

Aus dem Institut für Innere Medizin I
Frau Prof. Dr. M. Müller-Schilling
Fakultät für Medizin
des Universitätsklinikums Regensburg

**Analysen zum Einfluss spezifischer
Kapsidmutationen auf den CypA-abhängigen
Replikationsphänotyp von HIV-1.**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Benedikt Grandel

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuer: Prof. Dr. Bernd Salzberger

1. Mentor: Prof. Dr. Ralf Wagner

2. Mentor: Prof. Dr. Thomas Harrer

Projektbetreuer: Dr. Arne Schneidewind

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum vom Oktober 2010 bis Dezember 2014 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger und Herrn Dr. Arne Schneidewind am Institut für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Benedikt Grandel, geboren am 07.02.1983 in Regensburg, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Benedikt Grandel

Für meine Frau Nicola und meine Eltern.

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)	2
2.2 HIV-1: Taxonomie, Aufbau, Tropismus und Genomstruktur	4
2.3 Zelluläre Interaktionspartner des HIV-1 Kapsidproteins p24.....	8
2.3.1 HIV-1 und Cyclophilin A (CypA).....	8
2.3.2 Weitere zelluläre p24-Interaktionspartner	10
2.3.2.1 Kernporenproteine und Transportin 3.....	10
2.3.2.2 TRIM5 α	10
2.3.2.3 CPSF6	11
2.4 Die Funktion der zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) im Infektionsverlauf und bei einer verlängerten Kontrolle der Infektion.....	12
2.4.1 Korrelate einer effektiven CTL-Antwort in der akuten und chronischen Phase der HIV-Infektion	12
2.4.2 Grundlagen für eine verlängerte Kontrolle einer HIV Infektion	13
2.4.3 CTL-Immenselektionsdruck auf HIV	14
2.4.3.1 Charakterisierung einer protektiven Immunantwort vermittelt durch HLA-B*27	15
2.4.3.2 Charakterisierung einer protektiven Immunantwort vermittelt durch HLA-B*57	17
2.5 Grundlagen der vorliegenden Arbeit.....	17
2.6 Ziele der Arbeit	19
3. Materialien und Methoden	20
3.1 Materialien	20
3.1.1 Antikörper	20
3.1.2 Bakterien	20
3.1.2.1 One Shot MAX Efficiency DH5 α - T1 <i>E. coli</i> (Bestellnr.: 12297-016)	20
3.1.2.2 One Shot TOP10 <i>E. coli</i> (Bestellnr.: C4040-10)	20
3.1.2.3 One Shot Stabl3 <i>E. coli</i> (Bestellnr.: C7373-03).....	21
3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	21

3.1.3.1 Agarose	21
3.1.3.2 Antibiotika	21
3.1.3.2.1 Ampicillin	21
3.1.3.2.2 Geneticin (G-418)	21
3.1.3.2.3 Penicillin und Streptomycin	21
3.1.3.3 Calcineurin-Inhibitoren	22
3.1.3.3.1 Cyclosporin A (CsA)	22
3.1.3.3.2 FK-506	22
3.1.3.4 DNA-Größenstandard	22
3.1.3.5 Fötale Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	22
3.1.3.6 Dimethylsulfoxid (DSMO)	22
3.1.3.7 Dinukleotidtriphosphate (dNTPs)	22
3.1.3.8 Ethidiumbromid	22
3.1.3.9 FACS-Puffer:	23
3.1.3.10 Gelladepuffer	23
3.1.3.11 Glycerol	23
3.1.3.12 Kulturmedien	23
3.1.3.12.1 Bakterienkultur	23
3.1.3.12.2 Zellkultur	23
3.1.3.12.2.1 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	23
3.1.3.12.2.2 RPMI 1640	24
3.1.3.12.2.3 OptiMEM	24
3.1.3.13 Lipofectamin 2000	24
3.1.3.14 Paraformaldehyd (PFA)	24
3.1.3.15 Phosphat gepufferte Salzlösung ohne EDTA (auch: PBS ^{ohne})	24
3.1.3.16 Red Safe DNA Stain	24
3.1.3.17 Restriktionsendonukleasen	25
3.1.3.18 TAE-Puffer 50 x	25
3.1.3.19 Trypsin	25
3.1.3.20 Wasser	25

3.1.4 Geräte	26
3.1.4.1 Brutschrank.....	26
3.1.4.2 Durchflusszytometer	26
3.1.4.3 Freezing Container	26
3.1.4.4 Gellaufkammern und Elektrophoresegerät.....	26
3.1.4.5 Thermocycler	26
3.1.4.6 Typhoon 9200	26
3.1.4.7 Dark Reader Transilluminator	26
3.1.4.8 NanoDrop	26
3.1.4.9 Pipettierhilfen	27
3.1.4.10 Zentrifugen.....	27
3.1.5 Kits	27
3.1.6 Plasmide	27
3.1.7 PCR-Primer	27
3.1.7.1 Mutageneseprimer	27
3.1.7.2 Sequenzierungsprimer	29
3.1.8 Software	31
3.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	32
3.1.10 Viren und provirale Konstrukte.....	32
3.1.11 Zellen	35
3.1.11.1 GXR25 Zelllinie	35
3.1.11.2 HEK293T Zelllinie	35
3.2 Methoden.....	36
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	36
3.2.1.1 Agarosegelelektrophorese	36
3.2.1.2 Aufreinigung der Plasmid-DNA	36
3.2.1.3 ELISA (<i>enzyme linked immunosorbend assay</i>)	36
3.2.1.3.1 Bestimmung der p24-Konzentration im Zellkulturüberstand.....	36
3.2.1.3.2 Bestimmung der reversen Transkriptase-Aktivität im Zellkulturüberstand	37
3.2.1.4 Glycerolstocks.....	37

3.2.1.5 Herstellung der proviralen Varianten (Mutagenese)	37
3.2.1.6 Klonierungsstrategie zur Generierung der proviralen Vollängenkonstrukte....	38
3.2.1.7 Sequenzierungen	40
3.2.1.8 Transformation von <i>E. coli</i>	40
3.2.2 Zellbiologische Methoden	40
3.2.2.1 Bestimmung der relativen Infektiosität in GXR25-Zellen.....	40
3.2.2.2 Durchflusszytometrie / FACS (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)	41
3.2.2.3 Extrazelluläre Färbung von Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern ...	41
3.2.2.4 Langzeitkulturen von Virusvarianten	41
3.2.2.5 Langzeitlagerung von humanen Zellen.....	42
3.2.2.6 Passagierung der Zellen	42
3.2.2.7 Reinigung und Lagerung der virushaltigen Zellkulturüberstände	42
3.2.2.8 Selektion der GFP-Expression GXR25 Zellen	42
3.2.2.9 Transfektion humaner Zellen mit proviralen Konstrukten.....	43
4. Ergebnisteil	44
4.1 Beschreibung der einzelnen Teilprojekte.....	44
4.2 Charakterisierung von Env-Interaktionspartnern auf GXR25-Zellen	46
4.3 Vergleich des p24-ELISAs mit einem reversen Transkriptase-(RT) Assay	48
4.4 Phänotypische Analyse von CsA-abhängigen Virusvarianten	50
4.4.1 Wiederherstellung CsA-abhängiger Virusvarianten durch die <i>in vivo</i> Mutation S ₁₇₃ A	50
4.4.2 Phänotypische Analyse der KK10-assoziierten Mutationen im Kontext eines <i>clade B</i> Gag-Konsensusvirus.....	51
4.4.3 Wiederherstellung CsA-abhängiger Virusvarianten durch die <i>in vitro</i> Mutationen V ₂₁₈ A und A ₂₃₇ T	54
4.5 Cyclosporin A (CsA) Titration CsA-abhängiger Virusvarianten.....	57
4.6 Einfluss der immunsuppressiven Eigenschaft von CsA auf eine Infektion von GXR25-Zellen mit CsA-abhängigen Virusvarianten	60
4.7 Alternative Wege zur Kompensation des R ₂₆₄ K vermittelten Fitnessdefekts	62
4.7.1 Neue <i>in vitro</i> Mutationen kompensieren für R ₂₆₄ K.....	62

4.7.2 R ₂₆₄ K ohne S ₁₇₃ A: Ungewöhnliche <i>in vivo</i> Virusvarianten.....	66
4.8 Dominanz der CsA-Abhängigkeit durch R ₂₆₄ K über die CypA-Sensitivität durch T ₂₄₂ N74	
4.9 Analysen zur Vorhersage der p24-Struktur verschiedener Virusvarianten.....	75
5. Diskussion.....	80
5.1 Überblick.....	80
5.1.1 Bestimmung der relativen Infektiosität: Vor- und Nachteile des verwendeten Assays	81
5.1.2 Das Konsensusvirus als Modell zur Analyse von Punktmutationen	81
5.1.3 Hinweise auf den molekularen Mechanismus der CsA-Abhängigkeit.....	83
5.1.4 Alternative Möglichkeiten zur Kompensation des R ₂₆₄ K vermittelten Defekts	87
5.1.5 Analyse der p24-Strukturmodelle.....	89
5.2 Veränderte Proteininteraktionen mit p24 bei Kapsidvarianten	93
5.2.1 HLA-B*27 / -B*57-assoziierte Mutationen und TRIM5 α	93
5.2.2 Effekte der CypA-p24 Bindung auf Translokation und Integration.....	96
5.2.3 Die Interaktion des <i>cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6</i> (CPSF6) mit dem viralem Kapsid	97
5.2.4 Schematisches Modell der p24-Proteininteraktionen	102
6. Zentrale Aussagen	103
7. Ausblick.....	104
Danksagung	106
Abbildungsverzeichnis.....	107
Tabellenverzeichnis.....	108
Literaturverzeichnis	109
Abkürzungsverzeichnis.....	117
Appendix	120

1. Zusammenfassung

Eine effektive, HIV-spezifische Immunantwort durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) kann ein Grund dafür sein, dass eine HIV-infizierte Person eine verlängerte oder sogar andauernde Kontrolle der HIV-Infektion erlangt ¹. Die exprimierten humanen Leukozytenantigene (HLA) spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Vor allem die HLA-B Gene B*27 und B*57 sind wiederholt als protektiv im Fall einer HIV-Infektion beschrieben worden ²⁻⁵. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss verschiedener Punktmutationen auf die virale Replikationskompetenz. Die untersuchten Mutationen sind zum Teil *in vivo* und/oder *in vitro* mit dem CTL-Immenselektionsdruck auf zwei immunodominante p24/Gag-Epitope, TW10 (Aminosäuren 241-250) und KK10 (Aminosäuren 263-272) assoziiert ^{6,7}. Durch Mutagenese wurden provirale Varianten des HIV-Laborstamms NL4-3 generiert und in HEK293T-Zellen transfiziert. Mit den so generierten Viren erfolgte die Infektion einer Reporter-T-Zelllinie. Die Infektiosität der Virusvarianten im Vergleich zum WT wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Die Mutation R₂₆₄K im KK10-Epitop von p24 des HIV-1 macht das Virus *in vitro* nahezu replikationsinkompetent. In Patientenisolaten (*in vivo*) findet sich die Mutation R₂₆₄K deshalb fast ausschließlich in der Gegenwart der kompensatorisch wirkenden („sekundären“) Mutation S₁₇₃A. Die Interaktion von Cyclophilin A (CypA) mit dem viralen Kapsidprotein p24 spielt bei dem beschriebenen Phänotyp eine wichtige Rolle. Wildtyp HIV-1 und die kompensierte Variante sind *in vitro* CypA-abhängig, wohingegen die R₂₆₄K-Variante auf eine Inhibierung der CypA/p24 Interaktion, beispielsweise durch Cyclosporin A (CsA), angewiesen ist (CsA-abhängiger Phänotyp).⁷ Neben R₂₆₄K sind drei weitere Gag-Mutationen beschrieben, die eine CsA-Abhängigkeit vermitteln: T₁₈₆A, A₂₂₄E und G₂₂₆D ⁸⁻¹⁰.

In dieser Arbeit wurden vier wichtige Erkenntnisse erzielt: 1) Alle als CsA-abhängig bekannten Varianten wurden *in vitro* durch die *in vivo* relevante Mutation S₁₇₃A kompensiert („universeller Kompensator“). In eingeschränktem Maß gilt dies ebenfalls für die sekundären *in vitro* Mutationen V₂₁₈A und A₂₃₇T. Dies demonstriert, dass es sich bei T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K nicht nur um mehrere zu einem ähnlichen Phänotyp führende Mutationen handelt, sondern dass diese Mutationen den gleichen molekularen Mechanismus beeinträchtigen. 2) Es wurden mehrere, noch nicht beschriebene, kompensatorisch wirksame *in vitro* Mutationen für die R₂₆₄K-Variante identifiziert, die *in vitro* in ihrer Wirkung mit der S₁₇₃A Mutation vergleichbar sind. 3) Computergestützte Berechnungen einzelner Kapsidvarianten lieferten keine Anhaltspunkte dafür, dass die untersuchten Mutationen die Proteinstruktur von p24 verändern und zeigten zudem, dass die wirksamsten der alternativen kompensatorischen Mutationen in der Region der p24 α -Helices 2 bis 5 liegen. 4) Im Gegensatz zu den unter 2) beschriebenen alternativen *in vitro* Mutationen konnte für *in vivo* Mutationen eines ausgewählten Patientenisolats kaum ein kompensierender Effekt gezeigt werden. Bei den *in vivo* Mutationen handelt es sich um HLA-B*57 assoziierte Mutationen, die in einigen der seltenen Isolaten gefunden wurden, in denen R₂₆₄K *in vivo* ohne die S₁₇₃A Mutation nachgewiesen werden konnte.

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse über den Einfluss von Punktmutationen auf die Interaktion von p24 mit dem zellulären HIV-1 Ko-Faktor CypA und legt die Vermutung nahe, dass ein weiteres (zelluläres) Protein an p24 bindet und an der Vermittlung des CypA-abhängigen Phänotyps beteiligt ist.

2. Einleitung

2.1 Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)

Das heute weltweit verbreitete *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) wird durch das *Humane Immundefizienz Virus*, vor allem Typ 1 (HIV-1), verursacht. Die Erstbeschreibung des HIV erfolgte 1983 durch Barré-Sinoussi et al. und Gallo et al.^{11,12}. Der Ursprung der HIV-Pandemie liegt in Afrika, wo es vermutlich in den 1930iger Jahren mehrfach zu einer zoonotischen Übertragung des Affenimmundefizienzvirus (*simian immunodeficiency virus of chimpanzees* SIV_{cpz}) auf den Menschen kam. Im Zuge dieser Transfers sich entwickelte SIV_{cpz} zu HIV. Trotz intensiver Forschung in den vergangenen 30 Jahren konnte bisher keine Impfung gegen HIV entwickelt werden. Auch eine kurative Behandlung ist bisher nicht in Sicht, wenngleich auch eine Behandlung der HIV-Infektion mittlerweile durch Gabe von mehreren hochwirksamen antiviralen Wirkstoffen (HAART: *highly active antiretroviral therapy*) möglich ist (funktionelle Behandlung). Bei lebenslanger täglicher Einnahme der Medikamente erhöht sich die Lebenserwartung der Patienten deutlich¹³. Allerdings ist diese Behandlung für Betroffene in Entwicklungs- und Schwellenländern, die die Mehrheit der Betroffenen beheimaten, von diesen in der Regel nicht finanzierbar.

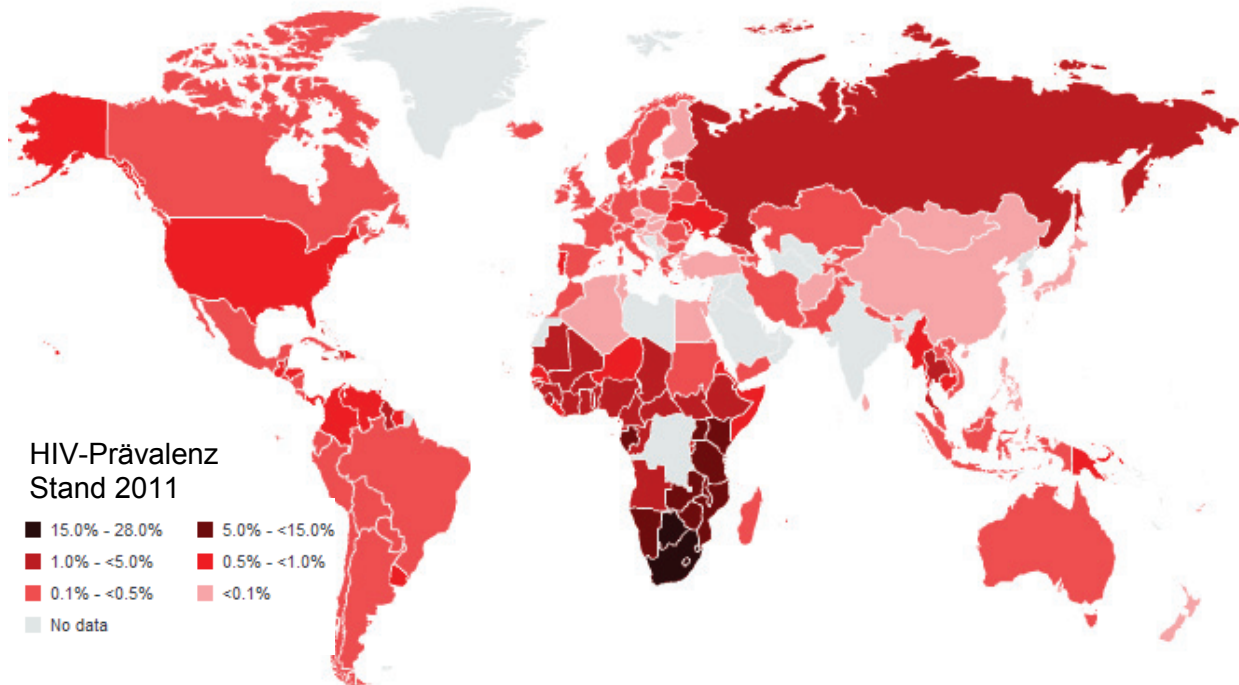


Abbildung (Abb.) 1: Weltweite HIV-Prävalenz

Gezeigt ist die HIV-Prävalenz in Prozent für jedes einzelne Land, soweit Daten erhoben sind und zur Verfügung stehen. Stand 2011. <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/datatools/aidsinfo/>

Laut UNAIDS waren im Jahr 2011 34 Mio. Menschen mit HIV infiziert. Die Gesamtprävalenz bei Erwachsenen betrug ca. 0,8%. Alleine im Jahr 2011 starben Schätzungen zu Folge 1,7 Mio. Menschen an AIDS-assoziierten Ursachen ¹⁴.

Am schwersten betroffen sind weite Teile Afrikas, Russlands und der Südostasiatische Raum (Abb. 1) (<http://www.unaids.org/en/dataanalysis/datatools/aidsinfo/>, Stand 2011).

Die Infektion erfolgt durch infektiöse Körperflüssigkeit (Samen, Vaginalsekret oder Blut) bei ungeschützten Sexualkontakten, Bluttransfusionen oder Verletzungen mit kontaminierten Gegenständen (z.B. Spritzen). Eine sexuelle Übertragung erfolgt meist nicht direkt durch Viruspartikel, sondern durch einzelne Virus-produzierende Zellen, wobei laut Keele et al. die Mehrzahl dieser Infektionen nur durch ein Virus bzw. eine infizierte Zelle (*founder-Virus*) etabliert wird ^{15,16}.

Der Krankheitsverlauf einer HIV-Infektion lässt sich in drei Stadien einteilen: Die akute Infektion, die chronische asymptomatische Infektion und das AIDS-Stadium (Abb. 2). Die akute Infektion verläuft häufig klinisch inapparent trotz einer Virämie von 10^6 bis 10^8 Genomäquivalenten / ml Blut. Eine HIV-Infektion ist bereits mit dem Einsetzen der Virusreplikation nachweisbar, diagnostiziert wird sie in der Regel jedoch erst mit der nach mehreren Wochen einsetzenden Serokonversion, die zugleich mit einem Abfall der Virämie ($< 2 \times 10^4$ Genomäquivalente / ml Blut) einhergeht. In seltenen Ausnahmefällen sinkt die Viruslast sogar unter die Nachweisgrenze von 50 Genomäquivalenten / ml Blut. Das Niveau, auf das die Virämie absinkt (auch als „*viral setpoint*“ bezeichnet), ist entscheidend für den weiteren Krankheitsverlauf. Mit einem höherem *viral setpoint* schreitet die Krankheit im Mittel schneller voran. Verantwortlich für den Rückgang der Virämie ist das Einsetzen der zellulären Immunantwort, vor allem durch HIV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) ¹⁶⁻¹⁹, aber auch durch die einsetzende Antikörperproduktion durch B-Plasmazellen. Das Ende der hochtitrigen Virämie stellt den Übergang zur latenten Phase dar, die meist mehrere Jahre dauert. Im Verlauf der latenten Phase sinkt die Zahl CD4-positiven Zellen langsam ab. Die durch die Virusreplikation zerstörten Zellen können zunächst noch gut durch die andauernde Neubildung von Zellen im Knochenmark ersetzt werden. Sinkt die Zahl aber unter 200 CD4-positiven Zellen / ml Blut, wird das Auftreten opportunistischer Erkrankungen stark begünstigt. Im Weiteren kommt es zum Zusammenbruch des Immunsystems und zum Ausbruch opportunistischer Infektionen sowie anderer AIDS definierender Ereignisse. Diesem Stadium geht häufig ein starker Anstieg der Viruslast voraus. ¹⁶

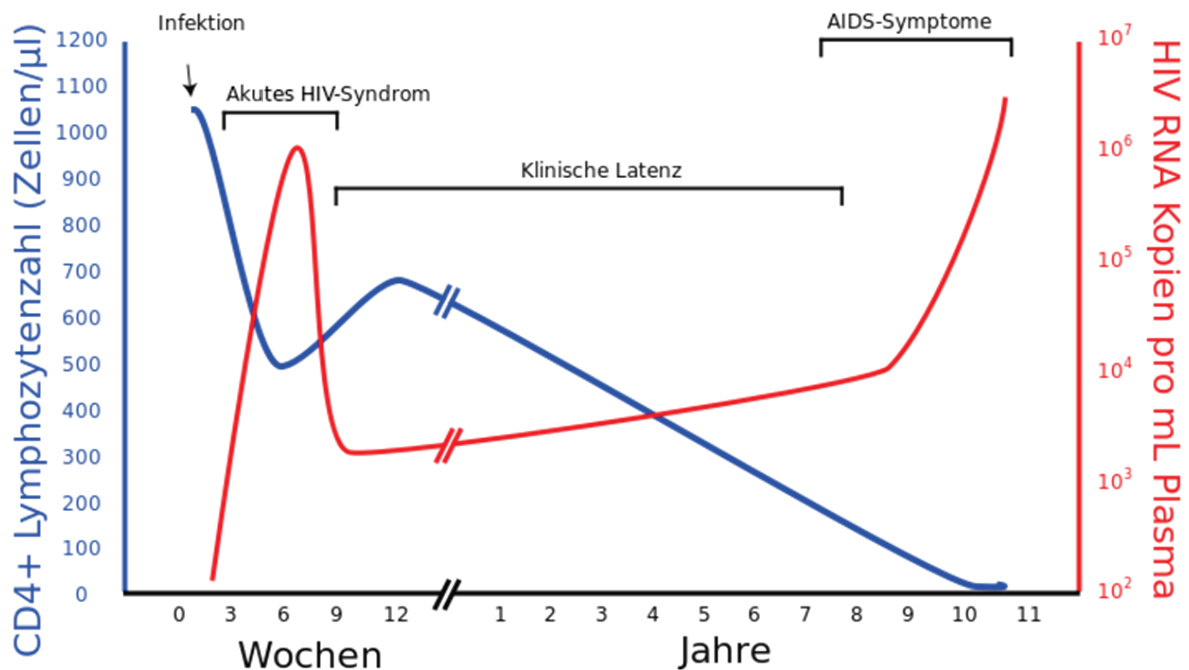


Abb. 2: Typischer Krankheitsverlauf bei einer HIV-Infektion

Gezeigt ist der schematische Krankheitsverlauf bei einer HIV-Infektion mit der Abnahme der CD4-positiven T-Lymphozyten (linke Ordinate; blau; Zellen / μl) und die sich mit dem Krankheitsstadium ändernde Viruslast / ml Blut (rechte Ordinate; rot; RNA Kopien / ml Plasma). Auf der Abszisse wird der zeitliche Verlauf mit wechselnder Skalierungsdimension (Wochen, Jahre) gezeigt.

Abbildung abgewandelt von: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hiv-timecourse_copy.svg, Stand 2013

2.2 HIV-1: Taxonomie, Aufbau, Tropismus und Genomstruktur

Das HI-Virus 1 (HIV-1) gehört zur Gattung der Lentiviren aus der Familie der Retroviridae (Unterfamilie: Orthoretrovirinae). Es gibt für verschiedene Spezies analoge Immundefizienz Viren, wie beispielsweise das SIV (Affenimmundefizienzvirus), das FIV (Felines Immundefizienzvirus) oder das BIV (Bovines Immundefizienzvirus). Neben HIV-1 ist als humanpathogener Vertreter noch das HI-Virus 2 aufzuführen, das aber für die HIV-Pandemie nur eine untergeordnete Rolle spielt und in dieser Arbeit nicht weiter beschrieben wird. An Hand der Sequenzunterschiede (> 30%) lassen sich vier Untergruppen von HIV-1 unterscheiden (M, N, O und P). Die Untergruppe M oder „major“ ist am weitesten verbreitet und lässt sich ihrerseits in acht Subtypen mit 70-75% Sequenzhomologie unterteilen (A-D, F, H, J und K). Neben diesen acht Subtypen existiert noch eine Reihe rekombinanter HIV-1 Subtypen aus zwei oder mehr der genannten Subtypen, die sogenannten *circulating recombinant forms* (CRFs) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). Der Subtyp C ist bezogen auf die globale Verbreitung dominant, in Westeuropa und den USA ist jedoch Subtyp B am weitesten verbreitet. Ähnlich wie HIV-2 spielen die

Untergruppen N („*non-M, non-O*“), O („*outlier*“) und P (Nomenklatur nach Robertson et al.)²⁰ in der Pandemie keine bedeutende Rolle.^{16,21}

Ein Viruspartikel hat einen Durchmesser von ca. 100 nm. Lentiviren besitzen pro Viruspartikel zwei separate einzelsträngige RNA-Kopien (ssRNA; *single stranded RNA*) des viralen Genoms von jeweils ca. 9200 Bp Länge. Die RNA-Genome sind +Strang-Genome, und liegen somit als *Sense*-Strang vor. Sie besitzen die Eigenschaften eukaryotischer mRNAs, wie beispielsweise eine 5'-cap-Struktur sowie einen 3'-PolyA-Schwanz. Als Primer enthalten sie für die reverse Transkription eine tRNA_{Lys} an einer als Primerbindestelle bezeichneten Position im 5'-U (*unique region*). Das Nukleoprotein (p7) komplexiert die Genome im Kapsid, in dem sie u.a. zusammen mit den viralen Proteinen Integrase und der reversen Transkriptase verpackt sind. Das Viruskapsid besteht aus ca. 1200 p24-Molekülen, die in ca. 12 Penta- und 250 Hexameren organisiert sind und zeichnet sich durch eine charakteristische konische Form aus (Abb. 3)^{22,23}.

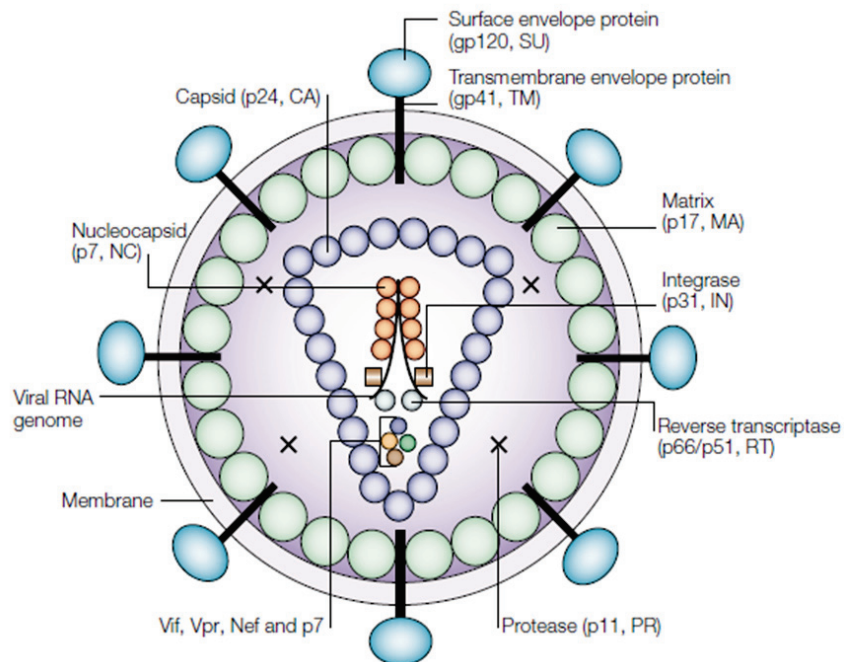


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines HIV-1 Partikels²⁴

Gezeigt sind von außen nach innen: Die Hüllmembran mit den *envelope*-Protein (bestehend aus gp120 und gp41), die Matrixproteine (p17) und das virale Enzym Protease. Die Membran selbst leitet sich von der Zellmembran der letzten Wirtszelle ab. Im Inneren befindet sich das konische HIV-Kapsid, bestehend aus Penta- und Hexameren des Kapsidproteins p24. Im Kapsid befinden sich die beiden ssRNA Kopien des viralen Genoms komplexiert durch das Nukleoprotein (p7) und die viralen Enzyme Integrase, Vif, Vpr, Nef und die reverse Transkriptase.²⁴

Das Kapsid ist über das Link-Protein (p6) mit der Virushülle (*envelope*, env) verbunden. Die Virushülle wurde von der Zellmembran der Wirtszelle beim Knospen des Partikels abgeleitet. Auf der Innenseite der Virushülle sind die Matrixproteine (p17) durch ihre Myristinsäurereste in der Virushülle verankert, was dem Virus eine definierte räumliche Struktur verleiht. Auf der Außenseite der Virushülle befinden sich bei HIV-1 lediglich ca. 14 virale Proteinkomplexe (Env-Homotrimere). Jedes Homotrimer besteht aus einer extrazellulären Domäne (gp120), die über eine nicht-kovalente Bindung an eine Transmembrandomäne (gp41) in der Virushülle verankert ist. Kodiert werden gp120 und gp41 durch das HIV-Gen env. Der trimere Proteinkomplex dient der Adsorption der Viruspartikel an ihre Wirtszellen.¹⁶

Die Wirtszellen des HI-Virus sind CD4-positive Zellen (u.a. T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen). Dabei sind die CD4-Rezeptoren die primären Interaktionspartner des HI-Virus mit seinen Wirtszellen. Diese Interaktion ist außerdem der erste Schritt zur Fusion von Virus- und Zellmembran. Für diese Membranfusion ist jedoch noch eine weitere Interaktion mit einem Ko-Rezeptor nötig. Das HIV Protein gp120, das als Trimer in der Virushülle vorliegt, dient als Interaktionspartner für den zellulären CD4-Rezeptor. Nach Kontakt mit CD4 durchläuft das Env-Trimer eine Konformationsänderung, was zum einen zu einer Annäherung des Partikels an die Zelloberfläche führt und zum anderen die Ko-Rezeptorbindestellen für ihre zellulären Interaktionspartner (CXCR4 (X4) oder CCR5 (R5)) zugänglich macht. Erst durch diese zweite Bindung wird die Fusion der beiden Membranen initiiert^{25,26}. An Hand des verwendeten Ko-Rezeptors lassen sich prinzipiell zwei HI-Virustypen unterscheiden: X4-trope und R5-trope Viren. X4-trope Viren benutzen CXCR4 (auch CD184) als Ko-Rezeptor und infizieren somit hauptsächlich T-Helferzellen. R5-trope Viren verwenden dagegen CCR5 (auch CD195) als Ko-Rezeptor und infizieren deshalb Monozyten und Makrophagen, aber auch CCR5⁺ CD4⁺ T-Zellen²⁷⁻²⁹. R5-trope Viren verursachen die meisten Neuinfektionen, da ihre Zielzellen (z.B. Makrophagen, CCR5⁺ CD4⁺ T-Zellen) im Gegensatz zu den CXCR4⁺, CD4⁺ T-Lymphozyten in den Schleimhautgeweben vorhanden sind. X4-trope Viren entwickeln sich meist erst im späteren Verlaufe der Infektion aus den ursprünglichen R5-tropen Viren.¹⁶

Das Genom von HIV-1 (Abb. 4) lässt sich in drei große kodierende Bereiche (gag, pol und env) unterteilen. Gag (*group-specific antigen*) ist ein Polyprotein, das für die bereits erwähnten Strukturproteine (Matrix-, Kapsid-, Link- und Nukleokapsidprotein) kodiert. Das Polyprotein Polymerase (Pol) kodiert für die Enzymmaschinerie des Virus (reverse Transkriptase (RT), Integrase (Int) und die Protease (Prot)). Das virale Oberflächenprotein Glykoprotein 140 (gp140 = Herterodimer aus gp120 und gp41) wird von env kodiert.

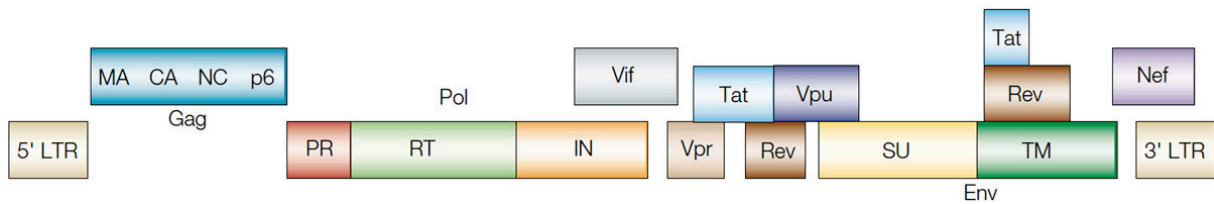


Abb. 4: Genomorganisation von HIV-1

Schematischer Genomaufbau von HIV-1 vom 5'- zum 3'-Ende: 5'-LTR (long terminal repeat), das Polyprotein Gag (group specific antigen), das Polyprotein Pol (polymerase), gefolgt von den akzessorischen Proteinen Vif (viral infectivity factor), Vpr (viral protein rapid) und Vpu (viral protein out). Im Bereich vom 3'-Ende Vpr und Beginn von Vpu liegen je die ersten Exons der transaktivatorischen Proteine Rev (regulator of expression of virion proteins) und Tat (transactivator of transcription). Die letzten kodierenden Bereiche sind das Polyprotein Env (envelope) und das akzessorische Protein Nef (negative factor), gefolgt vom 3'-LTR. ²⁴

Neben diesen drei großen Genen kodiert HIV-1 noch für sechs weitere Proteine (Nef, Rev, Vpr, Vpu, Vif und Tat). Manche Isolate kodieren für ein weiteres kleines Protein (Tev). Für die vorliegende Arbeit ist die transaktivatorische Wirkung von Tat hervorzuheben, da sie zur Induktion einer Tat-abhängigen GFP-Expression (green fluorescent protein) in den GXR25 Zellen (s. 3.1.11.1) verwendet wird. Die natürliche Aufgabe von Tat ist die Verstärkung der viralen Genomreplikation. ¹⁶

Dem Wunsch nach einer einfachen und langfristig wirksamen Behandlung bzw. einer präventiven Impfung gegen HIV steht die enorme Variabilität des Virus entgegen. Diese hat mehrere Ursachen. Die wichtigsten Quellen für die Sequenzvariabilität sind aber wohl die hohe Fehlerrate der zellulären RNA-Polymerase II (Fehlerrate: 1 Fehler / 10^3 - 10^5 Nukleotiden ³⁰), die zur Transkription der viralen DNA und somit zur Synthese der Tochter-RNA-Genome verwendet wird sowie die der viralen reversen Transkriptase (Fehlerrate: 1 Fehler / $2,5 \times 10^3$ - $5,8 \times 10^4$ Nukleotide ³¹). Zudem können bei einer Doppelinfektion einer Zelle mit verschiedenen Virussubtypen durch Rekombinationsereignisse chimäre Viren entstehen. Daneben kann es durch einen Wechsel des transkribierten Genomstrangs bei der reversen Transkription zur Bildung von Mosaiksequenzen zwischen den beiden Genomen eines viralen Partikels kommen („copy choice“ Rekombination). ¹⁶

2.3 Zelluläre Interaktionspartner des HIV-1 Kapsidproteins p24

2.3.1 HIV-1 und Cyclophilin A (CypA)

Für das Verständnis der vorliegenden Arbeit ist das zelluläre Enzym Cyclophilin A (CypA; Gene ID: 5478) von entscheidender Bedeutung. CypA ist eine cis-trans-Prolylisomerase, die mit einem exponierten Teil im N-Terminus von p24, der sogenannten CypA-Bindeschleife (Aminosäuren: 217-225), interagiert (Abb. 5 A). Über die Natur und die direkten Konsequenzen dieser Interaktion ist wenig bekannt außer, dass sie zumindest *in vitro* essentiell für HIV-1 ist (CypA-abhängiger Phänotyp)³²⁻³⁴. Gamble et al. postulieren beispielsweise in diesem Zusammenhang, dass CypA die p24-p24 Proteinbindungen destabilisiert und damit einen geordneten Zerfall des viralen Kapsids erleichtert³⁵. Zwar konnte gezeigt werden, dass CypA an P₉₀ tatsächlich eine cis-trans Isomerisierung katalysiert, diese allerdings weder in der Tertiärstruktur von p24 noch der Quartärstruktur der p24-Oligomere eine gravierenden strukturelle Änderungen zu bewirken scheint³⁶. Entgegen Gamble et al. wurde in der gleichen Arbeit ein stabilisierender Effekt von CypA auf das Kapsid gezeigt, der Destabilisierung durch Transportin 3 (TNPO3) entgegen wirkt³⁶. Ein Gleichgewicht dieser beiden Effekte wird als wichtige Voraussetzung für einen geordneten Zerfall des viralen Kapsids (*uncoating*) bezeichnet³⁶. Dass die Interaktion CypA-p24 *in vitro* für die Infektiosität des Virus entscheidend ist, lässt sich durch die Zugabe von Cyclosporin A (CsA) zeigen. Bei CsA handelt es sich um ein niedermolekulares, immunsuppressiv wirkendes Stoffwechselprodukt des Schlauchpilzes *Tolypocladium inflatum*³⁷, das in der Transplantationsmedizin Verwendung findet. CsA wirkt als kompetitiver Inhibitor für CypA-Substrate und verhindert so eine Interaktion zwischen CypA und p24 (Abb. 5 B)^{35,38}. In Gegenwart von 0,5 µM CsA kommt es bei einer Infektion der Reporterzelllinie GXR25 (s. 3.2.2.1) mit dem HIV-1 Laborstamm NL4-3 zu einer Reduktion der Infektiosität um ca. 50% (Abb. 5 C). Dies ist von Interesse, da bestimmte durch T-Zellantworten selektionierte p24/Gag-Varianten die Art des CypA-Phänotyps von HIV-1 beeinflussen können (s. 2.5).

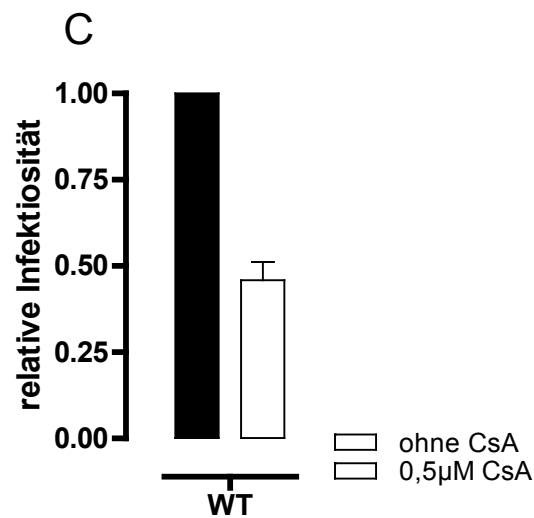
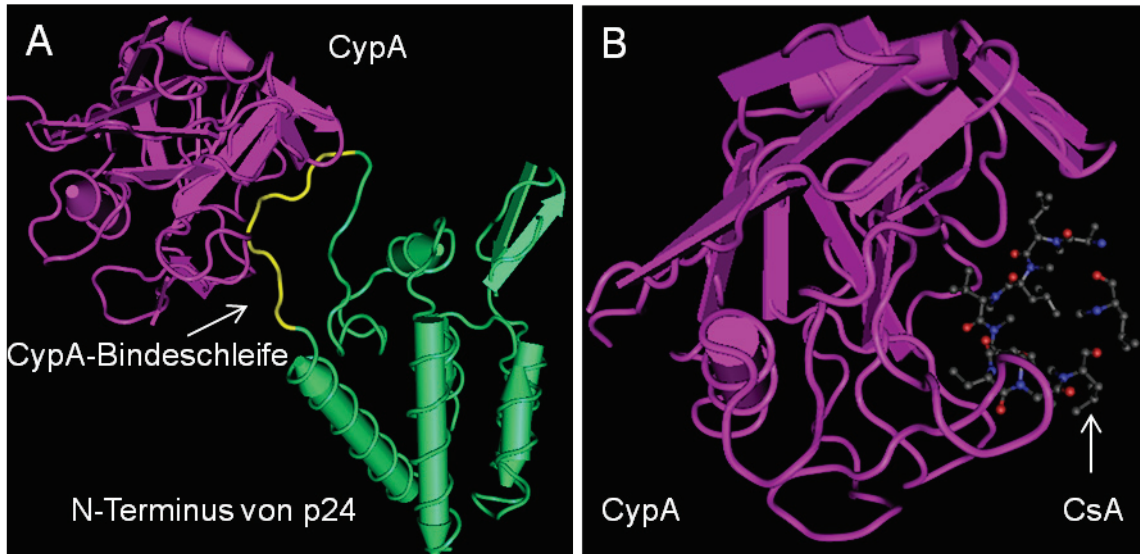


Abb. 5: Modell der Interaktion von HIV-1 und CypA sowie von CypA mit CsA.

(A) Basierend auf Daten aus Röntgenstrukturanalysen ist ein Modell der Interaktion von CypA (violett) mit der CypA-Bindeschleife (gelb) des N-terminalen Teils von HIV-1 p24 (grün) dargestellt (modifiziert nach Protein Database ID: 1AK4)³⁵. (B) Ein CsA-Molekül ist an das aktive Zentrum von CypA angelagert und verhindert dadurch Wechselwirkungen mit CypA-Proteinsubstraten, wie beispielsweise HIV-1 p24 (modifiziert nach Protein Database ID: 3CYS). Das Modell beruht auf NMR-Aufnahmen (*nuclear magnet resonance*)³⁹. (C) Dieser Graph demonstriert den CypA-abhängigen Phänotyp von HIV-1 am Beispiel von NL4-3 (Wildtyp, WT). GXR25-Zellen wurden mit 250ng p24 von NL4-3 in Abwesenheit (schwarzer Balken) oder Anwesenheit von 0,5 µM CsA (weißer Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil GFP positiver Zellen wurde an Hand von Durchflusszytometrie 48 Std. nach Infektion bestimmt. Die Infektionsraten wurden auf NL4-3 in Abwesenheit von CsA normalisiert. Die verwendeten Viren stammten aus mindestens zwei verschiedenen Transfektionen. Die gezeigten Daten zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Infektionen (s. 3.2.2.1).

2.3.2 Weitere zelluläre p24-Interaktionspartner

2.3.2.1 Kernporenproteine und Transportin 3

Eine Besonderheit der Lentiviren wie HIV-1 ist, dass sie auch ruhende Zellen infizieren können. Zur Infektion ruhender Zellen müssen sie ihr Genom durch die Poren der Kernmembran in den Nukleus translozieren. Das Protein Nup358 (*nuclear pore 358*; Gene ID: 5903) ist Bestandteil eines solchen Kernporenkomplexes (NPC, *nuclear pore complex*) und besitzt eine Cyclophilin-Domäne (Cyp)⁴⁰. Gleich dem zytoplasmatische CypA kann die Cyp-Domäne von Nup358 mit der CypA-Bindeschleife von p24 interagieren. Schaller et al. zeigen, dass diese Interaktion essentiell für HIV-1 ist⁴⁰. Dass die Bindung der Cyp-Domäne von Nup358 mit p24 um den Faktor drei stärker ist als die von CypA-p24 passt zu diesem Befund. Bei der Aufklärung dieser Interaktion machten sich Schaller et al. zunutze, dass die Bindung der Cyp-Domäne von Nup358 mit p24 nicht durch CsA zu hemmen ist⁴⁰.

Ein weiteres an der Translokation des viralen Genoms beteiligtes Protein ist Transportin 3 (TNPO3; Gene ID: 23534). Nach Shah et al. stimuliert TNPO3 *in vitro* durch seine Bindung an das virale Kapsid dessen geordneten Zerfall³⁶. Im Gegensatz dazu reduziert die CypA-p24 Interaktion die Bindung von TNPO3 an das Kapsid, was einer stabilisierenden Wirkung von CypA auf das virale Kapsid entspricht³⁶. Shah et al. konnten zudem in Zellen mit reduzierten TNPO3-Leveln zeigen, dass hier ein streng reguliertes Gleichgewicht zwischen den Effekten von TNPO3 und CypA vorliegt.

2.3.2.2 TRIM5 α

Das zelluläre Protein *tripartite motif 5 α* (TRIM5 α ; Gene ID: 85363) gehört zu der Familie der TRIM-Proteine. Alle Proteine dieser Familie haben drei Strukturmodule gemeinsam: Eine N-terminale Ring-Finger-Domäne, eine B-Box-Domäne und eine *coiled-coil*-Domäne⁴¹. Einige TRIM-Proteine, u.a. TRIM5 α , sind als Restriktionsfaktoren gegen verschiedene Lentiviren ein wichtiger Teil der intrinsischen Immunabwehr einer Zelle^{42,43,41}. Für die Restriktion viraler Kapside ist eine Multimerisierung von TRIM5 α -Molekülen auf der Oberfläche des viralen Kapsids essentiell⁴⁴. TRIM5 α erkennt über die sogenannte PRYSPRY-Domäne in seinem C-Terminus lentivirale Kapside^{45,41}. Dieser Vorgang ist relativ unspezifisch und seine Funktion ähnelt der eines *pattern recognition receptors* (PRR) wie beispielsweise den *toll-like receptors* (TLRs). Die Spezifität der TRIM-Proteine wird dabei durch die Aminosäuresequenz der PRYSPRY-Domäne bestimmt und ist stark speziesspezifisch^{45,41,46,47}. Die Effektivität dieser Proteine bezüglich der Restriktion wird durch die artspezifischen Anpassungen verschiedener Lentiviren an die jeweiligen PRYSPRY-Domänen ihrer Wirtsspezies unterstrichen⁴⁵. So restringiert beispielsweise TRIM5 von Rhesusaffen (*Macaca mulatta*)

zwar HIV-1 und die SIV_{AGM}-Variante jedoch nicht die spezieeigene SIV_{mac}-Variante⁴⁸⁻⁵¹. Dies ist auch der Grund, weshalb das humane Protein TRIM5 α das HIV-Kapsid nur vergleichsweise schwach restringieren kann, wohingegen beispielsweise die Restriktion des N-tropen murinen Leukämievirus (N-MLV) sehr potent ist⁵²⁻⁵⁶. Wie schnell die Evolution hier auf Proteinebene arbeiten könnte demonstrierten Yap et al. die dem humanem TRIM5 α durch den Austausch einer einzigen Aminosäure (R₃₃₂P) in der PRYSPRY-Domäne die Fähigkeit gaben HIV-1 effizient zu restringieren⁵⁷. Sowohl Daten aus Tierversuchen mit Rhesusaffen und dem Spezies-eigenen SIV_{mac251}-Stamm, als auch Arbeiten über die Fitnesskosten von Medikamentenresistenzmutationen von HIV-1 im Polyprotein Pol zeigen, dass bereits eine geringfügige Verringerung der viralen Fitness von klinischer Relevanz sein kann⁵⁸⁻⁶¹. Passend hierzu gibt es Berichte über Unterschiede im Grad der TRIM5 α -Resistenz bei HIV-1; so erweisen sich manche HIV-1-Patientenisolat im Vergleich zu etablierten HIV-1-Laborstämmen als deutlich sensitiver gegenüber einer TRIM5 α -Restriktion^{62,56}. Dabei demonstrierten Bativelli et al. in der gleichen Arbeit, dass bestimmte Mutationen, die wegen ihres Einflusses auf den CypA-Phänotyp auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, eine Änderung der Sensitivität gegenüber TRIM5 α vermitteln können. Ein Einfluss derselben Mutation auf zwei unterschiedliche Proteine (CypA und TRIM5 α) könnte auf eine direkte oder indirekte Interaktion dieser beiden Proteine auf der Oberfläche des HIV-Kapsids hindeuten. Unterstützt wird diese Annahme durch ein TRIMCyp-Fusionsprotein von Nachtaffen der Gattung *Aotus* aus Südamerika. Mindestens zwei Spezies dieser Gattung (*Aotus nancymae* und *Aotus trivirgatus*) exprimieren ein TRIMCyp-Fusionsprotein bestehend aus den TRIM5 Exons 1-7 die über eine Sequenz von elf Aminosäuren an ein vollständiges CypA fusioniert sind^{63,64}. Dieses Fusionsprotein ist ein effektiver Restriktionsfaktor für HIV-1^{63,64}. Neagu et al. konnten zudem zeigen, dass ein analoges rekombinantes humanes Fusionsprotein ebenfalls einen sehr potenten HIV-1-Restriktionsfaktor darstellt⁶⁵. Weiterhin ist bekannt, dass der TRIM5 α -vermittelte Block von HIV-1 in Rhesusaffen CypA-abhängig ist⁶⁶. Dagegen wird im Menschen einen Schutz des HIV-1 Kapsids vor Restriktionsfaktoren wie TRIM5 α durch CypA postuliert^{67,68}.

