese vermehrte APOBEC3-Transkription bei den LTNPs trägt möglicherweise zur Reduktion der Virusbeladung bei, wodurch wiederum ein längeres Überleben dieser Tiere begünstigt wird. Die Frage stellt sich nun, wie die erhöhte APOBEC3-Expression sich positiv auf die Überlebensdauer auswirken könnte. Hierzu muss man zunächst die APOBEC3-Vif-Interaktion betrachten. Wie bereits beschrieben, verursachen die Vif-Proteine der Lentiviren einen verstärkten Abbau von A3G/A3F (Sheehy et al., 2002; Yu et al., 2003; Zheng et al., 2004) oder eine Inhibition der Translation (Stopak et al., 2003). Möglicherweise führt eine hohe APOBEC3-Transkription zur Erschöpfung des Neutralisationspotential von Vif, weshalb nicht alle APOBEC3-Proteine von Vif gebunden und abgebaut werden können. Damit kann trotz Anwesenheit von Vif die virale Replikation beeinträchtigt sein (Mangeat et al., 2003; Sheehy et al., 2002). So wurde bei Patienten, die durch APOBEC3-induzierte hypermutierte Sequenzen im HIV-1 Genom aufwiesen, eine geringere Virusbeladung beobachtet (Pace et al., 2006). Ebenso weisen HIV-Infizierte mit einem langsamen Krankheitsverlauf eine größere genetische Vielfalt im Provirusgenom auf (Ross und Rodrigo, 2002) und Langzeitüberlebende zeigen eine höhere Variabilität des proviralen env-Gens (Roman et al., 2002; Wang et al., 2000). Diese hypermutierten proviralen Genome evolvieren langsamer und sind oftmals replikationsdefekt. Andere Studien konnten diesen Zusammenhang allerdings nicht bestätigen (Gandhi et al., 2008). Eine aktuelle Arbeit diskutiert dagegen sogar die Möglichkeit, dass die APOBEC3-induzierten Mutationen zur positiven Selektion der Viren während der frühen HIV-Infektion beitragen und damit der zytotoxischen T-

Zellimmunantwort leichter entgehen könnten (Wood et al., 2009). Auch hat Vif unterschiedliche Präferenz für den Abbau beider APOBEC3-Proteine. So gibt es Hinweise darauf, dass Vif von SIVmac das A3F nur unvollständig inhibiert, wogegen A3G eher abgebaut wird (Zennou und Bieniasz, 2006). Auf Grund unterschiedlicher Zielsequenzpräferenzen beider APOBEC3-Enzyme ist möglicherweise der Selektionsdruck für das Virus, A3G zu hemmen größer als für A3F (Zennou und Bieniasz, 2006). Die vom A3G induzierten Mutationen führen nämlich zur Generierung von Stoppcodons im Virusgenom, welche fatale Auswirkungen auf den viralen Entwicklungszyklus haben können. Die vom A3F eingeführten Variationen verursachen dagegen bevorzugt Aminosäureaustausche im Virusgenom, die unter anderem auch zur Selektion besser angepasster Viren beitragen können (Saksena et al., 2007). Daneben wird eine Vif-unabhängige APOBEC3-Aktivität der LMM-Form in den Zielzellen vermutet. So ist bekannt, dass in der frühen Infektionsphase noch kein Vif-Protein vorhanden ist (Camaur und Trono, 1996), um APOBEC3 zu inhibieren. Neben der durch APOBEC3-induzierten Mutation des retroviralen Genoms wurden auch deaminaseunabhängige Hemmungen beschrieben (Anderson and Hope, 2008; Holmes et al., 2007b; Iwatani et al., 2007; Luo et al., 2007; Mbisa et al., 2007). So kann beispielsweise das in die Viruspartikel eingebaute A3G, gebunden an virale genomische RNA, die reverse Transkription sterisch hemmen (Newman et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass LTNPs wenig oder gar kein funktionelles Vif-Protein mehr produzieren. Die Folge wäre auch hier ein vermehrter Einbau von APOBEC3 in die Viruspartikel. Eine höhere Mutationsrate viraler Genome wurde in diesem Zusammenhang bereits für die humanen APOBEC3-Proteine gezeigt (Beale et al., 2004; Harris et al., 2003; Lecossier et al., 2003; Mangeat et al., 2003; Sheehy et al., 2002). Mehrere Studien belegen, dass schon die Änderung einer Aminosäure in der konservierten SLQXLA-Sequenz vom Vif dessen Funktion beeinträchtigen kann (Bogerd et al., 2004; Mangeat et al., 2004; Schrofelbauer et al., 2004; Xu et al., 2004). Diese Mutation führt damit zu einem weniger pathogenen Virus und ist ebenfalls mit einer APOBEC3-induzierten erhöhten Hypermutationsrate des viralen Genoms verbunden (Schmitt et al., 2009). Auch Simon et al. bestätigten eine natürliche Variation unter den Vif-Allelen. So gibt es Vif-Varianten, die nicht in der Lage sind, APOBEC3 zu neutralisieren. Eine solche sporadische Inaktivierung der Vif-Allele kann *in vivo* durch Fehler während der reversen Transkription bzw. durch Deaminierung

verursacht werden (Simon et al., 2005). Denkbar ist, dass die erhöhte APOBEC3-Expression bei den LTNPs auch hier zu Vif-inaktivierenden Mutationen beiträgt. So fanden Yamada und Iwamoto bei den LTNPs häufiger mutiertes Vif als in Individuen mit progressivem HIV-Verlauf (Yamada und Iwamoto, 2000). Andere Studien zeigten aber, dass dieser Befund nicht immer konsistent ist (Hassaine et al., 2000; Zhang et al., 1997). Inwiefern sich die Mutationsfrequenz retroviraler SIV-Genome, insbesondere innerhalb der vif-Region, bei Makaken mit progressivem Verlauf von denen der Langzeitüberlebenden unterscheidet, ist derzeit Gegenstand weiterer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. In einer aktuellen Studie fanden Shirakawa et al., dass die Phosphorylierung des humanen A3G mit einer reduzierten Bindung an Vif einhergeht (Shirakawa et al., 2008). Solche posttranslationalen Modifikationen der APOBEC3-Proteine könnten auch hier die antivirale Aktivität beeinflussen. Darüber hinaus wurden auch APOBEC3-Polymorphismen mit dem Erkrankungsverlauf in Verbindung gebracht. So zeigten An et al., dass der A3G-Genotyp 186R/R mit einer schnelleren Progression der HIV-Infektion verbunden ist (An et al., 2004). Untersuchungen im Rhesusaffenmodell fanden einen ähnlichen Trend zwischen bestimmten A3G-Allelen und der SIV-Progression (Weiler et al., 2006). Daher ist eine Rolle von Polymorphismen der Wirtsgene für die Pathogenese der SIV-Infektion auch hier nicht auszuschließen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine erhöhte APOBEC3-Expression mit einer verringerten Virusbeladung, einer geringeren Induktion Interferon-induzierter Gene und damit einer höheren Überlebensdauer bei SIV-infizierten Rhesusaffen einhergeht. Die bedeutende Rolle der APOBEC3-Deaminasen bei der angeborenen Immunantwort gegen retrovirale Infektionen konnte hiermit bestätigt werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine höhere Viruslast mit einer verstärkten Induktion Interferon-induzierter Gene in Progressoren und einer geringeren APOBEC3-Expression verbunden ist. Das bedeutet somit eine schlechte Prognose und lässt die Applikation von Interferonen zur Therapie der HIV-Infektion fragwürdig erscheinen. Dennoch scheinen zumindest Interferone vom Typ I während der akuten Infektion eine Rolle bei der APOBEC3-Induktion zu spielen. Später in der chronischen Phase haben Interferone wahrscheinlich eher nachteilige Auswirkungen und sind Ausdruck einer überschießenden Immunantwort. Hier tragen eher andere Faktoren zur Erhöhung der APOBEC3-Expression bei. Solche Faktoren können genetischer, immunologischer und

sogar viraler Natur sein und den Krankheitsverlauf beeinflussen. Durch Auswahl geeigneter Immunisierungsstrategien könnte man versuchen, die APOBEC3-Expression zu erhöhen, um den Krankheitsverlauf zu verlangsamen. Auch eine Inhibierung der APOBEC3-Vif-Interaktion müsste sich vorteilhaft auf die Überlebensdauer HIV/SIV-infizierter Individuen auswirken.