2.3.2.3 CPSF6

In den letzten beiden Jahren wurde ein weiterer zellulärer p24-Interaktionspartner identifiziert, der *cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6* (CPSF6; Gene ID: 11052)^{69,70}. CPSF6 kann zwischen Nukleo- und Zytoplasma hin und her wandern und ist auf Grund einer sogenannten R/S-Domäne im C-terminalen Abschnitt in der Lage an TNPO3 (s. 2.3.2.1) zu binden⁷¹⁻⁷⁵. Eine verkürzte Form von CPSF6 ohne diese R/S-Domäne akkumuliert im Zytoplasma und stellt einen potenten Inhibitor für HIV-1 dar⁶⁹. Diese Entdeckung und v. a.

die Identifikation der CPSF6-p24-Interaktionsdomäne im Bereich der p24 α -Helices 3 bis 5⁷⁰ ist für die Interpretation der hier gewonnenen Ergebnisse von hoher Bedeutung (s. 5.2.3).

2.4 Die Funktion der zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) im Infektionsverlauf und bei einer verlängerten Kontrolle der Infektion

2.4.1 Korrelate einer effektiven CTL-Antwort in der akuten und chronischen Phase der HIV-Infektion

Bei der Kontrolle einer akuten HIV Infektion und der damit einhergehenden Abnahme der hohen Virämie in den ersten Wochen der Infektion (Abb. 2) spielen HIV spezifische CTLs eine entscheidende Rolle^{76,18,77}. Auch bei dem Makaken infizierenden SIV_{mac} (*simian immunodeficiency virus of macaques*) koinzidiert das Auftreten von SIV_{mac} spezifischer CTLs mit einer Kontrolle der akuten Infektion und einem Ende der Virämie⁷⁸. In einer Fallstudie zeigten Borrow et al. außerdem, wie groß der Einfluss der CTLs auf den akuten Infektionsverlauf und die Evolution der infizierenden HIV-Quasispezies ist¹⁷. Durch Anpassung an das Immunsystem des neuen Wirts entwickeln sich aus dem *founder* Virus eine Vielzahl an Virusvarianten, die in ihrer Gesamtheit als Quasispezies des Patienten bezeichnet werden. Neuere Publikationen bestätigen die Bedeutung der CTLs bei der Kontrolle der akuten Infektion und unterstreichen dabei den positiven Effekt von Gag-spezifischen CTL-Antworten¹⁹. Als Korrelat für eine effektive CTL-Antwort dient nicht nur die Gag-Spezifität der CTL-Antworten, sondern auch die Teilungsfähigkeit oder -frequenz (Stichwort: „clonal turnover“), die Antigenavidität und die Polyfunktionalität der CTLs^{19,79}. Aber auch der Klonotyp (Epitop-spezifischer Rezeptor, entstanden durch klonale Rearrangements im naiven T-Zellrezeptorgen) des T-Zellrezeptors (TCR) rückt derzeit in den Fokus von Untersuchungen. Bedingt durch ihre Fähigkeit zur Erkennung ähnlicher Epitopvarianten (Kreuzreaktivität) scheinen bestimmte TCR-Klonotypen vorteilhaft zu sein^{80,81}.

Auch bei der Kontrolle einer Infektion im chronischen Stadium spielen Gag-spezifische CTL-Antworten eine entscheidende Rolle. Unabhängig vom HLA-Phänotyp^{82,83} und des Konservierungsgrads der Epitopsequenz⁸² besteht vermutlich eine positive Korrelation zwischen einer breiten Gag-spezifischen CTL-Antwort und einer geringeren Viruslast. Hierbei dürfte der für Retroviren hohe Konservierungsgrad von Gag eine Rolle spielen, der eine Anpassung an die Immunantwort („escape“) im Vergleich zum hochvariablen Hüllprotein Env erschwert⁸⁴. Die Konservierung der Gag-Sequenz geht zum Teil soweit, dass es zu Typ-übergreifenden Antikörperantworten kommen kann¹⁶. Eine Ursache für die besondere Effektivität Gag-spezifischer CTL-Antworten liegt möglicherweise darin, dass infizierte Zellen bereits zwei Stunden nach der Infektion durch CTLs lysiert werden können. Nach Sacha et

al. können aus dem eingedrungenen viralen Kapsid mit Hilfe des Proteasoms Epitope generiert werden, ohne dass erst neue virale Proteine produziert und entsprechend prozessiert werden müssen ⁸⁵.

2.4.2 Grundlagen für eine verlängerte Kontrolle einer HIV Infektion

Eine effektive CTL-Antwort kann ein Grund dafür sein, dass eine betroffene Person eine verlängerte oder sogar andauernde Kontrolle der HIV-Infektion erlangt ¹. Für diese kleine Gruppe von HIV positiven Individuen gibt es mehrere Bezeichnungen, denen jeweils unterschiedliche Definitionen oder Subgruppen zugrunde liegen. Eine einheitliche Nomenklatur kann hier somit nicht angegeben werden. Aus diesem Grund werden nachfolgend Therapie-naive Personen, die ohne eine fortschreitende Zerstörung ihres Immunsystems mit einer HIV-Infektion leben, nach Baker et al. als *long term non-progressors* (LTNPs) bezeichnet ⁵. Die Art der CTL-Antwort, die ein Individuum generieren kann, wird durch die exprimierten HLA-Allele diktiert. Nur ein Epitop, das an der Zelloberfläche von einem HLA-Molekül präsentiert wird, kann auch von einem dafür spezifischen T-Zellrezeptorklon erkannt werden.

Es gibt drei verschiedene HLA-Typen: A, B und C. Jeder Mensch verfügt über je zwei Allele der drei HLA-Typen. Das führt zu einer maximalen Anzahl von 6 unterschiedlichen HLA-Allelen/-Molekülen pro Person. Im Fall einer HIV-Infektion spielt HLA-B eine besonders wichtige Rolle. Nach einer Studie von Kiepiela et al. werden mehr HLA-B restringierte CTL-Antworten generiert als HLA-A restringierte. Wegen der schnelleren Evolution der HLA-B Allele und ihrer höheren funktionellen Vielfalt gegenüber den HLA-A Allelen könnte der HLA-B Komplex auch einen höheren Immunselektionsdruck vermitteln ⁸⁶. Das HI-Virus kann durch sein Protein Nef (*negative factor*) eine Reduktion der Oberflächendichte von HLA-A und -B auf seiner Wirtszelle induzieren und somit die Präsentation seiner Epitope an der Zelloberfläche behindern ¹⁶. Es zeigte sich, dass HLA-B gegenüber diesem Nef vermittelten Effekt resistenter ist als HLA-A. Das könnte mit ein Grund dafür sein, dass HLA-B bei HIV-Infektionen eine größere Bedeutung beigemessen wird ⁸⁷. HLA-C ist gegenüber Nef zwar vollständig resistent, allerdings werden HIV-Epitope eher selten von HLA-C Molekülen restringiert ⁸⁸⁻⁹⁰. Auch ist die natürliche Expression von HLA-C im Vergleich zu HLA-A und -B gering ⁹¹. Abgesehen davon, dass es im Regelfall zu keiner dominanten HLA-C restringierten CTL-Antwort kommt, verhindert die Präsenz von HLA-C möglicherweise die Lyse infizierter Zellen durch natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ^{16,92}.

Es zeigt sich, dass die individuelle HLA-Ausstattung eines Infizierten einen deutlichen Einfluss auf den Verlauf einer HIV-Infektion haben kann ⁹³. Dabei kann eine Unterscheidung in protektive und nicht protektive HLA-Allele vorgenommen werden ⁹⁴⁻⁹⁶. Vor allem die HLA-B Gene B*27 und B*57 sind wiederholt als protektiv im Fall einer HIV-Infektion beschrieben

worden ^{2-5,94}. Diese Einteilung ist alleine aber keinesfalls ausreichend, da auch andere Faktoren einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. Dies wird unter anderem dadurch deutlich, dass nur ein Teil der Träger eines oder mehrerer protektiver HLA-Allele im Fall einer HIV-Infektion zu LTNPs werden ⁸⁰. Der HLA-Genotyp bestimmt über die präsentierbaren HIV-Epitope die initiale CTL-Immunantwort ⁹⁷, die mitunter sehr stereotyp sein kann. So richtet sich die immundominante CTL-Antwort bei HLA-B*27-positiven Individuen beinahe ausschließlich gegen das p24/Gag-Epitop KK10 ⁹⁸. Diese initiale CTL-Antwort kann jedoch durch Änderung der Aminosäuresequenz innerhalb oder nahe der entsprechenden Epitope verändert werden ⁹⁹. Mutationen, die die Präsentation eines Epitops temporär oder permanent erschweren oder gar unterbinden, werden als „*escape* Mutationen“ bezeichnet ¹⁰⁰. Da mit solch einem *escape* ein erheblicher Nachteil für das HI-Virus verbunden sein kann, geht man davon aus, dass diese Epitope nach einer Übertragung in einen neuen Wirt wieder revertieren, sollten sie keinem HLA-bedingten Selektionsdruck mehr ausgesetzt sein. Diese Vermutung konnte durch Tiermodelle mit SIV bestätigt werden. Allerdings zeigen andere Studien, dass es nach einer Übertragung nicht zwangsläufig zu einer Reversion aller *escape* Mutationen kommen muss ¹⁰¹. Da das Auftreten von *escape* Mutationen kein gerichteter Prozess ist, resultieren hieraus individuelle weiterführende CTL-Antworten bzw. Krankheitsverläufe ⁹⁷. Ein gutes Beispiel ist das oben erwähnte HLA-B*27 restringierte Epitop KK10, bei dem unter bestimmten Voraussetzungen (s. 2.4.3.1) eine Punktmutation zu einem Wegfall der entsprechenden CTL-Antwort führt und damit einhergehend zu einer raschen Progression des Krankheitsverlaufs. Diese Entwicklung findet in der Regel allerdings erst nach 9-12 Jahren ohne medikamentöse Behandlung statt ¹⁰².

2.4.3 CTL-Immenselektionsdruck auf HIV

In der akuten Phase der HIV-Infektion kommt es wie oben erwähnt zu einer Virämie, deren Ende mit dem Beginn einer HIV-spezifischen CTL-Immunantwort überlappt (s. 2.1 und Abb. 2). Dieser initiale CTL-Immenselektionsdruck in der akuten Phase setzt einen evolutionären Wettlauf zwischen dem *founder* Virus und dem Immunsystem in Gang ¹⁰⁰, der ohne medikamentöse Behandlung im Regelfall mit dem Zusammenbruch des Immunsystems und dem Auftreten von AIDS endet. Einer effektiven CTL-Immunantwort kann das Virus beispielsweise durch eine Änderung der Aminosäuresequenz der betroffenen Epitope entkommen, die eine Bindung an die jeweiligen HLA-Moleküle nicht mehr zulässt ¹⁰³. Eine CTL-Antwort gegen die veränderten Epitope ist somit nicht mehr möglich, was faktisch zu einem Wegfall dieser Immunantworten führt ¹⁰⁰. Eine aktuelle Studie von Abrahams konnte für HIV-1 *clade* C Infektionen zeigen, dass Mutationen in CTL-Epitopen in den ersten fünf Wochen nach der Infektion gehäuft auftreten und anschließend mit sinkender Viruslast abnehmen ¹⁰⁴. Diese Beobachtung wird durch ein mathematisches Modell nachgebildet, das

bei einer breiten Immunantwort und nach Erreichen des *viral setpoints* nur wenige *escape* Mutationen vorhersagt, da jede einzelne Mutation nur einen kleinen Vorteil erbringt¹⁰⁵. Weitere Beispiele für eine individuelle Anpassung des Virus an den HLA-Phänotyp seines Trägers sind auch für das lymphozytäre Choriomeningitis Virus und für das Hepatitis C Virus beschrieben¹⁰⁶⁻¹⁰⁹.

Für die Anpassung an das individuelle Immunsystem sind für das HI-Virus vor allem zwei Punkte von entscheidender Bedeutung: Die Breite und Ko-Dominanz der CTL-Immunantwort und das Ausmaß der intrinsischen „Kosten“ die durch *escape* Mutationen angehäuft werden¹⁰³. Je größer der Fitnessdefekt (z.B. durch eine verminderte Replikationskapazität) durch eine gegebene *escape* Mutation ist, desto geringer sollte die Wahrscheinlichkeit für ihre Persistenz sein. Je konservierter der Sequenzbereich ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass mit einer *escape* Mutation erhebliche Fitnessdefekte einhergehen. Entsprechend hierzu berichten Moore et al., dass HIV Sequenzpolymorphismen in Bereichen mit besonders geringen funktionellen oder strukturellen Limitationen besonders häufig auftreten und darüber hinaus auch mit bestimmten HLA-Allelen assoziiert sind¹¹⁰.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss verschiedener Punktmutationen auf die virale Replikationskompetenz. Die untersuchten Mutationen sind zum Teil *in vivo* und/oder *in vitro* mit dem CTL-Immenselektionsdruck auf zwei immunodominante p24/Gag-Epitope, TW10 (Aminosäuren 241-250) und KK10 (Aminosäuren 263-272) assoziiert. *In vivo* bedeutet im Rahmen dieser Arbeit, dass die jeweiligen Mutationen in Virusisolaten von Patienten nachgewiesen werden konnten, wohingegen *in vitro* Mutationen entweder durch Mutagenesereaktionen gezielt generiert wurden oder aber in Langzeitkulturen ohne (Immun-) Selektionsdruck entstanden sind. Bei dem KK10 Epitop handelt es sich um das durch HLA-B*27 dominant restringierte CTL-Epitop⁹⁸. Bei HLA-B*57 positiven Individuen ist in ca. 60% der Fälle das Epitop TW10 das immunodominant restringierte HLA-B*57 Epitop⁹⁸. Nachfolgend wird ein günstiger Krankheitsverlauf einer HIV-Infektion skizziert, der durch die Expression eines dieser protektiven HLA-B-Allele mit bedingt wird.

2.4.3.1 Charakterisierung einer protektiven Immunantwort vermittelt durch HLA-B*27

Die hochtitrige Virämie wird durch das Einsetzen der CTL-Immunreaktion beendet (s. 2.1 und Abb. 2). Bei HLA-B*27 positiven Individuen kann es dabei zu einer immunodominanten und sehr effektiven CTL-Antwort gegen das virale KK10-Epitop kommen (Aminosäuren 263-272), das in einem sehr konservierten Sequenzbereich der α -Helix 7 von p24/Gag liegt^{111,35,112}. Um der CTL-Immunantwort gegen das KK10-Epitop zu entgehen, etablieren sich in der Regel Viren mit Punktmutationen in diesem Sequenzabschnitt. Der eigentlichen *escape* Mutation an der Position 2 (R₂₆₄) des KK10-Epitops geht dabei meist eine Mutation an Position 6 (L₂₆₈) voraus. Diese Mutation, L₂₆₈M, spielt zwar für den permanenten *escape* des

KK10 Epitops keine tragende Rolle, ist aber *in vivo* meist die erste KK10-assoziierte Mutation, da sie (zumindest *in vitro*) kaum negative Auswirkungen auf das Virus hat, jedoch *in vitro* zumindest mit einem reduzierten CTL-Selektionsdruck einhergehen kann ^{7,80}. Im Gegensatz zum Leucin 268 ist das Arginin an Position 264 für das Epitop als Ankerposition für die Bindung an HLA-B*27 essentiell ¹¹³, Mutationen an dieser Position beeinträchtigen deswegen die Bindungsaffinität des Peptids für HLA-B*27 (*escape* Mutationen) ¹¹⁴. Bisher sind *in vivo* mit R₂₆₄K, G, Q, und T vier verschiedene *escape* Varianten beschrieben, die *in vitro* jedoch deutliche Replikationsdefekte aufweisen ^{114,115}. In einem Bindungs-Kompetitionsassay von radioaktiv markierten Wildtyp-NL4-3 KK10-Peptiden mit nicht markierten WT bzw. Varianten des KK10-Epitops ist der IC₅₀-Wert aller Peptidvarianten an HLA-B*27 gegenüber dem nicht markiertem Wildtyp-NL4-3 KK10-Epitop um mehr als zwei Dekaden erhöht und liegt zudem deutlich über dem Wert, der als Grenzwert für die Bindefähigkeit gilt ¹¹⁴. Ein derart mutiertes KK10-Epitop kann nicht mehr durch HLA-B*27 restringiert werden. Nun ist *in vivo* gerade die *escape* Variante mit der R₂₆₄K Mutation und dem schwerwiegendsten Defekt dominant vertreten ^{7,112}. Diese *in vivo* Dominanz lässt sich an Hand weiterer Mutationen erklären, die mit den *escape* Varianten *in vivo* assoziiert sind. Bei R₂₆₄K (RK) handelt es sich im Regelfall um nur eine einzige weitere Mutation: S₁₇₃A. Betrachtet man die Tertiärstruktur von p24, so liegen die beiden Mutationen in räumlicher Nähe zueinander auf zwei parallelen α -Helices ⁷. Generiert man diese Mutationen auf dem X4-tropen HIV-1 Laborstamm NL4-3, so weist die Variante S₁₇₃A, R₂₆₄K (SARK) *in vitro* eine Replikationskapazität ähnlich der von NL4-3 auf. Aus diesem Grund wird die Mutation S₁₇₃A auch als kompensatorische Mutation für den von R₂₆₄K vermittelten Defekt bezeichnet. Alternativ ist auch die Bezeichnung sekundäre Mutation im Gegensatz zur *escape* (primären) Mutation üblich. Darüber hinaus ist die Variante SARK replikationskompetenter als die anderen *escape* Varianten. Das gilt sogar, wenn diese mit ihren beschriebenen assoziierten Mutationen getestet werden ¹¹⁴. *In vivo* geht somit in der Regel ein erfolgreicher *escape* des KK10-Epitops mit dem Erwerb dieser beiden Mutationen einher. Fehlt nun auf Grund der R₂₆₄K *escape* Mutation ein durch HLA-B*27 präsentierbares KK10-Epitop, kommt es zum Zusammenbruch der protektiven KK10 spezifischen CTL-Immunantwort und somit zu einer raschen Progression der Infektion ^{102,112,116}. Ein weiterer Hinweis für die gute Rekonstitution von R₂₆₄K durch S₁₇₃A ist, dass es *in vivo* bei HLA-B*27 negativen Individuen zu keiner Reversion von R₂₆₄K kommt, wenn beide Mutationen zusammen auftreten. Dies könnte im Laufe der Zeit zur allmählichen Ausbreitung dieser ursprünglich HLA-B*27 assoziierten Variante führen ^{117,118}.

Auf Grund dieser intrinsischen Limitationen des Virus, die zu einer stark verzögerten Etablierung einer geeigneten *escape* Variante führen, ermöglicht HLA-B*27 folglich eine

langanhaltende Kontrolle der Viruslast und der Infektion durch eine andauernde, sehr effektive und immundominante CTL-Immunantwort gegen das HIV p24/Gag Epitop KK10¹¹⁶.

2.4.3.2 Charakterisierung einer protektiven Immunantwort vermittelt durch HLA-B*57

Bei HLA-B*57⁺ und -B*58⁺ Individuen kann es beim Einsetzen der adaptiven Immunantwort zu einer immundominanten CTL-Antwort gegen das p24/Gag-Epitop TW10 kommen (Aminosäuren 241-250)⁹⁸. Im Gegensatz zu dem unter 2.4.3.1 beschriebenen *escape* des KK10-Epitops kommt es hier sehr schnell zu einem *escape*. An Position 3 des Epitops erfolgt dabei meist ein Austausch von Threonin zu Asparagin (T₂₄₂N; TN)¹⁰¹. Diese Mutation führt zu einem Verlust der Bindefähigkeit des mutierten TW10-Epitops an HLA-B*57 / 58¹⁰¹. Im Gegensatz zur unter 2.4.3.1 beschriebenen *escape*-Mutation R₂₆₄K verursacht die Mutation T₂₄₂N *in vitro* nur einen moderaten Rückgang der Replikationskapazität¹¹⁹, was mit ein Grund für ihr frühzeitiges Auftauchen sein dürfte. Ähnlich wie R₂₆₄K entsteht jedoch auch T₂₄₂N nicht isoliert⁶. Bei den assoziierten Mutationen handelt es sich um ein Set aus bis zu vier Mutationen: H₂₁₉Q, I₂₂₃V, M₂₂₈I und G₂₄₈A⁶. Die Mutationen H₂₁₉Q, I₂₂₃V und M₂₂₈I sind innerhalb oder in unmittelbarer Nähe zur CypA-Bindeschleife von p24 (Aminosäuren 217-225) lokalisiert. Die Mutation G₂₄₈A wird als subdominante *escape* Mutation beschrieben⁶. Durch das frühzeitige Auftreten der *escape*-Mutation wird die CTL-Immunantwort gegen das nicht mutierte TW10-Epitop bald ihres Stimulus beraubt und eingestellt. Trotzdem hat sie einen lang anhaltenden positiven Effekt auf den Verlauf der Infektion. Der Mechanismus und die Grundlage für diese langanhaltende Protektion sind bisher jedoch unbekannt. Ein wesentlicher Punkt dürfte aber die Stärke der CTL-Antwort gegen das TW10-Epitop sein. Im ELISpot-Assay wurden von Altfeld et al. im Vergleich mit dem HLA-B*27 restringierten KK10-Epitop ungefähr die vierfache Menge an *spot forming units* / 10⁶ PBMCs gemessen (s. 2.4.3.1 und⁹⁸). Der durch HLA-B*57 vermittelte Schutz wird also durch eine kurzzeitige, aber sehr nachhaltig wirkende CTL-Immunantwort gegen das TW10 Epitop vermittelt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die beiden beschriebenen CTL-vermittelten Immunantworten sich zwar bezüglich ihrer Eigenschaften deutlich unterscheiden, aber dennoch maßgeblich an einer potenziell protektiven Wirkung von HLA-B*27 bzw. -B*57/58 beteiligt sind. Die Ursache für die unterschiedlich lange Dauer der CTL-Antwort gegen das KK10- bzw. TW10-Epitop wird durch die unterschiedlich gravierenden Nachteile mit bedingt, die mit den jeweiligen *escape* Mutationen einhergehen.

2.5 Grundlagen der vorliegenden Arbeit

Der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit sind die Arbeiten und Publikationen, sowie noch nicht veröffentlichte Daten von Schneidewind et al.^{6,7,114,120,118,121}. Der Schwerpunkt dieser Arbeiten liegt auf der phänotypischen Charakterisierung von HLA-B*27 und -B*57

restringierten *escape* Mutationen und deren assoziierten kompensatorischen Mutationen, wobei Mutationen des HLA-B*27 restringierten KK10-Epitops im Zentrum der Betrachtung stehen. Die in diesem Zusammenhang beschriebenen Fitnessseinbußen von CTL *escape* Mutationen im HLA-B*27-Epitop KK10 sind mit einer Interaktionsänderung des HIV-1 Kapsidproteins p24 mit Cyclophilin A (CypA) verbunden ⁷. Wegen der Bedeutung dieser Interaktion (s. 2.3.1) sind zu ihrer Klärung weitere Forschungsarbeiten notwendig. In der Literatur sind bereits einige mögliche Konsequenzen aus dieser Interaktion thematisiert. Eine Störung des fein regulierten Abbau-Prozesses des viralen Kapsids („*uncoating*“) wäre beispielsweise eine mögliche Erklärung für die *in vitro* beobachteten schweren Defekte der KK10 *escape* Varianten ^{7,35,36}. Die stereotype *escape*-Mutation R₂₆₄K führt zu einer dramatischen Reduktion der viralen Replikationskompetenz ⁷. In derselben Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass eine Ursache hierfür eine Änderung des CypA-Phänotyps des HI-Virus ist. Durch die Punktmutation R₂₆₄K verliert das Virus seine ursprüngliche CypA-Abhängigkeit zugunsten eines Phänotyps, bei dem CypA einen toxischen Effekt auf das Virus ausübt. Dies konnte mit Hilfe von CypA *knock out* Zellen und durch die Gabe von Cyclosporin A (CsA; s. 2.3.1) gezeigt werden ⁷. In Gegenwart von CsA kommt es zu einer Verbesserung der Replikationskompetenz der Variante R₂₆₄K (RK), die aus diesem Grund als CsA-abhängig bezeichnet wurde ⁷. Die Interpretation dieser Beobachtung wird durch den Umstand erschwert, dass eine mit R₂₆₄K assoziierte Mutation kompensatorische Eigenschaften vermittelt. Die Mutation S₁₇₃A optimiert die Replikationskapazität und stellt zugleich den ursprünglichen CypA-Phänotyp wieder her. Schneidewind et al. konnten weiterhin zeigen, dass die Kapsidstabilität durch die R₂₆₄K-Mutation gegenüber NL4-3 nicht signifikant verändert wird ⁷. Seltener, alternative *escape* Mutationen an der Position R₂₆₄ in KK10 verändern dagegen die CypA-Abhängigkeit der Virusvariante nicht ¹¹⁴. Diese Varianten zeichnen sich sogar durch eine noch schwächere Bindung an HLA-B*27 aus und replizieren besser als die Variante RK. Andererseits repliziert keine der alternativen Varianten so gut wie die Doppelmutante S₁₇₃A, R₂₆₄K (SARK) ¹¹⁴. Dies wird als ein wichtiger Grund für die *in vivo* Dominanz der RK-Variante gesehen. Der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen dem viralen Kapsidprotein p24 (Bestandteil des Gag-Polyproteins) und dem zytoplasmatischen CypA ist noch unbekannt.

In seltenen Fällen lässt sich die R₂₆₄K-Mutation *in vivo* auch in Abwesenheit der S₁₇₃A-Mutation nachweisen. Einer dieser ungewöhnlichen Fälle ist die Virussequenz eines HLA-B*27⁺, B57⁻ Trägers (F7148) ⁷. Diese virale Sequenz weist bei vorhandener R₂₆₄K-Mutation statt der typischen kompensatorischen Mutation S₁₇₃A eine Reihe von Mutationen auf, die mit der Expression von HLA-B*57 assoziiert sind ^{6,7} und die darüber hinaus im Bereich der CypA-Bindungsstelle in Gag liegen. Diese Mutationen sind typischerweise mit der dominanten *escape* Mutation des TW10-Epitops T₂₄₂N assoziiert ⁶ und gehen ebenfalls mit

einer Änderung des CypA-Phänotyps einher. Dieser Mutation wird der phänotypische Effekt zugeschrieben, HIV-1 nur in Gegenwart erhöhter CypA-Level effizient replizieren zu lassen. Das Virus wird sozusagen abhängiger von CypA und somit gleichzeitig sensitiver gegenüber CsA ⁶. Deshalb ist in der vorliegenden Arbeit untersucht worden, ob zwischen den beiden Phänotypen ein Zusammenhang besteht, der sich beispielsweise durch eine Austauschbarkeit der assoziierten Mutationen äußert, so wie die Virussequenz des Trägers F7148 das nahelegt.

2.6 Ziele der Arbeit

Die Ergebnisse der in der Einführung angeführten Arbeiten (s. 2.5) lassen postulieren, dass die Infektiosität von verschiedenen Virusvarianten mit CTL *escape* Mutationen in p24/Gag von der differentiellen Interaktion mit CypA und möglicherweise noch weiteren zytoplasmatischen Faktoren abhängt. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb eine detaillierte Analyse der replikativen Eigenschaften verschiedener CsA-abhängiger HIV-1 Gag-Varianten. Darüber hinaus wurde die Fähigkeit alternativer sekundärer *in vitro* und *in vivo* Mutationen zur Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit untersucht. Damit wurden auch Grundlagen zur weiteren Untersuchung des molekularen Mechanismus der HIV-1 CypA-Abhängigkeit auf Proteinebene gelegt. Die vorliegende Arbeit lässt sich grob in zwei Bereiche gliedern: 1) Herstellung von insgesamt 35 bislang nicht zur Verfügung stehenden proviralen Volllängekonstrukten. 2) Analyse der durch Transformationen generierten HIV-1 Varianten im Hinblick auf ihre relative Infektiosität und ihren CypA- bzw. CsA-Phänotyp in GXR25 Zellen, einer humanen CD4-positiven T-Zelllinie (s. 3.1.11.1). Anschließend wurden Virusvarianten, die bei diesen phänotypischen Analysen eine mit der S₁₇₃A-Mutation vergleichbar gute Rekonstitution der RK-Variante vermittelten, mit computerbasierten Verfahren auf erste Hinweise für strukturelle Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede hin untersucht.

Weiterhin wurde vom Autor der vorliegenden Arbeit die praktische Arbeit von zwei Medizindoktoranden unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger und Herrn Dr. Arne Schneidewind mit betreut. Dabei wurden die S3-Arbeiten, die Teil der Projekte waren (Transfektion von HEK293T-Zellen mit den proviralen Varianten zur Generierung der virushaltigen Überstände, sowie die Durchführung der Infektion von GXR25-Zellen mit den jeweiligen Virusvarianten (s. 3.2.2.1 und 3.2.2.2)) vom Autor durchgeführt. Die Arbeit von Herrn Sven Breitschwerdt charakterisiert ein HI-Virus, dessen Gag- und Pol-Sequenz dem einer Konsensussequenz aller HIV-1 *clade* B Varianten der Los Alamos National Lab (LANL)-Datenbank aus dem Jahr 2008 entspricht. Die Arbeit von Frau Franziska Winter verfolgte die Frage, ob natürliche Killerzellen (NK-Zellen) einen Immunselektionsdruck, ähnlich dem von CTLs, auf HIV-1 ausüben können.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Antikörper

Es wurden nachfolgend aufgelistete Fluoreszenz-markierte Antikörper verwendet:

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Antigen	Label	Einzusetzende Menge	Firma	Artikelnummer
CD4	APC	20µl / 100µl + 10 ⁶ Zellen	BD*	561840
CD195 (CCR5)	V450	5µl / 100µl + 10 ⁶ Zellen	BD	562121
CD184 (CXCR4)	PE	20µl / 100µl + 10 ⁶ Zellen	BD	561733
Donkey αMaus FcR	APC	5µl / 100µl + 10 ⁶ Zellen	eBioscience	17-4012-82
<i>Blocking Reagent</i>	-	10µl / 100µl + 10 ⁶ Zellen	Miltenyi Biotec	130-059-901

* BD: Becton Dickinson Biosciences

3.1.2 Bakterien

Es kamen drei verschiedenen Laborstämme von *Escherichia coli* (*E. coli*) zum Einsatz. Dabei handelte es sich jeweils um chemisch kompetente Bakterien, die für verschieden Transformationsaufgaben verwendet wurden. Alle Bakterienstämme wurden von der Firma Life Technologies erworben.

3.1.2.1 One Shot MAX Efficiency DH5α - T1 *E. coli* (Bestellnr.: 12297-016)

Zur Transformation (s. 3.2.1.8) wurden DH5α-Zellen mit subgenomischen HIV-1-haltigen Plasmiden (in der Regel SacI-SbfI-Fragmente, s. 3.2.1.6) verwendet, nachdem eine *site directed mutagenesis* Reaktion durchgeführt wurde (s. 3.2.1.5).

Bakterieller Genotyp:

supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

3.1.2.2 One Shot TOP10 *E. coli* (Bestellnr.: C4040-10)

Dieser Bakterienstamm kam bei Transformationen von subgenomischen HIV-1-haltigen Plasmiden zum Einsatz (s. 3.2.1.8).

Bakterieller Genotyp:

F.mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str_R) endA1 nupG λ-

3.1.2.3 One Shot Stab13 *E. coli* (Bestellnr.: C7373-03)

Die Transformation von proviralen Vollängenkonstrukten erfolgte mit *One Shot Stab13* (s. 3.2.1.8). Dieser Bakterienstamm zeichnet sich durch eine stark reduzierte Anzahl von Rekombinationsereignissen bei instabilen Konstrukten aus. Damit wird eine stabile Integration der proviralen Vollängenkonstrukte trotz der beiden *long terminal repeats* (LTRs) im Plasmid gewährleistet.

Bakterieller Genotyp:

$F^-mcrB\ mrrhsdS20(r_B^-, m_B^-)\ recA13\ supE44\ ara-14\ galK2\ lacY1\ proA2\ rpsL20(Str^R)\ xyl-5\ \lambda^- leumtl-1$

3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

3.1.3.1 Agarose

Für die Analyse der Restriktionsverdauung wurden 1%-ige Agarosegele (LE Agarose; Biozym Scientific GmbH; Bestellnr.: 840004) eingesetzt.

3.1.3.2 Antibiotika

3.1.3.2.1 Ampicillin

Ampicillin (Ratciopharm; Zulassungsnr.: 6614452.00.00) wurde in braun *aqua ad iniectabilia* (Braun; Zulassungsnr.: 1–18469) aufgelöst. Die so hergestellte Stammlösung (100 mg / ml) wurde in 1,5 ml Aliquots bei -20°C gelagert. Die Stammlösung wurde bei Bedarf 1:1.000 in LB-Medium verdünnt (Endkonzentration 100 µg / ml), um als Selektionsmarker das Wachstum von *E. coli* ohne Ampicillinresistenz (amp^R) zu unterdrücken.

3.1.3.2.2 Geneticin (G-418)

Zur Selektion der Geneticin-resistenten GXR25-Zellen kam G-418 (Gibco; Bestellnr.: 10131035) mit einer Endkonzentration von 500 µg/ml RPMI zum Einsatz.

3.1.3.2.3 Penicillin und Streptomycin

Eine gebrauchsfertige Mischung der Antibiotika Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) wurde zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen in der Zellkultur eingesetzt (Sigma-Aldrich Bestellnr.: P0781). Diese wurde in 5 ml Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert um Abbauprozesse zu vermeiden. Für eine Endkonzentration von 1×10^2 Units Penicillin / ml und 0,1 mg Streptomycin / ml erfolgte die Zusetzung von je einem Aliquot zu 500 ml Zellkulturmedium.

3.1.3.3 Calcineurin-Inhibitoren

3.1.3.3.1 Cyclosporin A (CsA)

Cyclosporin A (CsA) (Merck; Bestellnr.: 239835) ist ein kompetitiver Inhibitor des humanen Proteins Cyclophilin A (CypA) ^{35,38}. Es wurde eine Stammlösung (1 mM) in DMSO (Dimethylsulfit) hergestellt und in 50 µl Aliquots bei -20°C gelagert. Die verwendete Endkonzentration betrug wenn nicht anderes angegeben 0,5 µM / ml RPMI (s. 3.2.2.1).

3.1.3.3.2 FK-506

Bei FK-506 (Merck; Bestellnr.: 342500), auch Tacrolimus genannt, handelt es sich um einen Calcineurin-Inhibitor der im Komplex mit dem *FK Binding Protein 12* (FKBP12), nicht aber mit CypA an Calcineurin bindet. Es wurde eine Stammlösung (1 mM) in DMSO (Dimethylsulfit) hergestellt und in 50 µl Aliquots bei -20°C gelagert. Die verwendete Endkonzentration betrug wenn nicht anderes angegeben 0,5 µM / ml RPMI (s. 3.2.2.1).

3.1.3.4 DNA-Größenstandard

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde der Standard Gene Ruler 1kB (Thermo Scientific; Bestellnr.: SM0313) verwendet.

3.1.3.5 Fötale Kälberserum (fetal calf serum, FCS)

Das FCS (Gibco; LOT 41G9882K) wurde über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und danach durch Hitze-inaktiviert (Wasserbad: 56°C, 30 min). Anschließend wurde das FCS in Aliquots zu je 50 ml bei -20°C bis zum Gebrauch eingefroren.

3.1.3.6 Dimethylsulfoxid (DSMO)

DMSO (Sigma-Aldrich; Bestellnr.: D8418) diente als Lösungsmittel für CsA und FK-506 (s. 3.1.3.3).

3.1.3.7 Dinukleotidtriphosphate (dNTPs)

Für die PCR-Reaktionen (s. 3.2.1.5) wurde ein gebrauchsfertiger dNTP-Mix verwendet (Thermo Scientific; Bestellnr.: R0192).

3.1.3.8 Ethidiumbromid

Ethidiumbromid (Fluka; Bestellnr.: 46067) wurde zum Färben von Agarosegelen verwendet, wenn die erwarteten DNA-Banden sehr klein oder sehr schwach waren. Die Ethidiumbromid-

Lösung wurde auf 1:20.000 verdünnt und direkt in die noch flüssige, abgekühlte Agarose / TAE-Puffer Mischung gegeben.

3.1.3.9 FACS-Puffer:

PBS^{ohne} (500 ml), 1% FCS, 1 mg / ml Natriumazid.

Natriumazid beeinträchtigt die ATP-Synthese (Cytochrom-c-Oxidaseinhibitor) und unterbindet so die Internalisierung und den Abbau von Oberflächenmarkern bei den extrazellulären Färbungen (s. 3.2.2.3).

3.1.3.10 Gelladepuffer

Der verwendete Gelladepuffer (6-fach konzentriert) stammt aus eigener Herstellung.

Für 5 ml:	2,5 ml Glycerol (87%)	(s. 3.1.4.11)
	10 µl EDTA (0,5 M)	Sigma-Aldrich; 5134
	500 µl 4% Bromphenolblau	Sigma-Aldrich; B-5525
	500 µl 4% Xylenecyanol	Sigma-Aldrich; 18047
	1,49 ml H ₂ O dest.	

3.1.4.11 Glycerol

Glycerollösungen wurden aus Glycerol (100%) (Sigma-Aldrich; 49781) und PBS^{ohne} hergestellt.

3.1.3.12 Kulturmedien

3.1.3.12.1 Bakterienkultur

LB-Medium

Zur Kultur der verschiedenen *E. coli* Stämme (s. 3.1.2) fanden sowohl LB-Agarplatten als auch LB-Flüssigmedium Verwendung (s. 3.2.1.2 und 3.2.1.8). (LB-Agar (Luria / Miller); Roth; Bestellnr.: X969.2)

3.1.3.12.2 Zellkultur

3.1.3.12.2.1 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)

HEK293T Zellen wurden in mit 10% FCS (s. 3.1.3.5) und 1% Penicillin / Streptomycin (s. 3.1.3.2.3) versetzen DMEM (PAA; Bestellnr.: E15-810) (D10⁺) kultiviert. Vor einer Transfektion erfolgte eine Passage der Zellen in DMEM mit 10% FCS ohne Antibiotika (D10⁻) (s. 3.2.2.9).

3.1.3.12.2.2 RPMI 1640

Zur Kultur der GXR25-Zellen wurde RPMI 1640 (kurz RPMI) (Sigma-Aldrich; Bestellnr.: R8758) mit 10% FCS (s. 3.1.3.5) und 1% Penicillin / Streptomycin (s. 3.1.3.2.3) verwendet.

3.1.3.12.2.3 OptiMEM

Das reduzierte Medium OptiMEM (Gibco; Bestellnr.: 31985-062) wurde während der Transfektion von HEK293T Zellen zur Erhöhung der Transfektionseffizienz verwendet (s. 3.2.2.9).

3.1.3.13 Lipofectamin 2000

Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin 2000 (Life Technologies; Bestellnr.: 11668019) verwendet.

3.1.3.14 Paraformaldehyd (PFA)

Die Inaktivierung von infektiösem Zellkulturmaterial erfolgte mittels einer 4%igen PFA-Lösung (Merck; Bestellnr.: 1.04005.1000) in PBS^{ohne} verwendet. Das Zellkulturmaterial wurde dabei in der 4%igen PFA-Lösung resuspendiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lagerung dieser Lösung erfolgt aliquotiert (à 25 ml) und bei -20°C.

3.1.3.15 Phosphat gepufferte Salzlösung ohne EDTA (auch: PBS^{ohne})

PBS^{ohne} (10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) wurde zur Herstellung der 4%igen PFA-Lösung (s. 3.1.3.14) und des FACS-Puffers (s. 3.1.3.9) verwendet. Das PBS^{ohne} wurde vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene zur Verfügung gestellt.

3.1.3.16 Red Safe DNA Stain

Standardmäßig erfolgte die Färbung von Agarosegelen mit Red Safe DNA Stain (Chembio; 21141). Nur im Falle sehr schwacher Banden kam Etidiumbromid zum Einsatz. Die Red Safe-Lösung wurde 1:20.000 verdünnt direkt in die abgekühlte Agarose / TAE-Puffer Mischung pipettiert.

3.1.3.17 Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs) sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet und wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

Tabelle 2: Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonuklease	Artikelnummer
BsrFI	R0562S
EcoRI	R0101T
HindIII	R0104T
NcoI	R0193L
PacI	R0547L
PstI	R0140S
SacI	R0156L
SalI	R0138L
SbfI	R0642L
XhoI	R0146S

3.1.3.18 TAE-Puffer 50 x

Für 1 l: 242 g TRIS Roth; 9090.3
 100 ml EDTA (0,5M; pH 8) Sigma-Aldrich; 5134
 57,1 ml Eisessig Merck; 1.00063.1000
 Ad 1 l H₂O (Millipore)

3.1.3.19 Trypsin

Die Vereinzelnung von HEK293T Zellen und ihre Ablösung von der Oberfläche der Kulturflaschen erfolgte mit Trypsin (Sigma-Aldrich; Bestellnr.: T4549). Die 10x konzentrierte Stammlösung kann in 5 ml Aliquots bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert werden. Zur Herstellung einer gebrauchsfertigen Lösung wurde die Stammlösung 1:10 in PBS^{ohne} verdünnt.

3.1.3.20 Wasser

Zum Resuspendieren der PCR-Primer (s. 3.1.7) wurde autoklaviertes Nuklease-freies, steril-filtriertes und DEPC-behandeltes Wasser (Roth; Bestellnr.: T143.4) verwendet.

3.1.4 Geräte

3.1.4.1 Brutschrank

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank von Haereus kultiviert.

3.1.4.2 Durchflusszytometer

Das verwendete Durchflusszytometer war ein FACS Canto II von BD Biosciences mit der dazugehörigen FACS Diva Software.

3.1.4.3 Freezing Container

Zum schonenden Einfrieren von Zellen wurde ein Freezing Container (Nalgene; 5100-0001) verwendet.

3.1.4.4 Gellaufkammern und Elektrophoresegerät

Es wurden AgaGel Midi-Wide Gellaufkammern von Biometra in Kombination mit einem Elektrophoresegerät E455 von Consort benutzt.

3.1.4.5 Thermocycler

Die PCRs (s. 3.2.1.5) wurden mit einem Thermocycler Modell T3 von Biometra durchgeführt.

3.1.4.6 Typhoon 9200

Zur Analyse und Dokumentation der Agarosegele wurde ein Typhoon 9200 (GE Healthcare) verwendet. Dieses Gerät verwendet kein UV-Licht sondern das blaue, UV-nahe Licht eines Argon Lasers (488-457 nm), so dass die DNA während der Gelanalyse nicht beschädigt wird.

3.1.4.7 Dark Reader Transilluminator

Ein Dark Reader Transilluminator (Clare Chemical Research; Modell: DR-45M) wurde benutzt, um Gele zu analysieren und distinkte Banden auszuschneiden. Der Transilluminator arbeitet mit reinem blauem Licht zur Anregung der Fluorochrome und nicht mit UV-Licht, was eine Schädigung der DNA verhindert. Allerdings ist zu beachten, dass schwache Banden mit diesem Gerät nur schlecht bis nicht zu sehen sind.

3.1.4.8 NanoDrop

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Reinheit wurde ein ND-1000 Spektrophotometer (PqLab) verwendet.

3.1.4.9 Pipettierhilfen

Gerät	Hersteller
Mehrkanalpipette	Eppendorf
Pipetman Pipetten (S3 Bereich)	Gilson
Research Pipetten (S1/S2 Bereich)	Eppendorf
Easypet® Pipettierhilfe	Eppendorf
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences

3.1.4.10 Zentrifugen

Gerät	Hersteller
Biofuge fresco 1,5 / 2 ml Reaktionsgefäße	Heraeus
Multifuge 3 S-R 15 / 50 ml Reaktionsgefäße (S1/S2 Bereich)	Heraeus
Centrifuge 5710 15 / 50 ml Reaktionsgefäße (S3 Bereich)	Eppendorf

3.1.5 Kits

Gerät	Hersteller; Artikelnummer
CpG Methyltransferase (M.SssI)	New England Biolabs; M0226S
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences; 554714
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen; 12643
HIV-1 p24 ELISA	Perkin Elmer; NEK050B
Phusion® High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs; E0553L
Retrosys	Innovagen; RT-001
QIAquick PCR Purification	Qiagen; 28106
Quick Ligation System	New England Biolabs; M2200L
QuickLyse Miniprep	Qiagen; 27406

3.1.6 Plasmide

Alle proviralen Konstrukte wurden in pUC19 (subgenomische Fragmente) (GenBank: M77789.2) bzw. pUC18 (Konstrukte mit Volllängeproviren) (GenBank: L08752.1) kloniert.

3.1.7 PCR-Primer

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins synthetisiert und nach Herstellerangaben verdünnt.

3.1.7.1 Mutageneseprimer

Die Generierung der Primer erfolgte nach den Angaben des *Gene Tailor Kits* (Life Technologies) wie nachfolgend gezeigt:

Forward Primer (F) 5' AGGAACTACTAGTACCCTT**CAC**GAACAAATA 3'

Reverse Primer (R) 3' CTTCACTGTATCGTCCTTGATGATCATGGGAA 5'

Der überlappende Bereich soll mindestens 15-20 Nukleotide lang sein. Die einzelsträngigen Überhänge sind (ohne das fett gekennzeichnete Codon) idealerweise zehn Nukleotide lang. Das zu verändernde Codon ist fett hervorgehoben. Die Schmelztemperatur der Primer wurde mit dem *T_m-Calculator* (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>) berechnet. Die Untersuchung aller Primer auf ungünstige Sekundärstrukturen erfolgte mit dem Programm Generunner (Heliogenetics).

Tabelle 3: Mutageneseprimer

Primername	Primersequenz 5' - 3'	Nukleotidposition
A ₂₂₀ T_F	TTGCATCCAGTGCAT ACAGGGCCTATTGCACCA	1432
A ₂₂₀ T_R	TGGTGCAATAGGCCCTGTATGCACTGGATGCAA	1432
A ₂₂₄ E_F	CATGCAGGGCCTATTG AACCAGGCCAGA	1444
A ₂₂₄ E_R	AATAGGCCCTGCATGCACTGGATGC	1458
A ₂₂₄ V_F	CATGCAGGGCCTATTGT ACCAGGCCAGA	1444
A ₂₂₄ V_R	AATAGGCCCTGCATGCACTGGATGC	1458
A ₂₃₇ E_F	AACCAAGGGGAAGTGACATAG AAGGA ACTACTA	1478
A ₂₂₀ T_R	TGGTGCAATAGGCCCTGTATGCACTGGATGCAA	1432
A ₂₂₄ E_F	CATGCAGGGCCTATTG AACCAGGCCAGA	1444
A ₂₂₄ E_R	AATAGGCCCTGCATGCACTGGATGC	1458
A ₂₂₄ V_F	CATGCAGGGCCTATTGT ACCAGGCCAGA	1444
A ₂₂₄ V_R	AATAGGCCCTGCATGCACTGGATGC	1458
A ₂₃₇ E_F	AACCAAGGGGAAGTGACATAG AAGGA ACTACTA	1478
A ₂₃₇ E_R	TATGTCACTTCCCCTTGTTCTCTCATCTGG	1497
A ₂₃₇ T_F	AGGGGAAGTGACATA ACAGGA ACTACTA	1483
A ₂₃₇ T_R	TATGTCACTTCCCCTTGTTCTCTC	1497
G ₂₂₆ D_F	GGGCCTATTGCACCAG ACCAGATGAGAG	1450
G ₂₂₆ D_R	TGGTGCAATAGGCCCTGCATGCACT	1464
G ₂₄₈ A_F	TACCCTTCAGGAACAAATAG CATGGATG	1512
G ₂₄₈ A_R	TATTTGTTCCCTGAAGGGTACTAGTAGTTCC	1560
H ₂₁₉ Q_F	AATGGGATAGATTGCATCCAGTGC AGGCAGGG	1421
H ₂₁₉ Q_R	CACTGGATGCAATCTATCCCATTCTGCAGCTTC	1443
H ₂₁₉ Q (V ₂₁₈ M)_F	ATAGATTGCATCCAAT GCAAGCAGGGC	1427
H ₂₁₉ Q (V ₂₁₈ M)_R	TGGATGCAATCTATCCCATTCTGCAGC	1440
(H ₂₁₉ Q) I ₂₂₃ V_F	ATCCAGTGC AAGCAGGGCCTGTTGCACCAGG	1436
(H ₂₁₉ Q) I ₂₂₃ V_R	AGGCCCTGCT TGC ACTGGATGCAATCTATCCC	1455
L ₁₈₄ I_F	GCCACCCCAAGAT ATAAATACCATGC	1324
L ₁₈₄ I_R	ATCTTGTGGGGTGGCTCCTTCTGAT	1338
M ₁₄₂ I_F	AACCTCCAGGGGCAAAT CGTACATCAG	1197
M ₁₄₂ I_R	TTGCCCTGGAGGTTCTGCACTATA	1212
M ₂₂₈ I_F	GGCCTATTGCACCAGGCCAGAT CAGAGA ACCAAG	1451
M ₂₂₈ I_R	CTGGCCTGGTGCATAGGCCCTGCATGCAC	1470
N ₂₀₆ D_F	AAATGTTAAAAGAGACCAT CGATGAGGAAGCTG	1385
N ₂₀₆ D_R	GATGGTCTCTTTTAACATTTGCATGGCTGC	1404
Q ₂₄₄ H_F	CAGGAACTACTAGTACCCTT CACGA ACAAATA	1499
Q ₂₄₄ H_R	AAGGGTACTAGTAGTTCCTGCTATGTC ACTTC	1518
T ₁₈₆ A_F	CCACAAGATTTAAAT GCCATGCTAAACA [nt])	1330
T ₁₈₆ A_R	ATTTAAATCTTGTGGGGTGGCTCC	1344

Primername	Primersequenz 5' - 3'	Nukleotidposition
T ₂₃₉ I_F	AGTGACATAGCAGGAATTACTAGTACCC	1489
T ₂₃₉ I_R	TCCTGCTATGTCACCTTCCCCTT	1503
T ₂₄₂ N_F	ACATAGCAGGAACTACTAGTAA AC CTTCAGGAAC	1493
T ₂₄₂ N_R	ACTAGTAGTTCCTGCTATGTCACCTTCCCCT	1513
T ₂₅₁ I_F	CAAATAGGATGGATGAU AC ATAATCCAC	1525
T ₂₅₁ I_R	CATCCATCCTATTTGTTCTGAAG	1539
V ₂₁₈ A_F	AATGGGATAGATTGCATCCAG CG CATGCAG	1421
V ₂₁₈ A_R	TGGATGCAATCTATCCCATTCTGCAGCTTCC	1440
V ₂₁₈ M_F	AATGGGATAGATTGCATCCA AT GCATGCAGGGCCT	1421
V ₂₁₈ M_R	TGGATGCAATCTATCCCATTCTGCAGCTTCTCAT	1440
V ₂₅₈ I_F	AATCCACCTATCCCA AT AGGAGAAATCTATAAA	1546
V ₂₅₈ I_R	TTTATAGATTTCTCCTATTGGGATAGGTGGATT	1546

In der Tabelle ist die Position des veränderten Nukleotids gegenüber der NL4-3 Sequenz (GenBank: AF324493) angegeben und in der Primersequenz jeweils fett dargestellt. Die unterstrichenen Triplets berücksichtigen veränderte Codons durch frühere Mutagenesen und die entsprechende Punktmutation ist jeweils in Klammern im Primernamen angegeben.