## 5. Zusammenfassung

A3G und A3F repräsentieren Bestandteile der angeborenen Immunantwort, die in der Lage sind, die HIV-Replikation zu inhibieren. Aus der beschriebenen Literatur ergeben sich teilweise widersprüchliche Resultate. Einige Studien zeigten, dass eine erhöhte APOBEC3-Expression mit einer verringerten Virusbeladung HIV-Infizierter einhergeht, wohingegen andere Untersuchungen diesen Zusammenhang nicht belegen konnten. Somit ist letztendlich die Rolle der antiviralen Aktivität der APOBEC3-Proteine in der Pathogenese HIV-infizierter Individuen ungeklärt. Aus diesem Grund befasste sich die vorliegende Arbeit mit den Auswirkungen der APOBEC3-Expression auf den Krankheitsverlauf SIV-infizierter Rhesusaffen, dem wichtigsten Tiermodell für AIDS. Dafür wurden die A3G- und A3F-Transkriptionsraten zu verschiedenen Zeiten im Krankheitsverlauf mit real-time-PCR in einigen Zellpopulationen des Blutes sowie in den Zellen der Lymphknoten bestimmt. In diesen Untersuchungen ergab sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen APOBEC3-Expression und Virusbeladung. So wiesen Makaken, die am längsten überlebten die höchste APOBEC3-Expression, auch auf Proteinebene, und die niedrigste Virusbeladung auf. Es ist wahrscheinlich, dass diese erhöhte APOBEC3-Expression in den Langzeitüberlebenden zur Reduktion der Virusbeladung beitrug und somit den Krankheitsverlauf günstig beeinflusste, was sich in der Erhöhung der Überlebensdauer widerspiegelte. Allerdings war es nicht möglich, anhand der APOBEC3-Werte zu frühen Zeitpunkten im Infektionsverlauf eine Aussage über die zukünftige Progression eines Tieres zu machen. Dafür stellt nach wie vor die Virusbeladung ein verlässlicher Marker dar. Der direkte Zusammenhang zwischen der A3G- und der A3F-Expression bei SIV-infizierten Makaken legte ferner eine koordinierte Induktion der Transkription beider Gene durch infektionsspezifische Faktoren nahe. In einer Vielzahl von Studien wurde die Rolle von Interferonen im viralen Infektionsverlauf belegt. Daher haben wir im Verlauf der SIV-Infektion die APOBEC3-Expression über die Messung zweier Interferon-induzierter Gene (MxA und IP-10) in Bezug zur Interferonantwort gesetzt. In der akuten Phase fanden wir einen direkten Zusammenhang zwischen der A3G- und der MxA-Expression. Dagegen hatten Tiere in der chronischen Infektionsphase mit hoher MxA-Expression eine reduzierte APOBEC3-Transkription. Bei Rhesusaffen mit AIDS zeigte sich, vergleichbar zur Primärinfektion, wieder eine direkte Korrelation zwischen A3G und MxA. Diese

Resultate lassen vermuten, dass Typ-I-Interferone zumindest während der akuten Phase eine Rolle bei der Induktion der APOBEC3-Expression spielen. Später im Infektionsverlauf tragen eher andere Faktoren zum Anstieg der APOBEC3-Expression bei. So hatten fast alle der hier untersuchten LTNPs protektive Mamu-Allele. Es ist bekannt, dass über diese Allele eine starke antivirale Immunantwort induziert werden kann. Neben der erhöhten APOBEC3-Expression liefert also möglicherweise auch eine effektive T-Zellantwort einen wesentlichen Beitrag zum Langzeitüberleben. Darüber hinaus ging aus der Immunisierungsstudie hervor, dass es möglich ist, die APOBEC3-Expression durch Immunisierung zu erhöhen und damit die Virusbeladung zu reduzieren. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit verdeutlichen einen wesentlichen Beitrag der APOBEC3-Gene auf den Verlauf einer Immundefizienzvirusinfektion. Eine gezielte Induktion dieser antiretroviralen Proteine, z.B. durch bestimmte Immunisierungsstrategien, eröffnet möglicherweise neue therapeutische Wege, das Krankheitsgeschehen günstig zu beeinflussen.

---

## Literaturverzeichnis

- Abel, K., M. J. Alegria-Hartman, K. Zanotto, M. B. McChesney, M. L. Marthas, and C. J. Miller.** 2001. Anatomic site and immune function correlate with relative cytokine mRNA expression levels in lymphoid tissues of normal rhesus macaques. *Cytokine* **16**:191-204.
- Abel, K., M. J. Alegria-Hartman, K. Rothaeusler, M. Marthas, and C. J. Miller.** 2002. The relationship between simian immunodeficiency virus RNA levels and the mRNA levels of alpha/beta interferons (IFN-alpha/beta) and IFN-alpha/beta-inducible Mx in lymphoid tissues of rhesus macaques during acute and chronic infection. *J Virol* **76**:8433-45.
- Abel, K., D. M. Rocke, B. Chohan, L. Fritts, and C. J. Miller.** 2005. Temporal and anatomic relationship between virus replication and cytokine gene expression after vaginal simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* **79**:12164-72.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-402.
- An, P., G. Bleiber, P. Duggal, G. Nelson, M. May, B. Mangeat, I. Alobwede, D. Trono, D. Vlahov, S. Donfield, J. J. Goedert, J. Phair, S. Buchbinder, S. J. O'Brien, A. Telenti, and C. A. Winkler.** 2004. APOBEC3G genetic variants and their influence on the progression to AIDS. *J Virol* **78**:11070-6.
- Anderson, J. L., and T. J. Hope.** 2008. APOBEC3G restricts early HIV-1 replication in the cytoplasm of target cells. *Virology* **375**:1-12.
- Argyris, E. G., E. Acheampong, F. Wang, J. Huang, K. Chen, M. Mukhtar, and H. Zhang.** 2007. The interferon-induced expression of APOBEC3G in human blood-brain barrier exerts a potent intrinsic immunity to block HIV-1 entry to central nervous system. *Virology* **367**:440-51.
- Asensio, V. C., J. Maier, R. Milner, K. Boztug, C. Kincaid, M. Moulard, C. Phillipson, K. Lindsley, T. Krucker, H. S. Fox, and I. L. Campbell.** 2001. Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro. *J Virol* **75**:7067-77.
- Baca, L. M., P. Genis, D. Kalvakolanu, G. Sen, M. S. Meltzer, A. Zhou, R. Silverman, and H. E. Gendelman.** 1994. Regulation of interferon-alpha-inducible cellular genes in human immunodeficiency virus-infected monocytes. *J Leukoc Biol* **55**:299-309.
- Bach, E. A., M. Aguet, and R. D. Schreiber.** 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* **15**:563-91.
- Barin, F., S. M'Boup, F. Denis, P. Kanki, J. S. Allan, T. H. Lee, and M. Essex.** 1985. Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* **2**:1387-9.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-71.
- Bass, B. L.** 1997. RNA editing and hypermutation by adenosine deamination. *Trends Biochem Sci* **22**:157-62.

- Baumgarth, N., and M. Roederer.** 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* **243**:77-97.
- Beale, R. C., S. K. Petersen-Mahrt, I. N. Watt, R. S. Harris, C. Rada, and M. S. Neuberger.** 2004. Comparison of the differential context-dependence of DNA deamination by APOBEC enzymes: correlation with mutation spectra in vivo. *J Mol Biol* **337**:585-96.
- Biasin, M., L. Piacentini, S. Lo Caputo, Y. Kanari, G. Magri, D. Trabattoni, V. Naddeo, L. Lopalco, A. Clivio, E. Cesana, F. Fasano, C. Bergamaschi, F. Mazzotta, M. Miyazawa, and M. Clerici.** 2007. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. *J Infect Dis* **195**:960-4.
- Biron, C. A.** 1998. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol* **10**:383-90.
- Bishop, K. N., R. K. Holmes, A. M. Sheehy, N. O. Davidson, S. J. Cho, and M. H. Malim.** 2004. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* **14**:1392-6.
- Bishop, K. N., R. K. Holmes, and M. H. Malim.** 2006. Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J Virol* **80**:8450-8.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard.** 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* **15**:749-95.
- Bogerd, H. P., B. P. Doehle, H. L. Wiegand, and B. R. Cullen.** 2004. A single amino acid difference in the host APOBEC3G protein controls the primate species specificity of HIV type 1 virion infectivity factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3770-4.
- Bogerd, H. P., H. L. Wiegand, B. P. Doehle, K. K. Lueders, and B. R. Cullen.** 2006. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res* **34**:89-95.
- Bonvin, M., F. Achermann, I. Greeve, D. Stroka, A. Keogh, D. Inderbitzin, D. Candinas, P. Sommer, S. Wain-Hobson, J. P. Vartanian, and J. Greeve.** 2006. Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication. *Hepatology* **43**:1364-74.
- Booth, V., D. W. Keizer, M. B. Kamphuis, I. Clark-Lewis, and B. D. Sykes.** 2002. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. *Biochemistry* **41**:10418-25.
- Bourara, K., T. J. Liegler, and R. M. Grant.** 2007. Target cell APOBEC3C can induce limited G-to-A mutation in HIV-1. *PLoS Pathog* **3**:1477-85.
- Breen, E. C., J. F. Salazar-Gonzalez, L. P. Shen, J. A. Kolberg, M. S. Urdea, O. Martinez-Maza, and J. L. Fahey.** 1997. Circulating CD8 T cells show increased interferon-gamma mRNA expression in HIV infection. *Cell Immunol* **178**:91-8.
- Brenchley, J. M., T. W. Schacker, L. E. Ruff, D. A. Price, J. H. Taylor, G. J. Beilman, P. L. Nguyen, A. Khoruts, M. Larson, A. T. Haase, and D. C. Douek.** 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **200**:749-59.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, and D. C. Douek.** 2006a. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* **7**:235-9.

- Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks, and D. C. Douek.** 2006b. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* **12**:1365-71.
- Brennan, R. O., and D. T. Durack.** 1981. Gay compromise syndrome. *Lancet* **2**:1338-9.
- Bryant, M., and L. Ratner.** 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:523-7.
- Buchbinder, S. P., M. H. Katz, N. A. Hessel, P. M. O'Malley, and S. D. Holmberg.** 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *Aids* **8**:1123-8.
- Bushman, F. D., T. Fujiwara, and R. Craigie.** 1990. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* **249**:1555-8.
- Bustin, S. A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**:169-93.
- Camau, D., and D. Trono.** 1996. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol* **70**:6106-11.
- Cameron, P. U., S. A. Mallal, M. A. French, and R. L. Dawkins.** 1990. Major histocompatibility complex genes influence the outcome of HIV infection. Ancestral haplotypes with C4 null alleles explain diverse HLA associations. *Hum Immunol* **29**:282-95.
- Capobianchi, M. R., H. Ankel, F. Ameglio, R. Paganelli, P. M. Pizzoli, and F. Dianzani.** 1992. Recombinant glycoprotein 120 of human immunodeficiency virus is a potent interferon inducer. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**:575-9.
- Chakrabarti, L., M. Hurtrel, M. A. Maire, R. Vazeux, D. Dormont, L. Montagnier, and B. Hurtrel.** 1991. Early viral replication in the brain of SIV-infected rhesus monkeys. *Am J Pathol* **139**:1273-80.
- Chakrabarti, L., M. C. Cumont, L. Montagnier, and B. Hurtrel.** 1994. Variable course of primary simian immunodeficiency virus infection in lymph nodes: relation to disease progression. *J Virol* **68**:6634-43.
- Chakrabarti, L. A.** 2004. The paradox of simian immunodeficiency virus infection in sooty mangabeys: active viral replication without disease progression. *Front Biosci* **9**:521-39.
- Chen, H., C. E. Lilley, Q. Yu, D. V. Lee, J. Chou, I. Narvaiza, N. R. Landau, and M. D. Weitzman.** 2006a. APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Curr Biol* **16**:480-5.
- Chen, K., J. Huang, C. Zhang, S. Huang, G. Nunnari, F. X. Wang, X. Tong, L. Gao, K. Nikisher, and H. Zhang.** 2006b. Alpha interferon potently enhances the anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of APOBEC3G in resting primary CD4 T cells. *J Virol* **80**:7645-57.
- Chen, K. M., E. Harjes, P. J. Gross, A. Fahmy, Y. Lu, K. Shindo, R. S. Harris, and H. Matsuo.** 2008. Structure of the DNA deaminase domain of the HIV-1 restriction factor APOBEC3G. *Nature* **452**:116-9.

- Cheret, A., R. Le Grand, P. Caufour, O. Neildez, F. Matheux, F. Theodoro, F. Boussin, B. Vaslin, and D. Dormont.** 1997. Chemoattractant factors (IP-10, MIP-1alpha, IL-16) mRNA expression in mononuclear cells from different tissues during acute SIVmac251 infection of macaques. *J Med Primatol* **26**:19-26.
- Cheret, A., R. Le Grand, P. Caufour, O. Neildez, F. Matheux, F. Theodoro, B. Vaslin, and D. Dormont.** 1999. RANTES, IFN-gamma, CCR1, and CCR5 mRNA expression in peripheral blood, lymph node, and bronchoalveolar lavage mononuclear cells during primary simian immunodeficiency virus infection of macaques. *Virology* **255**:285-93.
- Chiu, Y. L., V. B. Soros, J. F. Kreisberg, K. Stopak, W. Yonemoto, and W. C. Greene.** 2005. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* **435**:108-14.
- Chiu, Y. L., H. E. Witkowska, S. C. Hall, M. Santiago, V. B. Soros, C. Esnault, T. Heidmann, and W. C. Greene.** 2006. High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:15588-93.
- Chiu, Y. L., and W. C. Greene.** 2008. The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu Rev Immunol* **26**:317-53.
- Cho, S. J., H. Drechsler, R. C. Burke, M. Q. Arens, W. Powderly, and N. O. Davidson.** 2006. APOBEC3F and APOBEC3G mRNA levels do not correlate with human immunodeficiency virus type 1 plasma viremia or CD4+ T-cell count. *J Virol* **80**:2069-72.
- Chou, C. S., O. Ramilo, and E. S. Vitetta.** 1997. Highly purified CD25- resting T cells cannot be infected de novo with HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1361-5.
- Cichutek, K., and S. Norley.** 1993. Lack of immune suppression in SIV-infected natural hosts. *Aids* **7 Suppl 1**:S25-35.
- Clark, S. J., M. S. Saag, W. D. Decker, S. Campbell-Hill, J. L. Roberson, P. J. Veldkamp, J. C. Kappes, B. H. Hahn, and G. M. Shaw.** 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* **324**:954-60.
- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343-6.
- Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al.** 1986. What to call the AIDS virus? *Nature* **321**:10.
- Conticello, S. G., C. J. Thomas, S. K. Petersen-Mahrt, and M. S. Neuberger.** 2005. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* **22**:367-77.
- Cooper, D. A., A. A. Imrie, and R. Penny.** 1987. Antibody response to human immunodeficiency virus after primary infection. *J Infect Dis* **155**:1113-8.
- Cullen, B. R., and E. D. Garrett.** 1992. A comparison of regulatory features in primate lentiviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**:387-93.
- Dang, Y., X. Wang, W. J. Esselman, and Y. H. Zheng.** 2006. Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J Virol* **80**:10522-33.

- Daniel, M. D., N. L. Letvin, N. W. King, M. Kannagi, P. K. Sehgal, R. D. Hunt, P. J. Kanki, M. Essex, and R. C. Desrosiers. 1985. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* **228**:1201-4.
- Deacon, N. J., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford-Menting, D. J. Hooker, D. A. McPhee, A. L. Greenway, A. Ellett, C. Chatfield, V. A. Lawson, S. Crowe, A. Maerz, S. Sonza, J. Learmont, J. S. Sullivan, A. Cunningham, D. Dwyer, D. Dowton, and J. Mills. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**:988-91.
- Decker, T., P. Kovarik, and A. Meinke. 1997. GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* **17**:121-34.
- Delebecque, F., R. Suspene, S. Calattini, N. Casartelli, A. Saib, A. Froment, S. Wain-Hobson, A. Gessain, J. P. Vartanian, and O. Schwartz. 2006. Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. *J Virol* **80**:605-14.
- Desrosiers, R. C., and D. J. Ringler. 1989. Use of simian immunodeficiency viruses for AIDS research. *Intervirology* **30**:301-12.
- Desrosiers, R. C. 1990. The simian immunodeficiency viruses. *Annu Rev Immunol* **8**:557-78.
- Desrosiers, R. C. 1995. Non-human primate models for AIDS vaccines. *Aids* **9 Suppl A**:S137-41.
- Dittmar, M. T., A. McKnight, G. Simmons, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and P. Simmonds. 1997. HIV-1 tropism and co-receptor use. *Nature* **385**:495-6.
- Dittmer, U., and G. Hunsmann. 1997. Long-term non-progressive human immunodeficiency virus infection: new insights from the simian immunodeficiency virus model. *J Gen Virol* **78 ( Pt 5)**:979-84.
- Dufour, J. H., M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane, and A. D. Luster. 2002. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* **168**:3195-204.
- Emau, P., H. M. McClure, M. Isahakia, J. G. Else, and P. N. Fultz. 1991. Isolation from African Sykes' monkeys (*Cercopithecus mitis*) of a lentivirus related to human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **65**:2135-40.
- Erlandsson, L., R. Blumenthal, M. L. Eloranta, H. Engel, G. Alm, S. Weiss, and T. Leanderson. 1998. Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curr Biol* **8**:223-6.
- Esnault, C., O. Heidmann, F. Delebecque, M. Dewannieux, D. Ribet, A. J. Hance, T. Heidmann, and O. Schwartz. 2005. APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature* **433**:430-3.
- Faure, E., P. Lecine, C. Lipcey, S. Champion, and J. Imbert. 1997. Cell-to-cell contact activates the long terminal repeat of human immunodeficiency virus 1 through its kappaB motif. *Eur J Biochem* **244**:568-74.
- Feng, S., and E. C. Holland. 1988. HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* **334**:165-7.
- Flint, S. J., Enquist, L.W., Racaniello, V. R., and A. M. Skalka, 2000. Principles of Virology. ASM Press, 3. Auflage
- Freeman, W. M., S. J. Walker, and K. E. Vrana. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* **26**:112-22, 124-5.