3.1.7.2 Sequenzierungsprimer

Mit den nachfolgend aufgelisteten Primern kann HIV-1 NL4-3 komplett sequenziert werden. Um die Identität einer Variante zu überprüfen, wurde im Regelfall der Primer 1c-F verwendet.

Tabelle 4: Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Primersequenz	Aminosäureposition
1a/b-F	5'-GCGACTGGTGAGTACGCC-3'	LTR 735
1a-R	3'-CTCCCTGCTTGCCCATAC-5'	Gag 40
1b-R	3'-ACCCATGCATTTAAAGTTC-5'	Gag 156
1c-F	5'-CCCTTCAGACAGGATCAGAAG-3'	Gag 67
1c-R	3'-TTCCTGCTATGTCACCTCC-5'	Gag 234
1d-F	5'-ACCTAGAACTTTAAATGCATGGG-3'	Gag 149
1d-R	3'-CAACAAGGTTTCTGTATCC-5'	Gag 318
1e/f-R	3'-TTCCCTAAAAATTAGCCTG-5'	Gag 254
1e-F	5'-CCACCTATCCCAGTAGGAG-3'	Gag 253
1f-F	3'-AGAAATGATGACAGCATGTC-5'	Gag 345
2a/b-F	5'-TAGAAGACATGATGACAGCATG-3'	Gag 346
2a-R	3'-GGTGGGGCTGTTGGCTC-5'	Gag 453/Pol 25
2b-R	3'-TCTTACTTTGATAAACCTCC-5'	Pol 114
2c-F	5'-AGACCAGAGCCAACAGCCCC-3'	Gag 451/Pol20
2c-R	3'-GCAAATACTGGAGTATTGTATGG-5'	Pol 217
2d/e-R	3'-GGTGATCCTTCCATCC-5'	Pol 312
2d-F	5'-AGTAGGACCTACACCTGTCAAC-3'	Pol 132
2e-F	5'-CAGTACTAAATGGAGAAAATTAG-3'	Pol 224
3a/b-F	5'-AATTGGGCCTGAAAATCC-3'	Pol 204
3a-R	3'-TGGAATATTGCTGGTGATCC-5'	Pol 310
3b-R	3'-TCTGTATGTCATTGACAGTCC-5'	Pol 407

Bezeichnung	Primersequenz	Aminosäureposition
3c/d-R	3'-AATTGTTTTACATCATTAGTGTG-5'	Pol 518
3c-F	5'-CCACAGGGATGGAAAGG-3'	Pol 306
3d-F	5'-GACAGCTGGACTGTCAATG-3'	Pol 404
3e-F	5'-GGGGCAAGGCCAATGGAC-3'	Pol 489
3e-R	3'-GTGAGTCTGTTACTATGTTTACTTC-5'	pol 647
3f/g-R	3'-TCACTAGCCATTGCTCTCC-5'	Pol 739
3f-F	5'-CTAAATTAGGAAAAGCAGG-3'	Pol 605
3g-F	5'-CAGCACACAAAGGAATTGG-3'	Pol 695
4a/b-F	5'-GGAGGAAATGAACAAGTAGATAAA-3'	Pol 699
4a-R	3'-ATATATCCACTGGCTACATG-5'	Pol 795
4b-R	3'-CCCTTTTCTTTTAAAATTGTG-5'	Pol 905
4c-F	5'-ATTAGCAGGAAGATGGCCAG-3'	Pol 820
4c-R	3'-CTTTTCTTCTTGGCACTAC-5'	Pol 978
4d-F	5'-TCAAAATTTTCGGGTTTATTAC-3'	Pol 937
4d-R	3'-CAAATGCCAATCTCTTTCTCC-5'	Vif 81
4e-F	5'-AAGCTCAGAAGTACACATCCC-3'	Vif 51
4e-R	3'-CTGGGGCTTGTTCCATCT-5'	Vif 179
5a/b-F	5'-ATGGAAAACAGATGGCAGG-3'	Vif 1
5a-R	3'-GAGACTCCCTGACCCAAATGCC-5'	Vif 85
5b-R	3'-GGTCTTCTGGGGCTTGTTCC-5'	Vif 180/Vpr7
5c/d-R	3'-CCTGGATGCTTCCAGGGCTC-5'	Tat1 14
5c-F	5'-CTAGCAGACCAACTAATTC-3'	Vif 101
5d-F	5'-CTGACAGAGGATAGATGGAAC-3'	Vif 169
5e-F	5'-TATCTATGAACTTATGGGGATA-3'C	Vpr 45
5e-R	3'-CTYTCATTGCCACTGTCTTC-5'	Vpu 57
5f/g-R	3'-GGGTCTGTGGGTACACA-5'	Env 78
5f-F	5'-CATCTCCTATGGCAGGAAGAAG-3'	tat1 45
5g-F	5'-GAGCAGAAGACAGTGGCAATG-3'	Vpu 49
6a/b-F	5'-GAAAGAGCAGAAGACAGTGG-3'	Vpu 47
6a-R	3'-GTACACAGGCATGTGTGGCCC-5'	Env 74
6b-R	3'-CAATTTAAAGAAACACAGAGTGG-5'	Env 129
6c-F	5'-GCCTGTGTACCCACAGAC-3'	Env 71
6c-R	3'-AATAATGTATGGGAATTGG-5'	Env 215
6d-F	5'-AGATAAAAACTGCTCTTTCA-3'A	Env 152
6d-R	3'-TTACAATATGCTTGTCTTAT-5'	Env 330
6e-F	5'-GTACAGTGTACACATGGAATTA-3'	Env 243
6e-R	3'-GGGAGGGGCATACATTGC-5'	Env 429
6f-F	5'-ACAGTTTTAATTGTGGAGGGG-3'	Env 371
6f-R	3'-GCCCATAGTGCTTCCTGC-5'	Env 526
7a/b-F	5'-TTAATTGTGGAGGAGAATTTTT-3'	Env 373
7a-R	3'-TTTATATAATTCATTCTCC-5'	Env 477
7b-R	3'-GAGTTTTCCAGAGCAACCCC-5'	Env 593
7c-F	5'-TGAGGGACAATTGGAGAAGTG-3'	Env 467
7c-R	3'-AAGCCTCCTACTATCATTATG-5'	Env 687
7d-F	5'-TTGCAACTCACAGTCTGGGG-3'	Env 557
7d-R	3'-CCTGCGTCCCAGAAGTTCC-5'	Env 779
7e-F	5'-TTCATAATGATAGTAGGAGG-3'	Env 676
7e-R	3'-TTTTGACCACTTGCCACCC-5'	Nef 7

Bezeichnung	Primersequenz	Aminosäureposition
7f-F	5'-GGAACCTTCTGGGACGCAGG-3'	Env 774
7f-R	3'-CCTTGTAAGTCATTGGTC-5'	Nef 82
7g-F	5'-ATGGGTGGCAAGTGGTC-3'	Nef 1
7g-R	3'-ACTGGTACTAGCTTGAAGCACC-5'	Nef 147
7h-F	5'-CAGGTACCTTTAAGACCAATG-3'	Nef 73
7h/i-R	3'-ACTCCGGATGCAGCTCTCGGGC-5'	Nef 201

Nachfolgend aufgelistete Primer sequenzieren vom Plasmid in das eingesetzte virale Konstrukt.

Bezeichnung	Primersequenz
pTZ19R R	3'-CCTTTGAGTGAGCTGATA-5'
3'LTR F	5'-GTTGTGTGACTCTGGTAACT-3'
pUC 19 F	5'-CGAAAGGGGGATGTG-3'
pUC 19 R	3'-TACACTTTATGCTTC-5'

3.1.8 Software

Die nachfolgende Tabelle listet wissenschaftliche Software und die Anwendung in der vorliegenden Arbeit auf.

Tabelle 5: Software

Name	Hersteller	Verwendung
Generunner	Heliogenetics	Analyse von Primern auf ungünstige Sekundärstrukturen.
Graphpad PRISM 5	GraphPad Software, Inc.	Grafikprogramm zur Erstellung der Graphen.
i-Tasser 3.0	http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/	De Novo Berechnung von 3D-Proteinstrukturen.
Modeller 9.13	http://salilab.org/modeller/	Auf Homology Modelling basierende Berechnung von 3D-Proteinstrukturen.
Pymol 1.5.0.4	Schrodinger LCC	Grafikprogramm zur Generierung von 3D-Proteinstrukturmodellen
Sequencher 5.0	Gene Codes Corporation	DNA-Sequenzanalyse.
SPSS Statistics 21	IBM	Programm zur statistischen Auswertung der Daten.
<i>T_m-Calculator</i>	Thermo Fischer	Berechnung der spez. Schmelztemperatur von Primern.

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
12 well Zellkulturplatten	Corning; 3513
Aspirationspipetten 2 ml	VWR; 724-0456
FACS-Röhrchen BD Falcon™	BD Biosciences; 352054
Cryotube Vials, external threads	Thermo Scientific; 347627
Cryotube Vials, internal threads	Thermo Scientific; 363401
Discardit II 5 ml	BD Biosciences; 309050
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Kisker; G001-AF
PCR-Tube-Streifen	Kisker; G003-SF
Petrischalen	BD Biosciences; 353004
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000 µl)	Kisker; 6020110, -7, -8
Plastikpipetten (5, 10, 25 ml)	Corning; 4487, -88, -89
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf; 0030125150 bzw. -094
Reaktionsgefäße (5 ml)	BD Biosciences; 352059
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	BD Biosciences; 352096 bzw. 352070
Safe Seal-Tips professional (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Biozym; 692139, -151, -066, -069, -078
Steriflip	Millipore; SLHA033SB
T25 Flaschen	Corning Inc.; 430639
T75 Flaschen	Corning Inc.; 430641

3.1.10 Viren und provirale Konstrukte

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Proviren mittels Transfektion infektiöse HIV-1 Viruspartikel generiert (s. 3.2.2.9). In der nachfolgenden Tabelle 6 sind alle verwendeten Konstrukte aufgelistet. Bis auf die gekennzeichneten Ausnahmen handelt es sich bei dem Plasmid jeweils um pUC19 (s. 3.1.6). Alle Virusvarianten sind von NL4-3 (als Wildtyp (WT) definiert) abgeleitet und sind somit CXCR4-trop. Die Virusvarianten sind alphabetisch aufgelistet und nach thematischen Gesichtspunkten in Gruppen unterteilt. Der erste Teil des Namens bezeichnet die eingeführten Punktmutationen, der zweite Teile des Namens (on WT, RK oder RKLM) gibt die Art des Virusrückrads an. Es handelt sich dabei entweder um die unveränderte Variante NL4-3 (WT), NL4-3 + R₂₆₄K (RK) oder NL4-3 + R₂₆₄K + L₂₆₈M (RKLM). Die Fußnoten in der Tabelle 6 beziehen sich auf die Quellen, in denen die jeweilige Virusvariante das erste Mal erwähnt wurde.

Tabelle 6: Liste der verwendeten proviralen Konstrukte.

HIV-1 Isolat	<i>In vitro</i> alternative sekundäre Mutationen¹²²
NL4-3 (= WT) ¹²³	Fortsetzung
HLA-B*27-KK10 assoziierte Varianten⁷	N ₂₀₆ D on RK
L ₂₆₈ M on WT	N ₂₀₆ D on RKLM
R ₂₆₄ K on WT	N ₂₀₆ D on WT
R ₂₆₄ K, L ₂₆₈ M on WT	Q ₂₄₄ H on RK
S ₁₇₃ A on WT	Q ₂₄₄ H on RKLM
S ₁₇₃ A, L ₂₆₈ M on WT	Q ₂₄₄ H on WT
S ₁₇₃ A, R ₂₆₄ K on WT	T ₂₃₉ I on RK
S ₁₇₃ A, R ₂₆₄ K, L ₂₆₈ M on WT	T ₂₃₉ I on RKLM
HLA-B*57 TW10 assoziierte Varianten¹⁰	T ₂₃₉ I on WT
G ₂₄₈ A on WT	T ₂₅₁ I on RK
H ₂₁₉ Q on WT	T ₂₅₁ I on RKLM
H ₂₁₉ Q, G ₂₄₈ A on WT	T ₂₅₁ I on WT
H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I on WT	V ₂₅₈ I, A ₂₂₀ T on RK
H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I, T ₂₄₂ N, G ₂₄₈ A on WT	V ₂₅₈ I, A ₂₂₀ T on RKLM
H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I on WT	V ₂₅₈ I, A ₂₂₀ T on WT
H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on WT	<i>In vivo</i> alternative sekundäre Mutationen^{7,122}
I ₂₂₃ V on WT	A ₂₃₇ T on RK
M ₂₂₈ I on WT	A ₂₃₇ T on RKLM
M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on WT	A ₂₃₇ T on WT ¹²⁴
T ₂₄₂ N on WT	G ₂₄₈ A on RK
V ₂₁₈ M on WT	G ₂₄₈ A on RKLM
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q on WT	G ₂₄₈ A on WT
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on WT	H ₂₁₉ Q on RK
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on WT	H ₂₁₉ Q on RKLM
<i>In vitro</i> alternative sekundäre Mutationen¹²²	H ₂₁₉ Q on WT
A ₂₂₀ T on RK	H ₂₁₉ Q, G ₂₄₈ A on RK
A ₂₂₀ T on RKLM	H ₂₁₉ Q, G ₂₄₈ A on RKLM
A ₂₂₀ T on WT	H ₂₁₉ Q, G ₂₄₈ A on WT
A ₂₂₄ V on RK	H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I on RK
A ₂₂₄ V on RKLM	H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I on RKLM
A ₂₂₄ V on WT	H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I on WT
A ₂₃₇ E on RK	H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I on RK
A ₂₃₇ E on RKLM	H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I on RKLM
A ₂₃₇ E on WT	H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I on WT
A ₂₃₇ T on RK	H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RK
A ₂₃₇ T on RKLM	H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RKLM
A ₂₃₇ T on WT	H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on WT
L ₁₈₄ I on RK	I ₂₂₃ V on RK
L ₁₈₄ I on RKLM	I ₂₂₃ V on RKLM
L ₁₈₄ I on WT	I ₂₂₃ V on WT
M ₁₄₂ I on RK	M ₂₀₀ I on RK
M ₁₄₂ I on RKLM	M ₂₀₀ I on RKLM
M ₁₄₂ I on WT	M ₂₀₀ I on WT
N ₂₀₆ D on RK	M ₂₀₀ I, V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RK
N ₂₀₆ D on RKLM	M ₂₀₀ I, V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RKLM
N ₂₀₆ D on WT	M ₂₀₀ I, V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on WT
Q ₂₄₄ H on RK	M ₂₀₀ I, V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RK
Q ₂₄₄ H on RKLM	M ₂₀₀ I, V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RKLM

<i>In vivo</i> alternative sekundäre Mutationen ^{7,122}
Fortsetzung
M ₂₀₀ I, V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on WT
M ₂₂₈ I on RK
M ₂₂₈ I on RKLM
M ₂₂₈ I on WT
M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RK
M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RKLM
M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on WT
V ₂₁₈ A on RK
V ₂₁₈ A on RKLM
V ₂₁₈ A on WT ¹²⁴
V ₂₁₈ A, A ₂₃₇ T on RK
V ₂₁₈ A, A ₂₃₇ T on RKLM
V ₂₁₈ A, A ₂₃₇ T on WT
V ₂₁₈ M on RK
V ₂₁₈ M on RKLM
V ₂₁₈ M on WT
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q on RK
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q on RKLM
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q on WT
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RK
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RKLM
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on WT
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RK
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on RKLM
V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, M ₂₂₈ I, G ₂₄₈ A on WT

CsA-abhängige <i>in vitro</i> Varianten
A ₂₂₄ E on WT ⁸
G ₂₂₆ D on WT ⁸
T ₁₈₆ A on WT ¹⁰
Kompensierte CsA-abhängige <i>in vitro</i> Varianten
A ₂₃₇ T on A ₂₂₄ E ⁹
A ₂₃₇ T on G ₂₂₆ D ¹²²
A ₂₃₇ T on T ₁₈₆ A ⁹
S ₁₇₃ A on A ₂₂₄ E ¹²²
S ₁₇₃ A on G ₂₂₆ D ¹²²
S ₁₇₃ A on T ₁₈₆ A ¹²²
V ₂₁₈ A on A ₂₂₄ E ¹²²
V ₂₁₈ A on G ₂₂₆ D ¹²²
V ₂₁₈ A on T ₁₈₆ A ¹²²
V ₂₁₈ A, A ₂₃₇ T on A ₂₂₄ E ¹²²
V ₂₁₈ A, A ₂₃₇ T on G ₂₂₆ D ¹²²
V ₂₁₈ A, A ₂₃₇ T on T ₁₈₆ A ¹²²

3.1.11 Zellen

Alle Zellen wurden bei konstant 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank von Haereus kultiviert.

3.1.11.1 GXR25 Zelllinie

Diese Zelllinie wurde von Brockman et al. hergestellt ¹²⁵. Es handelt sich um eine Weiterentwicklung einer ursprünglich von Gervaix et al. beschriebenen CEM Reporter-T-Zelllinie ¹²⁶. Die ursprüngliche Reporter-T-Zelllinie kodiert für ein *green fluorescence protein* (GFP)-Gen, das unter der Kontrolle eines HIV-1 *long terminal repeats* (LTR) steht. Im Falle einer HIV-1 Infektion kommt es zu einer Tat-induzierten Expression des GFP-Gens. Die verwendete GXR25 Zelllinie unterscheidet sich von der von Gervaix et al. beschriebenen Zelllinie durch die zusätzliche stabile Expression von CCR5. GXR25 steht deshalb für CEM-GFP, CXCR4, CCR5, Klon 25.

3.1.11.2 HEK293T Zelllinie

Diese klassische Zelllinie wurde wegen ihrer guten Transfizierbarkeit als Produzentenzelllinie zur Herstellung von HIV-1 Partikeln verwendet. Bei den HEK293T Zellen handelt es sich um *human embryonic kidney cells*. Im Unterschied zur parentalen HEK293 Zelllinie tragen die HEK293T Zellen noch das Gen für das große SV40 (*simian vacuolating virus 40*) T-Antigen. Dieses Protein erlaubt die episomale Replikation von Plasmiden, die einen SV40 *Origin of Replication* (ORI) besitzen (www.dsmz.de; Katalognr.: ACC-6359) .

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse eines Restriktionsverdau wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Standardgele liefen 30 min bei 110 V und 500 mA. Gele aus denen einzelne DNA-Banden aufgereinigt werden sollten, liefen 1,5 Std bei 80 V und 500 mA.

3.2.1.2 Aufreinigung der Plasmid-DNA

Glycerolstocks (s. 3.2.1.4) von Bakterienkulturen wurden frisch auf LB_{AMP}-Platten ausgestrichen (3-Ösen-Ausstrich) und über Nacht (16 Std) bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurden nach Herstellerangaben geeignete LB_{Amp}-Flüssigkulturen einzelner Klone angelegt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *Quick Lyse Miniprep Kits* von Qiagen nach Herstellerangaben mit nachfolgenden Modifikationen:

1. Zur Erhöhung der Ausbeute wurden 2 x 1,5 ml der Bakterienkultur eingesetzt:
Es wurden zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße befüllt und bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) pelletiert (Duplikat). Anschließend folgte die Resuspendierung und Vereinigung der Duplikat-Pellets dem Protokoll folgend mit 250 µl P1-Puffer. Die weiteren Schritte des Zellaufschlusses erfolgten nach Protokoll.
2. Um die aufgereinigte DNA möglichst vollständig aus den Säulchen zu lösen, wurde zum einen die Inkubation des Elutionspuffers auf 2 min verlängert und zum anderen der Elutionsschritt mit dem Eluat wiederholt.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und deren Reinheit erfolgten mit einem Nano Drop Spektrophotometer, anschließend konnte ein geeigneter Restriktionsverdau durchgeführt werden. Zur zweifelsfreien Bestimmung des aufgereinigten Provirus wurde das Plasmid ggf. zusätzlich mit einem geeigneten Primer ansequenziert (s. 3.2.1.7).

3.2.1.3 ELISA (*enzyme linked immunosorbend assay*)

3.2.1.3.1 Bestimmung der p24-Konzentration im Zellkulturüberstand

Die Durchführung der ELISAs erfolgte nach Herstellerangaben (Perkin Elmer). Jedoch wurden die Proben in PBS^{ohne} mit 1% FCS verdünnt, um die unspezifische Bindung von p24 an Plastik zu vermindern. Die Verdünnungen erfolgten im 96 Loch-Plattenformat mit einer Mehrkanalpipette. Anschließend konnte eine 1:15000-fache Verdünnung der Zellkulturüberstände von transfizierten HEK293T-Zellen gemessen werden (s. 3.2.2.9).

3.2.1.3.2 Bestimmung der reversen Transkriptase-Aktivität im Zellkulturüberstand

Zur Bestimmung der reversen Transkriptase-Aktivität (RT-Aktivität) im Zellkulturüberstand der transfizierten HEK293T-Zellen (s. 3.2.2.9) wurde das Retrosys Kit der Firma Innovagen nach Herstellerangaben verwendet. Allerdings erfolgten die Waschschriffe mit 4 x 3 ml Waschpuffer. Mit Hilfe dieses Kits ist es möglich, die Konzentration der RT anhand einer ELISA-basierten Messung der RT-Aktivität zu bestimmen.

Zur Auswertung wurde diejenige Verdünnung ausgewählt, bei der alle gemessenen Proben im linearen Messbereich der Standardkurve lagen.

3.2.1.4 Glycerolstocks

Nach Bestätigung der Sequenzidentität der unterschiedlichen proviralen Konstrukte durch einen geeigneten Restriktionsverdau und eine DNA-Sequenzierung geeigneter Genomabschnitte wurden von den dazugehörigen *E. coli* LB_{Amp} -Flüssigkulturen Glycerolstocks angelegt. Dafür wurden 333 μ l Kulturmedium mit 666 μ l einer 60%igen Glycerollösung gemischt und anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.1.5 Herstellung der proviralen Varianten (Mutagenese)

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Varianten des HIV-1 Isolats NL4-3 generiert, weswegen dieses Isolat fortan als Wildtyp (WT) bezeichnet wird. Die Generierung der Varianten erfolgte durch *site directed mutagenesis* auf subgenomischer Ebene (s. 3.2.1.6). Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen gag-Varianten wurden alle auf dem SacI-SbfI Fragment von NL4-3 erzeugt, das in ein pUC19 Plasmid (GenBank: M77789.2) kloniert worden war (Sac-Sbf in pUC19) (Abb. 6). Die Klonierungsstrategie für das Einbringen des mutierten Sequenzbereichs in ein provirales Volllängekonstrukt wird unter 3.2.1.6 erläutert.

Die Mutagenesereaktionen wurden zunächst mit dem genannten *Gene Tailor Kit* (Life Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nachdem dieses Produkt nicht mehr vertrieben wurde, kam für die DNA-Methylierung der *Templet*-Plasmid-DNA eine CpG Methylase und für die PCR die DNA-Polymerase Phusion (beide von New England Biolabs) nach Herstellerangaben zum Einsatz. Das bewährte Primerdesign des *Gene Tailor Kits* wurde beibehalten. Mit der Synthese der Primer wurde die Firma Eurofins beauftragt.

3.2.1.6 Klonierungsstrategie zur Generierung der proviralen Vollängenkonstrukte

Zur Herstellung der Volllänge-Proviren aus den durch *site directed mutagenesis* erzeugten Gag-Pol Fragmenten wurde folgende Klonierungsstrategie angewendet:

Der erste Schritt bestand in einer Klonierung des mutierten Gag-Pol Fragments in eine HIV-1 5'-Hälfte. Anschließend erfolgte die Generierung des Vollängen-Provirus durch Ligation der mutierten HIV-1 5'-Hälfte mit einer HIV-1 3'-Hälfte. Das Gag-Pol Fragment weist am 5'-Ende eine SacI- und am 3'-Ende eine SbfI-Schnittstelle auf (Abb. 6). Dieser im Rahmen der Arbeit als SacI-SbfI-Fragment bezeichnete Genomabschnitt von HIV-1 wurde in eine SacI und SbfI geschnittene und aufgereinigte NL4-3 5'-Hälfte+Zauberlinker (Zauberlinker = 5'-Hälfte NL4-3 Δ SacI-SbfI-Fragment) kloniert. Die so erzeugte 5'-Hälfte wurde mit EcoRI und NcoI geschnitten, aufgereinigt und mit einer entsprechend behandelten NL4-3 3'-Hälfte ligiert.

Um eine vollständige Restriktion der Plasmide zu erreichen, wurden sie 3 Std bei 37°C mit dem entsprechenden Restriktionsenzymcocktail (s.u.) inkubiert und die Proben anschließend langsam auf einem 1%igen Agarosegel getrennt (1,5 Std bei 80 V und 500 mA). Um Kontaminationen mit unerwünschter DNA zu vermeiden, erfolgte vor jeder Anwendung die Reinigung der Gellaufkammer und die Verwendung von frischem TAE-Puffer. Die gewünschten Banden konnten dann auf dem *Dark Reader* ausgeschnitten und mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt werden. Die DNA-Konzentration wurde anschließend im Nano Drop bestimmt. Die Ligationen erfolgten mit dem *Quick Ligation System* (New England Biolabs) nach Herstellerangaben.

Tabelle 7: Klonierung des Sac-Sbf-Fragments in NL4-3 5'-Hälfte + Zauberlinker

Reagenz / Plasmid mit:	Sac-Sbf-Fragment	NL4-3 5'-Hälfte + Zauberlinker
DNA	750 ng	750 ng
SacI (1:10 Verdünnung)	10 μ l	10 μ l
SbfI (1:10 Verdünnung)	10 μ l	10 μ l
NEB4-Puffer	5 μ l	5 μ l
BSA	0,5 μ l	0,5 μ l
BsrF (1:10 Verdünnung)	10 μ l	-
Pacl (1:10 Verdünnung)	-	5 μ l
H ₂ O	ad 50 μ l	ad 50 μ l

Schnittmuster Sac-Sbf-Fragment: **2356**, 1340 und 1313 Basenpaare

Schnittmuster NL4-3 5'-Hälfte + Zauberlinker: **7888** und 30 Basenpaare

Tabelle 8: Klonierung einer 5'-Hälfte mit einer 3'-Hälfte (beide NL4-3)

Reagenz / Plasmid mit:	5'-Hälfte NL4-3	3'-Hälfte NL4-3
DNA	750 ng	750 ng
EcoRI (1:10 Verdünnung)	10 µl	10 µl
NcoI (1:10 Verdünnung)	20 µl	20 µl
NEB3-Puffer	5 µl	5 µl
BSA	0,5 µl	0,5 µl
Sal I (1:10 Verdünnung)	10 µl	-
PstI (1:10 Verdünnung)	-	10 µl
H ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl

Schnittmuster 5'-Hälfte: **10.003** und 233 Basenpaare

Schnittmuster 3'-Hälfte: **4822**, 2650 und 228 Basenpaare

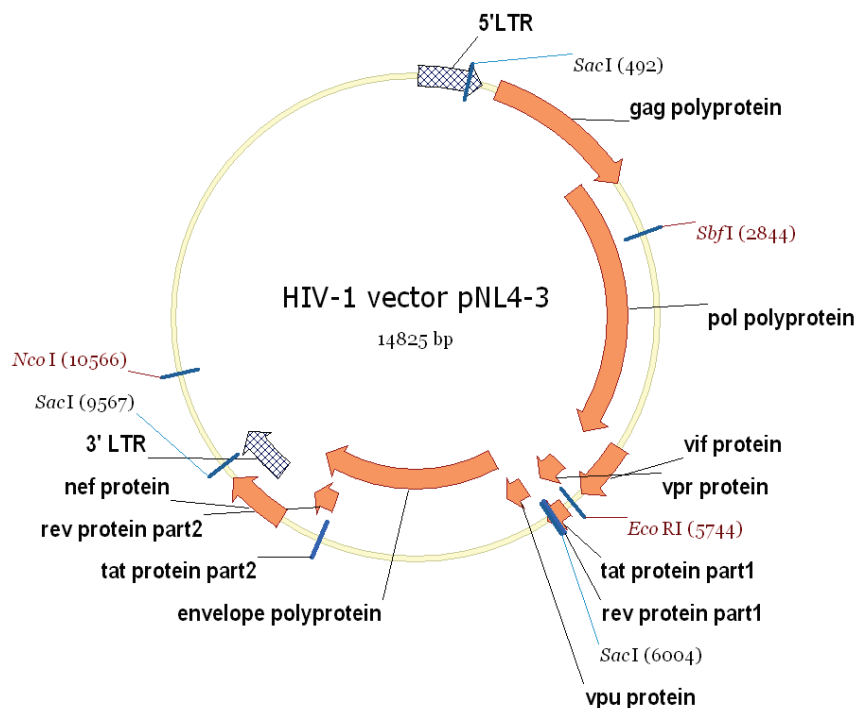


Abb. 6: HIV-1 Vektor pNL4-3

Nachfolgend werden die einzelnen für die Klonierungsstrategie relevanten Bereiche definiert, in die das HIV-1 Genom unterteilt wurde. Jeder dieser Bereiche wurde als separates Plasmid generiert. Das SacI-SbfI-Fragment beginnt bei der SacI-Restriktionserkennungssequenz (Nukleotid 487-492) und endet bei der SbfI-Restriktionserkennungssequenz (Nukleotid 2838-2845). Das Plasmid mit der HIV-1 5'-Hälfte kodiert die 5'-Hälfte vom 5'-*long terminal repeat* (LTR) bis zu der EcoRI-Restriktionserkennungssequenz (Nukleotid 5743-5748). Die 3'-Hälfte beginnt bei der EcoRI-Restriktionserkennungssequenz (Nukleotid 5743-5748) und endet bei der NcoI-Restriktionserkennungssequenz (Nukleotid 10565-10570). Quelle: *GenBank* AF324493; Grafik wurde mit dem Programm VectorNTI (Life Technologies) generiert.

3.2.1.7 Sequenzierungen

Sämtliche Sequenzierungen wurden von der Firma Life Technologies durchgeführt. Die Auswertung der Daten / Überprüfung der Sequenzen erfolgte mit der Software Sequencher Gene Codes.

3.2.1.8 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von TOP10, Stab13 und DH5 α *E. coli* wurde nach Herstellerangaben (Invitrogen) durchgeführt. Die Transformation von TOP10 *E. coli* erfolgte ausschließlich mit Plasmiden, die subgenomische Fragmente von HIV-1 kodierten (z.B. das SacI-SbfI-Fragment). Stab13 *E. coli* wurden nur mit Plasmiden transformiert, die für das vollständige Virusgenom kodierten. In DH5 α *E. coli* wurden dagegen nur Plasmide aus einer Mutagenese-PCR (s. 3.2.1.5) eingebracht. Dies diente der Reduzierung falsch positiver Kolonien. DH5 α *E. coli* sind in der Lage, die durch die CpG Methyltransferase methylierte Template-Plasmid-DNA der Mutagenese-PCR zu zerschneiden, können dies jedoch nicht mit den unmethylierten PCR-Produkten. Folglich sollten Kolonien, die auf den Platten wachsen, mit den Produkten der Mutagenese PCRs transformiert worden sein, die potenziell die gewünschte Mutation tragen können.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Bestimmung der relativen Infektiosität in GXR25-Zellen

Es wurden je 1×10^6 Zellen / 12-well in 0,5 ml RPMI mit 10% FCS und Pen/Strep (R10 $^+$) in Gegenwart oder Abwesenheit von CsA vorgelegt. Die Zellen wurden vor der Viruszugabe ca. 45 min präinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit Transfektionsüberständen des jeweiligen Virus (250 ng p24) und das Auffüllen auf das gleiche Volumen mit R10 $^+$. Die CsA-Konzentration zur Präinkubation war dabei so gewählt, dass sie nach Zugabe des Virus 0,5 μ M betrug. Sechs Stunden *post infectionem* (p.i.) wurde mit R10 $^+$ (ohne bzw. mit 0,5 μ M CsA) auf 2 ml aufgefüllt. Zwei Tage p.i. erfolgte die Entnahme von je 1 ml der Kultur und die Pelletierung der Zellen (5 min bei 300 x g). Der Überstand wurde verworfen und infektiöse Partikel 1 Std mit 350 μ l einer 4%igen PFA / PBS^{ohne}-Lösung inaktiviert. Anschließend folgte die Analyse von 2×10^5 Zellen an Hand der GFP-Fluoreszenz infizierter Zellen in einem FACS Canto II. Mit Hilfe dieser Daten konnte dann die relative Infektiosität in Bezug auf den HIV-1 Laborstamm NL4-3 (als WT definiert) berechnet werden.

3.2.2.2 Durchflusszytometrie / FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)

Zum Nachweis der Infektion von GXR25-Zellen wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Dazu erfolgte die Untersuchung der PFA-fixierten HIV-1 infizierten GXR25-Zellen (s. 3.1.11.1) auf ihre GFP-Produktion hin, die direkt mit einer produktiven Infektion durch HIV-1 korreliert. Es wurden jeweils 2×10^5 Zellen analysiert.

Desweiteren wurden mittels Durchflusszytometrie Zellen, die mit fluoreszierenden Antikörpern markiert worden waren (s. 3.2.2.3), auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker hin untersucht.

3.2.2.3 Extrazelluläre Färbung von Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern

Die Zellen wurden 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und anschließend zweimal mit 3 ml FACS-Puffer (s. 3.1.3.9) gewaschen. Zum Blocken der F_c -Rezeptoren erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 100 μ l FACS-Puffer und deren Inkubation mit 10 μ l anti- F_c -Antikörper 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen 15 min mit den gewünschten Fluoreszenz-markierten Antikörpern im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen wieder zweimal mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 5 min bei $300 \times g$). Da mit den verwendeten Antikörpern gegen CXCR4 und CCR5 keine oder nur schwache Signale detektiert werden konnten, wurde in diesen Fällen eine sekundäre Färbung durchgeführt. Ein polyklonaler APC-markierter anti-Maus- F_c -Antikörper (5 μ l für 20 min im Dunkeln) diente zur spezifischen Markierung der jeweiligen primären Maus-Antikörper (anti-CXCR4 bzw. anti-CCR5). Mit Hilfe dieses sekundären Antikörpers konnte ein mit dem CD4-Signal vergleichbares, starkes Signal der Zellen für beide Ko-Rezeptoren detektiert werden. Die Zellen wurden abschließend zwei Mal mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen. Zur Inaktivierung der Zellen erfolgte abschließend die Resuspendierung in 100 μ l einer 4%igen PFA-Lösung und eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Für die Liste der verwendeten Antikörper s. 3.1.1.

3.2.2.4 Langzeitkulturen von Virusvarianten

Zwanzig ml $R10^+$ Medium wurden mit 2×10^6 GXR25 Zellen angeimpft und mit der Virusvariante $R_{264}K$ infiziert (500 ng p24). Über einen Zeitraum von bis zu zehn Wochen wurden zweimal wöchentlich 10 ml Medium abgenommen und der Prozentsatz GFP-positiver Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Das fehlende Medium wurde durch frisches ersetzt. Bei steigender Infektionsrate wurden infektiöse Partikel isoliert. Bei den revers-transkribierten Genomen wurde der gag-Bereich durch *bulk sequencing* analysiert ⁷. Die entsprechenden Arbeiten wurden von Herrn Dr. Schneidewind durchgeführt ¹²¹. Die entdeckten Mutationen führten zur Generierung (s. 3.2.1.5) der unter 4.7.1 beschriebenen Virusvarianten.

3.2.2.5 Langzeitlagerung von humanen Zellen

Zur längerfristigen Lagerung von Zellkulturen in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen zentrifugiert (5 min bei 300 x g) und in kaltem Gefriermedium (DMEM bzw. RPMI mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in Cryo-Röhrchen mit Innengewinde aliquotiert. Danach wurden die Aliquots in einen auf 4°C vorgekühlten *freezing container* gestellt und über Nacht langsam auf -80°C gekühlt. Am nächsten Tag erfolgte das Einfrieren der Aliquots dann in flüssigem Stickstoff.

3.2.2.6 Passagierung der Zellen

3.2.2.6.1 HEK293T Zellen

Die HEK293T-Zellen wurden in T75 Flaschen in 15 ml D10⁺ kultiviert und zweimal pro Woche entweder 1:15 (Montag) oder 1:10 (Freitag) passagiert.

3.2.2.6.2 GXR25 Zellen

Die Kultivierung der GXR25-Zellen erfolgte in T75 Flaschen in einem Volumen von 50 ml R10⁺. In der Regel wurden die Zellen montags je nach Dichte 1:15 bis 1:20 passagiert. Freitags erfolgte entweder die Passagierung der Zellen in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:15 oder im Falle einer folgenden Infektion das Aussähen von 1 x 10⁶ Zellen.

3.2.2.7 Reinigung und Lagerung der virushaltigen Zellkulturüberstände

Bei Anwendung des unter 3.2.2.9 beschriebenen Transfektionsprotokolls konnten zwei Tage *post transfectionem* (p.t.) je Ansatz ca. 4 ml virushaltiger Überstand geerntet werden. Dieser wurde zentrifugiert (5 min bei 300 x g), mit Spritzenfiltern steril filtriert und in Cryo-Tubes aliquotiert. Die Aufbewahrung der Aliquots erfolgte bei -80°C. Zudem wurden 20 µl Überstand für einen p24-ELISA in einer 0,5%igen Triton X / PBS^{ohne} Lösung inaktiviert und bei -20°C zwischengelagert. Der verwendete p24-ELISA stammte von Perkin Elmer. Er ermittelte bei Anwendung des unter 3.2.2.9 beschriebenen Transfektionsprotokolls eine durchschnittliche p24-Konzentration von etwa 1300 ng/ml. Die Überstände wurden anschließend zur Bestimmung der relativen Infektiosität eingesetzt (s. 3.2.2.1).

3.2.2.8 Selektion der GFP-Expression GXR25 Zellen

Eine Selektion der GXR25-Zellen auf die Gegenwart des eingebrachten GFP-Gens ¹²⁶ erfolgte immer nach Abnahme eines frischen Aliquots von GXR25-Zellen in Kultur. Ab der zweiten Passage nach dem Auftauen wurden die Zellen über zwei Wochen in Gegenwart von Geneticin (500 µg/ml) kultiviert. Danach erfolgte die Kultivierung der Zellen ein bis zwei Wochen lang in Geneticin-freiem Medium, bevor sie in Experimenten eingesetzt wurden.

3.2.2.9 Transfektion humaner Zellen mit proviralen Konstrukten

Nachfolgendes Protokoll wurde im Verlauf dieser Arbeit zur effizienten Transfektion von HEK293T Zellen mit HIV-1 Proviren etabliert.

Zunächst wurden $2,8 \times 10^6$ HEK293T-Zellen in Antibiotika-freiem DMEM mit 10% FCS (D10⁻) ausgesät und über Nacht (16-18 Std) in 5 ml D10⁻ kultiviert. Am nächsten Tag folgte die Transfektion der HEK293T-Zellen, die dann ungefähr zu 70% konfluent waren. Für eine effektive Transfektion ist eine gleichmäßige Verteilung der Zellen entscheidend.

Pro Transfektionsansatz wurden 20 µl Lipofectamin 2000 (Invitrogen) mit 500 µl OptiMEM (Invitrogen) gemischt und 5 min inkubiert. Währenddessen erfolgte das Mischen der Plasmid-DNA (4 µg / Ansatz) mit 500 µl OptiMEM. Beide Volumina wurden vereinigt, kräftig gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 1 ml OptiMEM zu dem Transfektionsgemisch. Dann wurde das Kulturmedium abgesaugt, die 2 ml des Transfektionsgemisches vorsichtig aufgebracht und für 3-4 Std im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden die Flaschen vorsichtig mit 3 ml D10⁻ aufgefüllt.

4. Ergebnisteil

4.1 Beschreibung der einzelnen Teilprojekte

Zunächst werden zwei relevante Kontrollen der Arbeit beschrieben. Erstens wird die gleichmäßige Expression der HIV (Ko-)Rezeptoren in der für die vorliegende Arbeit essentiellen GXR25-T-Zelllinie gezeigt (s. 4.2). Zweitens wird an Hand von 19 ausgewählten Punktmutationen demonstriert, dass diese keinen Einfluss auf den verwendeten p24-ELISA haben (s. 4.3).

Der Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit ist die vertiefte Charakterisierung des Cyclosporin A- (CsA-) abhängigen Phänotyps, der durch die *escape* Mutation R₂₆₄K im HLA-B*27-restringierten Epitop KK10 vermittelt wird, sowie die Kompensation der defizienten Virusvariante durch zusätzliche („sekundäre“) Mutationen und deren Einfluss auf den CypA-Phänotyp. Bei der kompensatorischen Mutation, die *in vivo*, also in Patientenisolaten, nahezu stereotyp mit R₂₆₄K assoziiert ist, handelt es sich um S₁₇₃A. Mit diesem Wechsel von Serin nach Alanin an Position 173 von p24/Gag geht *in vitro* nicht nur eine dramatische Verbesserung der Replikationskompetenz von R₂₆₄K-Variante (RK-Variante) einher, sondern auch eine Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit dieser Virusvariante (s. 2.5 und ⁷). Zur Beschreibung dieses Themenkomplexes aus CypA- bzw. CsA-Abhängigkeit (s. 2.5 für Begriffsdefinition) und viraler Replikationskompetenz wurden parallel drei Fragen diskutiert:

1. In der Literatur sind vier Mutationen (T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K) beschrieben, die einen CsA-abhängigen Phänotyp vermitteln (s. 2.5 und ^{8,9,124}). Aus den verfügbaren Daten ist nicht ersichtlich, ob dem CsA-abhängigen Phänotyp dieser vier Virusvarianten ein gemeinsamer molekularer Mechanismus zu Grunde liegt, oder ob es sich um unterschiedliche Mechanismen mit einer vergleichbaren phänotypischen Manifestation handelt. Durch gezielte Generierung von Virusvarianten und deren anschließender phänotypischer Charakterisierung wurde dieser Frage nachgegangen (s. 4.4).
2. Für den hier verwendeten Versuchsaufbau zur Bestimmung der Infektiosität und des CypA-/CsA-Phänotyps der einzelnen Virusvarianten (s. 3.2.2.1) soll ermittelt werden, ob sich die vier CsA-abhängigen Varianten im Grad ihrer Abhängigkeit von CsA unterscheiden (s. 4.5). Darüber hinaus soll ausgeschlossen werden, dass die immunsuppressiven Eigenschaften von CsA einen Einfluss auf den Versuchsaufbau haben (s. 4.6).
3. Wie eingangs unter 2.5 dargelegt, ist *in vivo* ein *escape* des KK10-Epitops bei HLA-B*27-positiven HIV-Infizierten nur sehr selten ohne die *in vivo* stark assoziierte Mutation S₁₇₃A zu beobachten. In der Literatur lassen sich jedoch virale *in vivo* Sequenzen ohne eine Mutation an Position S₁₇₃ finden ^{7,120,127}. Auffällig ist, dass diese Mutationen entweder in

oder in räumlicher Nähe zur CypA-Bindeschleife (Aminosäuren: 217-225) von HIV-1 p24 liegen und/oder *in vivo* mit einer anderen *escape* Mutation, T₂₄₂N, assoziiert sind. Bei T₂₄₂N handelt es sich um die dominante *escape* Mutation des HLA-B*57-restringierten TW10 Epitops von p24⁹⁸. Da sowohl die *escape* Mutation T₂₄₂N als auch die mit ihr *in vivo* assoziierten Mutationen mit Änderungen im CypA-Phänotyp von HIV-1 einhergehen^{6,7}, legt das die Vermutung nahe, dass einzelne oder mehrere dieser Mutationen gemeinsam einen positiven Einfluss auf den durch R₂₆₄K vermittelten Defekt haben. Auch *in vitro* Langzeitkulturen der RK-Variante ohne CsA-Zugabe liefern Hinweise, dass eine Wiederherstellung durch alternative, über den N-terminalen Bereich von p24 verteilte Mutationen möglich ist. Die Frage nach möglichen Alternativen zur Kompensation der stark beeinträchtigten Virusvariante RK soll mit Hilfe dieser *in vitro* und *in vivo* Mutationen untersucht werden (s. 4.7-4.8).

Abschließend wird mit Hilfe eines computerbasierten Verfahrens eine Vorhersage getroffen, ob die Punktmutationen S₁₇₃A, R₂₆₄K und L₂₆₈M, sowie Virusvarianten, die *in vitro* vergleichbar effizient replizieren wie die *in vivo* Variante S₁₇₃A, R₂₆₄K (SARK), strukturelle Änderungen im Vergleich zu p24/NL4-3 aufweisen (s. 4.9).

4.2 Charakterisierung von Env-Interaktionspartnern auf GXR25-Zellen

Wie unter 4.1 beschrieben liegt das Augenmerk dieser Arbeit auf einem Vergleich von Virusvarianten, die sich an bestimmten Positionen in Gag von der Sequenz des als WT definierten HIV-1 Laborstamms NL4-3 unterscheiden. Diese Virusvarianten haben unterschiedliche Auswirkungen auf die virale Fitness, die hier als Infektiosität der Virusvariante gegenüber dem WT gemessen wird (relative Infektiosität). Um die Infektiosität einer Virusvariante zu bestimmen wurde ein Reporterzellsystem (GXR25, s. 3.1.11.1) verwendet, das ein GFP-Gen unter der Kontrolle eines Tat-induzierbaren Promotors besitzt. Der Vorteil einer solchen Reporterzelllinie gegenüber einem HI-Virus mit einem Reporter gen ist, dass man das Virus selbst nicht durch das Einbringen eines Transgens verändern muss. Die verwendete CD4-positive T-Zelllinie GXR25 (s. 3.1.11.1) exprimiert neben CD4 beide HIV Ko-Rezeptoren und ist somit sowohl durch X4- als auch R5-tropen Viren infizierbar. Das Gen für den CCR5-Rezeptor wurde von Brockman et al. in die parentale GXR-Zelllinie eingebracht ¹²⁵. Um die gleichmäßige Expression der drei Rezeptoren nachzuweisen wurden extrazelluläre Färbungen mit spezifischen Fluorochrom-markierten Antikörpern durchgeführt und im Durchflusszytometer nachgewiesen (Abb. 7). Die Expression von CD4 konnte im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle in der kompletten Zellpopulation demonstriert werden (Abb. 7 A und B). Der Nachweis von CXCR4 und CCR5 (Abb. 7 D und E) erfolgte mit einem polyklonalen sekundären APC-markierten α Maus FcR-Antikörper (s. 3.2.2.3). Die unspezifische Markierung der Zellen mit dem polyklonalen Antikörper wurde in Gegenwart des α Human FcR-Antikörpers bestimmt (P2 = 7%, Abb. 7 C).

Alle spezifisch gefärbten Populationen waren zu >90% positiv für das entsprechende Protein. In den nachfolgenden Infektionsexperimenten (ab 4.4) bestätigte sich darüber hinaus, dass die exprimierten Level an CD4 und CXCR4 der GXR25-Zellen für eine effiziente Infektion mit den verwendeten NL4-3 basierten Konstrukten ausreichend waren.