- Fultz, P. N., H. M. McClure, D. C. Anderson, R. B. Swenson, R. Anand, and A. Srinivasan.** 1986. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*). *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:5286-90.
- Gabuzda, D. H., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, T. Dorfman, W. A. Haseltine, and J. Sodroski.** 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol* **66**:6489-95.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic.** 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:865-7.
- Gandhi, S. K., J. D. Siliciano, J. R. Bailey, R. F. Siliciano, and J. N. Blankson.** 2008. Role of APOBEC3G/F-mediated hypermutation in the control of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors. *J Virol* **82**:3125-30.
- Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes* troglodytes. *Nature* **397**:436-41.
- Gao, G., X. Guo, and S. P. Goff.** 2002. Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein. *Science* **297**:1703-6.
- Garcia, J. V., and A. D. Miller.** 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350**:508-11.
- Gibson, U. E., C. A. Heid, and P. M. Williams.** 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* **6**:995-1001.
- Giorgi, J. V., L. E. Hultin, J. A. McKeating, T. D. Johnson, B. Owens, L. P. Jacobson, R. Shih, J. Lewis, D. J. Wiley, J. P. Phair, S. M. Wolinsky, and R. Detels.** 1999. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* **179**:859-70.
- Goila-Gaur, R., and K. Strebel.** 2008. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* **5**:51.
- Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon.** 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**:1425-31.
- Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, W. E. Paul, and L. J. Picker.** 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* **12**:289-95.
- Guo, F., S. Cen, M. Niu, Y. Yang, R. J. Gorelick, and L. Kleiman.** 2007. The interaction of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid inhibits tRNA<sup>3</sup>Lys annealing to viral RNA. *J Virol* **81**:11322-31.
- Gutterman, J. U.** 1994. Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:1198-205.
- Hache, G., M. T. Liddament, and R. S. Harris.** 2005. The retroviral hypermutation specificity of APOBEC3F and APOBEC3G is governed by the C-terminal DNA cytosine deaminase domain. *J Biol Chem* **280**:10920-4.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, and P. M. Sharp.** 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**:607-14.

- Halbach, A., D. Nierwetberg, J. G. Muller, U. Sauer, T. Kerkau, N. Stolte, P. Hofmann, S. Czub, V. ter Meulen, and S. Sopper.** 2000. Total numbers of lymphocyte subsets in different lymph node regions of uninfected and SIV-infected macaques. *J Med Primatol* **29**:148-57.
- Haller, O., M. Frese, and G. Kochs.** 1998. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech* **17**:220-30.
- Haller, O., G. Kochs, and F. Weber.** 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* **344**:119-30.
- Harris, R. S., K. N. Bishop, A. M. Sheehy, H. M. Craig, S. K. Petersen-Mahrt, I. N. Watt, M. S. Neuberger, and M. H. Malim.** 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**:803-9.
- Harris, R. S., and M. T. Liddament.** 2004. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* **4**:868-77.
- Hassaine, G., I. Agostini, D. Candotti, G. Bessou, M. Caballero, H. Agut, B. Autran, Y. Barthalay, and R. Vigne.** 2000. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 vif gene in long-term asymptomatic individuals. *Virology* **276**:169-80.
- Hatzakis, A., P. Gargalianos, V. Kiosses, M. Lazanas, V. Sypsa, C. Anastassopoulou, V. Vigniklis, H. Sambatakou, C. Botsi, D. Paraskevis, and C. Stalgis.** 2001. Low-dose IFN-alpha monotherapy in treatment-naive individuals with HIV-1 infection: evidence of potent suppression of viral replication. *J Interferon Cytokine Res* **21**:861-9.
- Hatzioannou, T., S. Cowan, S. P. Goff, P. D. Bieniasz, and G. J. Towers.** 2003. Restriction of multiple divergent retroviruses by Lv1 and Ref1. *Embo J* **22**:385-94.
- Haynes, B. F., G. Pantaleo, and A. S. Fauci.** 1996. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science* **271**:324-8.
- Heaphy, S., C. Dingwall, I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh, and M. A. Skinner.** 1990. HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* **60**:685-93.
- Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman.** 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7311-5.
- Heise, C., P. Vogel, C. J. Miller, C. H. Halsted, and S. Dandekar.** 1993. Simian immunodeficiency virus infection of the gastrointestinal tract of rhesus macaques. Functional, pathological, and morphological changes. *Am J Pathol* **142**:1759-71.
- Henderson, L. E., R. E. Benveniste, R. Sowder, T. D. Copeland, A. M. Schultz, and S. Oroszlan.** 1988. Molecular characterization of gag proteins from simian immunodeficiency virus (SIVMne). *J Virol* **62**:2587-95.
- Herbeuval, J. P., A. Boasso, J. C. Grivel, A. W. Hardy, S. A. Anderson, M. J. Dolan, C. Chougnet, J. D. Lifson, and G. M. Shearer.** 2005. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood* **105**:2458-64.

- Herbeuval, J. P., J. Nilsson, A. Boasso, A. W. Hardy, M. J. Kruhlak, S. A. Anderson, M. J. Dolan, M. Dy, J. Andersson, and G. M. Shearer.** 2006. Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:7000-5.
- Herbeuval, J. P., and G. M. Shearer.** 2007. HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol* **123**:121-8.
- Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith.** 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10**:413-7.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson.** 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**:1026-30.
- Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell, and P. R. Johnson.** 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**:389-92.
- Holmes, R. K., F. A. Koning, K. N. Bishop, and M. H. Malim.** 2007a. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G. *J Biol Chem* **282**:2587-95.
- Holmes, R. K., M. H. Malim, and K. N. Bishop.** 2007b. APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci* **32**:118-28.
- Huet, T., R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants, and S. Wain-Hobson.** 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**:356-9.
- Hug, H., M. Costas, P. Staeheli, M. Aebi, and C. Weissmann.** 1988. Organization of the murine Mx gene and characterization of its interferon- and virus-inducible promoter. *Mol Cell Biol* **8**:3065-79.
- Huthoff, H., and M. H. Malim.** 2005. Cytidine deamination and resistance to retroviral infection: towards a structural understanding of the APOBEC proteins. *Virology* **334**:147-53.
- Huthoff, H., and M. H. Malim.** 2007. Identification of amino acid residues in APOBEC3G required for regulation by human immunodeficiency virus type 1 Vif and Virion encapsidation. *J Virol* **81**:3807-15.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov.** 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**:987-95.
- Iwatani, Y., H. Takeuchi, K. Strebel, and J. G. Levin.** 2006. Biochemical activities of highly purified, catalytically active human APOBEC3G: correlation with antiviral effect. *J Virol* **80**:5992-6002.
- Iwatani, Y., D. S. Chan, F. Wang, K. S. Maynard, W. Sugiura, A. M. Gronenborn, I. Rouzina, M. C. Williams, K. Musier-Forsyth, and J. G. Levin.** 2007. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res* **35**:7096-108.
- Jacks, T., M. D. Power, F. R. Masiarz, P. A. Luciw, P. J. Barr, and H. E. Varmus.** 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**:280-3.
- Jakschies, D., H. Hochkeppel, M. Horisberger, H. Deicher, and P. von Wussow.** 1990. Emergence and decay of the human Mx homolog in cancer patients during and after interferon-alpha therapy. *J Biol Response Mod* **9**:305-12.

- Jarmuz, A., A. Chester, J. Bayliss, J. Gisbourne, I. Dunham, J. Scott, and N. Navaratnam.** 2002. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* **79**:285-96.
- Jin, X., A. Brooks, H. Chen, R. Bennett, R. Reichman, and H. Smith.** 2005. APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA levels associate inversely with human immunodeficiency virus viremia. *J Virol* **79**:11513-6.
- Jin, X., H. Wu, and H. Smith.** 2007. APOBEC3G levels predict rates of progression to AIDS. *Retrovirology* **4**:20.
- Kao, S., M. A. Khan, E. Miyagi, R. Plishka, A. Buckler-White, and K. Strebel.** 2003. The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* **77**:11398-407.
- Kestler, H., T. Kodama, D. Ringler, M. Marthas, N. Pedersen, A. Lackner, D. Regier, P. Sehgal, M. Daniel, N. King, and et al.** 1990. Induction of AIDS in rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *Science* **248**:1109-12.
- Kestler, H. W., 3rd, D. J. Ringler, K. Mori, D. L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel, and R. C. Desrosiers.** 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**:651-62.
- Kewenig, S., T. Schneider, K. Hohloch, K. Lampe-Dreyer, R. Ullrich, N. Stolte, C. Stahl-Hennig, F. J. Kaup, A. Stallmach, and M. Zeitz.** 1999. Rapid mucosal CD4(+) T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *Gastroenterology* **116**:1115-23.
- Khan, M. A., S. Kao, E. Miyagi, H. Takeuchi, R. Goila-Gaur, S. Opi, C. L. Gipson, T. G. Parslow, H. Ly, and K. Strebel.** 2005. Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J Virol* **79**:5870-4.
- Kochs, G., C. Janzen, H. Hohenberg, and O. Haller.** 2002. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3153-8.
- Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho.** 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* **68**:4650-5.
- Kozak, S. L., M. Marin, K. M. Rose, C. Bystrom, and D. Kabat.** 2006. The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. *J Biol Chem* **281**:29105-19.
- Kreisberg, J. F., W. Yonemoto, and W. C. Greene.** 2006. Endogenous factors enhance HIV infection of tissue naive CD4 T cells by stimulating high molecular mass APOBEC3G complex formation. *J Exp Med* **203**:865-70.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
- Landau, N. R., M. Warton, and D. R. Littman.** 1988. The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature* **334**:159-62.
- Lane, B. R., S. R. King, P. J. Bock, R. M. Strieter, M. J. Coffey, and D. M. Markovitz.** 2003. The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication. *Virology* **307**:122-34.

- Lecossier, D., F. Bouchonnet, F. Clavel, and A. J. Hance.** 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* **300**:1112.
- Lee, J. T., Jr., and J. A. McCubrey.** 2002. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* **16**:486-507.
- Lemp, G. F., S. F. Payne, D. Neal, T. Temelso, and G. W. Rutherford.** 1990. Survival trends for patients with AIDS. *Jama* **263**:402-6.
- Letvin, N. L., K. A. Eaton, W. R. Aldrich, P. K. Sehgal, B. J. Blake, S. F. Schlossman, N. W. King, and R. D. Hunt.** 1983. Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:2718-22.
- Letvin, N. L., M. D. Daniel, P. K. Sehgal, R. C. Desrosiers, R. D. Hunt, L. M. Waldron, J. J. MacKey, D. K. Schmidt, L. V. Chalifoux, and N. W. King.** 1985. Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science* **230**:71-3.
- Letvin, N. L.** 1990. Animal models for AIDS. *Immunol Today* **11**:322-6.
- Letvin, N. L., and N. W. King.** 1990. Immunologic and pathologic manifestations of the infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**:1023-40.
- Levy, J. A.** 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* **57**:183-289.
- Levy, J. A., C. E. Mackewicz, and E. Barker.** 1996. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today* **17**:217-24.
- Li, Q., L. Duan, J. D. Estes, Z. M. Ma, T. Rourke, Y. Wang, C. Reilly, J. Carlis, C. J. Miller, and A. T. Haase.** 2005. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* **434**:1148-52.
- Li, X. Y., F. Guo, L. Zhang, L. Kleiman, and S. Cen.** 2007. APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* **282**:32065-74.
- Liao, W., S. H. Hong, B. H. Chan, F. B. Rudolph, S. C. Clark, and L. Chan.** 1999. APOBEC-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. *Biochem Biophys Res Commun* **260**:398-404.
- Liddament, M. T., W. L. Brown, A. J. Schumacher, and R. S. Harris.** 2004. APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr Biol* **14**:1385-91.
- Lin, H., Z. Zhang, H. Zhang, P. Yan, Q. Wang, and L. Bai.** 2009. Primary culture of human blood-retina barrier cells and preliminary study of APOBEC3 expression: an in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Luo, K., B. Liu, Z. Xiao, Y. Yu, X. Yu, R. Gorelick, and X. F. Yu.** 2004. Amino-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human APOBEC3G packaging. *J Virol* **78**:11841-52.
- Luo, K., Z. Xiao, E. Ehrlich, Y. Yu, B. Liu, S. Zheng, and X. F. Yu.** 2005. Primate lentiviral virion infectivity factors are substrate receptors that assemble with cullin 5-E3 ligase through a HCCH motif to suppress APOBEC3G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:11444-9.

- Luo, K., T. Wang, B. Liu, C. Tian, Z. Xiao, J. Kappes, and X. F. Yu.** 2007. Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J Virol* **81**:7238-48.
- Lusso, P., P. D. Markham, A. Ranki, P. Earl, B. Moss, F. Dorner, R. C. Gallo, and K. J. Krohn.** 1988. Cell-mediated immune response toward viral envelope and core antigens in gibbon apes (*Hylobates lar*) chronically infected with human immunodeficiency virus-1. *J Immunol* **141**:2467-73.
- Luster, A. D., and J. V. Ravetch.** 1987. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* **166**:1084-97.
- Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono.** 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**:99-103.
- Mangeat, B., P. Turelli, S. Liao, and D. Trono.** 2004. A single amino acid determinant governs the species-specific sensitivity of APOBEC3G to Vif action. *J Biol Chem* **279**:14481-3.
- Mariani, R., D. Chen, B. Schrefelbauer, F. Navarro, R. Konig, B. Bollman, C. Munk, H. Nymark-McMahon, and N. R. Landau.** 2003. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**:21-31.
- Mattapallil, J. J., D. C. Douek, B. Hill, Y. Nishimura, M. Martin, and M. Roederer.** 2005. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* **434**:1093-7.
- Mbisa, J. L., R. Barr, J. A. Thomas, N. Vandegraaff, I. J. Dorweiler, E. S. Svarovskaia, W. L. Brown, L. M. Mansky, R. J. Gorelick, R. S. Harris, A. Engelman, and V. K. Pathak.** 2007. Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *J Virol* **81**:7099-110.
- Mehle, A., E. R. Thomas, K. S. Rajendran, and D. Gabuzda.** 2006. A zinc-binding region in Vif binds Cul5 and determines cullin selection. *J Biol Chem* **281**:17259-65.
- Mellors, J. W., C. R. Rinaldo, Jr., P. Gupta, R. M. White, J. A. Todd, and L. A. Kingsley.** 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**:1167-70.
- Miller, M. D., C. I. Lord, V. Stallard, G. P. Mazzara, and N. L. Letvin.** 1990. The gag-specific cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys infected with the simian immunodeficiency virus of macaques. *J Immunol* **144**:122-8.
- Miller, M. D., M. T. Warmerdam, I. Gaston, W. C. Greene, and M. B. Feinberg.** 1994. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med* **179**:101-13.
- Misse, D., H. Yssel, D. Trabattoni, C. Oblet, S. Lo Caputo, F. Mazzotta, J. Pene, J. P. Gonzalez, M. Clerici, and F. Veas.** 2007. IL-22 participates in an innate anti-HIV-1 host-resistance network through acute-phase protein induction. *J Immunol* **178**:407-15.
- Modrow, S., Falke, D. and U. Truyen.** 1998. *Molekulare Virologie. Eine Einführung für Biologen und Mediziner.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1. Auflage.

- Morrison, T. B., J. J. Weis, and C. T. Wittwer.** 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**:954-8, 960, 962.
- Muckenfuss, H., J. K. Kaiser, E. Krebil, M. Battenberg, C. Schwer, K. Cichutek, C. Munk, and E. Flory.** 2007. Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the human APOBEC3G gene. *Nucleic Acids Res* **35**:3784-96.
- Muhl, T., M. Krawczak, P. Ten Haaft, G. Hunsmann, and U. Saueremann.** 2002. MHC class I alleles influence set-point viral load and survival time in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Immunol* **169**:3438-46.
- Muller, M. C., and F. Barre-Sinoussi.** 2003. SIV<sub>agm</sub>: genetic and biological features associated with replication. *Front Biosci* **8**:d1170-85.
- Muramatsu, M., V. S. Sankaranand, S. Anant, M. Sugai, K. Kinoshita, N. O. Davidson, and T. Honjo.** 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* **274**:18470-6.
- Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo.** 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**:553-63.
- Nara, P. L., W. G. Robey, L. O. Arthur, D. M. Asher, A. V. Wolff, C. J. Gibbs, Jr., D. C. Gajdusek, and P. J. Fischinger.** 1987. Persistent infection of chimpanzees with human immunodeficiency virus: serological responses and properties of reisolated viruses. *J Virol* **61**:3173-80.
- Neil, S. J., V. Sandrin, W. I. Sundquist, and P. D. Bieniasz.** 2007. An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell Host Microbe* **2**:193-203.
- Neil, S. J., T. Zang, and P. D. Bieniasz.** 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**:425-30.
- Newman, E. N., R. K. Holmes, H. M. Craig, K. C. Klein, J. R. Lingappa, M. H. Malim, and A. M. Sheehy.** 2005. Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol* **15**:166-70.
- Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein.** 1994. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* **77**:391-400.
- Ohta, Y., T. Masuda, H. Tsujimoto, K. Ishikawa, T. Kodama, S. Morikawa, M. Nakai, S. Honjo, and M. Hayami.** 1988. Isolation of simian immunodeficiency virus from African green monkeys and seroepidemiologic survey of the virus in various non-human primates. *Int J Cancer* **41**:115-22.
- Okeoma, C. M., A. Low, W. Bailis, H. Y. Fan, B. M. Peterlin, and S. R. Ross.** 2009. Induction of APOBEC3 in vivo causes increased restriction of retrovirus infection. *J Virol* **83**:3486-95.
- Orandle, M. S., K. C. Williams, A. G. MacLean, S. V. Westmoreland, and A. A. Lackner.** 2001. Macaques with rapid disease progression and simian immunodeficiency virus encephalitis have a unique cytokine profile in peripheral lymphoid tissues. *J Virol* **75**:4448-52.
- Pace, C., J. Keller, D. Nolan, I. James, S. Gaudieri, C. Moore, and S. Mallal.** 2006. Population level analysis of human immunodeficiency virus type 1 hypermutation and its relationship with APOBEC3G and vif genetic variation. *J Virol* **80**:9259-69.