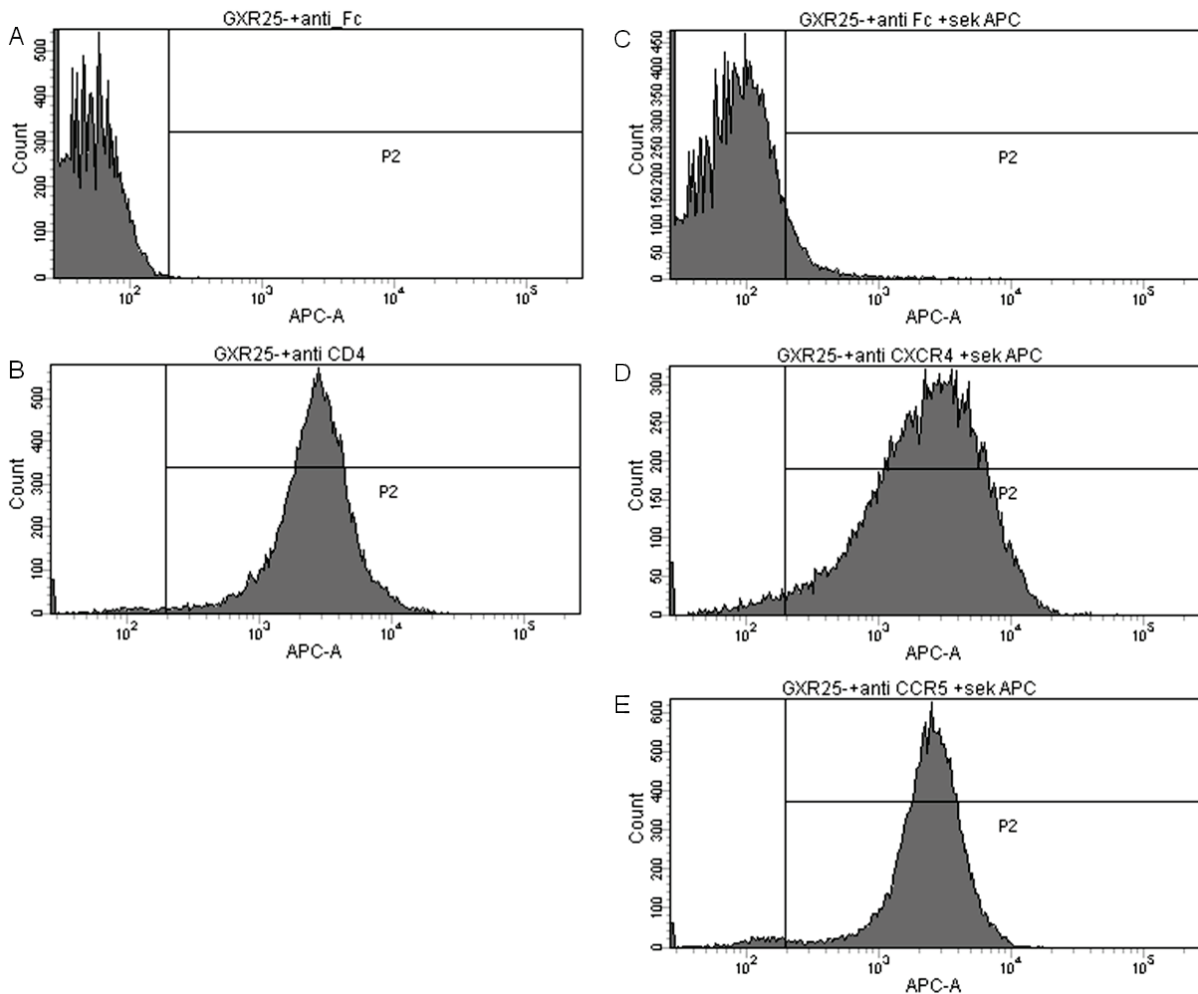


Abb. 7: Expression der HIV-1 Env-Interaktionspartner CD4, CXCR4 und CCR5 auf GXR25-Zellen.

Es wurden 1×10^6 GXR25-Zellen pro Probe eingesetzt. Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer (s. 3.1.3.9) gewaschen und anschließend 10 min bei Raumtemperatur mit $10 \mu\text{l}$ *blocking reagent* (s. 3.1.1) inkubiert. Anschließend wurden die Proben 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit einer geeigneten Menge des entsprechenden primären Antikörpers (CD4, CXCR4 oder CCR5; s. 3.1.1) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Proben mit FACS-Puffer (CD4) oder $5 \mu\text{l}$ APC-markiertem $\alpha\text{Maus FcR}$ -Antikörpern (CXCR4, CCR5) 20 min im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Proben zweimal in FACS-Puffer gewaschen und in $200 \mu\text{l}$ einer 4%-igen PBS-/ Formaldehydlösung resuspendiert. Nach einer Stunde wurden 2×10^5 Zellen im Durchflusszytometer untersucht. **A)** Negativkontrolle (ungefärbte Zellen mit *blocking reagent*). **B)** Nachweis von CD4. **C)** Negativkontrolle mit dem sekundären APC-markiertem $\alpha\text{Maus FcR}$ -Antikörper. **D)** Nachweis von CXCR4 mit dem sekundären APC-markiertem $\alpha\text{Maus FcR}$ -Antikörper. **E)** Nachweis von CCR5 mit dem sekundären APC-markiertem $\alpha\text{Maus FcR}$ -Antikörper.

4.3 Vergleich des p24-ELISAs mit einem reversen Transkriptase-(RT) Assay

Da sich die Überstandmengen, die bei der Infektion der GXR25-Zellen eingesetzt werden, aus der p24-Konzentration in den Zellkulturüberständen der HEK293T-Zellen errechnen, musste ausgeschlossen werden, dass die Bindung des monoklonalen p24-Detektor-Antikörpers des ELISAs (s. 3.2.1.3.1) durch die eingefügten Punktmutationen beeinträchtigt wird. Laut Hersteller (Perkin Elmer) wurde das genaue Epitop des Detektor-Antikörpers nie ermittelt. Eine weitere Möglichkeit zur indirekten Quantifizierung der Virusmenge ist die Messung der reversen Transkriptaseaktivität in den Zellkulturüberständen. Der anschließenden Vergleich der Messungen beider Assays folgt der Annahme, dass das Verhältnis von p24 zu reversen Transkriptase (RT) in verschiedenen Proben immer ungefähr gleich sein sollte. Abweichungen zwischen den beiden Assays sollten nur auftreten, wenn die eingebrachten Mutationen in p24 die Bindungsaffinität des Detektor-Antikörpers verändern, da die RT in allen Virusvarianten identisch ist (NL4-3 WT). Es wurden 19 verschiedene Virusvarianten ausgewählt und in einem reversen Transkriptase Assay der Firma Innovagen getestet (s. 3.2.1.3.2). Wie beim p24-ELISA wurden die Zellkulturüberstände der HEK293T-Zellen nach einmaligem Einfrieren vermessen. In Abb. 8 ist das Verhältnis der p24-Konzentration (ng/ml) und der RT-Konzentration (ng/ml) für die 19 Virusvarianten angegeben. Lediglich drei der 19 Datenpunkte liegen deutlich außerhalb der Standardabweichung (L_{184I}, A_{237E} on R_{264K} und T_{239I} on R_{264K}). Nimmt man eine Normalverteilung der Messwerte an, dann liegen 13 Messwerte (= 65%) im einfachen Intervall der Standardabweichung um den Mittelwert und 18 (= 95%) im zweifachen Intervall. Die beobachtete Verteilung entspricht dieser Erwartung. Für eine Abweichung der Messwerte über dem Mittelwert und jenseits einer Normalverteilung gibt es theoretisch zwei Möglichkeiten: Zum einen könnte der p24-Antikörper des ELISAs besser an die Kapsidvariante binden als an das Wildtyp-Kapsid. Eine derartige *gain of function* Mutation ist jedoch selten. Die zweite Möglichkeit, nämlich dass die RT-Aktivität der Varianten geringer ist als beim Wildtyp, kann wegen der unveränderten Identität der RT bei allen untersuchten Varianten eigentlich ausgeschlossen werden. Zudem liegen andere Varianten mit den Mutationen L_{184I}, A_{237E}, T_{239I} oder R_{264K} nicht außerhalb des einfachen Intervalls der Standardabweichung. Auch die empirischen Ergebnisse aus den durchgeführten ELISAs liefern für keine der in dieser Arbeit verwendeten Varianten eine reproduzierbar erhöhte bzw. reduzierte p24-Menge im Vergleich zu anderen Proben. Zusammengenommen erscheint das Abweichen der drei Proben ein zufälliger Effekt zu sein und nicht durch die jeweiligen Punktmutationen verursacht zu sein. Folglich gibt es keinen Hinweis auf einen Einfluss der Punktmutationen auf die Bindungsaffinität des p24-Detektorantikörpers des ELISAs.

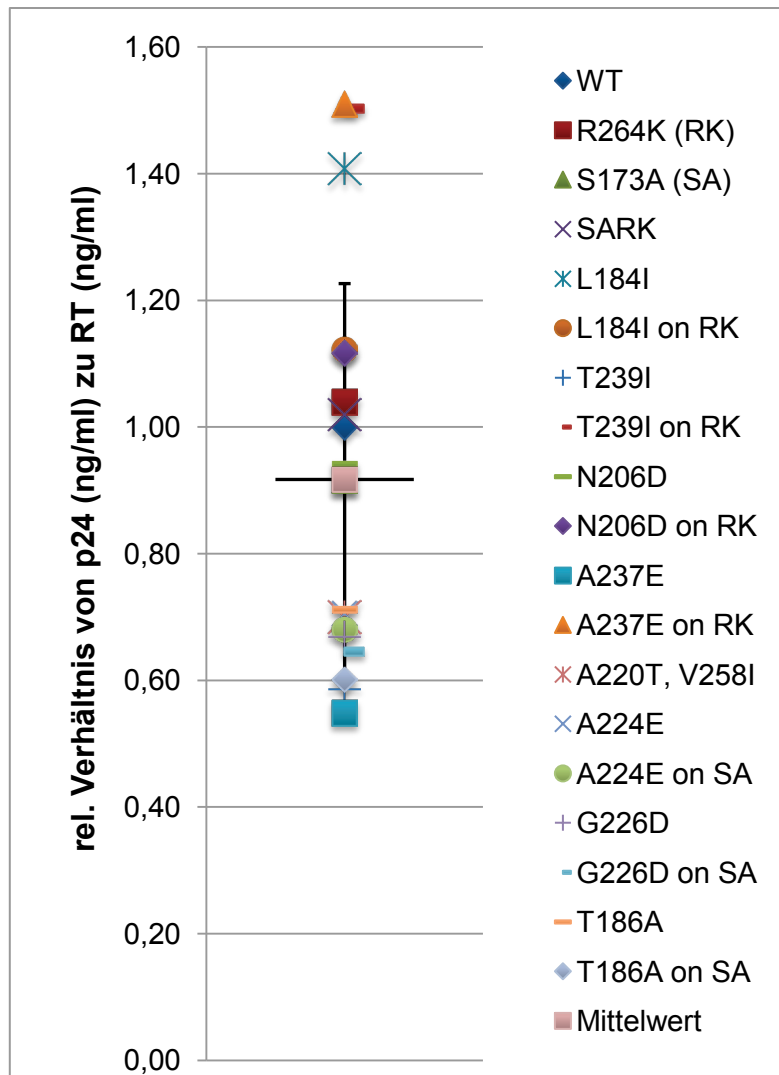


Abb. 8: Verhältnis aus der p24-ELISA Messwerte und der Messwerte der jeweiligen reversen Transkriptaseaktivität.

Die Bestimmung der p24-Konzentration und der Aktivität der reversen Transkriptase (RT) in Zellkulturüberständen von transfizierten HEK293T-Zellen erfolgte nach Protokoll (s. 3.2.1.3.1 bzw. 3.2.1.3.2). Anschließend wurde für jede Probe der Quotient aus der p24-Konzentration (ng/ml) der RT-Konzentration (ng/ml) gebildet. Diese Verhältnisse wurden auf den WT normiert. Desweiteren wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der 19 Datenpunkte bestimmt. Der Mittelwert der Verhältnisse liegt bei 0,92 (horizontaler schwarzer Balken). Um auf eine Normalverteilung der berechneten Verhältnisse zu testen wurde die Standardabweichung aller Datenpunkte mit Excel bestimmt (vertikalen schwarzen Balken).

4.4 Phänotypische Analyse von CsA-abhängigen Virusvarianten

Neben der bei HLA-B*27-positiven Patienten beobachteten (= *in vivo*) Mutation R₂₆₄K in p24/Gag sind mit T₁₈₆A, A₂₂₄E und G₂₂₆D noch drei weitere *in vitro* p24/Gag Mutationen beschrieben, die ebenfalls in CypA-exprimierenden Zelllinien eine CsA-abhängige Virusreplikation vermitteln^{8,9,124}. Wie unter 4.1 angeführt wird nachfolgend die Frage adressiert, ob sich Belege für einen gemeinsamen grundlegenden molekularen Mechanismus für die Abhängigkeit dieser vier unterschiedlichen Varianten von CsA (CsA-abhängiger Phänotyp) finden lassen.

4.4.1 Wiederherstellung CsA-abhängiger Virusvarianten durch die *in vivo* Mutation S₁₇₃A

Die Mutation S₁₇₃A ist bei HLA-B*27-positiven HIV-1 positiven Individuen stark mit der dominanten *escape* Mutation R₂₆₄K des KK10-Epitops assoziiert⁷. In derselben Arbeit wird auch eine deutliche Verbesserung der Replikationskompetenz der Doppelmutante S₁₇₃A und R₂₆₄K (SARK) gegenüber der Einzelmutation R₂₆₄K gezeigt. Gleiches gilt für die Tripelmutante SARKLM, die neben S₁₇₃A, R₂₆₄K noch die Mutation L₂₆₈M trägt. L₂₆₈M (LM) spielt zwar für den permanenten *escape* des KK10 Epitops keine tragende Rolle, ist aber *in vivo* meist die erste KK10-assoziierte Mutation, da sie (zumindest *in vitro*) kaum negative Auswirkungen auf das Virus hat, jedoch *in vitro* mit einem reduzierten CTL-Selektionsdruck einhergehen kann^{7,80}. Um Hinweise auf den molekularen Mechanismus der CsA-Abhängigkeit in den vier bekannten Virusvarianten T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K zu erhalten, wurde jede von ihnen gemeinsam mit der Mutation S₁₇₃A (SA) generiert (SA on R₂₆₄K (SARK), SA on T₁₈₆A, SA on A₂₂₄E und SA on G₂₂₆D). Anschließend wurden eine Million GXR25-Zellen mit 250 ng p24 WT oder einer der Virusvarianten infiziert und nach 48 Std im Durchflusszytometer auf die Expression des Reportergens GFP hin untersucht.

In Abb. 9 ist gezeigt, dass im Vergleich zu NL4-3 (WT) die Varianten T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K eine signifikant reduzierte Infektiosität aufweisen (Abb. 9, schwarze Balken). Es zeigte sich, dass die wiederherstellende Wirkung der Mutation S₁₇₃A (s. 2.4.3.1) in Gegenwart von CypA nicht auf die Variante SARK beschränkt ist, sondern sie kann auch für die drei *in vitro* Varianten SA on T₁₈₆A, SA on A₂₂₄E und SA on G₂₂₆D (Abb. 9, schwarze Balken) demonstriert werden. Die Variante SA on G₂₂₆D infiziert sogar sogar ebenso effizient wie der WT. Eine Behandlung der Zellen mit 0,5 µM CsA bewirkt beim WT einen Rückgang der Infektiosität um ca. 50 % (CypA-abhängiger Phänotyp), wohingegen die Infektiosität bei drei Varianten (R₂₆₄K, T₁₈₆A und G₂₂₆D) zunimmt (Abb. 9, weiße Balken), und somit als CsA-abhängig zu bezeichnen sind. Allerdings erreichen sie nicht das Niveau der mit der SA-Mutation kombinierten Varianten in Gegenwart von CypA (Abb. 9, schwarze Balken). Im Gegensatz dazu zeigt die vierte Variante, A₂₂₄E, keine starke CsA-Abhängigkeit. Hier kommt

es in Gegenwart von 0,5 μM CsA zu keiner signifikanten Zunahme der Infektiosität (Abb. 9, weißer Balken). Dennoch ist bei SA on $A_{224}\text{E}$, genauso wie bei den übrigen Doppelmutanten, eine deutliche Abnahme der Infektiosität in Gegenwart von CsA zu beobachten (Abb. 9, weiße Balken).

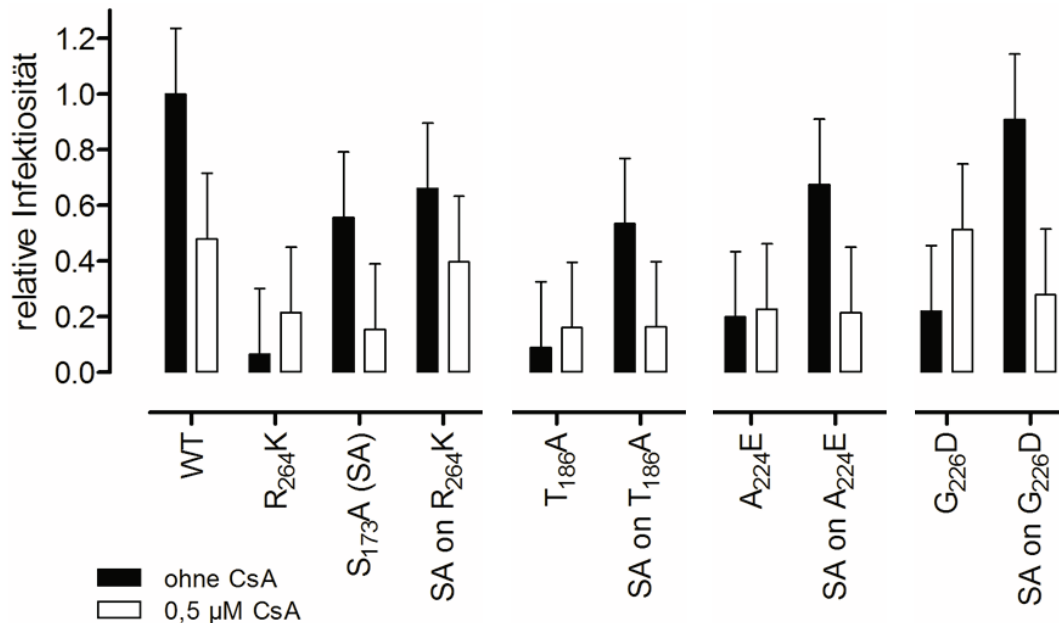


Abb. 9: S₁₇₃A wirkt als universale kompensierende Mutation für alle CsA-abhängigen Virusvarianten, indem sie die Replikationskapazität in Abwesenheit von CsA wiederherstellt.

GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 μM CsA (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Infektionsraten wurden auf die Messwerte des WT in Abwesenheit von CsA normalisiert. Die eingesetzten Viren wurden in mindestens zwei voneinander unabhängigen Transfektionen von HEK293T-Zellen generiert. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde eine univariate Varianzanalyse mittels SPSS (IBM) durchgeführt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert aus mindestens drei Experimenten mit einem Konfidenzintervall von 95%. Unterschiede zwischen zwei Virusvarianten gelten immer dann als signifikant, wenn die entsprechenden Konfidenzintervalle nicht überlappen.

4.4.2 Phänotypische Analyse der KK10-assoziierten Mutationen im Kontext eines *clade B* Gag-Konsensusvirus

Ein ausgewählter Laborstamm kann von einem *in vivo* Isolat erheblich abweichen, was die Aussagekraft von beobachteten Effekten, die z.B. durch Punktmutationen vermittelt werden, erheblich einschränkt. Um diesem Nachteil entgegenzuwirken wurde von Herrn Sven Breitschwerdt im Rahmen seiner medizinischen Dissertation, die vom Autor mit betreut wurde, ein HIV-1 Stamm mit einer *clade B* Konsensussequenz für die beiden Polyproteine Gag und Pol generiert. Als Grundlage für dieses Konsensusvirus diente das Sequenzenkompendium der *Los Alamos National Laboratory* (LANL)-Datenbank aus dem Jahr 2008 mit allen darin aufgeführten HIV-1 *clade B* Viren¹²⁸. Die so generierte Sequenz

weist für Gag 13 und für Pol 12 Sequenzunterschiede zu NL4-3 auf. Diese sind in Appendix 1 und 2 aufgelistet. Anhand dieser Daten wurde NL4-3 mittels *site-directed mutagenesis* in ein Virus mit Konsensussequenz (Konsensusvirus) umstrukturiert. Die *in vitro* gut charakterisierten *escape* Mutationen des HLA-B*27-restringierten KK10-Epitops (s. 2.4.3.1 und ⁷) bieten einerseits eine gute Möglichkeit die Eigenschaften des Konsensusvirus zu testen und gleichzeitig die Phänotypen der einzelnen Varianten in einem Virus zu bestätigen, das tendenziell mit anderen Isolaten näher verwandt ist NL4-3. Aus diesem Grund soll dieses Konsensusvirus an dieser Stelle als zusätzliche Kontrolle vorgestellt werden.

In einem ersten Schritt wurde die Infektiosität der Konsensusviren (Konsensus-Gag, Konsensus-Pol und Konsensus-Gag/Pol) jeweils in Gegenwart und Abwesenheit von CsA im Vergleich zu NL4-3 untersucht. Dabei zeigt sich, dass die Konsensusvarianten in Abwesenheit von CsA gegenüber NL4-3 eine um 40-50% verminderte Infektiosität aufweisen (Abb. 10 A, schwarze Balken). Die Zugabe von 0,5 μ M CsA führte, wie bei NL4-3, zu einer weiteren Verringerung der Infektiosität. Die eingebrachten Punktmutationen in Gag und/oder Pol haben folglich keinen Einfluss auf die CypA-Abhängigkeit von HIV-1 (Abb. 10 A, weiße Balken). Betrachtet man die relative Infektiosität der Konsensus-Gag-KK10-Varianten (Abb. 10 B, schwarze Balken), zeigen einige Varianten in Abwesenheit von CsA relativ zu Konsensus Gag eine tendenziell erhöhte Infektiosität, aber die Unterschiede erreichen kein signifikantes Niveau. Dieser Trend weicht von dem ab was von Schneidewind et al. beschrieben wurde und auch in dieser Arbeit mit den auf NL4-3 basierenden Konstrukten gezeigt wird (z.B.: Abb. 9 unter 4.4.1 und ⁷). Die stark erhöhte Infektiosität der Konsensus SA-Variante gegenüber dem Wildtyp Gag-Konsensusvirus (Abb. 10 B, schwarzer Balken) ist im Vergleich zu der NL4-3 SA-Variante gegenüber dem NL4-3 Wildtyp (Abb. 9 unter 4.4.1) jedoch sehr auffällig. Eine Aussage ob dieser Unterschied signifikant ist, kann allerdings an dieser Stelle nicht getroffen werden. Abgesehen von diesen Abweichungen ist jedoch nicht nur die beschriebene Kompensation durch die Mutation S₁₇₃A für den R₂₆₄K vermittelten Defekt nachweisbar, sondern auch die Wiederherstellung des CypA-abhängigen Phänotyps (s. 2.5 für Begriffsdefinition) (Abb. 10 B, schwarze und weiße Balken).

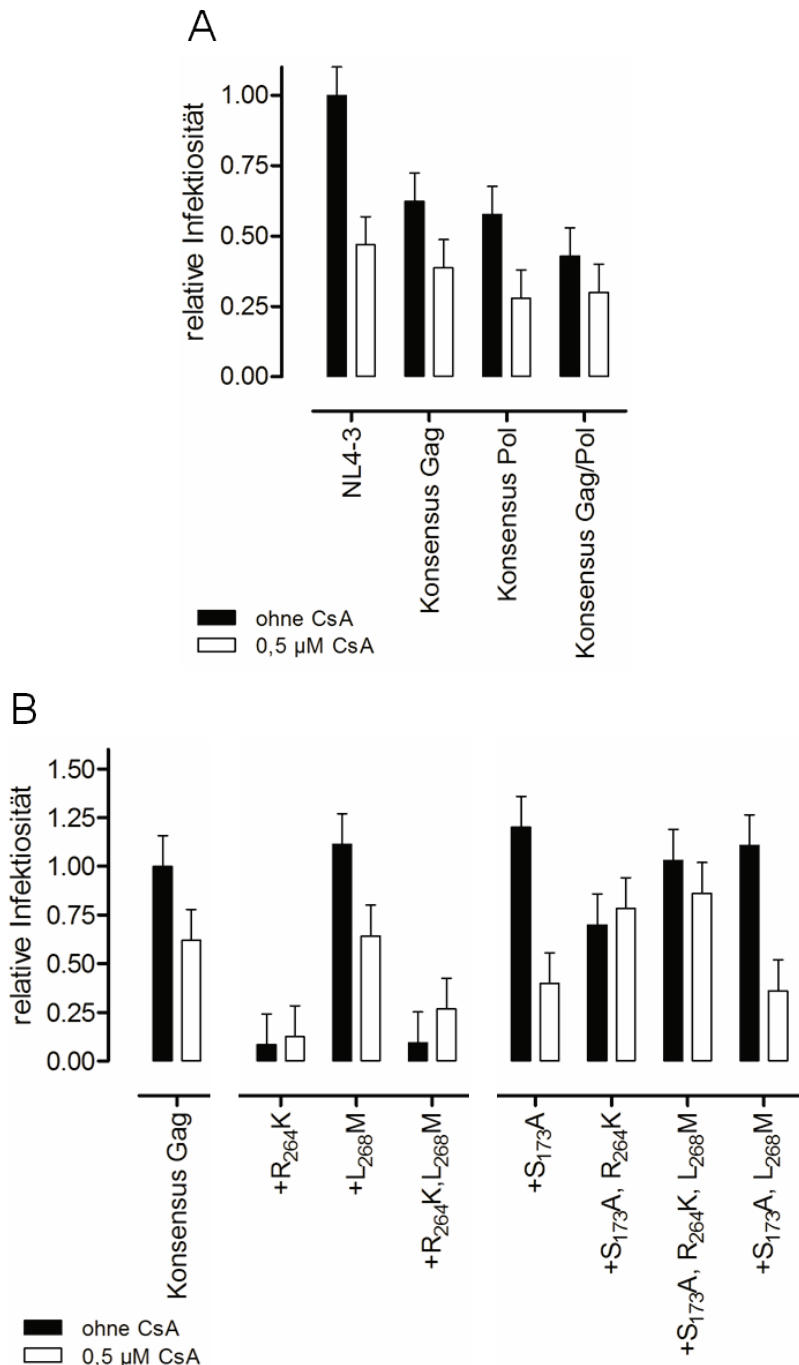


Abb. 10: Relative Infektiosität des Gag-Konsensusvirus ohne und mit den KK10-assoziierten Mutationen

A) Gezeigt ist die relative Infektiosität der Konsensus-Gag, Konsensus-Pol und Konsensus-Gag/Pol Viren im Vergleich zum WT NL4-3. **B)** Test des Konsensus-Gag-Virus mit dem kompletten Set der KK10-assoziierten Mutationen: S₁₇₃A, R₂₆₄K und L₂₆₈M. Die GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der verschiedenen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 µM CsA (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Durchführung analog zu Abb. 9.

4.4.3 Wiederherstellung CsA-abhängiger Virusvarianten durch die *in vitro* Mutationen V₂₁₈A und A₂₃₇T

Für die *in vivo* CsA-abhängige Virusvariante RK wurden von Aberham et al. zwei *in vitro* assoziierte Mutationen beschrieben, V₂₁₈A und A₂₃₇T. Beide Mutationen vermitteln eine Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit und eine Zunahme der Infektiosität in Abwesenheit von S₁₇₃A¹²⁴. In derselben Arbeit wurden auch die beiden *in vitro* CsA-abhängigen Virusvarianten A₂₂₄E und G₂₂₆D erstmals beschrieben. Die Positionen 224 und 226 flankieren das letzte der drei Proline in der CypA-Bindestelle von p24¹²⁴. Unter 4.4.1 wird beschrieben, dass in Kombination mit der Mutation S₁₇₃A die CypA-Abhängigkeit bei allen vier als CsA-abhängig beschriebenen Varianten wiederhergestellt werden kann und es ebenfalls zu einer Zunahme der Infektiosität kommt. Um weitere Hinweise auf den molekularen Mechanismus der CsA-Abhängigkeit zu bekommen wurden die unter 4.4.1 beschriebenen vier Varianten sowohl einzeln als auch in Kombination mit den beiden potenziell kompensierenden Mutationen V₂₁₈A und A₂₃₇T - an Stelle von S₁₇₃A - generiert.

Alle kombinierten Varianten zeigen eine deutliche Zunahme der Infektiosität gegenüber der nicht kompensierten Variante RK (Abb. 11, schwarze Balken), die im Falle von A₂₃₇T signifikant ist. Allerdings kommt es zu keinem additiven oder synergistischen Effekt, wenn die beiden Mutationen V₂₁₈A und A₂₃₇T mit R₂₆₄K kombiniert werden (Abb. 11, schwarze Balken). Bis auf die Variante V₂₁₈A on RK zeigen alle mit V₂₁₈A und/oder A₂₃₇T kombinierten Varianten einen CypA-abhängigen Phänotyp. Bei der Variante V₂₁₈A on RK ist allerdings auch keine Zunahme der Infektiosität in Gegenwart von CsA zu beobachten (Abb. 11, weiße Balken), so dass man sie als CypA-unabhängig bezeichnen kann. Auffällig ist allerdings, dass die Tripelmutante V₂₁₈A, A₂₃₇T on RK eine deutlich ausgeprägtere CypA-Abhängigkeit aufweist als die beiden Varianten, die nur mit einer Mutation (V₂₁₈A oder A₂₃₇T) kombiniert wurden. Die jeweiligen Varianten mit R₂₆₄K und L₂₆₈M (RKLM) weisen dieselben Eigenschaften auf wie die Varianten ohne LM (Abb. 11, schwarze und weiße Balken).

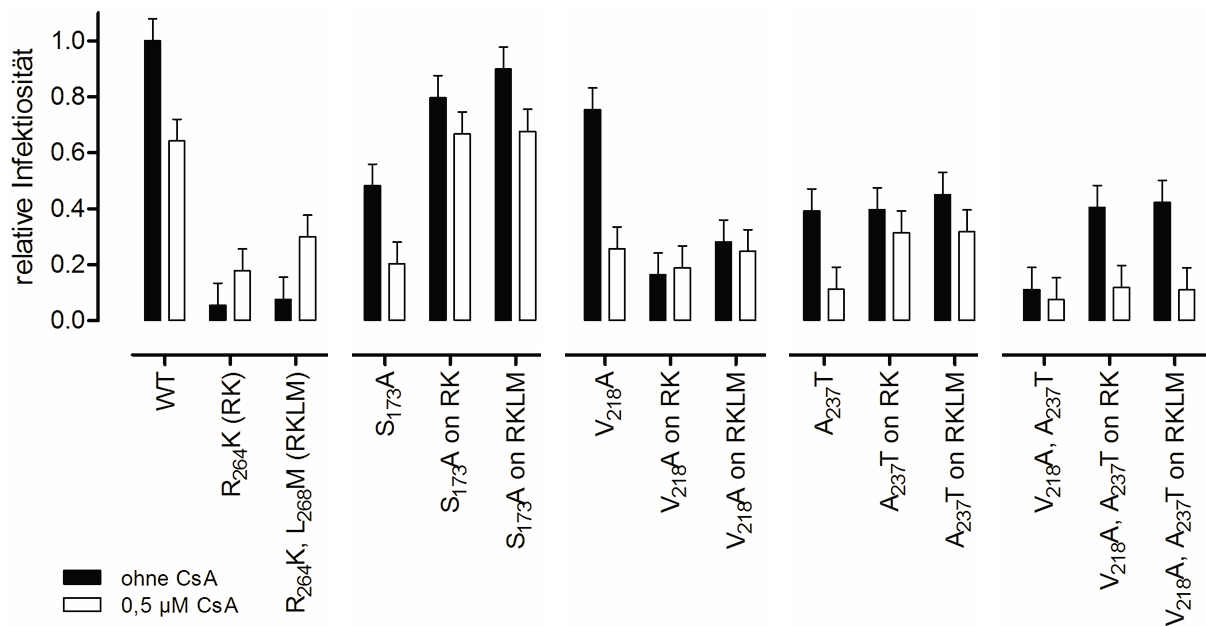


Abb. 11: Die Mutationen V₂₁₈A und A₂₃₇T verbessern die Infektiosität und stellen die CypA-Abhängigkeit der CsA-abhängigen Variante R₂₆₄K wieder her.

Die Mutationen V₂₁₈A und A₂₃₇T bewirken in allen Kombinationen mit R₂₆₄K einen kompensatorischen Effekt (schwarze Balken), der in der Regel auch mit einer Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit einhergeht (weiße Balken). GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 µM CsA (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion an Hand von Durchflusszytometrie bestimmt. Durchführung analog zu Abb. 9.

Kombiniert man die drei *in vitro* Varianten (T₁₈₆A, A₂₂₄E und G₂₂₆D) mit V₂₁₈A und/oder A₂₃₇T, erhält man ähnliche Ergebnisse wie für die *in vivo* Variante RK. Es kommt bei fast allen Doppel- bzw. Tripelmutanten relativ zu der jeweiligen nicht kompensierten Variante zu einer teils deutlichen erhöhten Infektiosität (Abb. 12, schwarze Balken) und darüber hinaus zu einer erneuten CypA-Abhängigkeit (Abb. 12, weiße Balken). Die einzige Ausnahme hierzu ist die Variante A₂₂₄E on V₂₁₈A, die ähnlich wie die Varianten A₂₂₄E (Abb. 9 und 12, weiße Balken) und V₂₁₈A on RK (Abb. 11, weißer Balken), keine Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit aufweist und sogar tendenziell weniger infektiös zu sein scheint als die Variante A₂₂₄E. Wie in Abb. 11 wird die deutlichste Zunahme der Infektiosität auch bei den drei *in vitro* Varianten durch die Mutation A₂₃₇T erzielt. Im Fall von A₂₂₄E vermittelt A₂₃₇T alleine aber auch zusammen mit V₂₁₈A eine Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit (Abb. 12, schwarze Balken) der ansonsten CypA-/CsA-unabhängig wirkenden Variante A₂₂₄E. Im Unterschied zu Abb. 11 sind die Tripelmutanten der *in vitro* Varianten allerdings deutlich weniger infektiös als die jeweilige A₂₃₇T-Variante (Abb. 12, schwarze Balken). Die ausgeprägtere CypA-Abhängigkeit der R₂₆₄K-Tripelmutante (Abb. 11, weiße Balken) ist nur bei einer der *in vitro* Tripelmutanten (V₂₁₈A, A₂₃₇T on G₂₂₆D) nachweisbar (Abb. 12, weiße Balken).

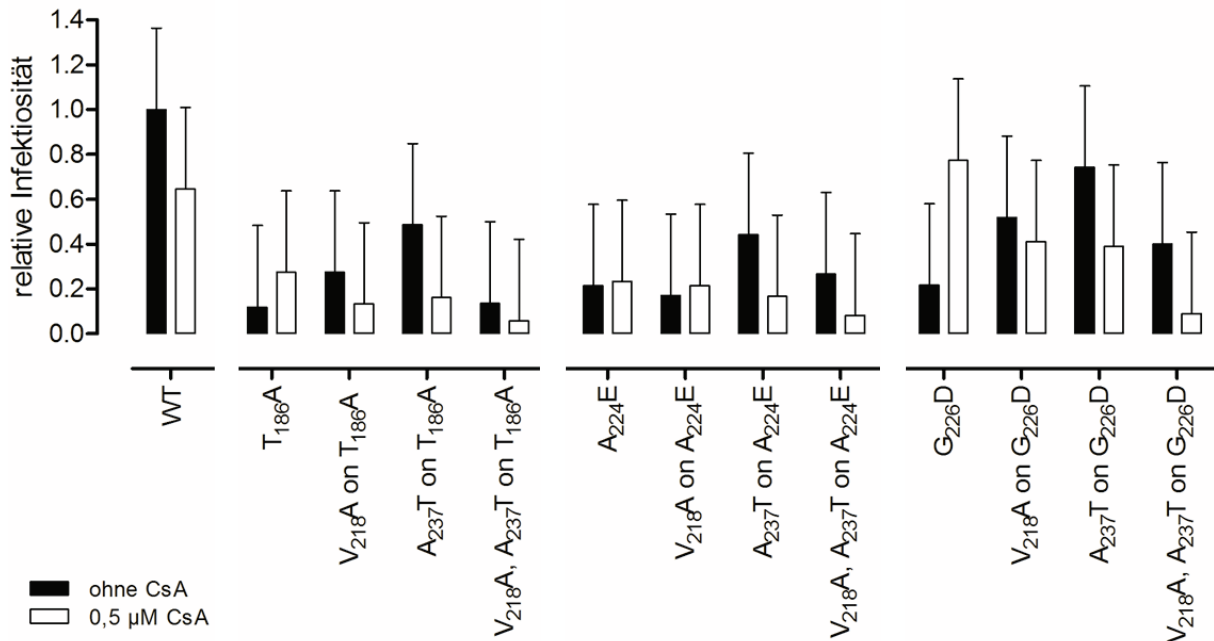


Abb. 12: Die Mutationen V₂₁₈A und A₂₃₇T verbessern die Infektiosität und stellen die CypA-Abhängigkeit der *in vitro* CsA-abhängigen Virusvarianten T₁₈₆A und G₂₂₆D wieder her.

Die kombinierten Varianten weisen im Vergleich zu den Defektvarianten (T₁₈₆A, A₂₂₄E und G₂₂₆D) eine erhöhte relative Infektiosität auf (schwarze Balken). Wie in Abb. 10 bei RK-Variante wird die deutlichste Zunahme der Infektiosität gegenüber den nicht kompensierten *in vitro* Varianten durch die Mutation A₂₃₇T erzielt. GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 µM CsA (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion an Hand von Durchflusszytometrie bestimmt. Durchführung analog zu Abb. 9.

Die in den Abbildungen 11 und 12 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl die *in vivo* relevante Mutation S₁₇₃A, als auch die *in vitro* Mutationen V₂₁₈A und A₂₃₇T bei allen vier Varianten (T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K) zu einer Zunahme der Infektiosität führen und in der Regel zugleich den CypA-abhängigen Phänotyp wiederherstellen. Additive oder synergistische Auswirkungen von V₂₁₈A und A₂₃₇T lassen sich in Bezug auf die Infektiosität nicht beobachten. Bei den drei *in vitro* Varianten ist im Gegenteil sogar eine Reduktion der Infektiosität zu beobachten. Allerdings scheinen die Tripelmutanten V₂₁₈A, A₂₃₇T on G₂₂₆D bzw. R₂₆₄K eine stärkere CypA-Abhängigkeit aufzuweisen, als die entsprechenden Doppelmutanten mit nur einer der beiden kompensatorisch wirkenden Mutationen.

4.5 Cyclosporin A (CsA) Titration CsA-abhängiger Virusvarianten

Unter 4.4 wurden starke Indizien für jeweils vergleichbare molekulare Mechanismen des CsA-abhängigen Phänotyps, vermittelt durch die drei Mutationen R₂₆₄K, T₁₈₆A und G₂₂₆D, aufgezeigt. Auch wenn die CsA-Abhängigkeit für die Mutation A₂₂₄E in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden kann, so ist der durch A₂₂₄E vermittelte Defekt doch ebenfalls mit der Mutation S₁₇₃A kompensierbar. Aus diesem Grund und auch weil in der Literatur ein vergleichbarer Phänotyp gezeigt wurde, wird die entsprechende Variante ebenfalls weiter untersucht. Zur Ermittlung des CypA- bzw. CsA-Phänotyps wurden die Proben bisher mit 0,5 µM CsA behandelt. Um den jeweiligen Einfluss von CypA besser charakterisieren zu können, erfolgte eine CsA-Titration der verschiedenen Varianten. Da die Mutation S₁₇₃A, wie unter den Abbildungen 9, 11 und 12 gezeigt, bei allen vier Varianten die effektivste Kompensation vermittelt, wurde neben den CsA-abhängigen Varianten auch die jeweils mit S₁₇₃A kompensierte Variante untersucht.

Die Titration der betrachteten Virusvarianten wurde mit CsA-Konzentrationen zwischen 0 und 1 µM durchgeführt. Hierbei nimmt die Infektiosität von NL4-3 (WT) mit steigender CsA-Konzentration erwartungsgemäß ab (Abb. 13 A, schwarze Balken), da das WT-Virus CypA-abhängig ist. Das gleiche gilt für die Variante mit S₁₇₃A (Abb. 13 A, graue Balken). Bei den nachfolgenden Graphen werden die durch S₁₇₃A kompensierten Varianten (Abb. 13 B-E, schwarze Balken) jeweils im Vergleich zu ihren Einzel-Mutation-Varianten aufgetragen (Abb. 13 B-E, graue Balken). Die mit S₁₇₃A kombinierten Virusvarianten zeigen wie der WT bei steigender CsA-Konzentration eine Verringerung ihrer Infektiosität relativ zu nicht-CsA-behandelten Zellen (schwarze Balken, 0 µM CsA). Allerdings reagiert die *in vivo* Variante SARK weniger empfindlich auf steigende CsA-Konzentrationen als die *in vitro* Varianten (Abb. 13 B, C und E, schwarze Balken), mit Ausnahme der Variante SA on A₂₂₄E (Abb. 13 D, graue Balken). Vergleicht man die Abbildungen 13 B, C und E miteinander, so fällt auf, dass die *in vivo* Variante R₂₆₄K im Gegensatz zu den beiden *in vitro* Varianten T₁₈₆A und G₂₂₄D einen verschobenen Verlauf der Infektiosität als Funktion der steigenden CsA-Konzentration aufweist. Die Infektiosität der Variante R₂₆₄K steigt bei niedrigen CsA-Konzentrationen erst kontinuierlich bis zu ihrem Maximum bei ca. 0,65 µM CsA an und sinkt dann wieder kontinuierlich. Bei 0,65 µM CsA ist die Infektiosität gegenüber 0 µM CsA etwa um den Faktor 2,8 erhöht (Abb. 13 B, graue Balken). Die Varianten T₁₈₆A und G₂₂₄D zeigen keinen solchen glockenartigen Verlauf. Hier erreicht die CsA-abhängige Steigerung der Infektiosität mit dem Faktor 2,5 (G₂₂₆D) bzw. 1,8 (T₁₈₆A) schon bei 0,15 µM CsA ein Plateau, um das herum nur geringfügige Abweichungen bei steigender CsA Konzentration gemessen werden können. Allerdings kommt es ab 0,65 (G₂₂₆D) bzw. 0,85 µM CsA (T₁₈₆A) analog zur RK-Variante zu einem Rückgang der Infektiosität relativ zu den Proben mit den nicht CsA behandelten Zellen (Abb. 13 C und E, graue Balken). Folglich gibt es keine optimale CsA-Konzentration, bei der

die Infektiosität der drei CsA-abhängigen Varianten ihr Maximum erreicht. Die verwendete CsA-Konzentration von 0,5 μ M ermöglicht jedoch einen guten Nachweis der CsA-Abhängigkeit bei allen drei Varianten. Wie bereits in 4.4.1 (Abb. 9) gezeigt, vermittelt die Mutation A₂₂₄E unter den in dieser Arbeit angewendeten Bedingungen keinen CsA-abhängigen Phänotyp. Relativ zum Messwert bei 0 μ M CsA sinkt die Infektiosität mit steigender CsA-Konzentration und erreicht bei 0,35 μ M CsA ein Plateau, das bei etwa 65% des Wertes in Abwesenheit von CsA liegt (Abb. 13 D, graue Balken). Zusätzlich wurden noch zwei Virusvarianten mit HLA-B*57-assoziierten Mutationen analysiert (T₂₄₂N und QVINA bestehend aus den Mutationen H₂₁₉Q, I₂₂₃V, M₂₂₈L, T₂₄₂N, G₂₄₈A). Die Variante T₂₄₂N gilt im Vergleich zur WT-Sequenz als CypA-abhängiger (CypA-sensitiv). Die Variante QVINA gilt dagegen als CypA-/CsA-unabhängig⁶. Bei steigender CsA-Konzentration erweist sich die Variante T₂₄₂N jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht empfindlicher gegenüber sinkenden CypA-Niveaus als der WT (Abb. 13 F, graue Balken). Der CypA-/CsA-unabhängige Phänotyp der Variante QVINA kann jedoch bestätigt werden, auch wenn sich die relative Infektiosität mit steigender CsA-Konzentration leicht verringert (Abb. 13 G, graue Balken).

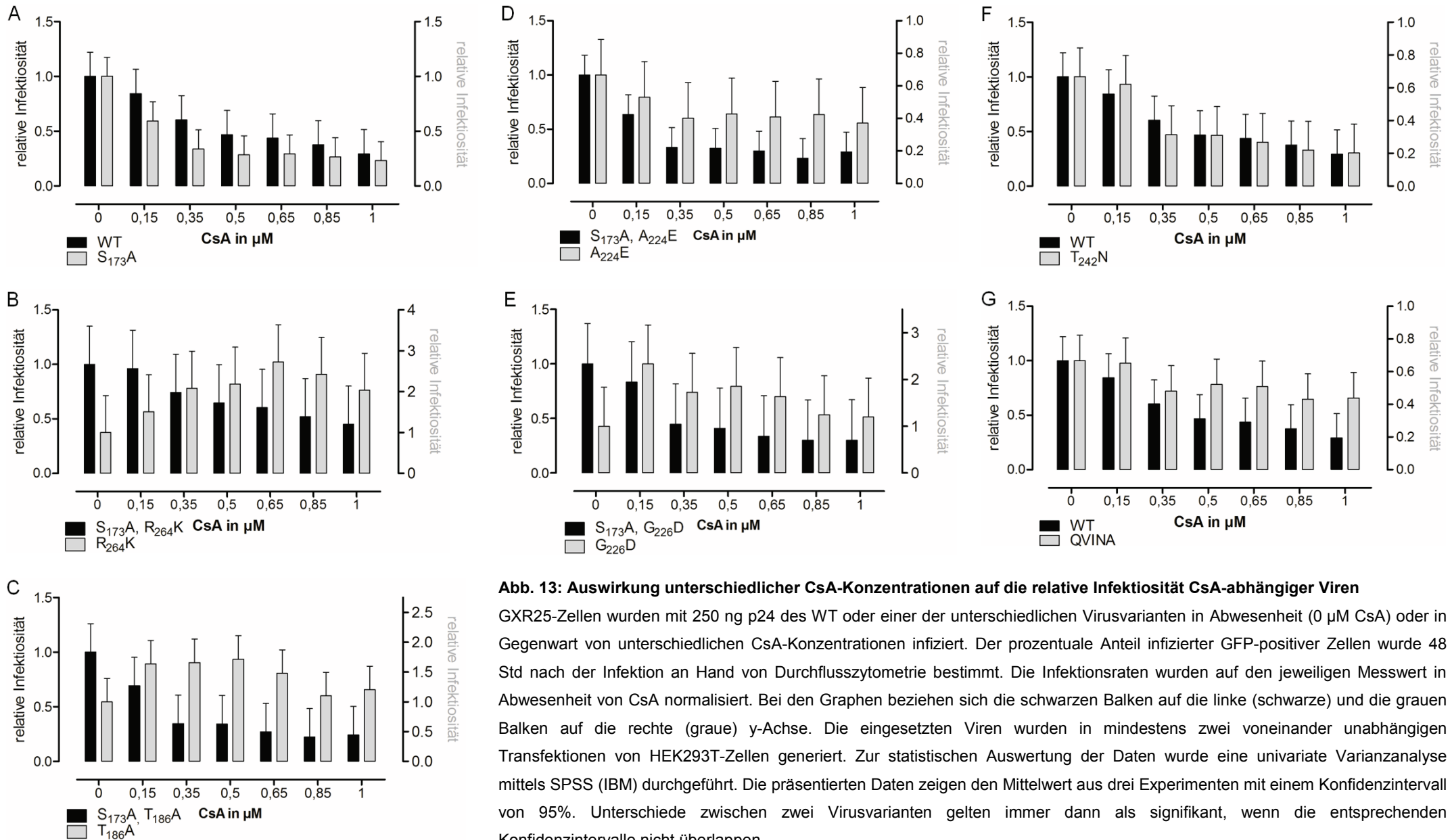


Abb. 13: Auswirkung unterschiedlicher CsA-Konzentrationen auf die relative Infektiosität CsA-abhängiger Viren

GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (0 μM CsA) oder in Gegenwart von unterschiedlichen CsA-Konzentrationen infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std nach der Infektion an Hand von Durchflusszytometrie bestimmt. Die Infektionsraten wurden auf den jeweiligen Messwert in Abwesenheit von CsA normalisiert. Bei den Graphen beziehen sich die schwarzen Balken auf die linke (schwarze) und die grauen Balken auf die rechte (graue) y-Achse. Die eingesetzten Viren wurden in mindestens zwei voneinander unabhängigen Transfektionen von HEK293T-Zellen generiert. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde eine univariate Varianzanalyse mittels SPSS (IBM) durchgeführt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert aus drei Experimenten mit einem Konfidenzintervall von 95%. Unterschiede zwischen zwei Virusvarianten gelten immer dann als signifikant, wenn die entsprechenden Konfidenzintervalle nicht überlappen.

4.6 Einfluss der immunsuppressiven Eigenschaft von CsA auf eine Infektion von GXR25-Zellen mit CsA-abhängigen Virusvarianten

In den bisher durchgeführten Experimenten wurde CsA zum Nachweis eines gegenüber dem Wildtyp NL4-3 veränderten CypA-Phänotyps verwendet, bei dem CypA einen „toxischen“ Effekt vermittelt (CsA-abhängiger Phänotyp). Bei der Verwendung von CsA ist jedoch zu beachten, dass CsA auch einen immunsuppressiven Effekt auf T-Zellen vermittelt^{129,130}. Dies könnte möglicherweise Auswirkungen auf den Infektionsverlauf in den eingesetzten GXR25-T-Zellen haben. CsA verhindert die Aktivierung von T-Zellen, indem es die Expression immunstimulatorischer Gene unterdrückt. Eine relativ einfache Möglichkeit den Einfluss der immunsuppressiven Eigenschaften von CsA von den hier beschriebenen Effekten auf die Infektiosität der Virusvarianten abzugrenzen, bietet die Verwendung eines alternativen Immunsuppressivums wie FK-506. Bei FK-506 handelt es sich um ein Stoffwechselprodukt des Gram-positiven Bakteriums *Streptomyces tsukubaensis*. Bei beiden Verbindungen (CsA und FK-506) handelt es sich um Calcineurinhemmer¹³¹. Calcineurin ist eine Serin-Threonin-Phosphatase, die den Transkriptionsfaktor NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*) aktiviert, was wiederum zu einer Aktivierung der T-Zelle führt¹³¹⁻¹³³. Allerdings unterscheidet sich der Hemmungsmechanismus von FK-506 und CsA. CsA bindet an CypA und der Komplex aus CsA und CypA lagert sich an Calcineurin an und verhindert die Aktivierung von NF-AT^{131,134}. FK-506 dagegen bindet an das Protein FKBP12 (*FK-506 binding protein 12*) nicht aber an CypA^{131,134,135}. Der Komplex aus FK-506 und FKBP12 lagert sich jedoch an der gleichen Region von Calcineurin an wie der CypA/CsA-Komplex und inhibiert die Aktivierung von NF-AT^{131,134}. Somit vermittelt FK-506 eine Immunsuppression durch die gleiche Signalkaskade wie CsA. Ferner können durch den Einsatz von FK-506 auch mögliche Auswirkungen durch die CypA-unabhängige immunsuppressive Wirkung von CsA bzw. FK-506 durch eine Inhibierung der c-Jun N-terminalen Kinase- (JNK) und p38-Signalkaskaden ermittelt werden¹³⁶. Wenn eine Immunsuppression über Calcineurin oder über JNK und p38 einen Einfluss auf die Infektion der GXR25-Zellen mit den verwendeten HIV-Varianten hat, so sollte dieser Effekt auch bei Verwendung von FK-506 auftreten. In der nachfolgenden Untersuchung wurden 0,5 µM FK-506 statt CsA verwendet. Da FK-506 etwa um den Faktor 100 wirksamer ist als CsA^{137,138}, sollten sich die potenziellen Auswirkungen einer Immunsuppression also deutlich zeigen. Da FK-506 nicht nur effizienter, sondern auch weniger cytotoxisch ist als CsA¹³⁹, sind durch die verwendete Menge FK-506 keine cytotoxischen Auswirkungen zu erwarten.