- Pancio, H. A., N. Vander Heyden, and L. Ratner.** 2000. The C-terminal proline-rich tail of human immunodeficiency virus type 2 Vpx is necessary for nuclear localization of the viral preintegration complex in nondividing cells. *J Virol* **74**:6162-7.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, J. F. Demarest, L. Butini, M. Montroni, C. H. Fox, J. M. Orenstein, D. P. Kotler, and A. S. Fauci.** 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**:355-8.
- Pantaleo, G., O. J. Cohen, T. Schacker, M. Vaccarezza, C. Graziosi, G. P. Rizzardì, J. Kahn, C. H. Fox, S. M. Schnittman, D. H. Schwartz, L. Corey, and A. S. Fauci.** 1998. Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. *Nat Med* **4**:341-5.
- Peeters, M.** 2001. The genetic variability of HIV-1 and its implications. *Transfus Clin Biol* **8**:222-5.
- Peng, G., K. J. Lei, W. Jin, T. Greenwell-Wild, and S. M. Wahl.** 2006. Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J Exp Med* **203**:41-6.
- Peng, G., T. Greenwell-Wild, S. Nares, W. Jin, K. J. Lei, Z. G. Rangel, P. J. Munson, and S. M. Wahl.** 2007. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood* **110**:393-400.
- Pestka, S., C. D. Krause, and M. R. Walter.** 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* **202**:8-32.
- Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.
- Powell, L. M., S. C. Wallis, R. J. Pease, Y. H. Edwards, T. J. Knott, and J. Scott.** 1987. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* **50**:831-40.
- Reimann, K. A., K. Tenner-Racz, P. Racz, D. C. Montefiori, Y. Yasutomi, W. Lin, B. J. Ransil, and N. L. Letvin.** 1994. Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Virol* **68**:2362-70.
- Reinhart, T. A., B. A. Fallert, M. E. Pfeifer, S. Sanghavi, S. Capuano, 3rd, P. Rajakumar, M. Murphey-Corb, R. Day, C. L. Fuller, and T. M. Schaefer.** 2002. Increased expression of the inflammatory chemokine CXC chemokine ligand 9/monokine induced by interferon-gamma in lymphoid tissues of rhesus macaques during simian immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **99**:3119-28.
- Rodriguez-Jimenez, F. J., A. Krause, S. Schulz, W. G. Forssmann, J. R. Conejo-Garcia, R. Schreeb, and D. Motzkus.** 2003. Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics* **81**:175-83.
- Rogozin, I. B., M. K. Basu, I. K. Jordan, Y. I. Pavlov, and E. V. Koonin.** 2005. APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle* **4**:1281-5.

- Roman, F., E. Karita, A. Monnet, C. Lambert, E. Fontaine, S. Allen, F. Schneider, R. Hemmer, J. C. Schmit, and V. Arendt.** 2002. Rare and new V3 loop variants in HIV-1-positive long-term non-progressors from Rwanda. *Aids* **16**:1827-9.
- Rose, K. M., M. Marin, S. L. Kozak, and D. Kabat.** 2004. Transcriptional regulation of APOBEC3G, a cytidine deaminase that hypermutates human immunodeficiency virus. *J Biol Chem* **279**:41744-9.
- Ross, H. A., and A. G. Rodrigo.** 2002. Immune-mediated positive selection drives human immunodeficiency virus type 1 molecular variation and predicts disease duration. *J Virol* **76**:11715-20.
- Saksena, N. K., B. Rodes, B. Wang, and V. Soriano.** 2007. Elite HIV controllers: myth or reality? *AIDS Rev* **9**:195-207.
- Samuel, C. E., K. L. Kuhen, C. X. George, L. G. Ortega, R. Rende-Fournier, and H. Tanaka.** 1997. The PKR protein kinase--an interferon-inducible regulator of cell growth and differentiation. *Int J Hematol* **65**:227-37.
- Samuel, C. E.** 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**:778-809, table of contents.
- Sanders, V. J., C. A. Pittman, M. G. White, G. Wang, C. A. Wiley, and C. L. Achim.** 1998. Chemokines and receptors in HIV encephalitis. *Aids* **12**:1021-6.
- Sarkis, P. T., S. Ying, R. Xu, and X. F. Yu.** 2006. STAT1-independent cell type-specific regulation of antiviral APOBEC3G by IFN-alpha. *J Immunol* **177**:4530-40.
- Sasada, A., A. Takaori-Kondo, K. Shirakawa, M. Kobayashi, A. Abudu, M. Hishizawa, K. Imada, Y. Tanaka, and T. Uchiyama.** 2005. APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1. *Retrovirology* **2**:32.
- Sauermann, U., C. Stahl-Hennig, N. Stolte, T. Muhl, M. Krawczak, M. Spring, D. Fuchs, F. J. Kaup, G. Hunsmann, and S. Sopper.** 2000. Homozygosity for a conserved Mhc class II DQ-DRB haplotype is associated with rapid disease progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques: results from a prospective study. *J Infect Dis* **182**:716-24.
- Sauermann, U.** 2001. Making the animal model for AIDS research more precise: the impact of major histocompatibility complex (MHC) genes on pathogenesis and disease progression in SIV-infected monkeys. *Curr Mol Med* **1**:515-22.
- Sawyer, S. L., M. Emerman, and H. S. Malik.** 2004. Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol* **2**:E275.
- Schacker, T., S. Little, E. Connick, K. Gebhard, Z. Q. Zhang, J. Krieger, J. Pryor, D. Havlir, J. K. Wong, R. T. Schooley, D. Richman, L. Corey, and A. T. Haase.** 2001. Productive infection of T cells in lymphoid tissues during primary and early human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **183**:555-62.
- Schaefer, T. M., C. L. Fuller, S. Basu, B. A. Fallert, S. L. Poveda, S. K. Sanghavi, Y. K. Choi, D. E. Kirschner, E. Feingold, and T. A. Reinhart.** 2006. Increased expression of interferon-inducible genes in macaque lung tissues during simian immunodeficiency virus infection. *Microbes Infect* **8**:1839-50.
- Schmitt, K., M. S. Hill, A. Ruiz, N. Culley, D. M. Pinson, S. W. Wong, and E. B. Stephens.** 2009. Mutations in the highly conserved SLQYLA motif of Vif in a simian-human immunodeficiency virus result in a less pathogenic virus and are associated with G-to-A mutations in the viral genome. *Virology* **383**:362-72.

- Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman.** 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**:521-9.
- Schrofelbauer, B., D. Chen, and N. R. Landau.** 2004. A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3927-32.
- Schulte, R., Y. S. Suh, U. Sauermann, W. Ochieng, S. Sopper, K. S. Kim, S. S. Ahn, K. S. Park, N. Stolte-Leeb, G. Hunsmann, Y. C. Sung, and C. Stahl-Hennig.** 2009. Mucosal prior to systemic application of recombinant adenovirus boosting is more immunogenic than systemic application twice but confers similar protection against SIV-challenge in DNA vaccine-primed macaques. *Virology* **383**:300-9.
- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi, and M. H. Malim.** 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**:646-50.
- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, and M. H. Malim.** 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **9**:1404-7.
- Shirakawa, K., A. Takaori-Kondo, M. Yokoyama, T. Izumi, M. Matsui, K. Io, T. Sato, H. Sato, and T. Uchiyama.** 2008. Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nat Struct Mol Biol* **15**:1184-91.
- Silvestri, G., D. L. Sodora, R. A. Koup, M. Paiardini, S. P. O'Neil, H. M. McClure, S. I. Staprans, and M. B. Feinberg.** 2003. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* **18**:441-52.
- Simon, A., J. Fah, O. Haller, and P. Staeheli.** 1991. Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines. *J Virol* **65**:968-71.
- Simon, J. H., D. L. Miller, R. A. Fouchier, M. A. Soares, K. W. Peden, and M. H. Malim.** 1998. The regulation of primate immunodeficiency virus infectivity by Vif is cell species restricted: a role for Vif in determining virus host range and cross-species transmission. *Embo J* **17**:1259-67.
- Simon, V., V. Zennou, D. Murray, Y. Huang, D. D. Ho, and P. D. Bieniasz.** 2005. Natural variation in Vif: differential impact on APOBEC3G/3F and a potential role in HIV-1 diversification. *PLoS Pathog* **1**:e6.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.
- Smith, P. L., G. Lombardi, and G. R. Foster.** 2005. Type I interferons and the innate immune response--more than just antiviral cytokines. *Mol Immunol* **42**:869-77.
- Sopper, S., C. Stahl-Hennig, M. Demuth, I. C. Johnston, R. Dorries, and V. ter Meulen.** 1997. Lymphocyte subsets and expression of differentiation markers in blood and lymphoid organs of rhesus monkeys. *Cytometry* **29**:351-62.