Um auch hier gegebenenfalls Unterschiede zu ermitteln, wurden alle CsA-abhängigen Varianten und die Variante A₂₂₄E getestet. Zusätzlich wurde auch die jeweilige mit S₁₇₃A kombinierte Variante untersucht. Wie in Abb. 14 gezeigt, gibt es bei keiner der untersuchten

Varianten einen signifikanten Unterschied zwischen den mit FK-506 behandelten und den nicht behandelten Proben (Abb. 14, schwarze und weiße Balken). Weder kommt es beim WT und den kompensierten Varianten zu der sonst beobachteten Reduzierung der Infektiosität (Abb. 14, weiße Balken), noch kommt es zu einer Zunahme der Infektiosität der nicht kompensierten Varianten (Abb. 14, schwarze Balken) (vergleiche Abb. 9). Allerdings ist beim Wildtyp und den SA-kompensierten Varianten ein schwacher Trend zu einer erhöhten Infektiosität zu beobachten. Für die beobachtete CsA-Abhängigkeit und die Kompensation durch die Mutation S₁₇₃A spielen die immunsuppressiven Eigenschaften von CsA jedoch keine nachweisbare Rolle. Dieser Befund stärkt darüber hinaus die Annahme, dass die Präsenz von CypA für die geringe Infektiosität der CsA-abhängigen Varianten ein wichtiger Faktor ist.

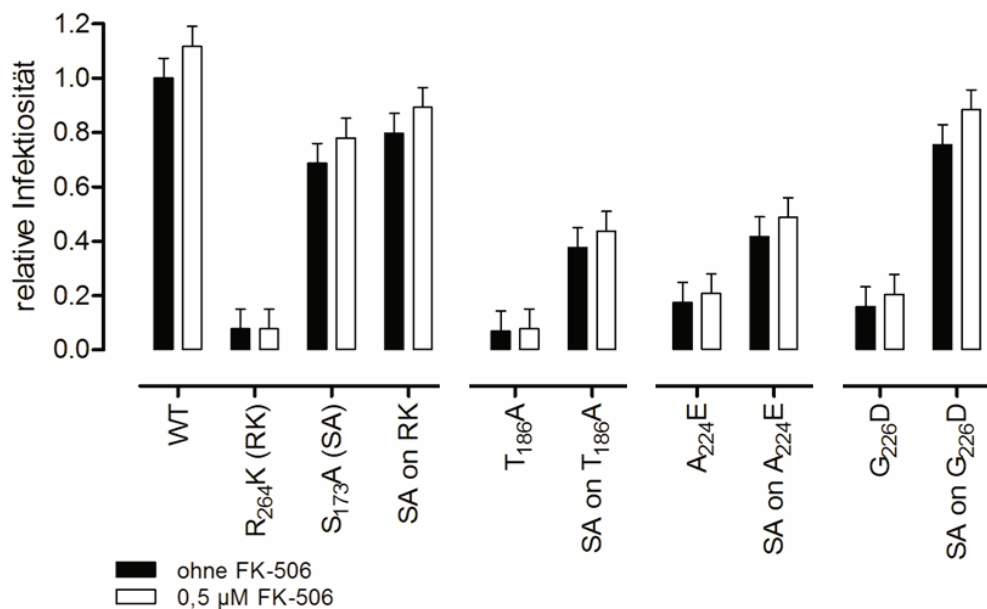


Abb. 14: FK-506 vermittelt weder eine Kompensation der Infektiosität noch eine Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit.

Es ist kein Einfluss der immunsuppressiven Wirkung von FK-506 auf den R₂₆₄K-vermittelten Defekt nachweisbar. Allerdings neigen der Wildtyp und die mit S₁₇₃A kompensierten Varianten in Gegenwart von FK-506 zu einer minimal erhöhten relativen Infektiosität. GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 μM FK-506 (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiven Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion an Hand von Durchflusszytometrie bestimmt. Die Infektionsraten wurden auf die Messwerte des WT in Abwesenheit von FK-506 normalisiert. Durchführung analog zu Abb. 9.

4.7 Alternative Wege zur Kompensation des R₂₆₄K vermittelten Fitnessdefekts

Obwohl *in vivo* (Patientenisolate) eine starke Assoziation zwischen der *escape* Mutation R₂₆₄K und der kompensierenden Mutation S₁₇₃A besteht, konnte in der vorliegenden Arbeit der Befund von Aberham et al. bestätigt werden¹²⁴, dass es neben S₁₇₃A zumindest theoretisch (*in vitro*) noch andere Möglichkeiten (z.B. mit V₂₁₈A und/oder A₂₃₇T) gibt, die negativen Eigenschaften von R₂₆₄K zu kompensieren (s. 4.4.3). Die gezeigten Ergebnisse geben aber keinen Hinweis auf die Ursache(n) der starken Dominanz der *in vivo* Mutation S₁₇₃A gegenüber den beiden *in vitro* Mutationen. Um die Assoziation zwischen S₁₇₃A und R₂₆₄K besser nachvollziehen zu können wurden zwei Ansätze verfolgt:

- 1) Generierung von Virusvarianten, die auf *in-vitro*-Isolaten von Langzeitkulturen der RK-Variante in Abwesenheit von CsA zurückgehen (s. 4.7.1) zur Verifizierung weiterer alternativer Sequenzpositionen/Mutationen, die eine Wiederherstellung der defekten Variante RK *in vitro* erlauben.
- 2) Identifizierung weiterer potentiell kompensatorisch wirkender Mutationen basierend auf seltenen *in-vivo*-Virussequenzen, die einen R₂₆₄K *escape* ohne eine S₁₇₃A Mutation zeigen. Die Generierung entsprechender NL4-3 Konstrukte und eine anschließende Charakterisierung in GXR25-T-Zellen wird unter 4.7.2 ausgeführt.

4.7.1 Neue *in vitro* Mutationen kompensieren für R₂₆₄K

Um zu überprüfen, ob *in vitro* eine Kompensation der Variante RK durch weitere Mutationen an alternativen Positionen von p24 möglich ist, wurden von Schneidewind et al. bereits 2007 GXR25-Kulturen mit den Varianten RK oder RKLK infiziert und über einen Zeitraum von mehreren Wochen in Abwesenheit von CsA kultiviert (nicht veröffentlicht). Die Zellen wurden wöchentlich mittels Durchflusszytometrie auf die Zunahme der GFP-Expression hin analysiert, die an eine produktive Infektion gekoppelt ist (s. 3.2.2.1). Im Fall einer zunehmenden Virusreplikation wurden die Genome dieser Varianten isoliert, aufgereinigt und der Gag-Sequenzbereich auf Mutationen hin untersucht (s. 3.2.2.4). Auf diese Weise konnten mit M₁₄₂I, L₁₈₄I, N₂₀₆D, A₂₂₀T, A₂₂₄V, A₂₃₇E, A₂₃₇T, T₂₃₉I, Q₂₄₄H, T₂₅₁I und V₂₅₈I elf verschiedene Mutationen an zehn unterschiedlichen Positionen von HIV-1 *gag* identifiziert werden. Interessanterweise ließ sich keine durch S₁₇₃A kompensierte Variante isolieren, was unter Berücksichtigung der Dominanz dieser Kombination *in vivo* unerwartet war. Auch eine Reversion (K₂₆₄R) wurde in keiner Kultur beobachtet. Ebenfalls unerwartet ist, dass eine Mutation an Position 142 in Gag aus einer Langzeitkultur isoliert wurde, obwohl p24 bei NL4-3 erst an Position 149 von Gag beginnt (GenBank: AAK08483.1). Beachtenswert ist auch, dass mit der Mutation A₂₃₇E eine alternative Mutation zu A₂₃₇T identifiziert werden konnte

(s. 4.4.3). Das gleich gilt für die Mutation $A_{224}V$. Obwohl $A_{224}E$ zumindest der Literatur nach eine CsA-Abhängigkeit vermittelt, wurde $A_{224}V$ in einer der replizierenden Virusvarianten als einzige Mutation neben $R_{264}K$ nachgewiesen. Alle Varianten wurden in GXR25-Zellen auf ihre Infektiosität hin untersucht (Abb. 15 A und B). Eine kompensierende Wirkung konnte für die Mutationen $M_{148}I$, $L_{184}I$, $N_{206}D$, $A_{224}V$, $A_{237}E/T$, $T_{239}I$ und $T_{251}I$ bestätigt werden (Abb. 15 A und B, schwarze Balken). Die Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit konnte sogar bei fast allen in den Langzeitkulturen gefundenen Mutationen demonstriert werden. Bei den Varianten die mit $A_{220}T$, $A_{224}V$ oder $Q_{244}H$ kombiniert waren, war die CypA-Abhängigkeit entweder nur schwach ausgeprägt oder der Phänotyp wirkte CypA-unabhängig (Abb. 15 A und B, weiße Balken). Dabei war die Bandbreite der Auswirkung dieser „sekundären“ Mutationen auf die Infektiosität gravierend (Abb. 15 A und B, schwarze Balken). Sie reicht von einer Reduktion um ca. 30% ($S_{173}A$, $N_{206}D$, $T_{239}I$ und $Q_{244}H$) bis fast 100% bei der Doppelvariante $A_{220}T+V_{258}I$. Weiterhin fällt auf, dass die Variante $A_{224}V$, im Gegensatz zu $A_{224}E$ (Abb. 9), CypA-abhängig ist. Insgesamt weisen vier ($L_{184}I$, $N_{206}D$, $A_{237}E$, und $T_{239}I$) der elf Mutationen ein kompensatorisches Potenzial auf, das zumindest in diesem experimentellen Zusammenhang mit dem der Mutation $S_{173}A$ in den Varianten SARK bzw. SARKLM vergleichbar ist (Abb. 15 A bzw. B, schwarze Balken).

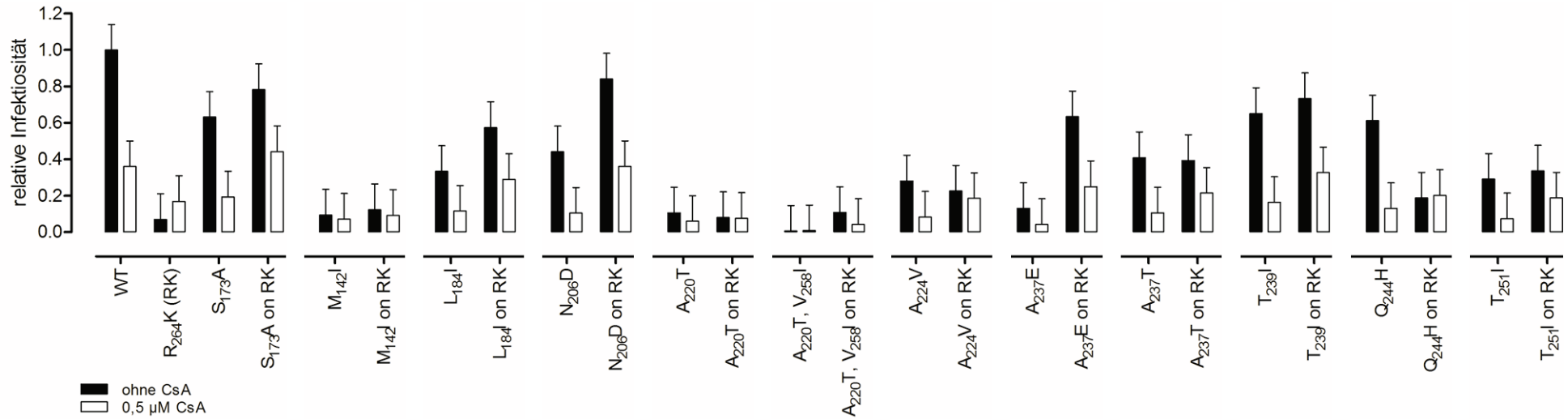


Abb. 15 A: Kombination der Mutationen aus den Langzeitkulturen mit der Variante R₂₆₄K (RK)

Eine kompensierende Wirkung für den R₂₆₄K-vermittelten Defekt konnte für die Mutationen M₁₄₈I, L₁₈₄I, N₂₀₆D, A₂₂₄V, A₂₃₇E/T, T₂₃₉I und T₂₅₁I gezeigt werden (schwarze Balken). Die Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit konnte mit fast allen in den Langzeitkulturen gefundenen Mutationen demonstriert werden (weiße Balken). GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 µM CsA (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion an Hand von Durchflusszytometrie bestimmt. Durchführung analog zu Abb. 9.

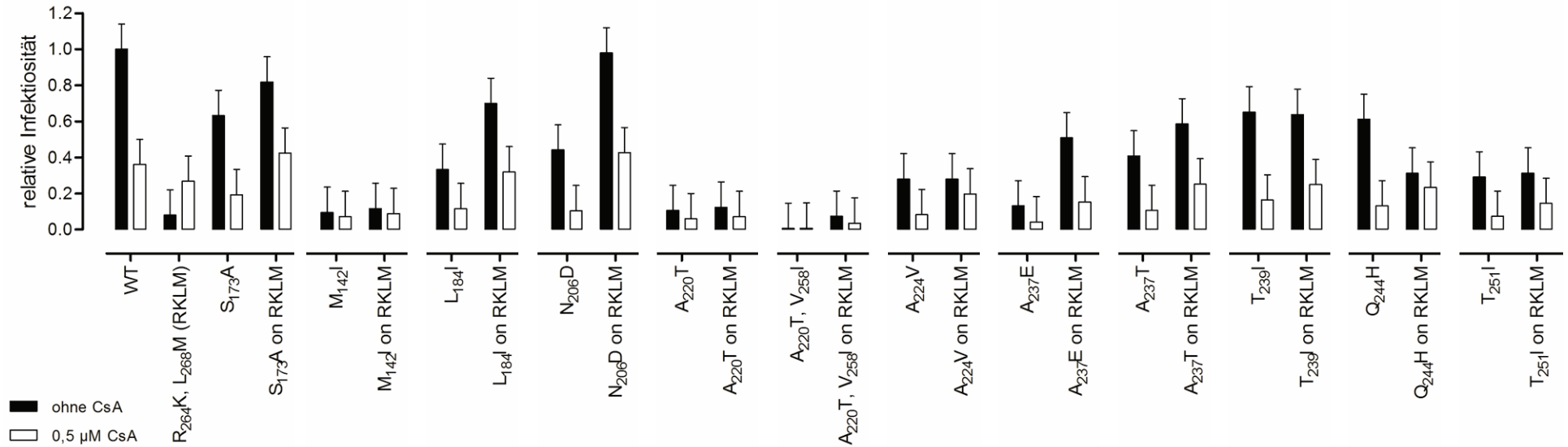


Abb. 15 B: Kombination der Mutationen aus den Langzeitkulturen mit der Variante R₂₆₄K, L₂₆₈M (RKLM)

Entsprechend den in Abb. 15 A gezeigten Daten konnte eine kompensierende Wirkung für den R₂₆₄K-vermittelten Defekt durch die Mutationen M₁₄₈I, L₁₈₄I, N₂₀₆D, A₂₂₄V, A₂₃₇E/T, T₂₃₉I und T₂₅₁I auch bei den RKLM-Varianten gezeigt werden (schwarze Balken). Gleiches gilt für die Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit (weiße Balken). GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 µM CsA (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion an Hand von Durchflusszytometrie bestimmt. Durchführung analog zu Abb. 9.

4.7.2 R₂₆₄K ohne S₁₇₃A: Ungewöhnliche *in vivo* Virusvarianten

Unter 4.4.3 und 4.7.1 wurde gezeigt, dass eine Kompensation der defizienten RK-Variante zumindest *in vitro* an unterschiedlichen Positionen in p24 durch alternative Mutationen vermittelt werden kann. Das wirft die Frage auf, ob es auch *in vivo* alternative Wege gibt, um den defizienten und CsA-abhängigen Phänotyp von R₂₆₄K durch weitere Mutationen zu kompensieren und/oder zu revertieren. In der Literatur zu diesem Thema wurden einige HI-Viren aus HLA-B*27-positiven Individuen beschrieben, die zwar die R₂₆₄K Mutation trugen, jedoch noch ein Serin an Position 173 aufwiesen^{7,120,127}. Diese atypischen Virusvarianten wurden auf gemeinsame Mutationen in p24 hin untersucht, soweit die Sequenzen zugänglich waren. So beschrieb eine Arbeit den Fall des HLA-B*27-positiven virämischen Individuums 27NC6 mit S₁₇₃ und R₂₆₄K¹²⁷. Da das infizierende Virus jedoch in diesem Fall vom Subtyp CRF01_AE war und erst spät im Verlauf des Projekts zugänglich wurde, wurde dieser Fall nicht intensiver analysiert. Im Bezug auf den Virussubtyp kann nicht ausgeschlossen werden, dass es subtypspezifische Unterschiede bei der Manifestation der R₂₆₄K Mutation gibt. Die in der Arbeit angegebenen Sequenzunterschiede zu einer HIV-1 *clade* B Konsensussequenz waren: T₁₈₆M, T₁₉₀I, E₂₀₃D, L₂₁₅V, A₂₂₄P, T₂₃₉V, N₂₅₂S, E₂₆₀D, I₂₆₁V und T₂₈₀V. Unter Berücksichtigung der unter 4.7.1 dargelegten Ergebnisse könnten die Mutation an den Positionen A₂₂₄ und T₂₃₉ möglicherweise den R₂₆₄K vermittelten Defekt partielle kompensieren. Darüber hinaus trägt diese *in vivo*-auftretende Virusvariante nicht nur die Mutation R₂₆₄K, sondern weist auch an den Positionen T₁₈₆ und A₂₂₄ Mutationen auf, also an Positionen, die zumindest im Fall von T₁₈₆A bzw. A₂₂₄E, mit einer Abhängigkeit von CsA assoziiert werden^{9,124}. Drei weitere Individuen (AC66, AC144 und B-10) wurden in einer Studie über Mutter-Kind-Transmissionen identifiziert¹²⁰. Hier übertrugen HLA-B*27-positiven Mütter das Virus auf ihre HLA-B*27-negativen Kinder. Eine weitere Quasi-Spezies mit S₁₇₃ und R₂₆₄K entwickelte sich in einem Fall (F7148⁷) in einer Kohorte chronisch HIV-1 infizierter HLA-B*27-positiven Individuen. Von diesen fünf beschriebenen Virusvarianten weisen vier mindestens zwei Mutationen in oder nahe der CypA-Bindeschleife (Aminosäuren 217-225) und dem HLA-B*57 restringierten Gag-Epitop TW10 (Aminosäuren 240-249) auf (s. 2.4.3.2). Da die Gag-Sequenz von F7148 vollständig bekannt ist und sie fast ausschließlich Mutationen in diesem Bereich trägt, ist sie ein vielversprechender Kandidat für mögliche alternative kompensierenden *in vivo* Mutationen für den R₂₆₄K vermittelten Effekt. An folgenden Positionen treten in der p24-Sequenz des Isolats von F7148 neben den HLA-B*27 assoziierten KK10-Mutationen R₂₆₄K und L₂₆₈M Unterschiede zu NL4-3 auf: M₂₀₀I, V₂₁₈M, H₂₁₉Q, M₂₂₈I und G₂₄₈A. Darüber hinaus gibt es im N-terminalen Teil von p24 keine weiteren Mutationen in dieser Sequenz (Abb. 16 und GenBank: EU183202). Abgesehen von M₂₀₀I ist für alle übrigen N-terminalen Mutationen *in vitro* ein Einfluss auf den CypA-Phänotyp von

HIV-1 beschrieben ^{6,7}. Die beiden Mutationen im C-Terminus dieses Isolats wurden nicht weiter berücksichtigt, da ein Einfluss auf die CypA-Bindung als unwahrscheinlich erachtet wurde.

```

150.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230
NL4-3  PRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSEALSSEGATPQDLNLTMLNTVGGHQAAQMLKETINEEAAEWDRHLHPVHAGFIAPGQMR
F7148  .....I.....MQ.....I...

.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310
NL4-3  PRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLYKTLRA
F7148  .....A.....K..M.....

.....320.....330.....340.....350.....360.....370...
NL4-3  YKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANPDKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVL
F7148  .....G.....S.....

```

Abb. 16: Sequenzvergleich von p24 des Patienten F7148 und Wildtyp NL4-3

Die obere Zeile zeigt jeweils die Proteinsequenz von NL4-3 p24, die untere Zeile zeigt die p24-Sequenz des Virusisolats F7148. Die dick gedruckten Aminosäuren kennzeichnen jeweils die exakte Position der darüberstehenden fortlaufenden Nummerierung, wobei 0 dem Startcodon des Gag-Polyproteins entspricht und 149 dem Start der p24-Sequenz. Die Punkte in der Zeile F7148 ⁷ bedeuten keinen Unterschied zur NL4-3-Sequenz. An Positionen an denen sich die Virussequenz des Patienten F7148 von NL4-3 unterscheidet steht im Ein-Buchstaben Code die vorgefundene Sequenzänderung. Im N-terminalen Bereich sind sieben Mutationen: M₂₀₀I, V₂₁₈M, H₂₁₉Q, M₂₂₈I, G₂₄₈A, R₂₆₄K und L₂₆₈M. Desweiteren finden sich noch zwei Mutationen im C-terminalen Bereich (N₃₂₅G und G₃₆₇S), die aber im Rahmen der Arbeit nicht berücksichtigt wurden. Die Position S₁₇₃ sowie das KK10-Epitop (Aminosäuren 263-272) sind grau unterlegt. Die CypA-Bindeschleife ist (Aminosäuren 217-225) unterstrichen.

Die Virussequenz von F7148 trägt mit H₂₁₉Q, M₂₂₈I und G₂₄₈A drei der T₂₄₂N-assozierten Mutationen (Abb. 16) (s. 2.4.3.2). Da das Individuum F7148 HLA-B*57-negativ ist ⁷, wurde vermutet, dass der *escape* des KK10-Epitops durch R₂₆₄K ohne S₁₇₃A durch bereits etablierte Mutationen im infizierenden Virus erleichtert werde. Zur Überprüfung dieser Hypothese, wurden die HLA-B*57-assozierten Mutationen von F7148 einzeln und in allen möglichen Kombinationen, mit R₂₆₄K bzw. R₂₆₄K, L₂₆₈M als NL4-3 Varianten hergestellt und auf ihr kompensatorisches Potenzial hin analysiert.

In Abwesenheit von CsA bewirken interessanterweise weder H₂₁₉Q, M₂₂₈I noch G₂₄₈A alleine eine Kompensation der RK- bzw. RKLM-Variante. Auch die Doppel- oder Dreifachmutanten führen zu keiner signifikanten Zunahme der Infektiosität (Abb. 17 A und B, schwarze Balken). Auch führte eine Inkubation der infizierten Zellen mit 0,5 µM CsA weiterhin zu einer Zunahme der Infektiosität bei den RK- und RKLM-Varianten, was die fortgesetzte Dominanz des CsA-abhängigen Phänotyps beweist (Abb. 17 A und B, weiße Balken).

Ferner wurden in dieser Arbeit Virusvarianten mit dem kompletten von Brockman et al. beschriebene Set an T₂₄₂N-assoziierten Mutationen generiert, das H₂₁₉Q, I₂₂₃V und M₂₂₈L (QVI) umfasst ⁶. Außerdem wurde die Mutation I₂₂₃V in zwei der oben beschriebenen p24-Sequenzen nachgewiesen, die die *escape* Mutation R₂₆₄K ohne S₁₇₃A aufwiesen (AC144 und B-10, ¹²⁰). In Abb. 18 ist gezeigt, dass die Mutationen QVI alleine keinen Einfluss auf die Infektiosität haben, auch führen sie in Kombination mit R₂₆₄K in Abwesenheit von CsA zu keiner Zunahme der Infektiosität (Abb. 18, schwarze Balken). In Gegenwart von 0,5 µM CsA kann durch das Set der QVI Mutationen die Vermittlung des von Brockman et al. beschriebenen CypA-/ CsA-unabhängigen Phänotyps bestätigt werden (Abb. 18, weiße Balken und ⁶. Interessanterweise zeigt die Variante QVI on RK in Gegenwart von 0,5 µM CsA eine Tendenz zu einer zunehmenden Infektiosität (Abb. 18, weiße Balken). Dieselben Beobachtungen wurden für die entsprechenden RKLK-Varianten gemacht (Abb. 18).

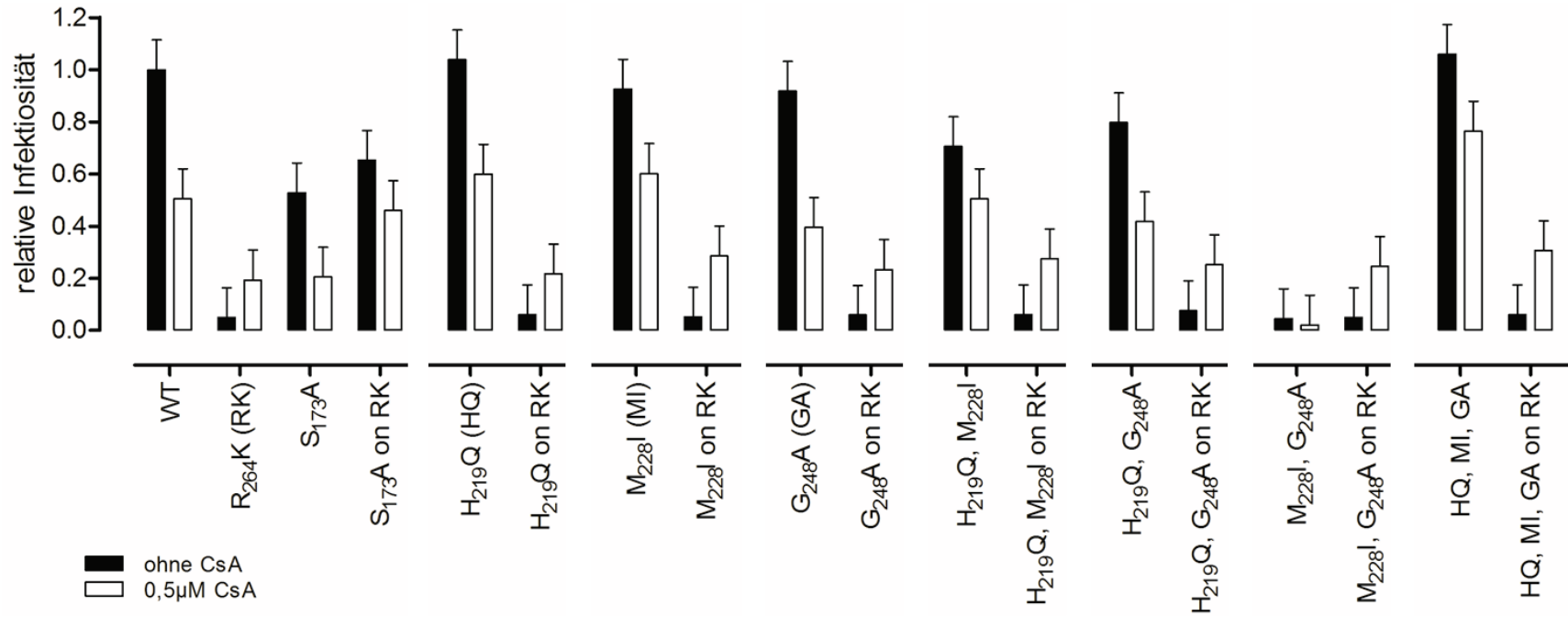


Abb. 17 A: Kombination von *in vivo* Mutationen der Sequenz F7148 mit R₂₆₄K (RK)

Keine der untersuchten Varianten zeigt eine signifikante Zunahme der Infektiosität im Vergleich zu der oder Defektvariante RK (schwarze Balken). Auch eine Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit kann nicht demonstriert werden (weiße Balken). Gleiches gilt für die RKLK-Varianten in Abb. 17 B auf der folgenden Seite. GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 µM CsA (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion an Hand von Durchflusszytometrie bestimmt. Durchführung analog zu Abb. 9.

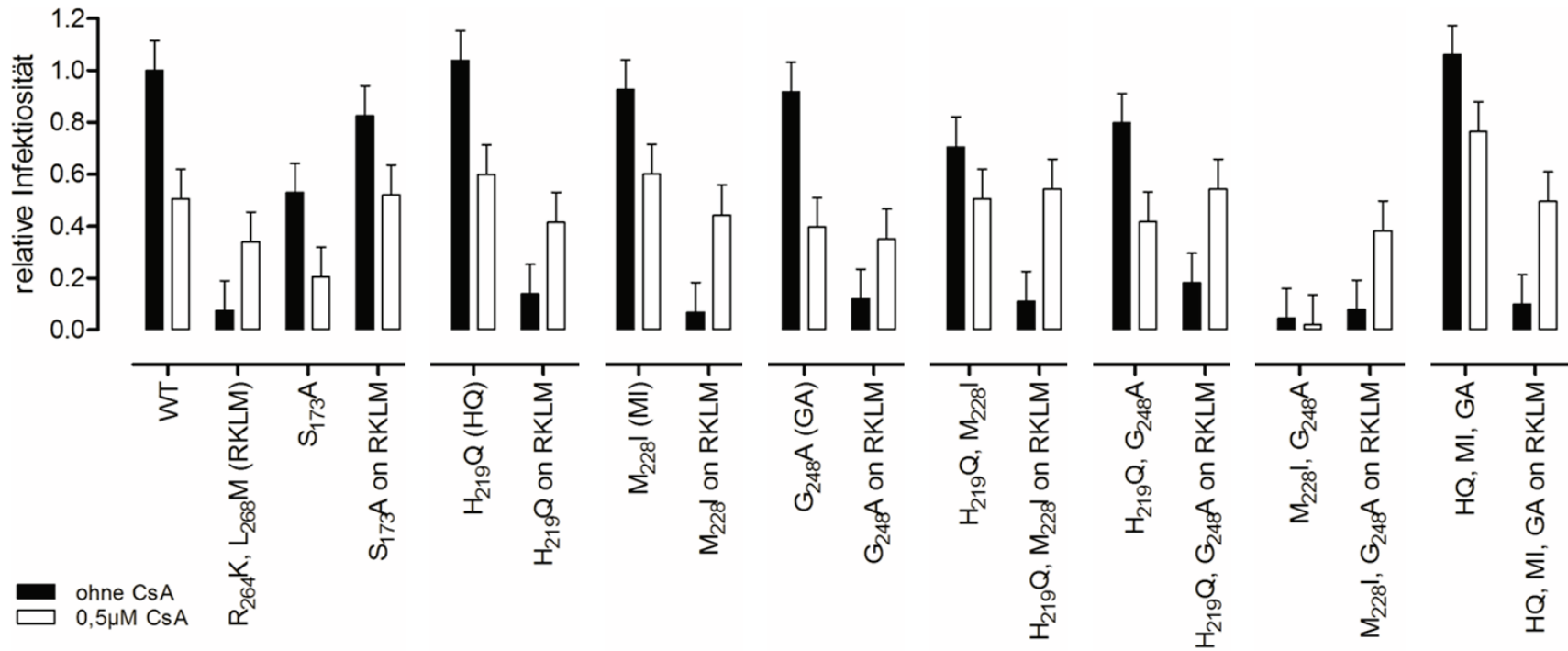


Abb. 17 B: Kombination von *in vivo* Mutationen der Sequenz F7148 mit R₂₆₄K, L₂₆₈M (RKLM)

GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 µM CsA (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion an Hand von Durchflusszytometrie bestimmt. Durchführung analog zu Abb. 9.

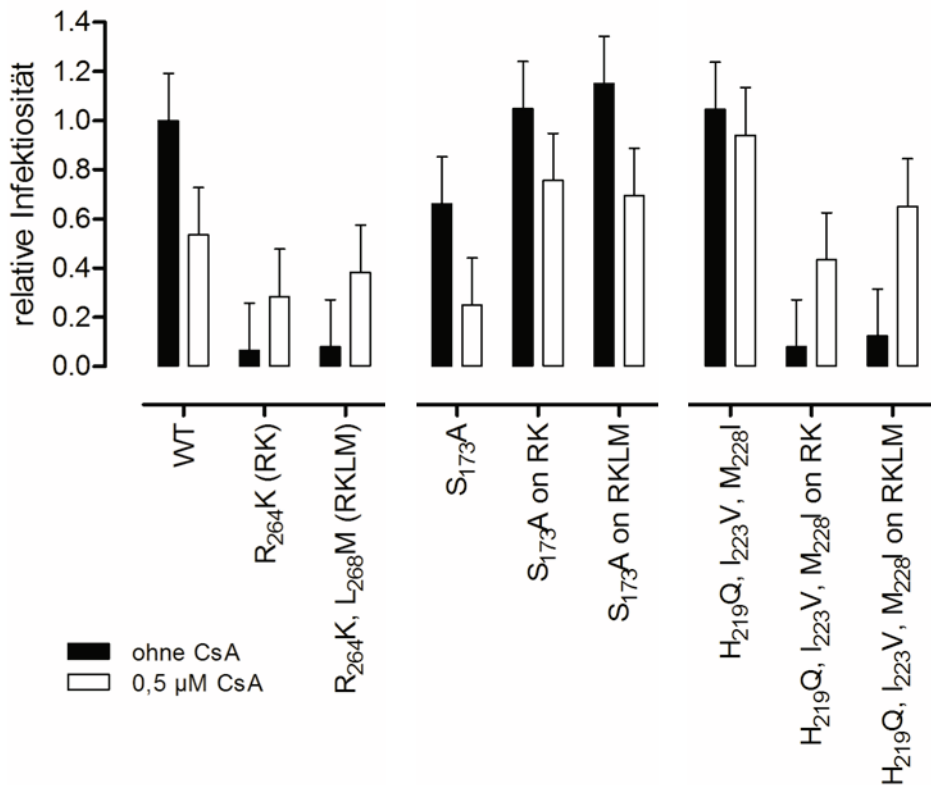


Abb. 18: R₂₆₄K (RK) und R₂₆₄K, L₂₆₈M (RKLM) in Kombination mit dem kompletten Set⁶ an HLA-B*57 assoziierten Mutationen der CypA-Bindeschleife.

Die gezeigten Mutationen vermitteln keinen kompensatorischen Effekt für den durch R₂₆₄K vermittelten Defekt (schwarze Balken). Allerdings neigen die kombinierten Varianten in Gegenwart von CsA zu einer erhöhten relativen Infektiosität (weiße Balken). GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 µM CsA (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion an Hand von Durchflusszytometrie bestimmt. Durchführung analog zu Abb. 9.

Sowohl durch die Mutationen aus der Sequenz von F7148 (H₂₁₉Q, M₂₂₈I und G₂₄₈A s. Abb. 17 A und B) als auch durch das vollständige Set an T₂₄₂N-assoziierten Mutationen (H₂₁₉Q, I₂₂₃V und M₂₂₈I) (Abb. 18) wurde weder eine Zunahme der Infektiosität noch eine Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit erzielt. Aus diesem Grund wurden die Eigenschaften der übrigen TW10-assoziierten Mutationen der p24-Sequenz von F7148 untersucht (jeweils auf der WT-Sequenz, mit R₂₆₄K und R₂₆₄K, L₂₆₈M).

Zunächst wurde die Wirkung der Mutation V₂₁₈M analysiert. Unter 4.4.3 konnte bereits die *in vitro* Mutation V₂₁₈A als kompensierende Mutation für R₂₆₄K gezeigt werden. Da mit V₂₁₈M nun eine *in vivo* Mutation an der gleichen Position in p24/Gag identifiziert wurde, konnte die Wirkung dieser beiden Varianten im Hinblick auf den R₂₆₄K vermittelten Phänotyp verglichen werden. Die Infektiosität wird durch beide Mutationen in ähnlichem Maße erhöht (Abb. 19, schwarze Balken). Die Variante V₂₁₈M on RKLM zeichnet sich allerdings durch eine tendenzielle Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit aus (Abb. 19, weiße Balken). Gleiches gilt für die RK-Varianten (Abb. 19).

Kombiniert man $V_{218}M$ mit den in Abb. 17 aufgeführten Mutationen $H_{219}Q$, $M_{228}I$ und $G_{248}A$ (MQIA), zeigen sich die unterschiedlichen Eigenschaften der untersuchten Mutationen. In Abwesenheit von CsA zeigt die Variante MQIA eine ähnliche stark verminderte Infektiosität wie die Variante $V_{218}M$ (Abb. 19, schwarze Balken), wohingegen die Infektiosität der Variante QIA (Abb. 17 A) in etwa mit dem WT vergleichbar ist. Übereinstimmend mit der Variante QIA zeigt auch die Variante MQIA einen CypA-abhängigen Phänotyp (Abb. 19, weiße Balken). Die Variante MQIA on RKLM zeigt zwar im Unterschied zu der in Abb. 17 B gezeigten Variante QIA on RKLM eine zunehmende Infektiosität (Abb. 19, schwarze Balken), allerdings kommt es dennoch zu keiner Wiederherstellung des CypA-abhängigen Phänotyps (Abb. 19, weiße Balken). Die Varianten $V_{218}M$, $H_{219}Q$ on RK oder RKLM sind ferner noch interessant, da die Präsenz der Mutation $H_{219}Q$ in diesen Varianten offenbar mit einem CsA-abhängigen Phänotyp assoziiert ist (Abb. 19, weiße Balken), obwohl mit der Mutation $V_{218}M$ weiterhin eine Verbesserung der Infektiosität einhergeht (Abb. 19, schwarze Balken; vergleiche $V_{218}M$ on RK/RKLM).

Da $I_{223}V$ auch Teil des von Brockman et al. beschriebenen $T_{242}N$ -assoziierten Mutationssets ist⁶, wurden Virusvarianten generiert die neben den Mutationen der p24-Sequenz von F7148 zusätzlich $I_{223}V$ tragen (MQVIA). Die MQVIA-Varianten verhalten sich ähnlich wie die zuvor beschriebenen Varianten von MQIA. Auch hier ist in Kombination mit den Mutationen $R_{264}K$ oder $R_{264}K$, $L_{268}M$ keine Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit zu beobachten (Abb. 19, weiße Balken), obwohl es zu einer Zunahme der Infektiosität kommt (Abb. 19, schwarze und weiße Balken).

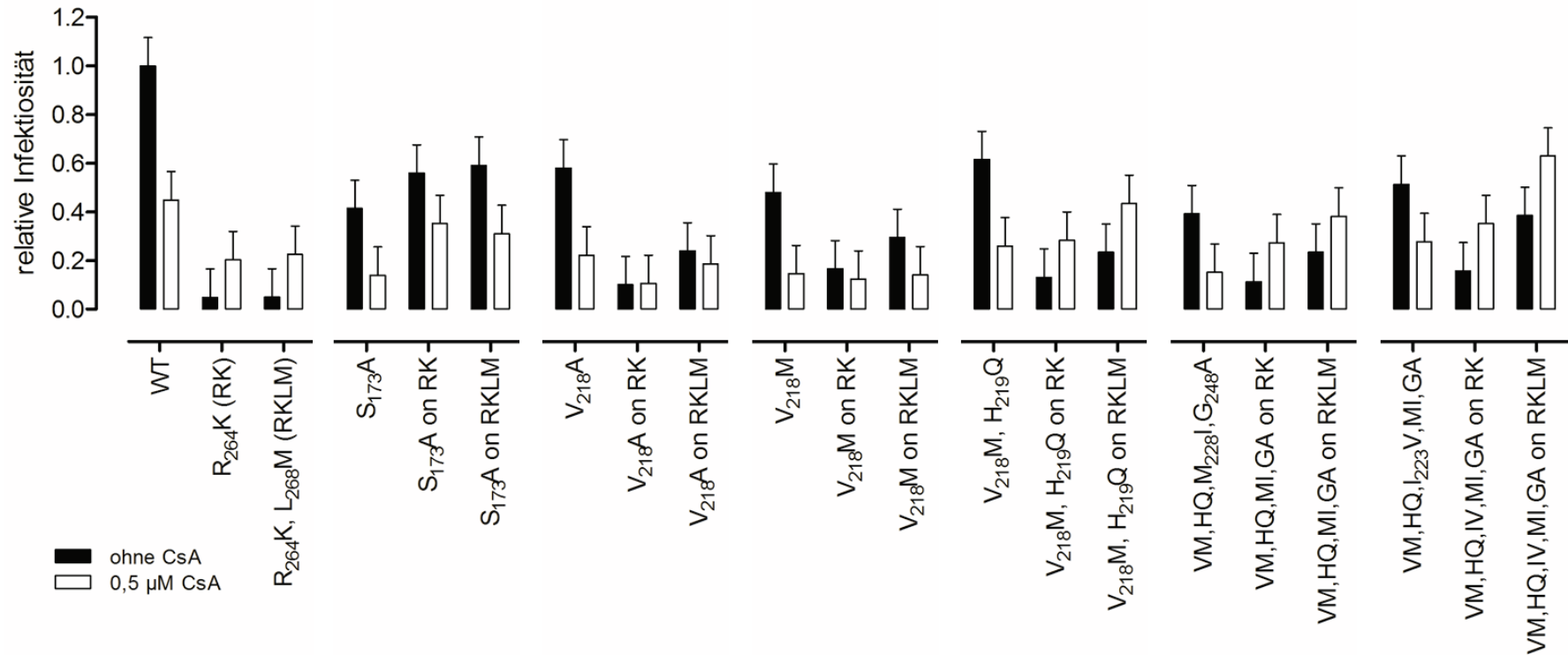


Abb. 19: R₂₆₄K (RK) und R₂₆₄K, L₂₆₈M (RKLM) in Kombination mit allen Mutationen der Virussequenz von F7148

Die *in vivo* (F7148) beschriebene Mutation V₂₁₈M vermittelt tendenziell eine bessere Kompensation des R₂₆₄K-vermittelten Defekts als die *in vitro* Mutation V₂₁₈A (schwarze Balken). Die Kombination von V₂₁₈M und H₂₁₉Q (VM bzw. HQ) mit R₂₆₄K (RK), aber vor allem mit R₂₆₄K, L₂₆₈M (RKLM) bewirkt interessanter Weise in An- und Abwesenheit von CsA eine leichte Erhöhung der relativen Infektiosität (schwarze und weiße Balken). Das gleiche gilt für die Varianten die alle TW10-assoziierten Mutationen der Sequenz F7148 (VM, HQ, M₂₂₈I und G₂₄₈A) tragen. Durch die Mutation I₂₂₃V kann dieser Effekt noch weiter verstärkt werden. GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 µM CsA (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion an Hand von Durchflusszytometrie bestimmt. Durchführung analog zu Abb. 9.

Abgesehen von den T₂₄₂N-assoziierten Mutationen weist die Sequenz von F7148 im N-terminalen Bereich von p24 mit M₂₀₀I nur eine weitere Mutation auf. Für diese Mutation ist in der Literatur weder ein Einfluss auf den CypA-Phänotyp noch eine Assoziation mit R₂₆₄K beschrieben. Um einen Einfluss dieser Mutation auszuschließen, wurde ihre Wirkung in Kombination mit R₂₆₄K bzw. R₂₆₄K, L₂₆₈M und den jeweiligen MQIA-Varianten untersucht. Es konnte allerdings kein Einfluss auf die Infektiosität der jeweiligen Varianten gezeigt werden. Auch auf den CypA-Phänotyp hat M₂₀₀I keinen Einfluss (Daten sind nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die T₂₄₂N-assoziierten *footprint* Mutationen in der p24-Sequenz von F7148 in Kombination mit R₂₆₄K oder R₂₆₄K, L₂₆₈M *in vitro* lediglich mit einer leichten Zunahme der Infektiosität einhergehen, aber es zu keiner Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit kommt. Der von Brockman et al. beschriebene CypA-unabhängige Phänotyp dieser Mutationen konnte allerdings bestätigt werden ⁶.

4.8 Dominanz der CsA-Abhängigkeit durch R₂₆₄K über die CypA-Sensitivität durch T₂₄₂N

Wie bereits unter 4.7.2 erwähnt, können die durch die *escape* Mutation T₂₄₂N-vermittelten Defekte durch ein Set aus den Mutationen H₂₁₉Q, I₂₂₃V und M₂₂₈I kompensiert werden ⁶. Die verstärkte Abhängigkeit der Variante T₂₄₂N von CypA (CypA-sensitiver Phänotyp) wird durch dieses Set an Mutationen nicht nur kompensiert, sondern in einen CypA-unabhängigen Phänotyp umgewandelt. Ein CypA-abhängiges bzw. sensitives Virus ist das genaue Gegenstück zu einem CsA-abhängigen Virus (RK-Variante). Dieser Zusammenhang wirft die Frage auf, ob ein bestehender TW10 *escape* im *founder* Virus einen atypischen *escape* des KK10-Epitops erleichtern könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine T₂₄₂N, R₂₆₄K Doppelmutante generiert und auf ihren CypA-Phänotyp hin untersucht. Dabei konnte eine eindeutige Dominanz der R₂₆₄K vermittelten CsA-Abhängigkeit gezeigt werden (Abb. 20, weiße Balken). Die Doppelmutante ist auch bezüglich ihrer Infektiosität genauso stark beeinträchtigt wie die RK-Variante (Abb. 20, schwarze Balken).

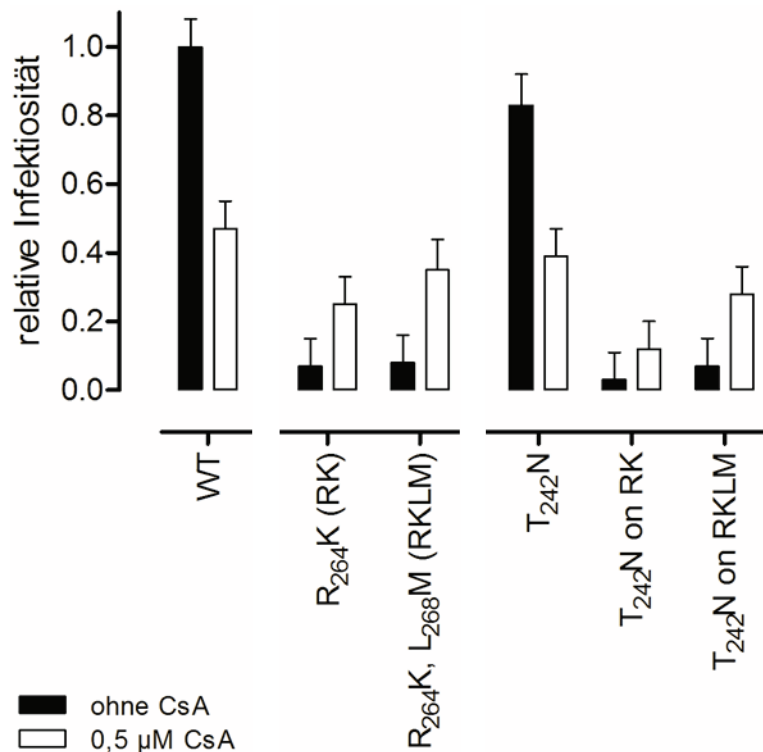


Abb. 20: Kombination von T₂₄₂N (CypA-Sensitivität) mit R₂₆₄K (CsA-Abhängigkeit)

Die Gegenwart der Mutation T₂₄₂N hat keinen Einfluss auf den durch R₂₆₄K vermittelten CsA-abhängigen Phänotyp. GXR25-Zellen wurden mit 250 ng p24 des WT oder einer der unterschiedlichen Virusvarianten in Abwesenheit (schwarze Balken) oder Gegenwart von 0,5 µM CsA (weiße Balken) infiziert. Der prozentuale Anteil infizierter GFP-positiver Zellen wurde 48 Std. nach der Infektion an Hand von Durchflusszytometrie bestimmt. Durchführung analog zu Abb. 9.