- Sopper, S., D. Nierwetberg, A. Halbach, U. Sauer, C. Scheller, C. Stahl-Hennig, K. Matz-Rensing, F. Schafer, T. Schneider, V. ter Meulen, and J. G. Muller.** 2003. Impact of simian immunodeficiency virus (SIV) infection on lymphocyte numbers and T-cell turnover in different organs of rhesus monkeys. *Blood* **101**:1213-9.
- Spring, M., C. Stahl-Hennig, T. Nisslein, C. Locher, D. Fuchs, W. Bodemer, G. Hunsmann, and U. Dittmer.** 1998. Suppression of viral replication in a long-term nonprogressing rhesus macaque experimentally infected with pathogenic simian immunodeficiency virus (SIV). *Clin Immunol Immunopathol* **87**:101-5.
- Staheli, P., F. Pitossi, and J. Pavlovic.** 1993. Mx proteins: GTPases with antiviral activity. *Trends Cell Biol* **3**:268-72.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber.** 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**:227-64.
- Stopak, K., C. de Noronha, W. Yonemoto, and W. C. Greene.** 2003. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* **12**:591-601.
- Stopak, K. S., Y. L. Chiu, J. Kropp, R. M. Grant, and W. C. Greene.** 2007. Distinct patterns of cytokine regulation of APOBEC3G expression and activity in primary lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. *J Biol Chem* **282**:3539-46.
- Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks, and M. A. Martin.** 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**:728-30.
- Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski.** 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**:848-53.
- Stylianou, E., P. Aukrust, K. Bendtzen, F. Muller, and S. S. Froland.** 2000. Interferons and interferon (IFN)-inducible protein 10 during highly active anti-retroviral therapy (HAART)-possible immunosuppressive role of IFN-alpha in HIV infection. *Clin Exp Immunol* **119**:479-85.
- Sui, Y., R. Potula, D. Pinson, I. Adany, Z. Li, J. Day, E. Buch, J. Segebrecht, F. Villinger, Z. Liu, M. Huang, O. Narayan, and S. Buch.** 2003. Microarray analysis of cytokine and chemokine genes in the brains of macaques with SHIV-encephalitis. *J Med Primatol* **32**:229-39.
- Sui, Y., S. Li, D. Pinson, I. Adany, Z. Li, F. Villinger, O. Narayan, and S. Buch.** 2005. Simian human immunodeficiency virus-associated pneumonia correlates with increased expression of MCP-1, CXCL10, and viral RNA in the lungs of rhesus macaques. *Am J Pathol* **166**:355-65.
- Suspene, R., D. Guetard, M. Henry, P. Sommer, S. Wain-Hobson, and J. P. Vartanian.** 2005. Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:8321-6.
- Tanaka, Y., H. Marusawa, H. Seno, Y. Matsumoto, Y. Ueda, Y. Kodama, Y. Endo, J. Yamauchi, T. Matsumoto, A. Takaori-Kondo, I. Ikai, and T. Chiba.** 2006. Anti-viral protein APOBEC3G is induced by interferon-alpha stimulation in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **341**:314-9.
- Temin, H. M., and S. Mizutani.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**:1211-3.

- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4.
- Tsujimoto, H., R. W. Cooper, T. Kodama, M. Fukasawa, T. Miura, Y. Ohta, K. Ishikawa, M. Nakai, E. Frost, G. E. Roelants, and et al.** 1988. Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **62**:4044-50.
- Turelli, P., B. Mangeat, S. Jost, S. Vianin, and D. Trono.** 2004. Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* **303**:1829.
- Ulena, N. K., A. D. Sarr, S. Thakore-Meloni, J. L. Sankale, G. Eisen, and P. J. Kanki.** 2008. Relationship between human immunodeficiency type 1 infection and expression of human APOBEC3G and APOBEC3F. *J Infect Dis* **198**:486-92.
- Varin, A., S. K. Manna, V. Quivy, A. Z. Decrion, C. Van Lint, G. Herbein, and B. B. Aggarwal.** 2003. Exogenous Nef protein activates NF-kappa B, AP-1, and c-Jun N-terminal kinase and stimulates HIV transcription in promonocytic cells. Role in AIDS pathogenesis. *J Biol Chem* **278**:2219-27.
- Veazey, R. S., M. DeMaria, L. V. Chalifoux, D. E. Shvetz, D. R. Pauley, H. L. Knight, M. Rosenzweig, R. P. Johnson, R. C. Desrosiers, and A. A. Lackner.** 1998. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* **280**:427-31.
- von Sydow, M., A. Sonnerborg, H. Gaines, and O. Strannegard.** 1991. Interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients in various stages of HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **7**:375-80.
- von Wussow, P., D. Jakschies, B. Block, B. Tschechne, I. Schedel, M. A. Horisberger, H. K. Hochkeppel, and H. Deicher.** 1990. The interferon-induced Mx-homologous protein in people with symptomatic HIV-1 infection. *Aids* **4**:119-24.
- Walker, C. M., D. J. Moody, D. P. Stites, and J. A. Levy.** 1986. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* **234**:1563-6.
- Wang, B., T. J. Spira, S. Owen, R. B. Lal, and N. K. Saksena.** 2000. HIV-1 strains from a cohort of American subjects reveal the presence of a V2 region extension unique to slow progressors and non-progressors. *Aids* **14**:213-23.
- Wang, T., C. Tian, W. Zhang, K. Luo, P. T. Sarkis, L. Yu, B. Liu, Y. Yu, and X. F. Yu.** 2007a. 7SL RNA mediates virion packaging of the antiviral cytidine deaminase APOBEC3G. *J Virol* **81**:13112-24.
- Wang, X., P. T. Dolan, Y. Dang, and Y. H. Zheng.** 2007b. Biochemical differentiation of APOBEC3F and APOBEC3G proteins associated with HIV-1 life cycle. *J Biol Chem* **282**:1585-94.
- Wang, Y., L. A. Bergmeier, R. Stebbings, T. Seidl, T. Whittall, M. Singh, N. Berry, N. Almond, and T. Lehner.** 2009. Mucosal immunization in macaques upregulates the innate APOBEC 3G anti-viral factor in CD4(+) memory T cells. *Vaccine* **27**:870-81.
- Watson, A., J. Ranchalis, B. Travis, J. McClure, W. Sutton, P. R. Johnson, S. L. Hu, and N. L. Haigwood.** 1997. Plasma viremia in macaques infected with simian immunodeficiency virus: plasma viral load early in infection predicts survival. *J Virol* **71**:284-90.

- Weiler, A., G. E. May, Y. Qi, N. Wilson, and D. I. Watkins.** 2006. Polymorphisms in eight host genes associated with control of HIV replication do not mediate elite control of viral replication in SIV-infected Indian rhesus macaques. *Immunogenetics* **58**:1003-9.
- Weisser, M., T. Haferlach, C. Schoch, W. Hiddemann, and S. Schnittger.** 2004. The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **18**:1551-3.
- Wiegand, H. L., B. P. Doehle, H. P. Bogerd, and B. R. Cullen.** 2004. A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *Embo J* **23**:2451-8.
- Wilhelm, J., and A. Pingoud.** 2003. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* **4**:1120-8.
- Wiley, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel.** 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* **66**:226-34.
- Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, C. N. Gundry, and K. S. Elenitoba-Johnson.** 2001. Real-time multiplex PCR assays. *Methods* **25**:430-42.
- Wojcechowskyj, J. A., L. J. Yant, R. W. Wiseman, S. L. O'Connor, and D. H. O'Connor.** 2007. Control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 is not predicted by inheritance of Mamu-B\*17-containing haplotypes. *J Virol* **81**:406-10.
- Wood, N., T. Bhattacharya, B. F. Keele, E. Giorgi, M. Liu, B. Gaschen, M. Daniels, G. Ferrari, B. F. Haynes, A. McMichael, G. M. Shaw, B. H. Hahn, B. Korber, and C. Seoighe.** 2009. HIV evolution in early infection: selection pressures, patterns of insertion and deletion, and the impact of APOBEC. *PLoS Pathog* **5**:e1000414.
- Wreschner, D. H., T. C. James, R. H. Silverman, and I. M. Kerr.** 1981. Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells. *Nucleic Acids Res* **9**:1571-81.
- Xu, H., E. S. Svarovskaia, R. Barr, Y. Zhang, M. A. Khan, K. Strebel, and V. K. Pathak.** 2004. A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:5652-7.
- Xu, H., E. Chertova, J. Chen, D. E. Ott, J. D. Roser, W. S. Hu, and V. K. Pathak.** 2007. Stoichiometry of the antiviral protein APOBEC3G in HIV-1 virions. *Virology* **360**:247-56.
- Yamada, T., and A. Iwamoto.** 2000. Comparison of proviral accessory genes between long-term nonprogressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Virol* **145**:1021-7.
- Yang, B., K. Chen, C. Zhang, S. Huang, and H. Zhang.** 2007a. Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/aprimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. *J Biol Chem* **282**:11667-75.
- Yang, Y., F. Guo, S. Cen, and L. Kleiman.** 2007b. Inhibition of initiation of reverse transcription in HIV-1 by human APOBEC3F. *Virology* **365**:92-100.

- Yant, L. J., T. C. Friedrich, R. C. Johnson, G. E. May, N. J. Maness, A. M. Enz, J. D. Lifson, D. H. O'Connor, M. Carrington, and D. I. Watkins.** 2006. The high-frequency major histocompatibility complex class I allele Mamu-B\*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol* **80**:5074-7.
- Ying, S., X. Zhang, P. T. Sarkis, R. Xu, and X. Yu.** 2007. Cell-specific regulation of APOBEC3F by interferons. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **39**:297-304.
- Young, H. A.** 1996. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* **16**:563-8.
- Yu, X., Y. Yu, B. Liu, K. Luo, W. Kong, P. Mao, and X. F. Yu.** 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**:1056-60.
- Yu, Q., D. Chen, R. Konig, R. Mariani, D. Unutmaz, and N. R. Landau.** 2004a. APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. *J Biol Chem* **279**:53379-86.
- Yu, Q., R. Konig, S. Pillai, K. Chiles, M. Kearney, S. Palmer, D. Richman, J. M. Coffin, and N. R. Landau.** 2004b. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol* **11**:435-42.
- Yu, Y., Z. Xiao, E. S. Ehrlich, X. Yu, and X. F. Yu.** 2004c. Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev* **18**:2867-72.
- Zennou, V., and P. D. Bieniasz.** 2006. Comparative analysis of the antiretroviral activity of APOBEC3G and APOBEC3F from primates. *Virology* **349**:31-40.
- Zhang, L., Y. Huang, H. Yuan, S. Tuttleton, and D. D. Ho.** 1997. Genetic characterization of vif, vpr, and vpu sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* **228**:340-9.
- Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam, and L. Gao.** 2003. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**:94-8.
- Zhang, K. L., B. Mangeat, M. Ortiz, V. Zoete, D. Trono, A. Telenti, and O. Michielin.** 2007. Model structure of human APOBEC3G. *PLoS ONE* **2**:e378.
- Zheng, Y. H., D. Irwin, T. Kurosu, K. Tokunaga, T. Sata, and B. M. Peterlin.** 2004. Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* **78**:6073-6.

# Publikationsverzeichnis

## Publikation mit persönlicher Beteiligung

Poehlmann TG, Busch S, Mussil B, Winzer H, Weinert J, Mebes I, Schaumann A, Fitzgerald JS, Markert UR. The Possible Role of the JAK/STAT Pathway in Lymphocytes at the Fetomaternal Interface. *Chem Immunol Allergy* 2005; 89: 26-35

## Vorträge

Bianka Mussil, Dirk Motzkus, Ulrike Sauermann, Christiane Stahl-Hennig, Sieghart Sopper. Increased APOBEC3-Expression in long-term non-progressors (LTNPs) of SIV-Infected Macaques. Tird European Congress of Virology, September 2007, Nürnberg, Germany.

Bianka Mussil, Dirk Motzkus, Ulrike Sauermann, Christiane Stahl-Hennig, Sieghart Sopper. Correlation between APOBEC3-Expression and Disease Progression in SIV-Infected Macaques. GfV-Arbeitskreis „Immunbiologie von Virusinfektionen“, 6. Workshop “Pathogenitätsmechanismen und Immunkontrolle viraler Erreger”, Oktober 2007, Deidesheim, Germany.

## Posterbeiträge

Mussil B, Busch S, Poehlmann TG, Schaumann A, Markert UR. HLA-G1s inhibits IL-2 but not PHA-induced proliferation of decidual CD8 cells. European Congress of Reproductive Immunology, July 2004, Plzen, Czech Republic. *Am. J. Reprod. Immunol*, 2004, 51: 490

Bianka Mussil, Dirk Motzkus, Ulrike Sauermann, Christiane Stahl-Hennig, Sieghart Sopper. APOBEC3G-Expression in SIV-Infected Macaques. 18<sup>th</sup> Annual Meeting Gesellschaft für Virologie, März 2008, Heidelberg, Germany.

Bianka Mussil, Dirk Motzkus, Ulrike Sauermann, Christiane Stahl-Hennig, Sieghart Sopper. APOBEC3G-Expression in SIV-Infected Macaques. 18<sup>th</sup> Annual Meeting Gesellschaft für Virologie, März 2008, Heidelberg, Germany.

Bianka Mussil, Dirk Motzkus, Ulrike Sauermann, Christiane Stahl-Hennig, Sieghart Sopper. Increased APOBEC3-Expression in SIV-Infected Rhesus Macaques is Associated with Slower Disease Progression. 26<sup>th</sup> Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Dezember 2008, San Juan, Puerto Rico, USA

# Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen ganz herzlich bedanken, die mir mit Ihrem Rat und ihrer Unterstützung zur Ausführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. G. Hunsmann möchte ich für die Übernahme des Referats und für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung Infektionsbiologie des Deutschen Primatenzentrums anzufertigen, danken.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Fritz danke ich für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit im Fachbereich Biologie der Georg-August-Universität Göttingen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Sieghart Sopper für die Vergabe des interessanten Themas und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Abteilung Infektionsbiologie. Seine sehr gute Betreuung, seine fachkundigen Anregungen und seine Unterstützung in allen Fragestellungen waren eine große Hilfe.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Infektionsbiologie, die mir mit Rat und Tat beiseite standen, mir praktische Hilfe, Anregungen und Ideen gaben, danke ich ganz herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ulrike Sauer mann für die Bereitstellung der Viruslastdaten. Bei Herrn Dr. Dirk Motzkus möchte ich mich für die Sequenzen der GAPDH-Primer bedanken. Für die Einarbeitung in das Programm Endnote bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Roman Siddiqui. Weiterhin bedanke ich mich für die Unterstützung bei Frau Nicola Schwedhelm, Frau Dr. Christiane Stahl-Hennig, Frau Dr. Monika Franz, Frau Dr. Judith Montag und Herrn Dr. Reiner Schulte.

Auch danke ich herzlich Frau Dr. Monika Kruse und Herrn Dipl. Biol. Fabian Schmidt für die vielen hilfreichen Tipps und Gespräche, nicht nur zum Thema der Arbeit.

Stellvertretend für die vielen netten Kollegen, die jederzeit für ein freundliches Gespräch zur Verfügung standen, möchte ich mich auch bei Tina, Wiebke, Kristin, Ann-Christin, Nadine, Betty, Andrea, Aneela, Astrid und Corinna bedanken.

Bei Frau Karin Wolter bedanke ich mich besonders für ihre Hilfsbereitschaft in vielen Belangen.

Des weiteren danke ich den Tierärzten, Tierpflegern und Pathologen des DPZ, ohne deren Zusammenarbeit viele Versuche nicht möglich gewesen wären.

Meinem Freund Janko danke ich ganz besonders herzlich für seine Liebe und Geduld sowie die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Hilfe in allen Lebensbereichen. Hierfür und für die unzähligen vielen anderen Dinge, die hier zu erwähnen eine kritische Seitenzahl überschreiten würde, gebe ich meinen allergrößten Dank.

## Lebenslauf

---

**Bianka Mußil**

geboren am 28. September 1976 in Mühlhausen (Thüringen)

Diplom-Biologin

Nationalität: deutsch

---

- seit 08/2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe „Neurovirologie und Infektionsimmunologie“ der Abteilung Infektionsbiologie am Deutschen Primatenzentrum GmbH, Leibnitz Institut für Primatenforschung, Göttingen  
Mitarbeit an dem Drittmittelprojekt "Expression antiretroviraler Gene in SIV-infizierten Rhesusaffen"
- 02/2006-06 2009 Doktorandin in der Arbeitsgruppe „Neurovirologie und Infektionsimmunologie“ der Abteilung Infektionsbiologie am Deutschen Primatenzentrum GmbH, Leibnitz Institut für Primatenforschung, Göttingen  
Titel der Dissertation: "Charakterisierung der angeborenen Immunantwort in SIV-infizierten Rhesusaffen"
- 03/2000-10/2000 Studentische Hilfskraft  
Pilzkultursammlung in Weimar und Isotopenkurs
- 10/1999-03/2000 Tutorium und Seminar zum mikrobiologischem Grundpraktikum
- 10/1996-09/2005 Diplomstudiengang Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik und Botanik  
Thema der Diplomarbeit: „Einfluss von löslichem HLA-G1 auf zytotoxische T-Zellen aus der Decidua“ in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 10/1995-10/1996 Magisterstudiengang Biologie, Anthropologie, Ur- und Frühgeschichte und Amerikanistik an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

09/1991-06/1995 Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Mühlhausen  
Abschluss: Abitur

09/1983-06/1991 Besuch der Grundschule Stadtbergstrasse in Mühlhausen