4.9 Analysen zur Vorhersage der p24-Struktur verschiedener Virusvarianten

Die unter 4.4 und 4.7 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass alle CsA-abhängigen Virusvarianten frei mit unterschiedlichen, kompensatorisch wirkenden Mutationen kombiniert werden können. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem molekularen Mechanismus, der den CsA-abhängigen Phänotyp vermittelt um einen sehr ähnlichen oder sogar den gleichen Mechanismus handeln könnte (s. 5.1). In diesem Fall könnte die freie Kombinierbarkeit der einzelnen, die CsA-Abhängigkeit vermittelnden Mutationen mit kompensatorisch wirkenden Mutationen als Hinweis dafür betrachtet werden, dass Änderungen der p24-Proteinstruktur durch die einzelnen Mutationen entweder nicht vorkommen oder einem vergleichbaren Muster folgen. Um über diesen Sachverhalt eine fundiertere Aussage treffen zu können, wurde zusammen mit Herrn Johannes Meier von einzelnen p24-Varianten eine computergestützte Strukturanalyse (*modelling*) mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Bei der ersten verwendeten Methode, dem *homology modelling*, versucht der Algorithmus des Programms Modeller eine gegebene Sequenz an die bekannte Struktur einer Mastersequenz anzupassen¹⁴⁰. Als Mastersequenz

dient dem Algorithmus in diesem Fall die p24-Sequenz des HIV-Laborstammes HXB2. Diese Art der Strukturanalyse erfordert weniger Rechenaufwand als eine *de novo* Analyse, bei der die Struktur der untersuchten Sequenz ohne Referenzstruktur berechnet wird. Der Nachteil des *homology modelling* Verfahrens gegenüber der *de novo* Generierung der Struktur ist wiederum, dass weniger gravierende strukturelle Änderungen eventuell nicht dargestellt werden, damit sich die Gesamtsequenz gut an die Mastersequenz alignen lässt. Dennoch eignet sich das *homology modelling* um ohne großen Rechenaufwand eine relativ sichere Aussage über größere strukturelle Änderungen machen zu können. Die p24-Sequenz des HIV-Stamm HXB2 (GenBank: AAB50258.1) unterscheidet sich im N-terminalen Bereich an lediglich zwei Positionen und im C-Terminus an einer weiteren Position von NL4-3 (GenBank: AAK08483.1). Die drei unterschiedlichen Positionen hatten keinen Einfluss auf die Proteinstruktur (Daten nicht gezeigt). Am N-Terminus der Referenzstruktur (HXB2) befindet sich noch der Linkerbereich, der im Polyprotein Gag das Matrixprotein mit dem Kapsidprotein verbindet (Aminosäuren: 133-148). Diese 16 Aminosäuren lange Kette bildet die beiden β -Faltblätter am N-Terminus von p24 (Abb. 21) und ist eigentlich laut GenBank weder bei HXB2 noch NL4-3 Teil von p24. Dennoch wird diese β -Faltblattstruktur in Publikationen *in vitro* als bedeutsam für die Ausbildung der konischen Kapsidstruktur beschrieben^{141,142}. Jedoch ist sie nicht essentiell, denn bei einer entsprechenden Deletionsmutante bilden sich zumindest *in vitro* infektiöse Partikel mit dem für HIV-1 typischen konischen Kapsid¹⁴². Bei den analysierten Varianten handelt es sich zum einen um die Defektvariante RK und die *in vivo* relevante Variante SARK. Zum anderen wurden die Strukturen der *in vitro* CsA-abhängigen Varianten T₁₈₆A, A₂₂₄E und G₂₂₆D jeweils mit und ohne S₁₇₃A berechnet, so wie auch die Strukturen der Varianten der *in vitro* kompensatorisch wirkenden Mutationen L₁₈₄I, N₂₀₆D und T₂₃₉I jeweils mit und ohne die Mutation R₂₆₄K. Keine der generierten Strukturen weist eine auffällige Änderung gegenüber dem Modell der Struktur von NL4-3 auf allerdings ist bei den Modellen der Varianten T₁₈₆A, R₂₆₄K und N₂₀₆D an R₂₆₄K eine leicht veränderte Positionierung der β -Faltblätter zu erkennen (Abb. 21 B und nicht gezeigte Daten). Nachfolgend werden zwei repräsentative Abbildungen gezeigt. In Abb. 21 A ist ein Alignment von NL4-3 (grün) mit der RK- (magenta) und SARK-Variante (türkis) dargestellt und in 21 B wird ein Alignment von NL4-3 (grün) mit der N₂₀₆D- (blau) und N₂₀₆D on R₂₆₄K-Variante (gelb) als beste kompensierende alternative *in vitro* Variante (vergleiche 4.7.1, Abb. 15 A) gezeigt.

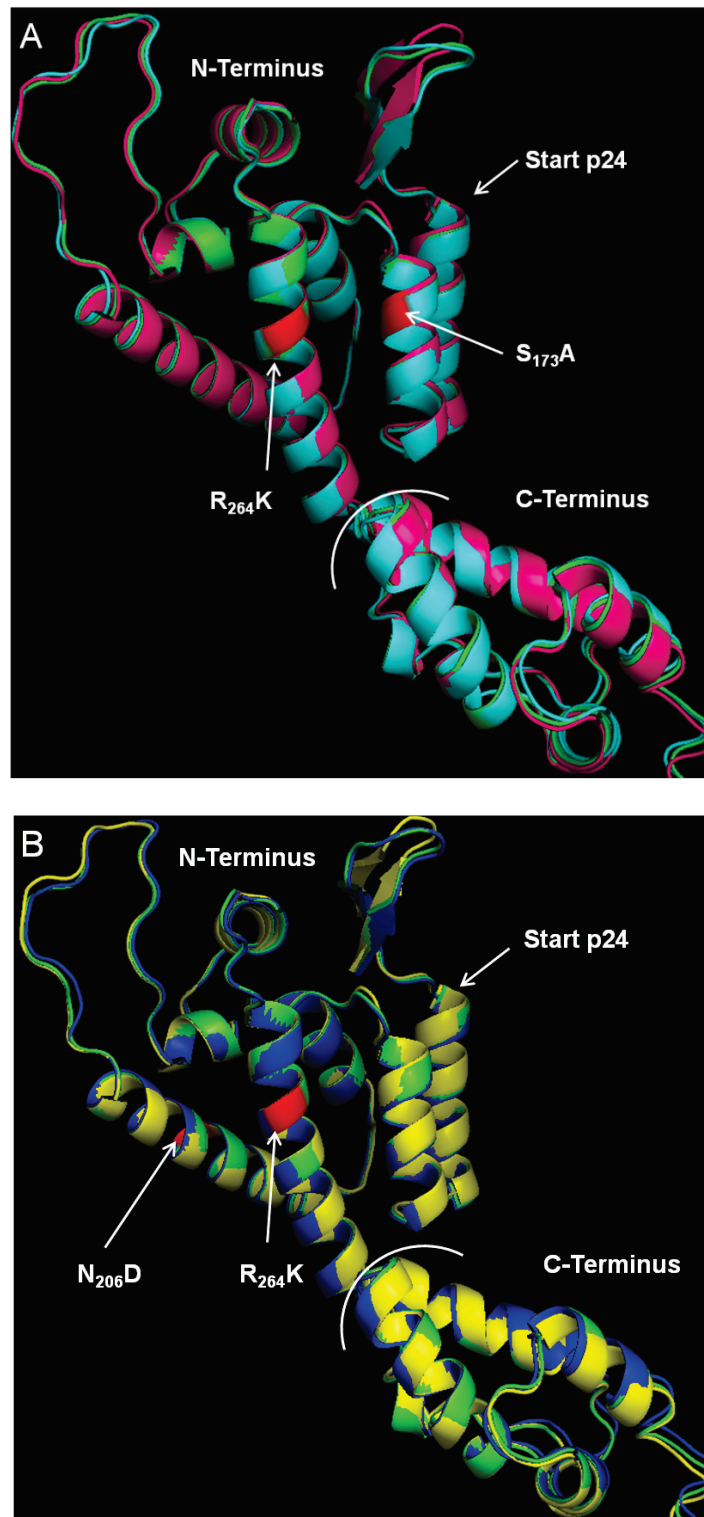


Abb. 21: Alignment der Strukturmodelle basierend auf dem *homology modelling* Verfahren

A) Gezeigt ist ein Alignment des WT NL4-3 (grün) mit den Varianten RK (magenta) und SARK (türkis). Die beiden relevanten Punktmutationen R₂₆₄K und S₁₇₃A sind rot hervorgehoben. **B)** Das analoge Alignment des WT NL4-3 (grün) mit den Varianten N₂₀₆D (blau) und N₂₀₆D, R₂₆₄K (gelb). Die beiden relevanten Punktmutationen R₂₆₄K und S₁₇₃A sind rot hervorgehoben. Die Berechnung der 3D-Struktur wurde mit dem Programm Modeller (<http://salilab.org/modeller/>) durchgeführt, die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Pymol.

Für die Varianten NL4-3, RK und SARK wurden zusätzlich noch das oben bereits erwähnte Verfahren der *de novo* Generierung der Strukturen durchgeführt, um die Aussagekraft der übrigen durch *homology modelling* generierten Strukturen zu erhöhen bzw. zu überprüfen. Das verwendete Programm *I-Tasser* nützt die Daten zu Modellen von neun anderen *modelling* Programmen und wählt nach einem spezifischen *scoring*-System die zehn besten Modelle aus. Auf Basis dieser Daten werden dann fünf Modelle der jeweiligen Templatesequenz berechnet¹⁴³. Dieser Vorgang erfordert deutlich mehr Rechenaufwand, liefert jedoch ein Strukturmodell das nicht auf eine möglichst hohe Ähnlichkeit zu einer Mastersequenz getrimmt wurde und deswegen auch empfindlicher auf Änderungen reagiert. Unter Abb. 22 ist das Alignment der Struktur von NL4-3 (grün) mit den Varianten RK (magenta) und SARK (türkis) gezeigt. Es zeigen sich auch hier keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den beiden Strukturen. Aligniert man die Modelle beider Methoden zeigt sich, dass die räumliche Position der Schleife zwischen den α -Helices 4 und 5, die die CypA-Bindestelle mit beinhaltet, leicht anders positioniert wird, dieser Effekt ist jedoch nicht auf die Punktmutationen zurückzuführen, da er innerhalb der jeweiligen Modellreihe konsistent ist (Daten nicht gezeigt). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die leicht unterschiedliche Positionierung dieser exponierten Bindschleife mit der Abwesenheit der β -Faltblattstruktur zusammenhängt. Diese wurde in der gezeigten *de novo* Analyse nicht berücksichtigt, da sie laut GenBank (AAK08483.1) nicht Teil von p24 ist. Um einen Einfluss dieser Linker-Sequenz auf die Struktur auszuschließen wurde jedoch noch eine zweite *de novo* Analysereihe mit der verlängerten Sequenz durchgeführt. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den *de novo* Strukturen mit und ohne den Linker-Abschnitt (Daten nicht gezeigt), so dass die beobachteten Unterschiede zwischen den *homology-modelling*- und den *de-novo*-Strukturen wohl Artefakte der unterschiedlichen Analysemethoden sind. Da diese 16 Aminosäuren allerdings als Teil der Referenzsequenz für das Programm Modeller definiert sind wurden sie bei den *homology-modelling*-Strukturen berücksichtigt (Abb. 21).

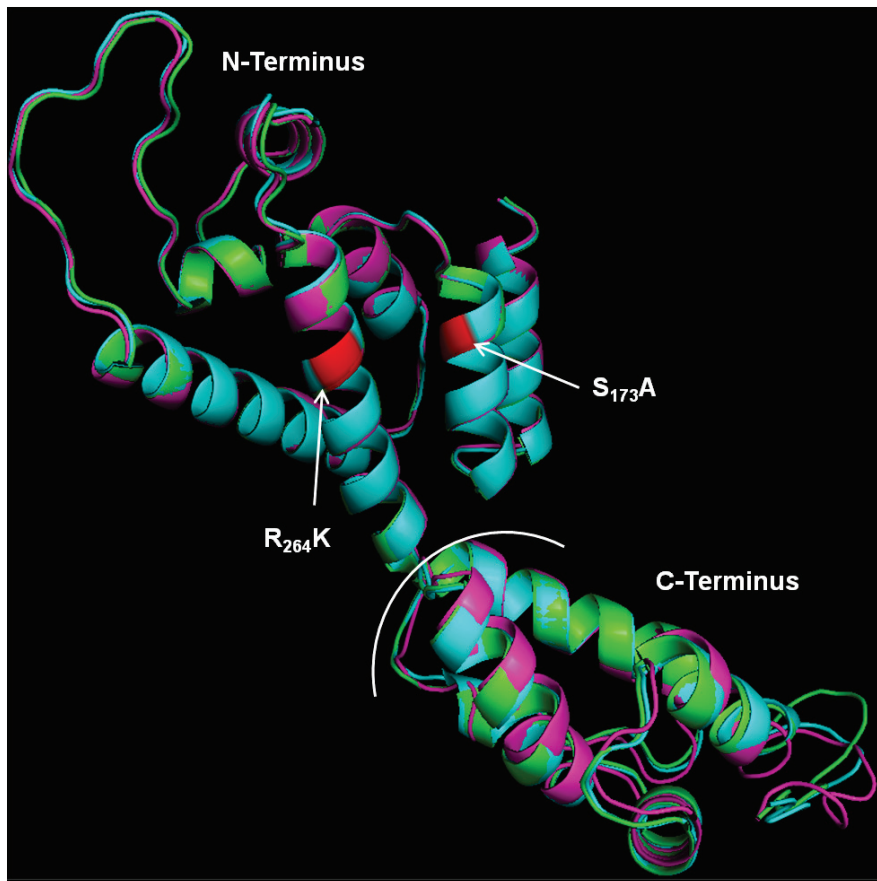


Abb. 22: Alignment der Strukturmodelle basierend auf einer *de novo* Berechnung durch I-Tasser

Gezeigt ist ein Alignment des WT NL4-3 (grün) mit den Varianten RK (magenta) und SARK (türkis). Die beiden relevanten Punktmutationen R₂₆₄K und S₁₇₃A sind rot hervorgehoben. Die Punktmutationen haben auch unter Verwendung der *de novo* Strukturanalyse keinen Einfluss auf die Proteinstruktur im N-Terminus von p24. Die Berechnung der 3D-Struktur wurde mit dem Programm I-Tasser (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) durchgeführt, die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Pymol.

5. Diskussion

5.1 Überblick

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, mit Hilfe der phänotypischen Charakterisierung zahlreicher HIV-1 NL4-3 Varianten die Grundlage für die protektive Wirkung des humanen Leukozytenantigens-B*27 (HLA-B*27) weiter aufzuklären. Es ist allgemein anerkannt, dass sie im engen Zusammenhang mit der hocheffizienten zytotoxischen T-Zell-(CTL-)Antwort gegen das stark konservierte p24/Gag Epitop KK10 steht. Altfeld et al. berichteten, dass eine dominante CTL-Antwort gegen das KK10-Epitop in allen untersuchten HLA-B*27-positiven Individuen ihrer Patientenkohorte nachweisbar war ⁹⁸. Dies wurde auch in einer Reihe anderer Publikationen bestätigt ^{102,144,145,112}. Die Expression von HLA-B*27 alleine ist aber noch kein Garant für eine *long-term-non-progressor-* (LTNP-)Status. Tatsächlich kommt es bei der Mehrheit der Patienten trotz Expression protektiver HLA-Allele zu einem Voranschreiten der Krankheit ⁸⁰. Bei HLA-B*27-positiven LTNPs wird die Protektion durch die eingeschränkte Fähigkeit des Virus vermittelt, dem Immunselektionsdruck der CTLs durch Maskierung oder Änderung des KK10-Epitops zu entkommen. Unter dem Einfluss des CTL-Selektionsdrucks kommt es in der Regel nach acht bis zwölf Jahren im KK10-Epitop nahezu stereotyp zu zwei *escape* Mutationen ^{102,112,146}. Als erstes etabliert sich in der Regel die Mutation L₂₆₈M, die aber nur zu einem temporär wirksamen *escape* des Epitops führt jedoch bald durch einen neuen CTL-Klon erkannt wird. Ein permanent wirksamer *escape* ist dem Virus nur durch eine Mutation an Position R₂₆₄ möglich, die als Ankerposition des KK10-Epitops für die Bindung an HLA-B*27 dient. Eine etablierte Mutation an Position 264 kündigt ein Fortschreiten der Erkrankung an (s. 2.4.3.1). Die dominante *escape* Mutation, die nahezu stereotyp in Patientenisolaten nachgewiesen wird (*in vivo*), ist R₂₆₄K. Da aber R₂₆₄K das Virus, zumindest *in vitro*, nahezu replikationsinkompetent macht, ist R₂₆₄K *in vivo* zum Ausgleich dieses Fitnessdefekts stark mit der *in vitro* kompensatorisch wirkenden (sekundären) Mutation S₁₇₃A assoziiert (s. 2.4.3.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der Befund von Schneidewind et al. bestätigt, dass der von R₂₆₄K vermittelte Defekt unter anderem durch einen veränderten CypA-Phänotyp bedingt wird ⁷. Darauf aufbauend konnten durch die Analyse zahlreicher Virusvarianten Erkenntnisse gesammelt werden, die zu einem besseren Verständnis des grundlegenden Mechanismus des CsA-abhängigen Phänotyps beitragen. Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit lassen sich sehr gut mit neueren Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen verknüpfen, worauf ab 5.2 verstärkt eingegangen wird. Zunächst wird unter 5.1.1 das in dieser Arbeit verwendete Assay zur Bestimmung der relativen Infektiosität diskutiert, anschließend werden unter 5.1.2 bis 5.1.5 die gewonnenen Erkenntnisse in Bezug zueinander gesetzt und diskutiert.

5.1.1 Bestimmung der relativen Infektiosität: Vor- und Nachteile des verwendeten Assays

Um die phänotypischen Auswirkungen der einzelnen Punktmutationen auf HIV-1 zu analysieren wurde in der vorliegenden Arbeit die Infektiosität der einzelnen Virusvarianten bestimmt. Zur Bestimmung der Infektiosität wurde die Reporter-T-Zelllinie GXR25 (s. 3.1.11.1) mit den jeweiligen Virusvarianten infiziert. Am zweiten Tag nach der Infektion erfolgte via Durchflusszytometrie die Bestimmung des Prozentsatzes der infizierten Zellen (s. 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Da nicht oder nur unzureichend bekannt ist in welchem Abschnitt des viralen Replikationszykluses negative oder positive Effekte durch die CsA-abhängigen Mutationen oder die anderen eingebrachten Mutationen vermittelt werden, ist dies eine geeignete Vorgehensweise um auf einen Defekt oder dessen Kompensation im Vergleich zu einer Wildtyp-Kontrolle zu testen. Dadurch wird sichergestellt, dass Auswirkungen unabhängig von der Art eines potenziell vermittelten Effekts als eine Änderung der Infektiosität beobachtet werden können. Der Nachteil dabei ist dass keine Aussage darüber getroffen werden kann wo im Replikationszyklus eine gegebene Mutation oder Kombination an Mutation eine Änderung der Infektiosität verursacht. Um eine genauere Aussage über den betroffenen Abschnitt des Replikationszyklus (reverse Transkription, Translokation, Integration, etc.) treffen zu können, müssten dann weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Nachfolgend sind beispielhaft zwei mögliche weiterführende Ansätze skizziert. Eine Funktion des viralen Kapsids ist es das Genom zu schützen und ein geeignetes Umfeld für die reverse Transkription zu schaffen. Hier kann nun beispielsweise untersucht werden, ob die Mutationen einen Einfluss auf die reverse Transkription haben. Dazu müsste die Bildung von Produkten der reversen Transkription quantitativ bestimmt werden. Anschließend können die Ergebnisse in Relation zum Wildtyp gesetzt werden. Ein anderer Ansatz wären Proteininteraktionsstudien wie Biacore-Analysen oder *pull-down*-Assays um zu ermitteln, ob die Mutationen ein Einfluss auf die Qualität von Proteininteraktionen haben oder das Interaktionsprofil vielleicht sogar ändern können.

5.1.2 Das Konsensusvirus als Modell zur Analyse von Punktmutationen

Die vorliegende Arbeit analysiert den Einfluss von verschiedenen Punktmutationen auf eine ansonsten identische Virussequenz. Eine definierte Punktmutation kann mit positiven und/oder negativen Auswirkungen auf HIV-1 verbunden sein. Im Fall einer *escape* Mutation, beispielsweise R₂₆₄K⁷, kann einerseits einer Immunantwort entgangen werden, andererseits kann die *escape* Mutation, z.B. durch eine verringerte Replikationskompetenz auch mit Kosten für die virale Fitness verbunden sein. Gleiches gilt für Mutationen, die eine Resistenz gegenüber einem antiretroviralen Medikament vermitteln^{147,60,4,148}. Möchte man die Auswirkungen einer definierten Punktmutation untersuchen, bietet sich die Verwendung

eines etablierten HIV-1-Laborstamms als Ausgangsstamm an, wie beispielsweise NL4-3. Die Aussagekraft solcher Untersuchungen wird jedoch durch eben diese Praxis auch geschmälert. Ein Laborstamm kann in seiner Aminosäuresequenz und wichtigen Eigenschaften wie Infektiosität, Pathogenität, etc. mitunter erheblich von den *in vivo* zirkulierenden Virus(quasi)spezies abweichen. Die Unterschiede zu den einzelnen Quasispezies ließen sich aber verringern, wenn an Stelle eines definierten Laborstamms ein Virus verwendet würde, dessen Sequenz näher mit jeder anderen beliebigen HI-Virussequenz desselben *clades* verwandt wäre. Eine gute Annäherung an dieses theoretische Virus stellt eine Konsensussequenz auf der Basis möglichst vieler HIV-1-Genomsequenzen desselben *clades* dar. Die Generierung und Charakterisierung eines derartigen HIV-1 *clade* B Konsensusvirus für die beiden Polyproteine Gag und Pol war das Thema der medizinischen Dissertation von Herrn Sven Breitschwerdt. Diese Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger, Herrn Dr. Arne Schneidewind und dem Autor der vorliegenden Arbeit betreut und befindet sich noch in Arbeit. Die S3-Arbeiten, die Teil des Projekts waren (Transfektion von HEK293T-Zellen mit den proviralen Varianten zur Generierung der virushaltigen Überstände, sowie die Durchführung der Infektion von GXR25-Zellen mit den jeweiligen Virusvarianten) wurden vom Autor für Herrn Breitschwerdt durchgeführt.

Alle drei Konsensusvarianten (Gag, Pol und Gag/Pol) wiesen gegenüber NL4-3 eine um 40 (Gag und Pol) bzw. 50% (Gag/Pol) verminderte relative Infektiosität auf (s. 4.4.2). Dies erscheint zunächst viel, jedoch relativiert die vergleichsweise hohe Zahl der Sequenzänderungen im Vergleich zu NL4-3 (13 Mutationen) diesen Prozentsatz, vor allem wenn man die erheblichen Auswirkungen bedenkt, die nur durch eine einzelne Mutation (z.B. R₂₆₄K, s. 4.4.1) vermittelt werden kann. Dennoch spielt die Anzahl der eingefügten Mutationen alleine durchaus eine Rolle, da das Gag/Pol Konsensusvirus schlechter repliziert als das Gag- oder Pol-Konsensusvirus. Die Ursache für die *in vitro* reduzierte Infektiosität könnte in der Natur der Konsensusviren selbst liegen, da es sich bei ihnen um artifizielle Konstrukte handelt, deren Aminosäuresequenz auf einer statistischen Wahrscheinlichkeit beruht, und sie keine durch evolutionäre Prozesse optimierte Virusvariante darstellen. Um zu ermitteln, ob eine Punktmutation beispielsweise den CypA-Phänotyp des Virus verändert ist die absolute Infektiosität des verwendeten Konsensus-WT jedoch nicht entscheidend.

Basierend auf diesem Ergebnis wurden die KK10-assoziierten Mutationen in das Gag-Konsensusvirus eingebracht. Die unterschiedlichen Virusvarianten wurden auf ihre Replikationskapazität und ihren CypA-Phänotyp hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die KK10-assoziierten Mutationen im Kontext des Gag-Konsensusvirus z.B. bezüglich der Infektiosität und des CypA-Phänotyps keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den jeweiligen NL4-3 Varianten aufwiesen (s. 4.4.2). So war beispielsweise die dramatische

Erhöhung der Infektiosität der *escape* Varianten durch die Kombination mit S₁₇₃A genauso nachweisbar wie die stark verminderte Infektiosität der RK-Variante. Dies bestätigt, dass die Auswirkungen der KK10-assoziierten Mutationen auf die Infektiosität von HIV-1, mit möglicherweise einer Ausnahme, keine Besonderheit von NL4-3 sind. Für die Variante SA könnte genau dies zutreffen. Die Mutation S₁₇₃A vermittelt im Vergleich zum jeweiligen Referenz-Wildtyp im Kontext des Gag-Konsensusvirus eine stark erhöhte Infektiosität im Vergleich zu der entsprechenden NL4-3 Variante (vergleiche Abb. 9 und 10 B). Trotz dieser Beobachtung steht mit dem (Gag-) Konsensusvirus nicht nur ein geeignetes Modellsystem zur Verfügung, die Auswirkung von *escape* oder auch Resistenzmutationen in Gag zu untersuchen, sondern auch die Möglichkeit die Aussagekraft der ermittelten Ergebnisse für die vollständige Population der *clade* B-Viren zu erhöhen. Wie oben beschrieben, ist dies möglich, weil der Verwandtschaftsgrad der Konsensussequenz mit einer beliebigen *clade* B HIV-1 Quasispezies-Sequenz im Schnitt höher ist als dies bei einem anderen *clade* B HIV-1 Laborstamm der Fall wäre. Dies stellt einen großen Vorteil bei der Verwendung des Konsensusvirus gegenüber einem einzelnen HIV-1 *clade* B-Laborstamm dar. Dies ist zwar eine allgemeinere Aussage, dafür hat sie die größere Vorhersagekraft. Für eine ausführlichere Darstellung der Konsensusviren wird auf die Dissertation von Sven Breitschwerdt verwiesen (in Arbeit).

5.1.3 Hinweise auf den molekularen Mechanismus der CsA-Abhängigkeit

Unter 4.4.1 und 4.4.3 wurde der Frage nachgegangen, ob dem Phänotyp der vier als CsA-abhängig beschriebenen Gag-Varianten T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K ein gemeinsamer molekularer Mechanismus zu Grunde liegen könnte. Hierzu lieferte ein Ansatz belastbare Hinweise, bei dem die *in vivo* kompensatorische Mutation S₁₇₃A für die *escape* Mutation R₂₆₄K mit den drei anderen Varianten kombiniert wurde (s. 4.4.1). Es zeigte sich, dass S₁₇₃A bei jeder dieser Mutationen die Infektiosität deutlich erhöhte und zu einer Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit führte, auch wenn für die Variante A₂₂₄E keine CsA-Abhängigkeit demonstriert werden konnte (s.u. und 4.4.1). Somit erwies sich die *in vivo* Mutation S₁₇₃A gleichsam als universeller Kompensator für den CsA-abhängigen Phänotyp. Dies ist insofern besonders bemerkenswert, da die vier Mutationen T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K nicht in benachbarten Strukturen von p24 liegen. Die Mutationen T₁₈₆A (Element der α -Helix 3 von p24) und R₂₆₄K (Element der α -Helix 7 von p24) befinden sich im zentralen Bereich der N-terminalen Hälfte von p24, wohingegen die beiden anderen Mutationen (A₂₂₄E und G₂₂₆D) in der CypA-Bindeschleife lokalisieren (Abb. 23 A und B). Somit ermöglichen die p24-Mutationen A₂₂₄E und G₂₂₆D im Bereich der CypA-Bindeschleife zwar potenziell einen Einfluss auf die Interaktion mit CypA, aber bedingt durch ihre Lage in der Tertiärstruktur von p24 erscheint eine Interaktion mit der Aminosäure an Position 173 unwahrscheinlich

(Abb. 23 A). Die Aminosäuren an den Positionen 186 und 264 wiederum befinden sich in räumlicher Nähe zur Position 173 (Element der α -Helix 2 von p24), was eine direkte Einflussnahme von $S_{173}A$ auf $T_{186}A$ bzw. $R_{264}K$ vorstellbar macht (Abb. 23 B). Jedoch ist nach wie vor nicht bekannt wie die Kompensation von der Mutation $S_{173}A$ vermittelt wird ebenso ist weiter unbekannt wie der CsA-abhängige Phänotyp durch die beiden Mutation überhaupt vermittelt wird.

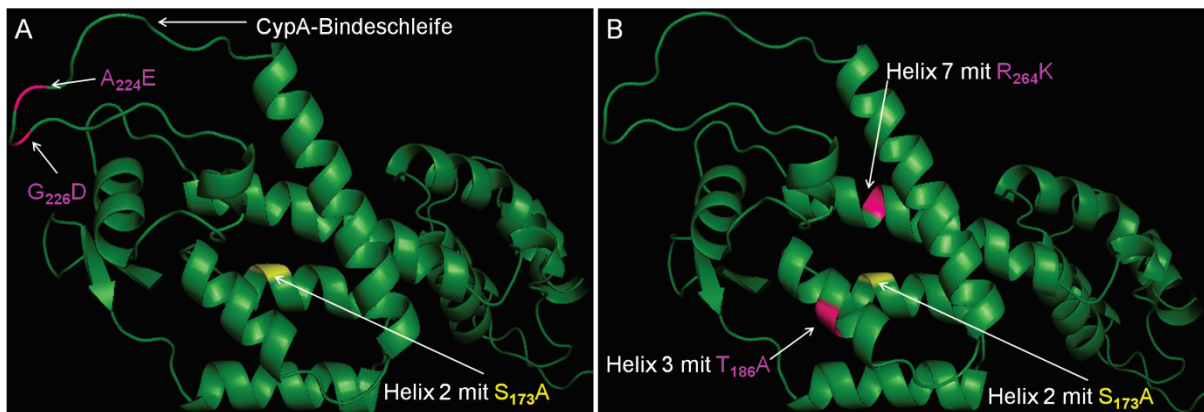


Abb. 23: Lokalisation der Mutationen mit CsA-abhängigen Phänotyp relativ zur sekundären Mutation $S_{173}A$.

In **A** und **B** wird je die Lokalisation von zwei der Mutationen gezeigt die einen CsA-abhängigen Phänotyp vermitteln (magenta) relativ zur universalen kompensatorisch wirkenden Mutation $S_{173}A$ (gelb). Die Berechnung der Struktur erfolgte durch das Analyseprogramm Modeller, die graphische Darstellung mit PyMol.

Die *escape* Mutation $R_{264}K$ ist zwar *in vivo* stark mit der Mutation $S_{173}A$ assoziiert, allerdings haben Aberham et al. zwei Mutationen ($V_{218}A$ und $A_{237}T$) beschrieben, die zumindest *in vitro* in der Lage sind die Infektiosität der RK-Variante in Gegenwart von CypA zu erhöhen¹²⁴. Die Fähigkeit dieser beiden Mutationen, den durch $R_{264}K$ vermittelten Defekt zu kompensieren war jedoch deutlich geringer als die von $S_{173}A$ (s. 4.4.3). Gleichwohl konnten die Defekte der Varianten $T_{186}A$, $A_{224}E$ bzw. $G_{226}D$ ebenfalls durch $V_{218}A$ und / oder $A_{237}T$ in der Mehrheit der Fälle kompensiert und die CypA-Abhängigkeit des Wildtyps wiederhergestellt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen älterer Arbeiten^{8,9,124}. Somit ist $S_{173}A$ *in vitro* nicht die einzige, aber die effizienteste der bislang bekannten Mutationen zur universalen Kompensation der CsA-abhängigen Varianten $T_{186}A$, $A_{224}E$, $G_{226}D$ und $R_{264}K$. Im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Ergebnissen^{124,9,10} erwies sich die Mutation $A_{224}E$, wie weiter oben erwähnt, in dieser Arbeit als nicht hinreichend zur Initiierung eines CsA-abhängigen Phänotyps (Abb. 9, weißer Balken). Der hier beobachtete Phänotyp, der durch die Mutation $A_{224}E$ alleine vermittelt wird, gleicht dem der CypA-unabhängigen Variante QVINA⁶. Beide Varianten infizieren die GXR25-Zellen in Gegenwart von CypA und in Gegenwart von CsA mit vergleichbarer Effizienz. Im Gegensatz zu der Variante QVINA⁶ weist die Variante $A_{224}E$ (Abb. 9, schwarzer Balken) allerdings eine stark verminderte Infektiosität gegenüber dem Wildtyp NL4-3 auf. Trotz der gezeigten CypA-Unabhängigkeit von $A_{224}E$ lässt sich die

Infektiosität in Kombination mit beispielsweise S₁₇₃A deutlich steigern was auch mit einer starken CypA-Abhängigkeit der kompensierten Variante einhergeht (Abb. 9, schwarzer und weißer Balken). Eine mögliche Ursache für den hier beobachteten und von den Daten von Aberham et al. abweichenden Phänotyp der Variante A₂₂₄E liegt möglicherweise im Versuchsaufbau. Die Experimente von Aberham et al. wurden beispielsweise in CD4-positiven HeLa-Zellen durchgeführt¹²⁴ im Unterschied zu den in dieser Arbeit verwendeten CD4-positiven T-Zellen der Linie GXR25. Da die Arbeiten von Aberham et al. auch im Kontext von NL4-3 durchgeführt wurden, ist ein auf das eingesetzte Virus zurückgehender Effekt relativ unwahrscheinlich. Somit konnten sowohl die Effekte der sekundären Mutationen V₂₁₈A und A₂₃₇T als auch die der CsA-Abhängigkeit vermittelnden Mutationen T₁₈₆A und G₂₂₆D in einem weniger artifiziellen System nachgewiesen werden (s. 4.4.3). Die freie Kombinierbarkeit der sekundären Mutationen mit den Mutationen T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K, die fast immer eine Verbesserung der Infektiosität und einen CypA-abhängigen Phänotyp zur Folge hat deutet zusammen mit den Ergebnissen der CsA-Titration (s. 4.5) auf einen sehr ähnlichen molekularen Mechanismus für die reduzierte Infektiosität der Varianten T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K hin. Abgesehen von A₂₂₄E unterscheiden sich die restlichen drei Varianten lediglich in der CsA-Konzentration, bei der die Infektion am effizientesten verläuft. Dies zeigt, dass es leicht unterschiedliche optimale CypA-/CsA-Konzentration für die Virusvarianten gibt. Die zugrundeliegende(n) Ursache(n) der Unterschiede lassen sich an Hand der gezeigten Daten jedoch nicht ermitteln. Bei einer CsA-Titration der S₁₇₃A kompensierten Varianten unterscheidet sich die *in vivo* dominante Variante SARK insofern von den *in vitro* Varianten, als dass sie relativ zum 0 µM-Wert schwächer auf steigende CsA-Konzentrationen reagiert, somit also weniger CypA-abhängig ist. Zusammenfassend sprechen diese geringen Unterschiede jedoch dafür, dass der reduzierten Infektiosität der vier Varianten höchstwahrscheinlich der gleiche grundsätzliche molekulare Mechanismus zu Grunde liegt.

In diese Indizienkette fügt sich auch ein Experiment ein, das die immunsuppressiven Effekte von CsA auf den CsA-abhängigen Phänotyp untersucht. Durch die Behandlung der Zellen mit FK-506 wurde ein Einfluss der immunsuppressiven Eigenschaften von CsA auf die in dieser Arbeit verwendeten GXR25-Zellen analysiert. Wie unter 4.6 beschrieben, ist FK-506 wie CsA eine niedermolekulare, immunsuppressive Substanz, die den gleichen Signalweg inhibiert wie CsA, allerdings nicht an CypA bindet^{131,134}. Die CsA-abhängigen Varianten erfahren durch eine Behandlung der Zellen mit FK-506 weder eine Zunahme der Infektiosität noch eine Wiederherstellung des CypA-abhängigen Phänotyps (s. 4.6). Somit kann eine dominierende Rolle der immunsuppressiven Wirkung von CsA auf die Kompensation der CsA-abhängigen Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Ferner kann der fehlende Einfluss von FK-506 bei allen vier Varianten als weiterer Hinweis für die

Ähnlichkeit des molekularen Mechanismus gewertet werden, der der CsA-Abhängigkeit zu Grunde liegt. Unterstützt wird diese Annahme durch eine Arbeit von Briggs et al., in der FK-506 im Gegensatz zu CsA keine Auswirkungen auf die Infizierbarkeit von H9-Zellen mit HIV-1 hat ¹⁴⁹. Diese Interpretation wird auch durch Arbeiten von Schneidewind et al. mit der RK-Variante in einer Jurkat CypA *knock out* Zelllinie unterstützt. Hier kann in Abwesenheit von CsA eine erhöhte Infektiosität der RK-Variante gegenüber den CypA-positiven Kontrollzellen gezeigt werden ⁷. Eine weitere bedeutsame Möglichkeit zur Überprüfung dieses Sachverhalts stellt die Infektion der Zellen in Gegenwart von Debio25 dar. Bei Debio25 handelt es sich um ein nicht-immunsuppressives CsA-Analogon der Firma Debiopharm. Matsuoka et al. zeigten, dass eine Kompensation CsA-abhängiger Varianten sowohl durch Inkubation mit Debio25 als auch mit CsA vermittelt werden konnte ¹⁵⁰. Bedenkt man die verschiedenen Ansatzpunkte all dieser Arbeiten, kann man davon ausgehen, dass die immunsuppressiven Eigenschaften von CsA keinen nachweisbaren Einfluss auf den CsA-abhängigen Phänotyp der untersuchten Virusvarianten haben.

Obwohl die Mutationen, die eine CsA-Abhängigkeit vermitteln, in zwei deutlich voneinander getrennten Abschnitten von p24 liegen (s.o.), wirkten sowohl S₁₇₃A als auch V₂₁₈A und A₂₃₇T universell als kompensatorische Mutation für die CsA-abhängigen Varianten T₁₈₆A, G₂₂₆D und R₂₆₄K. Für die Variante A₂₂₄E konnte eine CsA-Abhängigkeit aus unbekanntem Gründen zwar nicht bestätigt werden, dennoch ist der Defekt der durch A₂₂₄E vermittelt wird eindeutig mit S₁₇₃A, V₂₁₈A und A₂₃₇T zu kompensieren. Dabei gilt für alle vier Defektvarianten, dass das kompensatorische Potenzial der *in vivo* dominanten Mutation S₁₇₃A deutlich größer als das der *in vitro* Mutationen V₂₁₈A und A₂₃₇T ist (Tabelle 9 und s. 4.4.1 bzw. 4.4.3). Eine Behandlung der Zellen mit CsA zeigt zudem, dass mit einer Zunahme der Infektiosität immer - auch bei A₂₂₄E - eine Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit des Wildtyp-Virus einhergeht. Die leicht unterschiedlichen CsA-Optima der Gag-Varianten in der Titration mit CsA offenbarten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Varianten T₁₈₆A, G₂₂₆D und R₂₆₄K, für die eine CsA-Abhängigkeit demonstriert werden konnte. Darüber hinaus konnte nach dem Einsatz von FK-506 und dem Vergleich mit ähnlichen Arbeiten - wie oben beschrieben - ein Einfluss der immunsuppressiven Wirkung von CsA auf die untersuchten Virusvarianten in den behandelten Zellen nahezu ausgeschlossen werden.

Tabelle 9: S₁₇₃A vermittelt die beste Kompensation bei allen Defektmutanten

	T ₁₈₆ A	A ₂₂₄ E	G ₂₂₆ D	R ₂₆₄ K
ohne	--	-	-	--
S ₁₇₃ A	++	+++	+++	+++
V ₂₁₈ A	+	-	++	-
A ₂₃₇ T	++	+	+++	+
V ₂₁₈ A + A ₂₃₇ T	-	+	+	+

Gezeigt ist das kompensatorische Potential einer sekundären Mutation (Vertikale) wenn sie mit einer der Defektvarianten (Horizontale) kombiniert wird. „ohne“ demonstriert dabei die Infektiosität im Vergleich zum WT (relative Infektiosität; WT = 1) der Defektmutation-Variante alleine. Die Symbole kennzeichnen verschiedene Abstufungen der relativen Infektiosität: +++ relative Infektiosität zwischen 0,61 und 1. ++ relative Infektiosität zwischen 0,6 und 0,41. + relative Infektiosität zwischen 0,4 und 0,21. - relative Infektiosität zwischen 0,2 und 0,11. -- relative Infektiosität kleiner 0,11.

Zusammenfassend zeigt dieser Abschnitt, dass es belastbare Hinweise gibt, die dafür sprechen, dass die CsA-Abhängigkeit von drei der vier Gag-Varianten auf einem gemeinsamen Mechanismus beruht. Dass auch der Defekt von A₂₂₄E beispielsweise durch S₁₇₃A kompensierbar ist, unterstützt die Ansicht, dass es sich nicht um einen grundlegend anderen Mechanismus handelt, auch wenn in der vorliegenden Arbeit keine Beteiligung von CypA am Defekt von A₂₂₄E gezeigt werden konnte.

5.1.4 Alternative Möglichkeiten zur Kompensation des R₂₆₄K vermittelten Defekts

Die Charakterisierung der verschiedenen Mutationen, die in den beschriebenen Langzeitkulturen (s. 3.2.2.4) identifiziert wurden, erwiesen sich als ausgesprochen aufschlussreich (s. 4.7.1) bei der Suche nach der molekularen Ursache des durch R₂₆₄K vermittelten Defekts. Durch *in vivo* Gag-Sequenzen aus den Arbeiten von Granier et al. und Schneidewind et al. (s. 4.7.2) kann angenommen werden, dass es in sehr seltenen Fällen auch *in vivo* zu Mutationen an den hier beschriebenen Positionen kommen kann^{118,127}. Entsprechend war in beiden Arbeiten jeweils in einer der untersuchten Quasispezies die Mutation T₂₃₉V in Abwesenheit von S₁₇₃A vorhanden. Die guten kompensatorischen Eigenschaften von T₂₃₉I für die RK- und RKLK-Variante sind in Abb. 15 A und B gezeigt. Dies kann als Beleg dafür gewertet werden, dass es sich nicht um *in vitro* oder Zelllinienspezifische Effekte handelt. Auch die unterschiedlichen Substitutionen an Position A₂₃₇ (Abb. 11 bzw. 15) und V₂₁₈ (Abb. 11 und 12 bzw. 19) deuten darauf hin, dass nicht nur verschiedene Varianten an der gleichen Position zulässig sein können, sondern diese Substitutionen auch *in vivo* auftreten können⁶. Allerdings zeigen die Einzelvarianten der „sekundären“ Mutationen in den durchgeführten Untersuchungen zum Teil eine deutlich geringere Infektiosität im Vergleich zum Wildtyp NL4-3 als die Variante SA (Tabelle 10).

Dieser Befund könnte als eine hinreichende Begründung für die *in vivo* Dominanz der S₁₇₃A Mutation in Kombination mit R₂₆₄K interpretiert werden, allerdings sollten die Ergebnisse aus den GXR25-Zellen nicht ohne weiteres auf primäre Zellen (PBMCs) übertragen werden. Interessant wäre auch zu ermitteln, ob und zu welchem Anteil die alternativen kompensierenden Mutationen durch *deep sequencing* in Patientenmaterial nachgewiesen werden können.

Tabelle 10: Eigenschaften der alternativen sekundären Mutationen

	S ₁₇₃ A	L ₁₈₄ I	N ₂₀₆ D	A ₂₃₇ E	T ₂₃₉ I
ohne	+++	+	++	-	+++
R ₂₆₄ K	+++	++	+++	+++	+++

Gezeigt ist die Infektiosität im Vergleich zum WT (relative Infektiosität; WT = 1) von sekundären (kompensatorisch wirkenden) Mutation (Horizontale) alleine („ohne“) oder wenn sie mit der Defektvariante R₂₆₄K (Vertikale) kombiniert werden. Die Symbole kennzeichnen verschiedene Abstufungen der relativen Infektiosität: +++ relative Infektiosität zwischen 0,61 und 1. ++ relative Infektiosität zwischen 0,6 und 0,41. + relative Infektiosität zwischen 0,4 und 0,21. - relative Infektiosität zwischen 0,2 und 0,11. - - relative Infektiosität kleiner 0,11.

Wegen des sehr stark inhibierten Phänotyps der RK-Variante gehen Schneidewind et al. allerdings davon aus, dass das Auftreten der R₂₆₄K Mutation zeitlich eng mit dem Erwerb der kompensierenden Mutation (typischerweise S₁₇₃A) gekoppelt ist, auch wenn es auf Grund der geringen Fallzahl nicht sicher belegt werden kann⁷. Zudem fehlen weitere zugängliche Studien um diese Aussage besser untermauern zu können. Eine zeitgleiche Mutation an beiden Positionen im selben Genom dürfte auf Grund der statistisch geringen Wahrscheinlichkeit *in vivo* keine große Rolle spielen. Somit sind „sekundäre“ Mutationen im Vorteil, die nur geringe Kosten bzw. geringe negative Einflüsse mit sich bringen. Zudem tritt nicht jede Substitution an einer Position mit derselben Wahrscheinlichkeit auf, auch dann nicht, wenn jeweils nur ein Nukleotid ausgetauscht werden muss. So wird das Auftreten der R₂₆₄K Mutation (AGA → AAA) *in vivo* gegenüber den selteneren alternativen Mutationen an der Position R₂₆₄ (s. 2.4.3.1) auch durch die Bevorzugung eines Austausches von Guanin gegenüber Adenin begünstigt^{151,114,152}. Dieser Effekt könnte *in vivo* auch das Auftreten der hier untersuchten Mutationen jeweils positiv oder negativ beeinflussen und so zur Dominanz von S₁₇₃A *in vivo* beitragen. Gleichwohl muss auch beachtet werden, dass zumindest ein Teil der untersuchten kompensatorisch wirkenden Mutationen unter Umständen gerade im Kontext von NL4-3 besonders gut wirken könnte. Dies sollte sich beispielsweise durch Einbringen der jeweiligen Mutationen in das Gag-Konsensusvirus (s. 5.1.2) in einer ersten Annäherung gut untersuchen lassen.

Die Untersuchung von *in vivo* Mutationen, die in Virussequenzen mit der R₂₆₄K *escape* Mutation des KK10-Epitops, jedoch ohne S₁₇₃A, identifiziert wurden (s. 4.7.2), liefert keine geeignete Erklärung für das Fehlen der Mutation S₁₇₃A. Bestimmte Kombinationen der

untersuchten Mutationen erhöhen zwar die Infektiosität relativ zum WT NL4-3, aber es kommt zu keiner ausgeprägten Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit, wie dies typischerweise durch S₁₇₃A oder eine der unter 4.7.1 beschriebenen alternativen *in vitro* kompensatorischen Mutationen der Fall ist. Hinzu kommt, dass die Infektiosität bei einzelnen Varianten auch in Gegenwart von CsA zunimmt. Bedingt durch die relativ große Streuung der Messwerte handelt es sich hierbei jedoch eher um eine Tendenz. Möglicherweise ist eine Reversion der CsA-Abhängigkeit *in vivo* auch nicht mehr zwingend erforderlich, sobald ein gewisses Maß an Infektiosität durch alternative, eventuell schon im *founder* Virus vorhandene Mutationen gewährleistet wird. Die durch den Wegfall der gegen das KK10-Epitop gerichteten CTL-Antwort bedingten Vorteile für das Virus überwiegen demnach die Nachteile durch die suboptimale Kompensation des R₂₆₄K-vermittelten Defektes. Der nachweislich starke Immunselektionsdruck *in vivo* durch die gegen das KK10-Epitop gerichtete CTL-Antwort ist im Einklang mit dieser Hypothese. Dies konnte *in vitro* mit Ko-Kultorexperimenten von HLA-B*27-positiven GXR25-Zellen mit KK10-spezifischen CTLs gezeigt werden ¹¹⁴. Da mit Wildtyp NL4-3 infizierte Zellen im Gegensatz zu mit der RK-Variante infizierte Zellen von den CTLs lysiert werden können sank die Anzahl lebender, mit Wildtyp NL4-3 infizierter GXR25-Zellen auf das Niveau der mit der RK-Variante infizierten Zellen ab ¹¹⁴. In Fällen wie der viralen *in vivo* Sequenz F7148 ⁶ wäre eine Analyse der Virusevolution auf jeden Fall interessant, um eine mögliche Etablierung der S₁₇₃A Mutation (oder eine der hier vorgestellten alternativen *in vitro* Mutationen) im weiteren Verlauf der Infektion zu verfolgen. Unabhängig davon sind allerdings auch weitere Möglichkeiten denkbar. Beispielsweise könnte sich die Mutation S₁₇₃A in Gegenwart bestimmter *founder* Virus-Mutationen auch als nachteilig erweisen, da sie die Fitness des entsprechenden Virus entweder direkt (z.B. über eine geringere Replikationskompetenz) oder indirekt beeinträchtigt, indem sie zur Entstehung eines neuen CTL-Epitops im HLA-Kontext des infizierten Individuums führt. Diese beiden Erklärungsversuche dürften allerdings nur in vergleichsweise wenigen Fällen zum Tragen kommen und fügen sich somit in das Bild der beobachteten *in vivo* Dominanz von S₁₇₃A ein.

5.1.5 Analyse der p24-Strukturmodelle

Die mit Hilfe des *homology modelling* berechneten Modelle der p24 Struktur (s. 4.9, Abb. 21) offenbaren keine auffälligen strukturellen Unterschiede der vier Varianten T₁₈₆A, G₂₂₆D, A₂₂₄E und R₂₆₄K untereinander und gegenüber dem Modell der NL4-3 Struktur. Dies gilt auch für die mit den sekundären Mutationen S₁₇₃A, L₁₈₄I, N₂₀₆D, und T₂₃₉I in An- und Abwesenheit der Mutation R₂₆₄K (Abb. 21 und nicht gezeigte Daten). Dennoch kann dies eine Beteiligung struktureller Änderungen am CsA-abhängigen Phänotyp bzw. der Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit nicht vollständig ausschließen. Allerdings weisen die berechneten

discrete optimised protein energy (DOPE-) scores (Bewertung der Konformations-Energie der p24-Varianten), die im Rahmen des *homology modelling* berechnet werden, bei keiner der untersuchten Varianten auffällige Schwankungen auf. Derartige Schwankungen wären ein Hinweis auf Veränderungen in der Proteinstruktur. Ferner bestätigen auch die durch I-Tasser berechneten *de novo* Strukturmodelle von NL4-3, sowie den Varianten RK und SARK, die Modelle nach dem *homology modelling* Verfahren, so dass es keine Hinweise für Konformationsänderungen auf Grund der analysierten Punktmutationen gibt. Darüber hinaus ist keine der oben genannten Aminosäuren an der Stabilisierung der Hexamerstruktur beteiligt, die durch Wechselwirkungen von Aminosäuren der α -Helices 1 und 2 mit Aminosäuren der α -Helix 3 des benachbarten Monomers vermittelt wird²³. Allerdings kann eine veränderte Wechselwirkung mit CypA oder anderen p24-Interaktionspartnern, wie CypB³⁸ oder TRIM5 α ⁴³ auf diese Weise nicht ausgeschlossen werden. Auch besteht die Möglichkeit, dass die Mutationen negative Auswirkungen auf die Struktur des Polyproteins Gag Pr55 haben und so beispielsweise die Multimerisierung der immaturren Kapsidstruktur behindern. Untersuchungen am Manson-Pfizer-Affenvirus, das, wie alle Retroviren, wegen des hohen Konservierungsgrads eine sehr ähnliche Gag-Struktur wie HIV-1 besitzt, können in dieses bisher wenig untersuchte Feld Einblicke verschaffen¹⁵³. An der Bildung der Hexamere im immaturren Kapsid sind demnach nur Interaktionen zwischen den C-terminalen Domänen beteiligt, wohingegen Kontakte der N-terminalen Domänen im Bereich der α -Helices 4 bis 7 bei inter-Hexamer-Interaktionen eine Rolle spielen. Interessanterweise ist die Situation im maturated Kapsid genau andersherum¹⁵³. Eine Rolle der hier untersuchten Mutationen im Reifungsprozess des Kapsids kann nach derzeitiger Datenlage nicht ausgeschlossen werden, es wurden jedoch keine Hinweise in der Literatur gefunden das nahelegen.

Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es nur zwei Bereiche von p24, in denen Punktmutationen einen CsA-abhängigen Phänotyp vermitteln können (s.o.). Dabei handelt es sich um die CypA-Bindeschleife (A₂₂₄E und G₂₂₆D) und um den zentralen Bereich mit den α -Helices 3 und 7 (T₁₈₆A und R₂₆₄K) (Abb. 24 und 25). Die Bindung von CypA an die CypA-Bindeschleife von p24 vermittelt Bewegungen der α -Helices 1, 2, 4 und 6^{35,154}, nicht aber von α -Helix 3 und 7, wo die Mutationen T₁₈₆A bzw. R₂₆₄K den CsA-abhängigen Phänotyp vermitteln. Obwohl keine der beiden Mutationen eine Veränderung der Tertiärstruktur hervorzurufen scheint (Abb. 21 und nicht gezeigte Daten), verändern sie den durch eine Bindung von CypA induzierten Effekt derart, dass die Infektiosität des Virus reduziert wird (Abb. 9). Das gleiche gilt für die Mutationen A₂₂₄E und G₂₂₆D in der CypA-Bindeschleife; im Bezug auf die in dieser Arbeit nicht bestätigte CsA-Abhängigkeit der Variante A₂₂₄E sei nochmals auf 4.4.1 und 4.4.3 verwiesen. Die *in-silico*-Analysen geben auch hier keine Hinweise auf eine Änderung der Tertiärstruktur (s. 4.9). Allerdings gibt es mehrere Mutationen im Bereich der CypA-

Bindeschleife die zum Teil einen gravierenden Einfluss auf die Interaktion von p24 mit CypA haben, da hier natürlich nicht nur die räumliche Struktur ausschlaggebend ist sondern auch die chemischen Eigenschaften der Aminosäureseitenketten. Beispielsweise wird für die Mutationen H₂₁₉Q ein Einfluss auf die Struktur der CypA-Bindeschleife diskutiert¹⁵⁵ und eine Mutation an Position 222 (P₂₂₂A) führt zu einem vollständigen Verlust der CypA-p24 Interaktion¹⁵⁶. Passend hierzu ist für die Aminosäure A₂₂₄ eine direkte Beteiligung an der Interaktion mit CypA beschrieben¹⁵⁴. Desweiteren wurde für die Mutation A₂₂₄E *in vitro* eine Zelllinien-abhängige verschlechterte Interaktion von p24-Proteinen beschrieben, die in Gegenwart von CsA oder in Kombination mit P₂₂₂A partiell kompensiert werden kann³⁴. Über mögliche Auswirkungen einzelner Punktmutationen im N-terminalen Bereich von p24 auf die Bildung der p24-Penta- und -Hexamere bzw. der Kapsidstruktur insgesamt ist keine eindeutige Aussage möglich. Für die Kapsidbildung ist der N-terminale Teil von p24 (Aminosäuren 127-277) zwar nicht zwingend notwendig¹⁵⁷, jedoch können Punktmutationen in diesem Bereich die Zahl der gebildeten Partikel auch um den Faktor 20 senken¹⁴². Da die α -Helices 3 und 7 nach bisherigem Wissen jedoch nicht mit CypA interagieren und auch ihre räumliche Position von CypA unabhängig ist, erscheint ein direkter Einfluss der Mutationen T₁₈₆A und R₂₆₄K auf die Interaktion mit CypA als unwahrscheinlich.

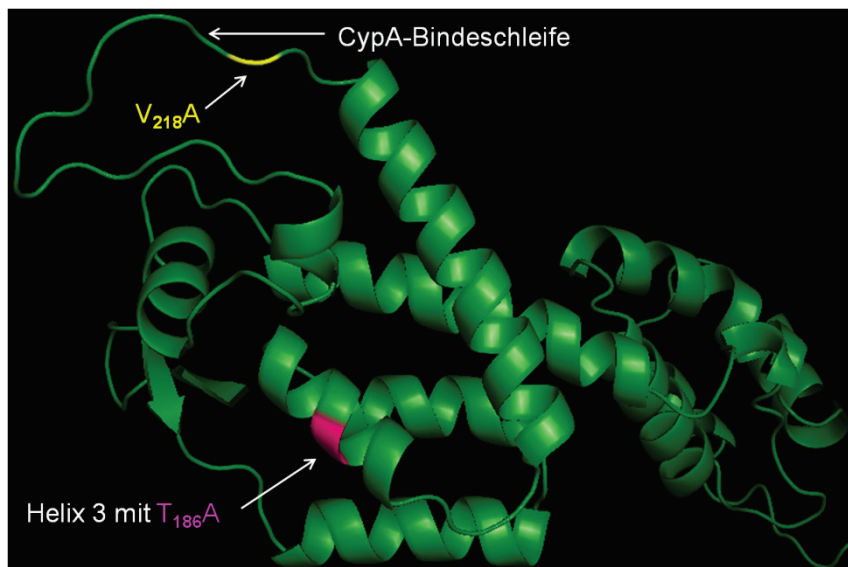


Abb. 24: Beispiel für die räumliche Unabhängigkeit von Defektmutation (T₁₈₆A) und kompensatorisch wirkender Mutation (V₂₁₈A).

Auf der N-terminalen Domäne von p24 (grün) ist die kompensatorisch wirkende Mutation V₂₁₈A (gelb) und die CsA-abhängige Defektmutation T₁₈₆A (magenta) markiert (s. 4.4.3). Die Berechnung der Struktur erfolgte durch das Analyseprogramm Modeller, die graphische Darstellung mit PyMol.

Es konnten deutliche Hinweise gesammelt werden, dass die räumliche Lage der kompensatorisch wirkenden Mutationen und der Defektmutationen T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D bzw. R₂₆₄K kein entscheidender Faktor zu sein scheint. Als Beispiel sei hier die Kompensation von

T₁₈₆A (α -Helix 3) durch V₂₁₈A/M (CypA-Bindeschleife) aufgeführt (Abb. 24). Betrachtet man jedoch die *in vivo* relevante R₂₆₄K-Mutation, so wird ersichtlich, dass alle *in vitro* gut kompensierenden Mutationen in der Tertiärstruktur gegenüber der α -Helix 7 angeordnet sind (Abb. 25). Dies spricht dafür, dass diesem Bereich von p24 bei der Kompensation des R₂₆₄K-vermittelten Defekts erhebliche Bedeutung zukommt und die Lokalisation der kompensatorisch wirkenden Mutationen nicht ohne Bedeutung ist. Zwar wurde nicht ermittelt, ob L₁₈₄I, N₂₀₆D, A₂₃₇T und T₂₃₉I eine kompensierende Wirkung auf die drei *in vitro* CsA-abhängigen Varianten haben, aber die Austauschbarkeit der kompensatorisch wirkenden Mutation, die unter 4.4.1 und 4.4.3 gezeigt wird, lässt dies möglich erscheinen.

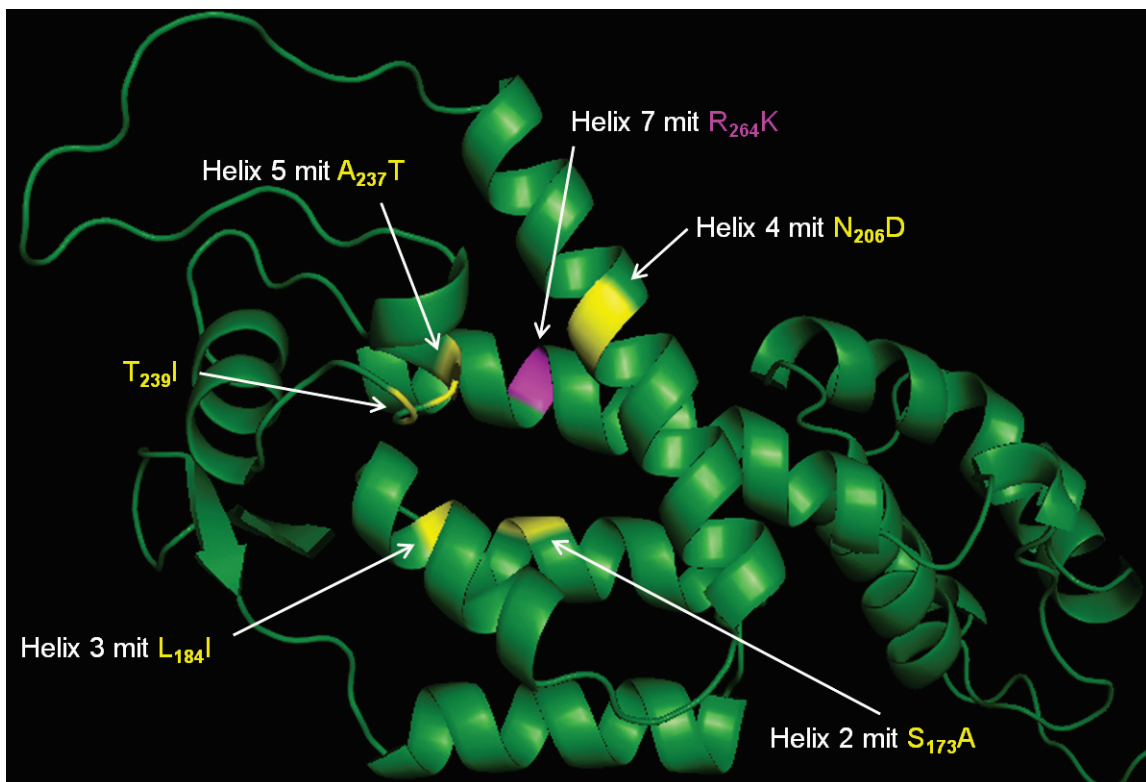


Abb. 25: Gehäuftes Auftreten der kompensatorischen Mutationen für die defiziente R₂₆₄K Mutation in der Region der α -Helices 2 bis 5 in der N-terminalen Hälfte von p24.

Auf der N-terminalen Hälfte von p24 (grün) sind die Positionen (gelb) markiert, an denen Punktmutationen eine Kompensation des R₂₆₄K vermittelten Defekts bewirken können (s. 4.7.1). Die Berechnung der Struktur erfolgte durch das Analyseprogramm Modeller, die graphische Darstellung mit PyMol.

Die hier diskutierten Daten lassen somit auf einen sehr ähnlichen Mechanismus für den Defekt bzw. die CsA-Abhängigkeit der vier Virusvarianten T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K schließen. Genau in diesem Punkt liegt jedoch ein entscheidendes Problem: Gerade die demonstrierte Austauschbarkeit der kompensatorisch wirkenden Mutationen macht es schwer, ein grundlegendes Muster zu erkennen das zur Kompensation der Defekt-Mutationen führt, da die Punktmutationen T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K in der Tertiärstruktur zum Teil weit voneinander entfernt sind. Basierend auf den beschriebenen und

recherchierten Daten lassen sich spekulative Überlegungen anstellen. Beispielsweise könnte ein drittes unbekanntes (zelluläres) Protein involviert sein, dessen Interaktionsbereich mit p24 diese beiden α -Helices umfasst, und das auf nicht bekannte Weise die CypA-p24 Interaktion beeinflusst oder verändert. Eine Alternative zu diesen Überlegungen wäre, dass die Bindung bzw. enzymatische Aktivität von CypA oder einem möglichen dritten Interaktionspartner einen nachteiligen Effekt vermittelt, falls sich die p24-Sequenz in den α -Helices 3 oder 7 mit T₁₈₆A bzw. R₂₆₄K ändert. Beispielsweise könnte es zu veränderten Interaktionen mit den benachbarten α -Helices 2 bis 5 kommen. In dieses Bild fügen sich sowohl die *in vivo* relevante S₁₇₃A Mutation als auch die unter 4.7.1 beschriebenen alternativen *in vitro* kompensatorisch wirkenden Mutationen ein, weil sie sich auf exakt diesen α -Helices befinden. Wie allerdings die beiden CsA-abhängigen Varianten A₂₂₄E und G₂₂₆D mit in diese beiden Modelle passen, ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch unklar. In den vergangenen beiden Jahren sind einige Publikationen erschienen, welche die hier angesprochenen Mutationen in Bezug zu zellulären Proteinen abseits von CypA stellen und ein tieferes Verständnis der hier gezeigten Daten ermöglichen. Zum einen wird für einen Teil der hier beschriebenen Mutationen ein Zusammenhang zu dem zellulären Restriktionsfaktor TRIM5 α (s. 5.2) hergestellt ^{127,158}, dem bisher bei HIV-1 vergleichsweise wenig Bedeutung zugemessen wurde. Zum anderen wurden weitere Interaktionspartner für die CypA-Bindeschleife bzw. p24 identifiziert, die die Translokation des Kapsids in den Zellkern und sogar die Integration des viralen DNA-Genoms in das Wirtszellgenom entscheidend mit beeinflussen (s. 5.3) ^{36,40}. Desweiteren ist mittlerweile ein weiterer p24-Interaktionspartner identifiziert worden, der wie oben spekuliert im Bereich der α -Helices 3 bis 5 bindet. In einer kürzlich erschienen Arbeit wurden zudem die hier vorgestellten Ergebnisse und Hypothesen im direkten Zusammenspiel mit diesem Interaktionspartner bestätigt (s. 5.4) ¹⁵⁹.

5.2 Veränderte Proteininteraktionen mit p24 bei Kapsidvarianten

5.2.1 HLA-B*27 / -B*57-assoziierte Mutationen und TRIM5 α

Eine Reihe von Veröffentlichungen in den letzten Jahren demonstriert, dass es einen Zusammenhang zwischen CypA und dem zellulären Restriktionsfaktor TRIM5 α gibt (s. 2.3.2.2). Dabei wurde gezeigt, dass einige Mutationen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang mit der Defektmutation R₂₆₄K untersucht wurden (S₁₇₃A, V₂₁₈A, H₂₁₉Q, I₂₂₃V, M₂₂₈I, T₂₄₂N, G₂₄₈A; s. 4.4.1 und 4.7.2), auch die Sensitivität gegenüber einer Restriktion durch TRIM5 α beeinflussen können. Battivelli et al. zeigten an Hand von Viren mit Gag/Pol Sequenzen aus unterschiedlichen Patientenisolaten, dass die Interaktion von CypA mit dem viralen Kapsid die Sensitivität gegenüber TRIM5 α beeinflusst. Wird CypA

durch das nicht immunsuppressive CsA-Analogon Debio25 gehemmt, steigt in der Regel die Sensitivität des untersuchten Virus gegenüber TRIM5 α ⁵⁶. Diese Beobachtung steht im Einklang zu der u.a. hier demonstrierten CypA-Abhängigkeit von HIV-1 (s. 4.4). Wie eingangs erwähnt (s. 2.3.2.2) sind aber gerade Laborstämme wie NL4-3 relativ TRIM5 α -resistent, weswegen die hier beschriebenen Effekt nicht alleine durch eine Änderung der Sensitivität gegenüber TRIM5 α erklärbar sein dürften. Für die Sensitivität gegenüber TRIM5 α spielen zudem auch die jeweils exprimierten TRIM5 α -Allele eine Rolle ^{56,160}. Aus den Ergebnissen ihrer Arbeit folgerten Battivelli et al., dass die Kapsidstabilität und die Infektiosität der untersuchten HI-Viren von mindestens drei Faktoren abhängig ist: Der spezifischen Sequenz des viralen Kapsids, der Anwesenheit von CypA und den exprimierten TRIM5 α -Allelen ⁵⁶. Wie oben bereits angemerkt wurde konnte unabhängig von CypA gezeigt werden, dass mit dem *escape* des KK10- oder TW10-Epitops assoziierte Mutationen Auswirkungen auf die Sensitivität gegenüber TRIM5 α haben können. Dies wurde von Battivelli et al. für die Mutationen S₁₇₃A/T, V₂₁₈A, H₂₁₉Q, I₂₂₃V, M₂₂₈L, T₂₄₂N, G₂₄₈A, R₂₆₄K und L₂₆₈M demonstriert. Allerdings scheint der Einfluss dieser Mutationen auf die Sensitivität gegenüber TRIM5 α stark vom Kontext der individuellen Gag-Sequenz abzuhängen. Bei einem TRIM5 α -sensitiven Virusisolat kann die Reversion einzelner Mutationen zu einem deutlichem Rückgang der Sensitivität führen, wohingegen die gleichen Reversionen bei TRIM5 α -resistenten Isolaten keine oder nur eine schwache Abnahme der Sensitivität gegenüber TRIM5 α bewirken ¹⁵⁸. Eine Vorhersage über die TRIM5 α -Sensitivität eines Virus auf Grund bestimmter Mutationen und der daraus resultierenden Infektiosität kann bisher nicht getroffen werden ¹⁵⁸. Diese Kontextabhängigkeit der Wirkung dieser Mutationen im Zusammenhang mit TRIM5 α steht allerdings im Widerspruch mit der Häufigkeit mit der diese Mutationen in Viren HLA-B*27- bzw. -B*57-positiver Patienten nachgewiesen werden ^{6,7,98}. In einer weiteren Studie wurde untersucht, ob die Sensitivität gegenüber TRIM5 α bei HLA-B*27- und -B*57-positiven Patienten einen Einfluss auf eine mögliche Kontrolle der HIV-Infektion hat. Es konnte gezeigt werden, dass die TRIM5 α -Sensitivität eines Virus und die Viruslast bei nicht virämischen HLA-B*27- oder B*57-positiven Patienten (*Controller*) im Vergleich zu HLA-B*27- oder B*57-negativen Patienten in einer signifikant negativen Korrelation zueinander stehen ¹²⁷. Bei HLA-B*57-positiven Patienten dieser Studie wurde die Sensitivität gegenüber TRIM5 α durch die dominante *escape* Mutation des TW10-Epitops T₂₄₂N vermittelt. Die assoziierten Mutationen im Bereich der CypA-Bindeschleife (H₂₁₉Q, I₂₂₃V und M₂₂₈L/I) hatten bei den Isolaten dieser Studie in Gegenwart von T₂₄₂N keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber TRIM5 α ¹²⁷. Genauso wenig konnte unter 4.7.2 eine effiziente Kompensation der RK-Variante durch diese Mutationen gezeigt werden. Ferner konnte bei den Viren von HLA-B*27-positiven Patienten von Granier et al. keine signifikante Korrelation

zwischen spezifischen Mutationen und der TRIM5 α -Sensitivität gezeigt werden, was hier jedoch auch der geringen Patientenzahl in der Studie geschuldet sein könnte. Jedoch zeigten alle analysierten Viren dieser HLA-B*27-positiven Patienten grundsätzlich eine erhöhte Sensitivität gegenüber TRIM5 α ¹²⁷. Die Autoren kamen deshalb zu dem Schluss, dass die Sensitivität der viralen Quasispezies gegenüber TRIM5 α bei HLA-B*27-positiven Individuen ein Faktor sein kann, der bei der Kontrolle der HIV-Infektion beteiligt ist ¹²⁷. Obwohl es für die beobachteten Sequenz-abhängigen Auswirkungen der untersuchten Mutationen noch keine Erklärung gibt, unterstreichen diese Ergebnisse, dass die gleichen CTL-assoziierten *escape* Mutationen bzw. die jeweiligen begleitenden Mutationen sowohl CypA-abhängige als auch TRIM5 α -abhängige Effekte vermitteln können ^{150,56,127}. Dies wird im Detail für die HLA-B*57-assoziierte *escape* Mutation T₂₄₂N des TW10-Epitops gezeigt ¹²⁷. Die Mutation T₂₄₂N verhindert zusammen mit G₂₄₈A eine effiziente Bindung des TW10-Epitops an HLA-B*57. Dabei vermittelt die Mutation T₂₄₂N eine moderat verminderte Replikationskapazität, die mit einer erhöhten Abhängigkeit von CypA einhergeht ^{119,6}. Granier et al. konnten zeigen, dass die T₂₄₂N Mutation eine Zunahme der TRIM5 α -Sensitivität vermittelt und nicht nur die beschriebene CypA-Sensitivität ⁶. Jedoch kann diese Sensitivität gegenüber TRIM5 α durch die Mutation G₂₄₈A kompensiert werden ¹²⁷. Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll die vielfältigen Auswirkungen, die ein starker Immunselektionsdruck, in diesem Fall ein TW10-spezifischer CTL-Klon, erzeugen kann. Die Mutation G₂₄₈A wurde zusammen mit anderen Mutationen, die mit dem *escape* des TW10-Epitops assoziiert sind, in einigen HIV-1 *in vivo* Sequenzen HLA-B*27-positiver Individuen identifiziert, die eine R₂₆₄K Mutation in Abwesenheit der S₁₇₃A Mutation aufweisen. Zwar konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein überzeugender Anhaltspunkt für eine effektive kompensatorische Wirkung der TW10-assoziierten Mutationen für die RK-Variante gezeigt werden, aber das schließt nicht aus, dass diese Mutationen *in vivo* essentiell für die betreffenden Viren sind. Dies könnte auch eine *in vivo* Reduktion der TRIM5 α -Sensitivität einschließen. In dem hier verwendeten Versuchsaufbau, der mit NL4-3 bzw. NL4-3-Varianten arbeitet, würde ein derartiger Effekt nicht auffallen, da es sich bei NL4-3 laut Granier et al. um ein relativ TRIM5 α -resistentes Virus handelt ¹²⁷. Zudem ist der Einfluss einer Punktmutation, wie oben bereits erwähnt, in TRIM5 α -resistenten Viren nur schwach oder gar nicht nachweisbar ⁵⁶.

Die hier beschriebene doppelte Funktion von *escape* Mutationen (z.B.: T₂₄₂N) und ihren assoziierten Mutationen (z.B.: G₂₄₈A) in Bezug auf CypA und TRIM5 α legt nahe, dass TRIM5 α trotz seiner geringen restriktiven Fähigkeiten gegenüber vielen HIV-1-Isolaten bei der langanhaltenden Kontrolle von HIV-1 eine bisher unterschätzte Rolle spielen könnte. Demnach kann TRIM5 α die Entwicklung von *escape* oder assoziierten kompensatorisch wirkenden Mutationen beeinträchtigt ¹²⁷.

5.2.2 Effekte der CypA-p24 Bindung auf Translokation und Integration

Wie eingangs beschrieben interagiert das virale Kapsid nicht nur mit CypA. Um ruhende Zellen effizient infizieren zu können muss HIV-1 die Kernmembran überwinden und bedient sich dazu weiterer zellulären Proteine (s. 2.3.2.1). Schaller et al. konnten demonstrieren, dass unter anderem das Kernporenpotein Nup358 an diesem Prozess beteiligt ist. Sie konnten zudem zeigen, dass eine Hemmung von CypA die Abhängigkeit von Nup358 reduziert. CypA scheint demnach einen gewissen Einfluss auf die Wahl des vom HIV-1-Genom verwendeten Importmechanismus in den Nukleus zu haben⁴⁰. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das zytoplasmatische Protein CypA einen Einfluss auf den Integrationsort des HIV-1-Genoms hat⁴⁰. Genome von HIV-1-Varianten, die CypA z.B. auf Grund der p24-Mutation P₂₂₂A nicht binden können integrieren an Loci höherer Transkriptionsaktivität als Wildtyp HIV-1. Das gleiche gilt für Wildtyp HIV-1 in Gegenwart von CsA. Andere Mutationen, darunter die Kapsidmutation N₂₀₆D, vermitteln eine Integration an Loci mit reduzierter transkriptioneller Aktivität. Beide Situationen weisen *in vitro* im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Replikationskapazität auf⁴⁰. Übereinstimmend hiermit ist die Infektiosität der Variante N₂₀₆D gegenüber dem NL4-3 Wildtyp um ca. 60% vermindert (s. 4.7.1). Die Tatsache, dass N₂₀₆D *in vitro* den von R₂₆₄K vermittelten Defekt kompensiert, könnte der Argumentationslinie von Schaller et al. folgend bedeuten, dass die Position R₂₆₄ auf noch nicht bekannte Art und Weise indirekt mit der Wahl des Integrationslokus des HIV-1-Genoms verbunden ist. Demnach könnte der Defekt der RK-Variante zumindest teilweise von einem ungünstigen Integrationsort des HIV-1-Genoms herrühren. Mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Assay zur Bestimmung der relativen Infektiosität der verschiedenen Virusvarianten (s. 3.2.2.1 und 3.2.2.2), kann jedoch keine derart präzise Aussage getroffen werden, da nur die Anzahl infizierter Zellen gemessen wird. Es wurde auf Grund der zahlreichen analysierten Varianten nicht weiter untersucht wo im viralen Replikationszyklus eine gegebene Punktmutation einen Block oder negativen Effekt vermittelt (s. 5.1.1). Die Arbeit von Schaller et al. ist allerdings noch aus einem weiteren Grund interessant. Es wurde gezeigt, dass ein chimäres NL4-3 Virus (gag/pol von NL4-3; env vom R5-tropen Stammes BA-L) mit der Gag-Mutation N₂₀₆D sowohl in HeLa TZM-bl (Subzelllinie der humanen Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa (CD4⁺, CCR5⁺)) als auch in aus primären humanen Monozyten generierten Makrophagen (MDMs, *monocyte derived macrophages*) nahezu replikationsinkompetent ist. Nachdem CCR5-positive Zellen in der Regel die primären Wirtszellen von HIV-1 sind, könnte dieses Ergebnis von Schaller et al. erklären, warum N₂₀₆D *in vivo* nicht mit R₂₆₄K assoziiert ist. Obwohl die NL4-3 Variante mit N₂₀₆D on R₂₆₄K in der T-Zelllinie GXR25 (CD4⁺, CXCR4⁺) deutliche kompensatorische Eigenschaften für den R₂₆₄K vermittelten Defekt aufweist, die durchaus mit denen der *in vivo* auftretenden S₁₇₃A Mutation vergleichbar sind. Dieser Sachverhalt ist in 4.7.1 dargestellt. Es

wäre interessant zu ermitteln, ob diese Variante bei Patienten mit X4-tropen Viren nachzuweisen ist.

Neben Nup358 spielt auch das Protein Transportin 3 (TNPO3) eine wichtige Rolle bei der Translokation des viralen Genoms bzw. beim geordneten Zerfall des Kapsids. TNPO3 bewirkt laut Shah et al. eine Destabilisierung des viralen Kapsids, die einer Kapsid-stabilisierenden Wirkung von CypA entgegenwirkt³⁶. In Übereinstimmung hierzu ist bei einem TNPO3 *knock down* die Infektiosität von NL4-3 in Gegenwart von CsA um den Faktor vier erhöht. Dies wird mit der Inhibierung der Kapsid-stabilisierenden Wirkung von CypA durch CsA erklärt³⁶. Die beobachtete reduzierte Infektiosität in Abwesenheit von TNPO3 wurde von Shah et al. zudem mit einer Rolle von TNPO3 bei der Integration des viralen Genoms in Verbindung gebracht, da in Gegenwart eines Integraseinhibitors eine Akkumulation von nicht integrierter proviraler DNA (*2-long terminal repeat circles* (2-LTR-*circles*)) im Nukleus beobachtet wurde. Shah et al. zeigten auch, dass Mutationen an Position 139 und 206 von p24 (T₁₃₉I bzw. N₂₀₆D) nicht durch einen TNPO3 *knock down* inhibiert werden. Auch ist die Variante mit der Mutation N₂₀₆D weniger empfänglich für einen TNPO3-vermittelten Zerfall des Kapsids, obwohl sie keine Auswirkungen auf dessen intrinsische Stabilität hat³⁶. Unter 5.1.4 wird die Fähigkeit einiger Mutationen (z.B.: N₂₀₆D) diskutiert den durch R₂₆₄K vermittelten Defekt *in vitro* vergleichbar gut zu kompensieren wie die *in vivo* Mutation S₁₇₃A (s. 4.7.1). In den hier genannten Arbeiten wird beschrieben, dass vor allem die Mutation N₂₀₆D *in vitro* die Interaktion von p24 mit den Proteinen Nup358 und TNPO3 beeinflusst und HIV-1 von diesen Faktoren weitgehend unabhängig macht^{36,40}. Damit ist jedoch auch verbunden, dass die R5-trope HIV-1 N₂₀₆D-Variante in MDMs nahezu nicht mehr infektiös ist⁴⁰. Wohingegen die Infektiosität der X4-tropen NL4-3 N₂₀₆D-Variante in der hier verwendeten T-Zelllinie GXR25 im Vergleich zum WT bei 45% liegt (s. 4.7.1). Dies deutet darauf hin, dass der Defekt von R₂₆₄K über CypA nicht nur an den Zerfall des Kapsids gekoppelt ist, sondern auch an die Prozesse der Translokation und der Integration des viralen Genoms. Auf Grunde der gegenläufigen Datenlage zu der Mutation N₂₀₆D in R5- bzw. X4-positiven Zellen muss auch weiter untersucht werden, ob Zelltyp-abhängige Effekt bestimmte Mutationen favorisieren.

5.2.3 Die Interaktion des cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 (CPSF6) mit dem viralem Kapsid

Die unter 5.2.1 und 5.2.2 aufgeführten und diskutierten Arbeiten liefern deutliche Hinweise, dass das Kapsid nicht nur das virale Genom mit seinen assoziierten Enzymen schützt, sondern auch über die Interaktion mit Proteinen der Wirtszelle einen Einfluss auf nachfolgende Schritte im Replikationszyklus von HIV-1 hat^{36,40}. Bemerkenswerterweise

liegen alle Positionen für Punktmutationen, die der vorliegenden Arbeit nach einen mit S₁₇₃A vergleichbaren kompensatorischen Effekt vermitteln können (s. 4.7.1), nicht auf der α -Helix 7 oder nahe der CypA-Bindeschleife, sondern in einer von den α -Helices 3 bis 5 gebildeten Region (Abb. 26 A, gelb hervorgehobene Positionen: L₁₈₄, A₂₃₇, T₂₃₉, und N₂₀₆). Den Ergebnissen der computergestützten Strukturanalysen nach haben die untersuchten Mutationen an diesen Positionen ebenso wenig einen Einfluss auf die dreidimensionale Struktur von p24 (s. 4.9) wie die Defektmutation R₂₆₄K. Die Ansammlung der Mutationen in einer Region legt daher den Verdacht nahe, dass diese Region die Kontaktfläche für die Bindung eines weiteren Proteins darstellt.

Tatsächlich konnte diese Vermutung 2012 von Price et al. bestätigt werden: Die α -Helices 3 bis 5 bilden die Kontaktfläche für die Bindung eines weiteren zellulären Proteins, des *cleavage and polyadenylation specificity factors subunit 6* (CPSF6)^{69,70}. In Abb. 26 B ist die Positionierung der Interaktionsregion von CPSF6 (gelb) mit dem N-Terminus von p24 (grau) gezeigt. Es wurde gezeigt, dass die Mutation N₂₀₆D zu einem totalen Verlust der Bindung von CPSF6 an p24 führt^{70,161,162}. Price et al. identifizierten zudem fünf weitere Mutationen, die zumindest ähnliche phänotypische Auswirkungen haben wie N₂₀₆D, darunter auch die Mutation T₂₃₉A⁷⁰. Im Gegensatz dazu wurde unter 4.7.1 eine stark ausgeprägte kompensatorische Wirkung für Mutationen an diesen Positionen (N₂₀₆D bzw. T₂₃₉I) für die CsA-abhängige Defektvariante R₂₆₄K gezeigt werden. Die unterschiedliche Rolle dieser beiden Aminosäuren bei der Interaktion mit einem neuen p24-Interaktionspartner spricht dafür, dass der R₂₆₄K-vermittelte Defekt in Zusammenhang mit CPSF6 stehen könnte. Price et al. zeigten ferner, dass eine Störung der Interaktion von p24 mit CPSF6 durch N₂₀₆D einen Verlust der Abhängigkeit von TNPO3 und Nup358 zur Folge hat⁷⁰. Passend dazu berichteten Maertens et al., dass Mutationen in TNPO3, die eine Interaktion mit CPSF6 unterbinden, auch eine Infektion der Zellen mit HIV-1 erschweren¹⁶³. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die Schaller et al. in Bezug auf CypA machten⁴⁰, was ein Zusammenspiel dieser Proteine zur Koordination von reverser Transkription, Translokation und Integration nahe legt. Wenn der R₂₆₄K-vermittelte Defekt mit einer veränderten Interaktion mit CPSF6 zusammenhängt und dieser Defekt mit einer CsA-Abhängigkeit einhergeht impliziert das, dass die Ursache des Defekts in einer Störung dieser drei Schritte des viralen Replikationszykluses liegt.

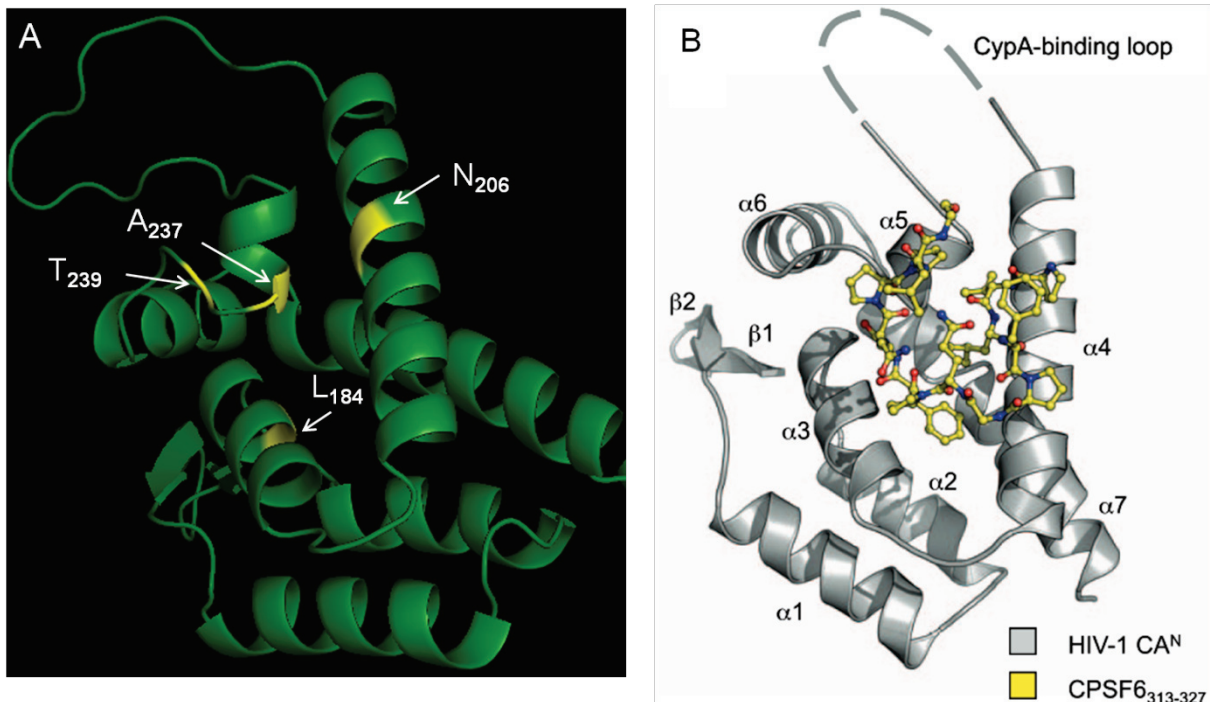


Abb. 26: Dreidimensionale Darstellungen des N-Terminus von HIV-1 p24

A) Auf dem N-Terminus von p24 (grün) sind die Positionen (gelb) markiert, an denen Punktmutationen eine Kompensation des R₂₆₄K vermittelten Defekts bewirken können (s. 4.7.1). Die Berechnung der Struktur erfolgte durch Modeller, die graphische Darstellung mit PyMol. **B)** Gezeigt ist der Sequenzbereich (Aminosäuren 313-327) von CPSF6 (gelb) der die Interaktion zwischen CPSF6 und Aminosäuren aus dem Bereich der p24 α -Helices 3 bis 5 des N-Terminus von p24 (grau) vermittelt. Abgewandelt nach Price et al. ⁷⁰.

Diese Sichtweise wird durch die Arbeit von Rasaiyaah et al. unterstützt, in der nicht nur die Bedeutung von CPSF6 für die frühe Phase der Infektion bestätigt, sondern auch gezeigt wird, dass die Rekrutierung von CypA und CPSF6 eine Evasionstrategie des Virus gegen eine angeborene intrazelluläre Interferon (IFN) Typ I Antwort der Zelle darstellt. Das Virus tarnt sich demnach mit einer Hülle aus zellulären Proteinen und entgeht somit den intrazellulären PRRs. Die gleichen Proteine verwendet es, um die Translokationsmaschinerie der Zelle nutzen zu können ¹⁶⁴. Weiterhin konnte die Bindung der beiden Proteine PF-3450074 und Nup153 im Bereich der CPSF6-Bindestelle gezeigt werden. PF-3450074 ist eine niedermolekulare Substanz, die als mögliches Medikament in einem *drug screening* Verfahren identifiziert wurde ¹⁶⁵ und als kompetitiver Inhibitor die Bindestelle für CPSF6 auf der Kapsidoberfläche blockiert ⁷⁰. Nup153 ist wie Nup358 Bestandteil eines Kernporenkomplexes. Die Autoren, die diese Interaktion beschrieben, vertreten die Ansicht, dass CPSF6 und Nup153 um die Bindestelle konkurrieren, was CPSF6 die Rolle eines Restriktionsfaktors und nicht die eines Ko-Faktors zuschreibt ¹⁶⁶. An dieser Stelle sei allerdings nochmals auf die Arbeit von Schaller et al. verwiesen, die eine Bindung von CypA und der Cyp-Domäne von Nup358 beschreibt ⁴⁰. Da CypA schwächer an p24 bindet als Nup358, kann CypA möglicherweise von Nup358 verdrängt werden. Ähnliches wäre auch für CPSF6 und Nup153 vorstellbar, kann aber nach derzeitiger Datenlage noch nicht bewiesen

werden. Im Gegensatz zum Wildtyp ist die Variante mit der N₂₀₆D Mutation nicht von Nup153 abhängig, sondern wie das feline Immundefizienzvirus abhängig von Nup155, was auf einen alternativen Importmechanismus schließen lässt⁶⁹.

Eine weitere Studie über die Funktion der Interaktion von CPSF6 mit p24 stellte sogar den unmittelbaren Zusammenhang zu den Mutationen her, die in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden. Nachdem die oben genannten Arbeiten ein Zusammenwirken von CypA und CPSF6 nahelegten und die Daten der vorliegenden Arbeit eine Kompensierbarkeit des CsA-abhängigen Phänotyps mit Mutationen im Bereich der CPSF6-Bindestelle zumindest für die Variante R₂₆₄K belegen (s. 4.7.1), trugen Henning et al. erheblich zur Aufklärung der Ursache des durch die *escape* Mutation R₂₆₄K vermittelten Fitnessdefekts bei. Dabei fokussierte sich ihre Arbeit auf ein weiteres gemeinsames phänotypisches Merkmal der vier CsA-abhängigen Varianten T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K: Sie sind nicht mehr in der Lage ruhende Zellen effizient zu infizieren^{167,10,159}. Dabei ist jedoch anzumerken, dass dieser Defekt nicht für alle Zelllinien /-typen zu gelten scheint^{167,10}. Henning et al. zeigten auf, dass N₂₀₆D, A₂₃₇T und T₂₃₉I auch in anderen Zellsystemen eine Kompensation für R₂₆₄K und T₁₈₆A vermitteln¹⁵⁹. Was einen Zelllinien-spezifischen Effekt der unter 4.7.1 gezeigten Daten ausschließt. Ferner wurde auch der Befund von Price et al. bestätigt, dass diese Kompensation mit einer vollständigen (N₂₀₆D) bzw. partiellen (A₂₃₇T und T₂₃₉I) Inhibierung der Bindung von p24 mit CPSF6 einhergeht^{70,159}. Auch für die Mutationen V₂₁₈A und Q₂₄₄H wurde, analog zu den unter 4.7.1 gezeigten Daten, eine kompensatorische Wirkung für den R₂₆₄K vermittelten Defekt demonstriert, allerdings hatten beide Mutationen keinen Einfluss auf die Bindung von CPSF6. Die gleiche Beobachtung wurde auch für S₁₇₃A gemacht: Auch hier geht die Kompensation von R₂₆₄K (s. 4.4.1) nicht mit einer Inhibierung der p24-CPSF6 Bindung einher¹⁵⁹. Mit welcher Mutation eine Kompensation für R₂₆₄K oder T₁₈₆A auch erzielt werden konnte, sie war immer zumindest mit einer erhöhten Fähigkeit verbunden, auch ruhende Zellen infizieren zu können¹⁵⁹. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Austauschbarkeit der kompensierenden Mutationen S₁₇₃A, V₂₁₈A und A₂₃₇T demonstriert (s. 4.4.1), was die Vermutung nahe liegen ließ, dass die alternativen Mutationen, wie z.B.: N₂₀₆D, nicht nur für R₂₆₄K kompensatorisch wirken könnten. Im Zuge dieser Experimente demonstrierten Henning et al. auch, dass die Bindungen von CypA und CPSF6 offenbar unabhängig voneinander stattfinden, da eine Bindung von CPSF6 in den verwendeten HeLa-Zellen weder durch CsA noch einen CypA *knock down* verhindert werden konnte¹⁵⁹. Allerdings ist anzumerken, dass in HeLa-Zellen Tests auf CypA-Effekte nicht immer die gleichen Ergebnisse liefern wie beispielsweise in Jurkat- oder GXR25-Zellen⁷. So konnte von Henning et al. in HeLa-Zellen weder für den WT noch für kompensierte RKLK-Varianten die beschriebene Abhängigkeit von CypA festgestellt werden, wohl aber in Jurkat-Zellen¹⁵⁹.

Eine Rekrutierung von CPSF6 durch CypA ist nach momentanem Wissensstand deswegen noch nicht sicher auszuschließen.

Die sekundären Mutationen für die CsA-abhängigen Varianten lassen sich somit in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe wirkt demnach über eine Beeinträchtigung der Bindung von CPSF6 (N₂₀₆D und A₂₃₇T), die zweite Gruppe kompensiert offenbar die negativen Auswirkungen der Mutation R₂₆₄K, ohne die Bindung von CPSF6 an p24 zu beeinträchtigen (S₁₇₃A, V₂₁₈A, T₂₃₉I und Q₂₄₄H)¹⁵⁹. Eine kompensatorische Wirkung dieser Mutationen für den Defekt der RK-Variante, die auch immer eine Wiederherstellung des CypA-abhängigen Phänotyps bewirkte (s. 4.4.1 und 4.7.1), konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls demonstriert werden. Der zu Grunde liegende Defekt ist nach allen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung zu Henning et al. bei den vier untersuchten Defektvarianten (T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K) sehr ähnlich (s. 4.4 bis 4.7). Die oben beschriebenen Gruppen an kompensatorisch wirkenden Mutationen weisen auf eine theoretische Flexibilität des Virus bei der Interaktion mit seinen zellulären Ko-Faktoren hin, die jedoch *in vivo* in der Regel nicht beobachtet wird. Zudem ist trotz dieser Fülle an neueren Erkenntnissen der Mechanismus, der dem Fitnessdefekt der CsA-abhängigen Varianten zu Grunde liegt, weiterhin ungeklärt. Es muss aber angenommen werden, dass die CsA-abhängigen Varianten schwerwiegenden Störungen beim komplexen Zusammenspiel von reverser Transkription, Translokation und Integration unterliegen^{40,70,36,159}. Möglicherweise kommt es zudem als Folge daraus zu einer Induktion von antiviralen Antworten der Zellen durch die Aktivierung von PRRs, wie es von Rasaiyaah et al. beschrieben wurde¹⁶⁴.

5.2.4 Schematisches Modell der p24-Proteininteraktionen

In Abb. 27 ist ein zusammenfassender schematischer Überblick der Interaktionen von p24 mit seinen zellulären Ko-Faktoren gegeben. CypA bindet im Zytoplasma an die CypA-Bindeschleife³⁸; an der Kernmembran bindet Nup358 über seine Cyp-Domäne an die CypA-Bindeschleife und verdrängt mutmaßlich auf Grund seiner größeren Bindungsaffinität das zytoplasmatische CypA⁴⁰. Unabhängig von CypA bindet CPSF6 im Bereich der α -Helices 3 bis 5 an p24. Ob es zu einer Interaktion zwischen CypA und CPSF6 kommt ist noch unbekannt^{70,159}. Allerdings sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und von Henning et al. dafür, da Mutationen wie R₂₆₄K oder N₂₀₆D phänotypische Effekte vermitteln, die beide p24-Interaktionspartner betreffen (s. 5.2.3^{70,159}). Auch ist nicht abschließend geklärt ob es zwischen p24 und TNPO3 zu einer direkten Interaktion kommt oder ob die Interaktion indirekt über CPSF6 vermittelt wird^{36,159}.

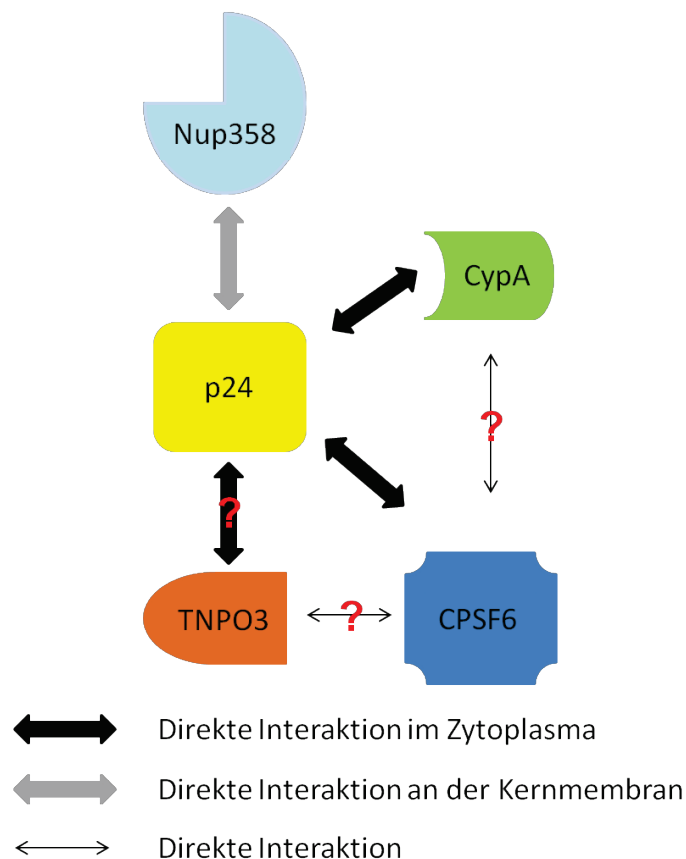


Abb. 27: Schematisches Modell der p24-Proteininteraktionen

Direkte Interaktionen zwischen p24 und einem anderen Protein werden durch dicke Pfeile gekennzeichnet. Dabei wird unterschieden ob die Interaktion im Zytoplasma stattfindet (schwarze Pfeile) oder an der den Poren der Kernmembran (grauer Pfeil). Eine mögliche Interaktion zwischen zwei Interaktionspartnern von p24 ist durch einen dünnen Pfeil angedeutet. Interaktionen die noch nicht sicher belegbar sind durch rote Fragezeichen kenntlich gemacht.

6. Zentrale Aussagen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei wichtige Aspekte erarbeitet:

1) Die in Patientenisolaten (*in vivo*) relevante sekundäre Mutation S₁₇₃A kompensiert *in vitro* alle als CsA-abhängig bekannten Varianten („universeller Kompensator“). In eingeschränktem Maß gilt dies ebenfalls für V₂₁₈A und A₂₃₇T. Dies demonstriert, dass es sich nicht nur um mehrere Mutationen handelt, die zu einem ähnlichen Phänotyp führen, sondern dass die Mutationen T₁₈₆A, A₂₂₄E, G₂₂₆D und R₂₆₄K den gleichen molekularen Mechanismus beeinträchtigen.

2) Es wurden mehrere, noch nicht beschriebene, kompensatorisch wirksame Mutationen für die RK-Variante identifiziert, die *in vitro* in ihrer Wirkung mit der S₁₇₃A Mutation vergleichbar sind und ebenfalls eine Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit vermitteln.

3) Die computergestützten Berechnungen der Kapsidvarianten lieferten keine Anhaltspunkte dafür, dass die untersuchten Mutationen die Proteinstruktur von p24 verändern und zeigten zudem, dass die wirksamsten der alternativen kompensatorischen Mutationen in der Region der p24 α -Helices 2 bis 5 liegen.

Dies führt zu der Hypothese, dass dieser Bereich eine mögliche Bindestelle für einen weiteren HIV-1 Ko-Faktor darstellt, der entweder über eine direkte Interaktion mit CypA oder indirekt an der Generierung des CsA-abhängigen Phänotyps der RK-Variante beteiligt ist. Mittlerweile konnte von Price et al. mit CPSF6 ein Faktor identifiziert werden, der diesen Effekt vermittelt⁷⁰. Unterstützt wird dies durch Daten von Henning et al., die zeigen, dass die hier untersuchten alternativen kompensatorischen Mutationen einen inhibierenden Einfluss auf die Interaktion mit CPSF6 ausüben¹⁵⁹. Die zitierten Arbeiten unterstreichen, dass die vorgestellten Daten sowohl einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der vielfältigen Funktionen des viralen Kapsids leisten können, als auch helfen Angriffspunkte für neuartige antiretrovirale Medikamente zu identifizieren.

7. Ausblick

Einige neue Erkenntnisse, die im Laufe der vergangenen zwei Jahre publiziert wurden unterstützen und bestätigen manche der in der Diskussion aufgestellten Hypothesen und Überlegungen. Dies gilt vor allem für die Entdeckung von CPSF6 als p24-Interaktionspartner und der Beschreibung der CPSF6-Bindestelle in der Region der α -Helices 3 bis 5 von p24⁷⁰, aber auch für die unter 5.1.2, 5.1.3 und 5.2.4 beschriebenen kompensatorisch wirkenden Mutationen für den R₂₆₄K vermittelten Defekt aus dem Bereich der CPSF6-Bindestelle (s. 4.7.1 und ¹⁵⁹). Außerordentlich wichtig ist daneben auch die Erkenntnis, dass CypA und CPSF6 Interaktionspartner von Kernporenproteinen sein könnten^{36,40}. Dadurch zeichnet sich ab, dass Vorgänge im Zytoplasma und die Struktur des viralen Kapsids einen maßgeblichen Einfluss auf den Vorgang und den Mechanismus der Translokation und indirekt sogar auf nukleäre Prozesse wie die Integration des viralen Genoms in das Wirtszellchromatin haben¹⁶⁸. Diese Prozesse sind über das Kapsid an weitere essentielle virale Prozesse gekoppelt, wie beispielsweise die reverse Transkription, die ihrerseits von einem geordneten Zerfall des Kapsids abhängig ist¹⁶⁸. Es handelt sich also um ein überaus komplexes Zusammenspiel zellulärer und viraler Proteine, das zudem mehrere Abschnitte des viralen Replikationszykluses betrifft. Bedingt durch diese Komplexität ist es nicht weiter verwunderlich, dass auch mit den neuen Informationen aus der Literatur und der vorliegenden Arbeit die Frage nach dem eigentlichen Mechanismus der CsA-Abhängigkeit noch nicht abschließend beantwortet kann. Hierbei könnten sich jedoch Untersuchungen zu den seltenen p24-Varianten R₂₆₄A/G/Q/T^{167,114} bzw. A₂₂₄V (s. 4.7.1 und ¹⁵⁹) als hilfreich erweisen, für die im Unterschied zu R₂₆₄K und A₂₂₄E in der Literatur keine CsA-Abhängigkeit beschrieben wurde. Auch die Frage nach Interaktionen zwischen CypA und CPSF6 ist zurzeit noch nicht zufriedenstellend geklärt. Bis jetzt ist nur die jeweils unabhängige Bindung von CypA und CPSF6 an p24 bekannt¹⁵⁹. Es ist allgemein anerkannt, dass die Wechselwirkung zwischen CypA und p24 einen Einfluss auf die Stabilität des Kapsids hat, auch wenn es widersprüchliche Ansichten darüber gibt ob es stabilisierende³⁶ oder destabilisierende⁽³⁵⁾ Effekte sind. Die Kapsidstabilität von HIV-1 ist ein streng regulierter Prozess, der durch zelluläre Enzyme positiv oder negativ modelliert werden kann. Bei einem replikationsfähigen Virus wie z.B. NL4-3 oder einem dominantem Patientenisolat-Virus besitzt das Kapsid eine Aminosäuresequenz die eine optimale Stabilität bietet. Wird dieses Gleichgewicht aus stabilisierenden und destabilisierenden Einflüssen gestört (Mutationen, Hemmung oder *knock down* von Ko-Faktoren) können diese Auswirkungen eventuell durch kompensatorische wirkende Mutationen wieder ausgeglichen werden. Jedoch erreichen selbst gut kompensierte Varianten zumindest *in vitro* im Vergleich zu einem Referenzvirus selten das Optimum (vergleiche beispielsweise 4.7.1: N₂₀₆D on R₂₆₄K und S₁₇₃A on R₂₆₄K mit dem WT NL4-3). Die in dieser Arbeit und auch von Henning et al. demonstrierte

Austauschbarkeit der kompensatorisch wirkenden Mutationen für den durch R₂₆₄K vermittelten Defekt legt den Eindruck nahe, dass beide Enzyme Teil des gleichen Prozesses sind. Unterstützt wird diese Annahme durch die Abhängigkeit von HIV-1 von Nup358 und TNPO3, die sowohl durch CypA als auch CPSF6 vermittelt wird^{40,159}. Über die genauen Mechanismen ist allerdings auch hier noch wenig bekannt. Weitere Interaktionsstudien, vor allem mit den CsA-abhängigen Varianten könnten hier weitere Erkenntnisse liefern. Durch den *knock down* weiterer Bestandteile von Kernporenkomplexen oder *pull-down*-Assays könnten zudem zusätzliche oder alternative Interaktionspartner für Wildtyp-p24 oder für die in dieser Arbeit vorgestellten p24-Varianten identifiziert werden. Desweiteren erscheint es als bedeutsam, die einzelnen Varianten in verschiedenen Wirtszellpopulationen auf ihre Infektiosität hin zu untersuchen, um das dominante Auftreten der SARK-Variante *in vivo* besser zu verstehen. Vor allem Untersuchungen mit Makrophagen-artigen Zellen und der Population der CCR5-positiven T-Helferzellen könnten wichtige Erkenntnisse liefern. Auch bioinformatische bzw. -physikalische Ansätze sollten in Betracht gezogen werden, um mehr Informationen über die Natur der Interaktion von p24 mit CypA und/oder CPSF6 zu erhalten.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger möchte ich sehr dafür danken, dass er die Rolle meines Doktorvaters übernommen hat. Außerdem bedanke ich mich für die langjährige Unterstützung und für das Erstgutachten.

Bei Herrn Dr. Arne Schneidewind möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken dieses interessante Thema zu bearbeiten. Zudem möchte ich mich für die Unterstützung im Vorfeld des KIT und der CROI bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner sowie Herrn Prof. Dr. Thomas Harrer danke ich vielmals für die Übernahme des Mentorats. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Wagner auch für die Übernahme des zweiten Gutachtens und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner danke ich für die hervorragende Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie & Hygiene.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Wolf möchte ich danken, dass er die Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie & Hygiene möglich gemacht hat.

Mein besonderer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wagner, die mich vollständig integriert hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Weiterhin möchte ich mich namentlich vor allem bei Dr. Benedikt Asbach, Dr. Alexander Kliche, Dr. Josef Köstler und PD Dr. Jens Wild bedanken, die mich wirklich immer ohne Rücksicht auf den eigenen Terminplan bei der Lösung meiner Probleme unterstützt haben.

Außerdem möchte ich Herrn Johannes Meier für Unterstützung bei der Generierung der 3D-Strukturmodelle danken.

Ein großes Dankeschön geht auch an Frau Sara Wennige, ohne die diese Arbeit in dieser Zeit nie zu machen gewesen wäre. Desweiteren bedanke ich mich auch bei allen Mitarbeitern aus dem H1, die mir grade zu Anfang meiner Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Bei Frau Franziska Winter und Herrn Sven Breitschwerdt möchte ich mich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein extra Dank gebührt meiner Frau Nicola, Dr. Benedikt Asbach, Herrn Prof. Dr. Udo Barabas und Herrn Prof. Dr. Salzberger für die Durchsicht meines Manuskripts und ihre hilfreichen Anmerkungen.

Am Schluss und doch am wichtigsten danke ich meiner Familie und vor allem meiner Frau Nicola mehr als Worte es zu sagen vermögen für ihre Unterstützung und Liebe.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung (Abb.) 1: Weltweite HIV-Prävalenz.....	2
Abb. 2: Typischer Krankheitsverlauf bei einer HIV-Infektion	4
Abb. 3: Schematischer Aufbau eines HIV-1 Partikels ²⁴	5
Abb. 4: Genomorganisation von HIV-1	7
Abb. 5: Model der Interaktion von HIV-1 und CypA sowie von CypA mit CsA.....	9
Abb. 6: HIV-1 Vektor pNL4-3.....	39
Abb. 7: Expression der HIV-1 Env-Interaktionspartner CD4, CXCR4 und CCR5 auf GXR25-Zellen.	47
Abb. 8: Verhältnis aus der p24-ELISA Messwerte und der Messwerte der jeweiligen reversen Transkriptaseaktivität.	49
Abb. 9: S ₁₇₃ A wirkt als universale kompensierende Mutation für alle CsA-abhängigen Virusvarianten, indem sie die Replikationskapazität in Abwesenheit von CsA wiederherstellt.	51
Abb. 10: Relative Infektiosität des Gag-Konsensusvirus ohne und mit den KK10-assoziierten Mutationen	53
Abb. 11: Die Mutationen V ₂₁₈ A und A ₂₃₇ T verbessern die Infektiosität und stellen die CypA-Abhängigkeit der CsA-abhängigen Variante R ₂₆₄ K wieder her.	55
Abb. 12: Die Mutationen V ₂₁₈ A und A ₂₃₇ T verbessern die Infektiosität und stellen die CypA-Abhängigkeit der <i>in vitro</i> CsA-abhängigen Virusvarianten T ₁₈₆ A und G ₂₂₆ D wieder her.....	56
Abb. 13: Auswirkung unterschiedlicher CsA-Konzentrationen auf die relative Infektiosität CsA-abhängiger Viren	59
Abb. 14: FK-506 vermittelt weder eine Kompensation der Infektiosität noch eine Wiederherstellung der CypA-Abhängigkeit.	61
Abb. 15 A: Kombination der Mutationen aus den Langzeitkulturen mit der Variante R ₂₆₄ K (RK).....	64
Abb. 15 B: Kombination der Mutationen aus den Langzeitkulturen mit der Variante R ₂₆₄ K, L ₂₆₈ M (RKLM)	65
Abb. 16: Sequenzvergleich von p24 des Patienten F7148 und Wildtyp NL4-3.....	67
Abb. 17 A: Kombination von <i>in vivo</i> Mutationen der Sequenz F7148 mit R ₂₆₄ K (RK)	69
Abb. 17 B: Kombination von <i>in vivo</i> Mutationen der Sequenz F7148 mit R ₂₆₄ K, L ₂₆₈ M (RKLM)	70
Abb. 18: R ₂₆₄ K (RK) und R ₂₆₄ K, L ₂₆₈ M (RKLM) in Kombination mit dem kompletten Set ⁶ an HLA-B*57 assoziierten Mutationen der CypA-Bindeschleife.	71
Abb. 19: R ₂₆₄ K (RK) und R ₂₆₄ K, L ₂₆₈ M (RKLM) in Kombination mit allen Mutationen der Virussequenz von F7148.....	73
Abb. 20: Kombination von T ₂₄₂ N (CypA-Sensitivität) mit R ₂₆₄ K (CsA-Abhängigkeit).....	75

Abb. 21: Alignment der Strukturmodelle basierend auf dem <i>homology modelling</i> Verfahren	77
Abb. 22: Alignment der Strukturmodelle basierend auf einer <i>de novo</i> Berechnung durch I-Tasser	79
Abb. 23: Lokalisation der Mutationen mit CsA-abhängigen Phänotyp relativ zur sekundären Mutation S ₁₇₃ A	84
Abb. 24: Beispiel für die räumliche Unabhängigkeit von Defektmutation (T ₁₈₆ A) und kompensatorisch wirkender Mutation (V ₂₁₈ A)	91
Abb. 25: Gehäuftes Auftreten der kompensatorischen Mutationen für die defiziente R ₂₆₄ K Mutation in der Region der α -Helices 2 bis 5 in der N-terminalen Hälfte von p24	92
Abb. 26: Dreidimensionale Darstellungen des N-Terminus von HIV-1 p24	99
Abb. 27: Schematisches Modell der p24-Proteininteraktionen	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper	20
Tabelle 2: Restriktionsendonukleasen	25
Tabelle 3: Mutageneseprimer	28
Tabelle 4: Sequenzierungsprimer	29
Tabelle 5: Software	31
Tabelle 6: Liste der verwendeten proviralen Konstrukte	33
Tabelle 7: Klonierung des Sac-Sbf-Fragments in NL4-3 5'-Hälfte + Zauberlinker	38
Tabelle 8: Klonierung einer 5'-Hälfte mit einer 3'-Hälfte (beide NL4-3)	39
Tabelle 9: S ₁₇₃ A vermittelt die beste Kompensation bei allen Defektmutanten	87
Tabelle 10: Eigenschaften der alternativen sekundären Mutationen	88

Literaturverzeichnis

1. Miura, T. *et al.* HLA-Associated Alterations in Replication Capacity of Chimeric NL4-3 Viruses Carrying gag-protease from Elite Controllers of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **83**, 140–149 (2009).
2. Migueles, S. A. *et al.* HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2709–2714 (2000).
3. Altfeld, M. *et al.* Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS Lond. Engl.* **17**, 2581–2591 (2003).
4. Streeck, H. *et al.* Recognition of a Defined Region within p24 Gag by CD8+ T Cells during Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Individuals Expressing Protective HLA Class I Alleles. *J. Virol.* **81**, 7725–7731 (2007).
5. Baker, B., Block, B., Rothchild, A. & Walker, B. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin. Biol. Ther.* **9**, 55–69 (2009).
6. Brockman, M. A. *et al.* Escape and Compensation from Early HLA-B57-Mediated Cytotoxic T-Lymphocyte Pressure on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Alter Capsid Interactions with Cyclophilin A. *J Virol* **81**, 12608–12618 (2007).
7. Schneidewind, A. *et al.* Escape from the Dominant HLA-B27-Restricted Cytotoxic T-Lymphocyte Response in Gag Is Associated with a Dramatic Reduction in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication. *J Virol* **81**, 12382–12393 (2007).
8. Braaten, D. *et al.* Cyclosporine A-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants demonstrate that Gag encodes the functional target of cyclophilin A. *J. Virol.* **70**, 5170–5176 (1996).
9. Yang, R. & Aiken, C. A Mutation in Alpha Helix 3 of CA Renders Human Immunodeficiency Virus Type 1 Cyclosporin A Resistant and Dependent: Rescue by a Second-Site Substitution in a Distal Region of CA. *J. Virol.* **81**, 3749–3756 (2007).
10. Qi, M., Yang, R. & Aiken, C. Cyclophilin A-Dependent Restriction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Mutants for Infection of Nondividing Cells. *J. Virol.* **82**, 12001–12008 (2008).
11. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–871 (1983).
12. Gallo, R. C. *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865–867 (1983).
13. Schackman, B. R. *et al.* The lifetime cost of current human immunodeficiency virus care in the United States. *Med. Care* **44**, 990–997 (2006).
14. UNAIDS: Global Fact Sheet 2012.
15. Keele, B. F. *et al.* Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7552–7557 (2008).
16. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. & Schätzl, H. in *Mol. Virol.* 409–459 (Spektrum Akademischer Verlag, 2010). at <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-8274-2241-5_18>
17. Borrow, P. *et al.* Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* (1997). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9018240>>
18. Koup, R. A. *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* **68**, 4650–4655 (1994).
19. Turk, G. *et al.* Early Gag immunodominance of the HIV-specific T-cell response during acute/early infection is associated with higher CD8+ T-cell antiviral activity, and correlates with the preservation of the CD4+ T-cell compartment. *J. Virol.* (2013). doi:10.1128/JVI.00865-13
20. Robertson, D. L. *et al.* HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science* **288**, 55–55 (2000).
21. Plantier, J.-C. *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* **15**, 871–872 (2009).

22. Pornillos, O. *et al.* X-ray Structures of the Hexameric Building Block of the HIV Capsid. *Cell* **137**, 1282–1292 (2009).
23. Sundquist, W. I. & Krausslich, H.-G. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
24. Robinson, H. L. New hope for an aids vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 239–250 (2002).
25. Blumenthal, R., Durell, S. & Viard, M. HIV Entry and Envelope Glycoprotein-mediated Fusion. *J. Biol. Chem.* **287**, 40841–40849 (2012).
26. Weiss, R. A. Thirty years on: HIV receptor gymnastics and the prevention of infection. *BMC Biol.* **11**, 57 (2013).
27. McKinnon, L. R. & Kaul, R. Quality and quantity: mucosal CD4⁺ T cells and HIV susceptibility. *Curr. Opin. HIV AIDS* **7**, 195–202 (2012).
28. Bunders, M. J. *et al.* Memory CD4⁺CCR5⁺ T cells are abundantly present in the gut of newborn infants to facilitate mother-to-child transmission of HIV-1. *Blood* **120**, 4383–4390 (2012).
29. Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M. & Lugli, E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* **43**, 2797–2809 (2013).
30. Knippa, K. & Peterson, D. O. Fidelity of RNA Polymerase II Transcription: Role of Rbp9 in Error Detection and Proofreading. *Biochemistry (Mosc.)* **52**, 7807–7817 (2013).
31. O'Neil, P. K. *et al.* Mutational Analysis of HIV-1 Long Terminal Repeats to Explore the Relative Contribution of Reverse Transcriptase and RNA Polymerase II to Viral Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 38053–38061 (2002).
32. Braaten, D. & Luban, J. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J* **20**, 1300–1309 (2001).
33. Sokolskaja, E., Sayah, D. M. & Luban, J. Target Cell Cyclophilin A Modulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity. *J. Virol.* **78**, 12800–12808 (2004).
34. Li, Y., Kar, A. K. & Sodroski, J. Target Cell Type-Dependent Modulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Disassembly by Cyclophilin A. *J. Virol.* **83**, 10951–10962 (2009).
35. Gamble, T. Crystal Structure of Human Cyclophilin A Bound to the Amino-Terminal Domain of HIV-1 Capsid. *Cell* **87**, 1285–1294 (1996).
36. Shah, V. B. *et al.* The Host Proteins Transportin SR2/TNPO3 and Cyclophilin A Exert Opposing Effects on HIV-1 Uncoating. *J. Virol.* **87**, 422–432 (2013).
37. Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U. & Stähelin, H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* **6**, 468–475 (1976).
38. Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V. & Goff, S. P. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73**, 1067–1078 (1993).
39. Spitzfaden, C., Braun, W., Wider, G., Widmer, H. & Wüthrich, K. Determination of the NMR solution structure of the cyclophilin A-cyclosporin A complex. *J. Biomol. NMR* **4**, 463–482 (1994).
40. Schaller, T. *et al.* HIV-1 Capsid-Cyclophilin Interactions Determine Nuclear Import Pathway, Integration Targeting and Replication Efficiency. *PLoS Pathog* **7**, e1002439 (2011).
41. Ozato, K., Shin, D.-M., Chang, T.-H. & Morse, H. C. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 849–860 (2008).
42. Sebastian, S. & Luban, J. TRIM5[?] selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid. *Retrovirology* **2**, 40 (2005).
43. Stremlau, M. *et al.* Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5[?] restriction factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5514–5519 (2006).
44. Ganser-Pornillos, B. K. *et al.* Hexagonal assembly of a restricting TRIM5[?] protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 534–539 (2011).
45. Sawyer, S. L., Wu, L. I., Emerman, M. & Malik, H. S. Positive selection of primate TRIM5[?] identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2832–2837 (2005).

46. Pertel, T. *et al.* TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* **472**, 361–365 (2011).
47. Grütter, M. & Luban, J. TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 142–150 (2012).
48. Stremlau, M. *et al.* The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**, 848–853 (2004).
49. Song, B. *et al.* Retrovirus Restriction by TRIM5? Variants from Old World and New World Primates. *J. Virol.* **79**, 3930–3937 (2005).
50. Ylinen, L. M. J., Keckesova, Z., Wilson, S. J., Ranasinghe, S. & Towers, G. J. Differential Restriction of Human Immunodeficiency Virus Type 2 and Simian Immunodeficiency Virus SIVmac by TRIM5? Alleles. *J. Virol.* **79**, 11580–11587 (2005).
51. Nakayama, E. E. & Shioda, T. TRIM5? and Species Tropism of HIV/SIV. *Front. Microbiol.* **3**, (2012).
52. Hatzioannou, T., Cowan, S., von Schwedler, U. K., Sundquist, W. I. & Bieniasz, P. D. Species-Specific Tropism Determinants in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid. *J. Virol.* **78**, 6005–6012 (2004).
53. Keckesova, Z., Ylinen, L. M. J. & Towers, G. J. The human and African green monkey TRIM5? genes encode Ref1 and Lv1 retroviral restriction factor activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10780–10785 (2004).
54. Yap, M. W., Nisole, S., Lynch, C. & Stoye, J. P. Trim5? protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10786–10791 (2004).
55. Perron, M. J. *et al.* The Human TRIM5? Restriction Factor Mediates Accelerated Uncoating of the N-Tropic Murine Leukemia Virus Capsid. *J. Virol.* **81**, 2138–2148 (2007).
56. Battivelli, E. *et al.* Strain-Specific Differences in the Impact of Human TRIM5 α , Different TRIM5 α Alleles, and the Inhibition of Capsid-Cyclophilin A Interactions on the Infectivity of HIV-1. *J. Virol.* **84**, 11010–11019 (2010).
57. Yap, M. W., Nisole, S. & Stoye, J. P. A Single Amino Acid Change in the SPRY Domain of Human Trim5 α Leads to HIV-1 Restriction. *Curr. Biol.* **15**, 73–78 (2005).
58. Wainberg, M. A., Hsu, M., Gu, Z., Borkow, G. & Parniak, M. A. Effectiveness of 3TC in HIV clinical trials may be due in part to the M184V substitution in 3TC-resistant HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS Lond. Engl.* **10 Suppl 5**, S3–10 (1996).
59. Deeks, S. G. *et al.* Virologic and Immunologic Consequences of Discontinuing Combination Antiretroviral-Drug Therapy in HIV-Infected Patients with Detectable Viremia. *N. Engl. J. Med.* **344**, 472–480 (2001).
60. Nijhuis, M., Deeks, S. & Boucher, C. Implications of antiretroviral resistance on viral fitness. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **14**, 23–28 (2001).
61. Lim, S.-Y. *et al.* TRIM5? Modulates Immunodeficiency Virus Control in Rhesus Monkeys. *PLoS Pathog.* **6**, (2010).
62. Sokolskaja, E., Berthoux, L. & Luban, J. Cyclophilin A and TRIM5? Independently Regulate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity in Human Cells. *J. Virol.* **80**, 2855–2862 (2006).
63. Nisole, S., Lynch, C., Stoye, J. P. & Yap, M. W. A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13324–13328 (2004).
64. Sayah, D. M., Sokolskaja, E., Berthoux, L. & Luban, J. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* **430**, 569–573 (2004).
65. Neagu, M. R. *et al.* Potent inhibition of HIV-1 by TRIM5-cyclophilin fusion proteins engineered from human components. *J. Clin. Invest.* **119**, 3035–3047 (2009).
66. Keckesova, Z., Ylinen, L. M. J. & Towers, G. J. Cyclophilin A renders human immunodeficiency virus type 1 sensitive to Old World monkey but not human TRIM5 alpha antiviral activity. *J. Virol.* **80**, 4683–4690 (2006).
67. Towers, G. J. *et al.* Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat. Med.* **9**, 1138–1143 (2003).

68. Sayah, D. M. & Luban, J. Selection for Loss of Ref1 Activity in Human Cells Releases Human Immunodeficiency Virus Type 1 from Cyclophilin A Dependence during Infection. *J. Virol.* **78**, 12066–12070 (2004).
69. Lee, K. *et al.* Flexible Use of Nuclear Import Pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe* **7**, 221–233 (2010).
70. Price, A. J. *et al.* CPSF6 Defines a Conserved Capsid Interface that Modulates HIV-1 Replication. *PLoS Pathog* **8**, e1002896 (2012).
71. Rügsegger, U., Blank, D. & Keller, W. Human Pre-mRNA Cleavage Factor Im Is Related to Spliceosomal SR Proteins and Can Be Reconstituted In Vitro from Recombinant Subunits. *Mol. Cell* **1**, 243–253 (1998).
72. Kataoka, N., Bachorik, J. L. & Dreyfuss, G. Transportin-SR, a Nuclear Import Receptor for SR Proteins. *J. Cell Biol.* **145**, 1145–1152 (1999).
73. Lai, M.-C., Lin, R.-I., Huang, S.-Y., Tsai, C.-W. & Tarn, W.-Y. A Human Importin- β Family Protein, Transportin-SR2, Interacts with the Phosphorylated RS Domain of SR Proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 7950–7957 (2000).
74. Dettwiler, S., Aringhieri, C., Cardinale, S., Keller, W. & Barabino, S. M. L. Distinct Sequence Motifs within the 68-kDa Subunit of Cleavage Factor Im Mediate RNA Binding, Protein-Protein Interactions, and Subcellular Localization. *J. Biol. Chem.* **279**, 35788–35797 (2004).
75. Ruepp, M.-D. *et al.* Mammalian pre-mRNA 3' End Processing Factor CF Im68 Functions in mRNA Export. *Mol. Biol. Cell* **20**, 5211–5223 (2009).
76. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M. & Oldstone, M. B. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **68**, 6103–6110 (1994).
77. Kløverpris, H. N. *et al.* HIV Control through a Single Nucleotide on the HLA-B Locus. *J. Virol.* **86**, 11493–11500 (2012).
78. Reimann, K. A. *et al.* Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J. Virol.* **68**, 2362–2370 (1994).
79. Almeida, J. R. *et al.* Superior control of HIV-1 replication by CD8⁺ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J. Exp. Med.* **204**, 2473–2485 (2007).
80. Chen, H. *et al.* TCR clonotypes modulate the protective effect of HLA class I molecules in HIV-1 infection. *Nat. Immunol.* **13**, 691–700 (2012).
81. Ladell, K. *et al.* A Molecular Basis for the Control of Preimmune Escape Variants by HIV-Specific CD8⁺ T Cells. *Immunity* **38**, 425–436 (2013).
82. Kiepiela, P. *et al.* CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med.* **13**, 46–53 (2007).
83. Pereyra, F. *et al.* Genetic and Immunologic Heterogeneity among Persons Who Control HIV Infection in the Absence of Therapy. *J. Infect. Dis.* **197**, 563–571 (2008).
84. Altfeld, M. & Allen, T. M. Hitting HIV where it hurts: an alternative approach to HIV vaccine design. *Trends Immunol.* **27**, 504–510 (2006).
85. Sacha, J. B. *et al.* Gag-specific CD8⁺ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 2746–2754 (2007).
86. Kiepiela, P. *et al.* Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature* **432**, 769–775 (2004).
87. Rajapaksa, U. S. *et al.* HLA-B may be more protective against HIV-1 than HLA-A because it resists negative regulatory factor (Nef) mediated down-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 13353–13358 (2012).
88. Goonetilleke, N. *et al.* The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **206**, 1253–1272 (2009).
89. Makadzange, A. T. *et al.* Characterization of an HLA-C-restricted CTL response in chronic HIV infection. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1036–1041 (2010).
90. Mkhwanazi, N. *et al.* Immunodominant HIV-1-specific HLA-B- and HLA-C-restricted CD8⁺ T cells do not differ in polyfunctionality. *Virology* **405**, 483–491 (2010).

91. Schaefer, M. R. *et al.* A Novel Trafficking Signal within the HLA-C Cytoplasmic Tail Allows Regulated Expression Upon Differentiation of Macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md* **1950** **180**, 7804–7817 (2008).
92. Cohen, G. B. *et al.* The Selective Downregulation of Class I Major Histocompatibility Complex Proteins by HIV-1 Protects HIV-Infected Cells from NK Cells. *Immunity* **10**, 661–671 (1999).
93. Kaslow, R. A. *et al.* Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2**, 405–411 (1996).
94. Hendel, H. *et al.* New Class I and II HLA Alleles Strongly Associated with Opposite Patterns of Progression to AIDS. *J. Immunol.* **162**, 6942–6946 (1999).
95. Tang, J. *et al.* Favorable and Unfavorable HLA Class I Alleles and Haplotypes in Zambians Predominantly Infected with Clade C Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **76**, 8276–8284 (2002).
96. Gao, X. *et al.* AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* **11**, 1290–1292 (2005).
97. Goulder, P. J. R. *et al.* Patterns of Immunodominance in HIV-1–specific Cytotoxic T Lymphocyte Responses in Two Human Histocompatibility Leukocyte Antigens (HLA)-identical Siblings with HLA-A*0201 Are Influenced by Epitope Mutation. *J. Exp. Med.* **185**, 1423–1433 (1997).
98. Altfeld, M. *et al.* HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8+ T Cell Response against HIV-1. *PLoS Med* **3**, e403 (2006).
99. Allen, T. M. *et al.* Selective Escape from CD8+ T-Cell Responses Represents a Major Driving Force of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Sequence Diversity and Reveals Constraints on HIV-1 Evolution. *J. Virol.* **79**, 13239–13249 (2005).
100. Price, D. A. *et al.* Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 1890–1895 (1997).
101. Leslie, A. J. *et al.* HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat. Med.* **10**, 282–289 (2004).
102. Goulder, P. J. *et al.* Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med.* **3**, 212–217 (1997).
103. Jones, N. A. *et al.* Determinants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from the Primary CD8+ Cytotoxic T Lymphocyte Response. *J. Exp. Med.* **200**, 1243–1256 (2004).
104. Abrahams, M.-R. *et al.* Rapid, complex adaptation of transmitted HIV-1 full-length genomes in subtype C-infected individuals with differing disease progression: *AIDS* **27**, 507–518 (2013).
105. Deutekom, H. W. M. van, Wijnker, G. & Boer, R. J. de. The Rate of Immune Escape Vanishes When Multiple Immune Responses Control an HIV Infection. *J. Immunol.* **191**, 3277–3286 (2013).
106. Aebischer, T., Moskophidis, D., Rohrer, U. H., Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H. In vitro selection of lymphocytic choriomeningitis virus escape mutants by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 11047–11051 (1991).
107. Neumann-Haefelin, C. *et al.* Human leukocyte antigen B27 selects for rare escape mutations that significantly impair hepatitis C virus replication and require compensatory mutations. *Hepatology. Baltim. Md* **54**, 1157–1166 (2011).
108. Weiner, A. J. *et al.* Association of cytotoxic T lymphocyte (CTL) escape mutations with persistent hepatitis C virus (HCV) infection. *Princess Takamatsu Symp.* **25**, 227–235 (1995).
109. Timm, J. *et al.* CD8 Epitope Escape and Reversion in Acute HCV Infection. *J. Exp. Med.* **200**, 1593–1604 (2004).
110. Moore, C. B. *et al.* Evidence of HIV-1 Adaptation to HLA-Restricted Immune Responses at a Population Level. *Science* **296**, 1439–1443 (2002).
111. Nixon, D. F. *et al.* HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides. *Publ. Online 01 Dec. 1988 Doi101038336484a0* **336**, 484–487 (1988).

112. Kelleher, A. D. *et al.* Clustered Mutations in HIV-1 Gag Are Consistently Required for Escape from Hla-B27–Restricted Cytotoxic T Lymphocyte Responses. *J. Exp. Med.* **193**, 375–386 (2001).
113. Jardetzky, T. S., Lane, W. S., Robinson, R. A., Madden, D. R. & Wiley, D. C. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* **353**, 326–329 (1991).
114. Schneidewind, A. *et al.* Structural and Functional Constraints Limit Options for Cytotoxic T-Lymphocyte Escape in the Immunodominant HLA-B27-Restricted Epitope in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid. *J Virol* **82**, 5594–5605 (2008).
115. Ammaranond, P. *et al.* A New Variant Cytotoxic T Lymphocyte Escape Mutation in HLA-B27-Positive Individuals Infected with HIV Type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **21**, 395–397 (2005).
116. Ammaranond, P. *et al.* HIV Immune Escape at an Immunodominant Epitope in HLA-B*27–Positive Individuals Predicts Viral Load Outcome. *J. Immunol.* **186**, 479–488 (2011).
117. Cornelissen, M. *et al.* Multiple transmissions of a stable human leucocyte antigen-B27 cytotoxic T-cell-escape strain of HIV-1 in The Netherlands. *AIDS Lond. Engl.* **23**, 1495–1500 (2009).
118. Schneidewind, A. *et al.* Maternal Transmission of Human Immunodeficiency Virus Escape Mutations Subverts HLA-B57 Immunodominance but Facilitates Viral Control in the Haploidentical Infant. *J Virol* **83**, 8616–8627 (2009).
119. Martinez-Picado, J. *et al.* Fitness Cost of Escape Mutations in p24 Gag in Association with Control of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* **80**, 3617–3623 (2006).
120. Schneidewind, A. *et al.* Transmission and Long-Term Stability of Compensated CD8 Escape Mutations. *J. Virol.* **83**, 3993–3997 (2009).
121. Schneidewind, A. DFG-Antrag SCH 1085-2-1.
122. Grandel B *et al.* Impact of specific capsid mutations on the CypA dependent replication phenotype of HIV-1. *Noch Nicht Veröff.*
123. Adachi, A. *et al.* Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59**, 284–291 (1986).
124. Aberham, C., Weber, S. & Phares, W. Spontaneous mutations in the human immunodeficiency virus type 1 gag gene that affect viral replication in the presence of cyclosporins. *J. Virol.* **70**, 3536–3544 (1996).
125. Brockman, M. A., Tanzi, G. O., Walker, B. D. & Allen, T. M. Use of a novel GFP reporter cell line to examine replication capacity of CXCR4- and CCR5-tropic HIV-1 by flow cytometry. *J. Virol. Methods* **131**, 134–142 (2006).
126. Gervaix, A. *et al.* A new reporter cell line to monitor HIV infection and drug susceptibility in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4653–4658 (1997).
127. Granier, C. *et al.* Pressure from TRIM5 α Contributes to Control of HIV-1 Replication by Individuals Expressing Protective HLA-B Alleles. *J. Virol.* **87**, 10368–10380 (2013).
128. LANL. HIV Sequence Database: 2008 Compendium. (2008). at <<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2008compendium.html>>
129. Elliott, J. F. *et al.* Induction of interleukin 2 messenger RNA inhibited by cyclosporin A. *Science* **226**, 1439–1441 (1984).
130. Kronke, M. *et al.* Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 5214–5218 (1984).
131. Kapturczak, M. ., Meier-Kriesche, H. . & Kaplan, B. Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant. Proc.* **36**, S25–S32 (2004).
132. Clipstone, N. A. & Crabtree, G. R. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695–697 (1992).
133. Jain, J. *et al.* The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* **365**, 352–355 (1993).
134. Huai, Q. *et al.* Crystal structure of calcineurin–cyclophilin–cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin–drug complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12037–12042 (2002).

135. Fruman, D. A., Burakoff, S. J. & Bierer, B. E. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J.* **8**, 391–400 (1994).
136. Matsuda, S. *et al.* Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep.* **1**, 428–434 (2000).
137. Kino, T. *et al.* FK-506, A NOVEL IMMUNOSUPPRESSANT ISOLATED FROM A STREPTOMYCES I. FERMENTATION, ISOLATION, AND PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS. *J. Antibiot. (Tokyo)* **Vol. 40**, 1249–1255 (2006).
138. Kino, T. *et al.* FK-506, A NOVEL IMMUNOSUPPRESSANT ISOLATED FROM A STREPTOMYCES II. IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECT OF FK-506 IN VITRO. *J. Antibiot. (Tokyo)* **Vol. 40**, 1256–1265 (2006).
139. Atcherson, M. M. & Trifillis, A. L. Cytotoxic effects of FK506 on human renal proximal tubule cells in culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **30A**, 562–567 (1994).
140. Eswar, N. *et al.* in *Curr. Protoc. Protein Sci.* (John Wiley & Sons, Inc., 2001). at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps0209s50/abstract>>
141. Gross, I., Hohenberg, H., Huckhagel, C. & Krausslich, H.-G. N-Terminal Extension of Human Immunodeficiency Virus Capsid Protein Converts the In Vitro Assembly Phenotype from Tubular to Spherical Particles. *J. Virol.* **72**, 4798–4810 (1998).
142. Schwedler, U. K. von *et al.* Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. *EMBO J.* **17**, 1555–1568 (1998).
143. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40 (2008).
144. Wilson, Jamie D. K. *et al.* Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *AIDS Volume 14*, pp 225–233 (2000).
145. Goulder, P. J. R. *et al.* Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature* **412**, 334–338 (2001).
146. Feeney, M. E. *et al.* Immune Escape Precedes Breakthrough Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viremia and Broadening of the Cytotoxic T-Lymphocyte Response in an HLA-B27-Positive Long-Term-Nonprogressing Child. *J. Virol.* **78**, 8927–8930 (2004).
147. Wainberg, M. A., Hsu, M., Gu, Z., Borkow, G. & Parniak, M. A. Effectiveness of 3TC in HIV clinical trials may be due in part to the M184V substitution in 3TC-resistant HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS Lond. Engl.* **10 Suppl 5**, S3–10 (1996).
148. Boutwell, C. L. *et al.* Frequent and Variable Cytotoxic-T-Lymphocyte Escape-Associated Fitness Costs in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype B Gag Proteins. *J. Virol.* **87**, 3952–3965 (2013).
149. Briggs, C. J., Ott, D. E., Coren, L. V., Oroszlan, S. & Tözsér, J. Comparison of the effect of FK506 and cyclosporin A on virus production in H9 cells chronically and newly infected by HIV-1. *Arch. Virol.* **144**, 2151–2160 (1999).
150. Matsuoka, S., Dam, E., Lecossier, D., Clavel, F. & Hance, A. J. Modulation of HIV-1 infectivity and cyclophilin A-dependence by Gag sequence and target cell type. *Retrovirology* **6**, 21 (2009).
151. Moriyama, E. N., Ina, Y., Ikeo, K., Shimizu, N. & Gojobori, T. Mutation pattern of human immunodeficiency virus gene. *J. Mol. Evol.* **32**, 360–363 (1991).
152. McCallum, M. *et al.* Basis for Early and Preferential Selection of the E138K Mutation in HIV-1 Reverse Transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4681–4688 (2013).
153. Bharat, T. A. M. *et al.* Structure of the immature retroviral capsid at 3 Å resolution by cryo-electron microscopy. *Nature* **487**, 385–389 (2012).
154. Agarwal, P. K. Cis/trans isomerization in HIV-1 capsid protein catalyzed by cyclophilin A: Insights from computational and theoretical studies. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **56**, 449–463 (2004).
155. Gatanaga, H. *et al.* Altered HIV-1 Gag Protein Interactions with Cyclophilin A (CypA) on the Acquisition of H219Q and H219P Substitutions in the CypA Binding Loop. *J. Biol. Chem.* **281**, 1241–1250 (2006).
156. Franke, E. K., Yuan, H. E. H. & Luban, J. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**, 359–362 (1994).

157. Borsetti, A., Öhagen, Å. & Göttlinger, H. G. The C-Terminal Half of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Precursor Is Sufficient for Efficient Particle Assembly. *J. Virol.* **72**, 9313–9317 (1998).
158. Battivelli, E. *et al.* Gag Cytotoxic T Lymphocyte Escape Mutations Can Increase Sensitivity of HIV-1 to Human TRIM5 α , Linking Intrinsic and Acquired Immunity. *J. Virol.* **85**, 11846–11854 (2011).
159. Henning, M. S., Dubose, B. N., Burse, M. J., Aiken, C. & Yamashita, M. In Vivo Functions of CPSF6 for HIV-1 as Revealed by HIV-1 Capsid Evolution in HLA-B27-Positive Subjects. *PLoS Pathog* **10**, e1003868 (2014).
160. Rahm, N. *et al.* Susceptibility and adaptation to human TRIM5 α alleles at positive selected sites in HIV-1 capsid. *Virology* **441**, 162–170 (2013).
161. Ambrose, Z. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Mutation N74D Alters Cyclophilin A Dependence and Impairs Macrophage Infection. *J. Virol.* **86**, 4708–4714 (2012).
162. Lee, K. *et al.* HIV-1 Capsid-Targeting Domain of Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 6. *J. Virol.* **86**, 3851–3860 (2012).
163. Maertens, G. N. *et al.* Structural basis for nuclear import of splicing factors by human Transportin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 2728–2733 (2014).
164. Rasaiyaah, J. *et al.* HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. *Nature* **503**, 402–405 (2013).
165. Blair, W. S. *et al.* HIV Capsid is a Tractable Target for Small Molecule Therapeutic Intervention. *PLoS Pathog* **6**, e1001220 (2010).
166. Matreyek, K. A., Yücel, S. S., Li, X. & Engelman, A. Nucleoporin NUP153 Phenylalanine-Glycine Motifs Engage a Common Binding Pocket within the HIV-1 Capsid Protein to Mediate Lentiviral Infectivity. *PLoS Pathog* **9**, e1003693 (2013).
167. Yamashita, M., Perez, O., Hope, T. J. & Emerman, M. Evidence for Direct Involvement of the Capsid Protein in HIV Infection of Nondividing Cells. *PLoS Pathog* **3**, e156 (2007).
168. Hilditch, L. & Towers, G. J. A model for cofactor use during HIV-1 reverse transcription and nuclear entry. *Curr. Opin. Virol.* **4**, 32–36 (2014).

Abkürzungsverzeichnis

α (bei Antikörpern)	anti- (z. B.: dhuman CCR5 Antikörper = anti-human CCR5 Antikörper)
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
Amp.	Ampicillin
APC	Allophycocyanin, ein Fluorochrom
BIV	bovines Immundefizienzvirus
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CPSF6	<i>cleavage and polyadenylation specificity factors subunit 6</i>
CsA	Cyclosporin A
CypA	Cyclophilin A
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
Δ	Delta
D10 ⁺	DMEM mit 10% FCS und 1% Penicilin/Strepomycin
D10 ⁻	DMEM mit 10% FCS ohne Antibiotika
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Env oder env	Protein: Envelope oder das entsprechende Gen
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FIV	felines Immundefizienzvirus
FKBP12	FK-Bindeprotein 12
g	Gramm
Gag oder gag	Polyprotein: gruppenspezifisches Antigen oder das entsprechende Gen
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp	Glykoprotein
GXR25	<i>green fluorescent protein, CXCR4⁺, CCR5⁺ Clone 25</i>
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HEK293T	<i>human embryonic kidney 293 expressing the large SV40 T-antigen</i>
HIV-1 bzw. -2	humanes Immundefizienzvirus 1 bzw. 2
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration

Int	Protein: Integrase
l	Liter
LANL	<i>Los Alamos National Library</i>
Log	Logarithmus
M	Mol oder molar
MA	Matrixprotein
MDMs	<i>monocyte derived macrophages</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
Mio.	Million
mM	Millimol oder millimolar
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
Nef oder nef	Protein: Negativ Faktor oder das entsprechende Gen
ng	Nanogramm
NK-Zelle(n)	natürliche Killerzellen
N-MLV	N-tropes murines Leukemievirus
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
p.i.	<i>post infection</i>
p.t.	<i>post transfection</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
Pol oder pol	Polyprotein Polymerase oder das entsprechende Gen
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
p6	Linkerprotein oder das entsprechende Gen
p24	Kapsidprotein oder das entsprechende Gen
QVINA	H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I, T ₂₄₂ N G ₂₄₈ A Mutationen
R10 ⁺	RPMI mit 10% FCS und 1% Penicilin/Streptomycin
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium (kurz: RPMI)
Rev oder rev	Protein: <i>regulator of expression of virion proteins</i> oder das entsprechende Gen
RT	Protein: reverse Transkriptase
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>

Std	Stunden
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Tat oder tat	Protein: Transaktivator der Transkription oder das entsprechende Gen
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TRIM5 α	<i>tripartite motif 5α</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Variante RK	p24 Variante mit der Mutation R ₂₆₄ K
Variante RKLM	p24 Variante mit den Mutationen R ₂₆₄ K, L ₂₆₈ M
Variante SARK	p24 Variante mit den Mutationen S ₁₇₃ A, R ₂₆₄ K
Variante SARKLM	p24 Variante mit den Mutationen S ₁₇₃ A, R ₂₆₄ K, L ₂₆₈ M
Variante QVI	p24 Variante mit den Mutationen H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I
Variante MQVI	p24 Variante mit den Mutationen V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, M ₂₂₈ I
Variante QIA	p24 Variante mit den Mutationen H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, G ₂₄₈ A
Variante MQIA	p24 Variante mit den Mutationen V ₂₁₈ M, H ₂₁₉ Q, I ₂₂₃ V, G ₂₄₈ A
Variante TN	p24 Variante mit der Mutation T ₂₄₂ N
Vif oder vif	Protein: <i>viral infectivity factor</i> oder das entsprechende Gen
Vpr oder vpr	Protein: Virales Protein R oder das entsprechende Gen

Appendix

	10	20	30	40	50	60	70
NL4-3	MGARASVLS G GELDKWEKIR R LRPGGKKQY K LKHIVWAS R ELERFAVNP G LLETSEGCR Q ILGQLQPSL Q T						
KonsensusR.....K.....						
	80	90	100	110	120	130	140
NL4-3	GSEELRSLY N TIAVLYCVH Q RIDVKDTKE A LDKIEEE Q N K SKKKA Q AA A DTGNNSQV S Q N YPIV Q N L Q G						
KonsensusV.T.....E.....E.....S.....						
	150	160	170	180	190	200	210
NL4-3	QMVHQAIS P R T LNAWVKV V E E KAFSPEV I PMFSALSEG A TPQDLN T MLN T VG G HQAAM Q MLKETINE E AA						
Konsensus						
	220	230	240	250	260	270	280
NL4-3	EWDR L HPV H AGPIAPG Q M R E P RGSDIAG T STLQEQIG W M T HN P PIPV G E I YKR W IIL G L N KIVRMYS P T						
KonsensusN.....						
	290	300	310	320	330	340	350
NL4-3	SILDIR Q GP K EPFRDYVDR F YK T LRAEQAS Q EVKNW M T E TLLV Q NAN P DC K TILKALGP G ATLEEM T AC						
KonsensusA.....						
	360	370	380	390	400	410	420
NL4-3	QGVGGPG H K A RVLA E AMS Q V T NPATIM I Q K GNFR N QR K T V KCFN C G E GH I AK N CRAP R K K GCW K CG K E G						
KonsensusS...M...R.....						
	430	440	450	460	470	480	490
NL4-3	HQMKDCT E R Q ANFLGKI W PS H KGR P GN F L Q SRPEPT A PP E ESFR F GE E T T PS Q K Q EP I DKELYPLAS L R						
Konsensus						
	500						
NL4-3	SLFGSDPSS Q						
KonsensusN.....						

App. 1: Sequenzunterschiede von Gag NL4-3 zu einem Konsensus Gag.

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von NL4-3. Dick gedruckte Aminosäuren markieren eine Position, die einem vielfachen von zehn entspricht. In der Konsensussequenz sind Unterschiede zu NL4-3 durch die Konsensusaminosäure an der entsprechenden Position kenntlich gemacht (K₁₄R, Q₂₈K, I₈₂V, V₈₄T, D₉₃E, D₁₀₂E, N₁₂₅S, H₂₅₂N, G₃₄₀A, P₃₇₃S, I₃₇₈M, K₃₈₀R, S₄₉₅N). Entsprechend implizieren Punkte eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zwischen der NL4-3 Sequenz und der Konsensussequenz.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
NL4-3	FFREDLAF	Q GKAREFSSE Q	TRANSPTR	R ELQVWGRDNN S	LSLEAGADR	Q GTVSFSFPQ I	T LWQRPLVT I	K IGGQLKEAL L	DTGADDTV L	E EMNLPGRW K	P KMIGGIG G F I	KVRQYDQ I	L IEICGHKA I G T
Konsensus
	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
NL4-3	VLVGPTPV N	I GRNLLT Q I	G CTLNFPIS P	I ETVPVKL K	P GMDGPKVK Q	W PLTEEKIKAL V	E ICTEME K E G	K ISKIGPEN P	Y NTPVFA I K	K KDSTKWR K L V	D FRELNR T Q	D FWEVQ L G I	P HPAGLK Q K S
KonsensusK.....
	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
NL4-3	VTVLDVGD A	Y FSVPLDK D	F RKYTAFT I	P S I NNETPG I	R Y Q YNVLP Q	G W K GSPAI F	Q CS M T	K ILEPFR K O	N PDIVI Y Q	M DLVGS D L E	I GQHR T K I E	L RQHLLRW G F	T TPDKKH Q K E P
KonsensusS.....C.V.....
	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
NL4-3	PDKWTV Q P I	V LPEKDSW T V	N DIQKLV G K L	N WASQ I Y	A G K VRQL C	K LLR G T K	A LTEVV P L	T EEAELE L A	E NREIL K E P V	H GVY D PS K D	L IAE I Q K G Q	G Q W TY Q I Y Q E	P F K N L K T G K Y
KonsensusK.....R.....
	530	540	550	560	570	580	590	600	620	630	640	650	
NL4-3	KQLTEAV Q K I	A TESIV I W K	T PK F L P I Q	K ETWEAW W T E	Y WQAT W I P E	W E F VNT P L V K	L W Y Q L E K E P I	I G A ET F V D G	A ANRE T K L G K	A GY V T D R G R Q	K V V P L T D T N	Q K T E L Q A I H L A	
KonsensusV.....	
	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
NL4-3	VTDSQ Y A L G I	I QA Q P D K S E	S ELV S Q I E E L	I L K KE K V Y L	A W V PA H K G I G N	E Q V D K L V S A	G IR K V L F L D G	I D K A Q E E H E K	Y H S N W R A M A S	D FN L P P V V A K E	I V A S C D K C Q	L K G E A M H G Q V	D C S P G I W Q L D C
Konsensus
	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
NL4-3	THLE G K V I L	V AV H V A S G Y	E A E V I P A E T	Q E T A Y F L L K L	A GR V P V K T V	H T D N G S N F T S	T T V K A A C W W A G	I K Q E F G I P Y N	P Q S Q G V I E S M	N K E L K K I I	G Q V R D Q A E H L K T	A V Q M A V F I H N	F K R K G G I G G Y S
KonsensusI.....V.....
	920	930	940	950	960	970	980	980	1000				
NL4-3	AGERIV D I A	T DI Q T K E L Q	K Q I T K I Q N	F R V Y R D S R D P	V W K P A K L L W K	G E G A V V I Q D N	S DI K V V P R R K	A K I I R D Y G K M	A G D D C V A S R Q D E D				
KonsensusL.....

App. 2: Sequenzunterschiede von Pol NL4-3 zu einem Konsensus Pol.

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz von NL4-3. Dick gedruckte Aminosäuren markieren eine Position, die einem vielfachen von zehn entspricht. In der Konsensussequenz sind Unterschiede zu NL4-3 durch die Konsensusaminosäure an der entsprechenden Position kenntlich gemacht (Q₂₅₇K, C₃₁₇S, Y₃₃₆C, M₃₃₉V, R₄₃₂K, V₄₄₈I, K₅₁₃R, I₅₉₀V, V₇₈₇I, V₈₂₈I, I₈₆₆V, V₉₄₉L). Entsprechend implizieren Punkte eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zwischen der NL4-3 Sequenz und der Konsensussequenz.

