

Daniel Rupp  
Dr. med.

## **Charakterisierung eines Blocks der späten Genexpression des Humanen Immundefizienz Virus-1 in Nagerzelllinien**

Promotionsfach: Infektiologie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Oliver T. Keppler

HIV (*human immunodeficiency virus*) hat als Erreger von AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) eine der schwersten Pandemien der Menschheitsgeschichte verursacht. Ein immunkompetentes Kleintiermodell, das effizient mit HIV infiziert werden kann, hätte einen hohen Stellenwert für Untersuchungen zur HIV-Pathogenese und Testung neuer antiviraler Strategien. Dessen Entwicklung wird durch Spezies-spezifische Barrieren für HIV an verschiedenen Schritten des Replikationszykluses in Nagerzellen erschwert. Das dreifach-transgene Rattenmodell der HIV-Infektion unterstützt durch gewebespezifische Expression des humanen Rezeptorkomplexes (CD4/CCR5) und des Transkriptionsverstärkers Cyclin T1 die initiale HIV-1-Infektion mit hoher Effizienz, jedoch schränken weitere Barrieren in der späten Phase der HIV-Replikation die Virämie und Pathogenese in diesen Tieren ein.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Identifizierung und Charakterisierung zellulärer Faktoren angestrebt, welche die Effizienz der HIV-1-Replikation in Rattenzellen beeinflussen können. Durch das Screening eines Pools ausgewählter humaner Gene wurde Crm1 (Exportin 1) als Positivregulator der Produktion infektiöser HIV-1-Partikel in Rattenfibroblasten identifiziert. Die transiente Expression von humanem, aber nicht von Ratten Crm1 steigerte die HI-Virusproduktion um das bis zu 50-fache. Diese Steigerung konnte durch Inhibitoren des Crm1-abhängigen nukleären Exportwegs blockiert werden. Die Expression von humanem Crm1 steigerte die Produktion verschiedener HIV-1-, HIV-2- und SIV-Isolate in Ratten- und Maus-Fibroblasten, jedoch nicht in humanen und Hamster Zellen.

Die funktionelle Analyse chimärer Ratten Crm1-Proteine, die eine unterschiedliche Anzahl humaner Aminosäuren trugen, zeigte fünf Aminosäuren an Position 411, 414, 474, 478 und 481 des Proteins auf, die entscheidend für den Spezies-spezifischen Unterschied im Kontext der HIV-Infektion waren. Die Herstellung einer Rattenzelllinie mit stabiler Expression von humanem Crm1 war trotz unterschiedlicher experimenteller Strategien nicht möglich. Zur Evaluierung der replikationsfördernden Eigenschaft von humanem Crm1 im Kontext des HIV-Tiermodells wurde die kodierende cDNA in einen gewebespezifischen Transgenvektor kloniert und mit diesem wurden Crm1-transgene Rattenlinien hergestellt. Der Transgenvektor wurde in drei unabhängigen Linien stabil an die Nachkommen vererbt und

Thymozytenextrakte aller untersuchten transgenen Ratten wiesen hohe Mengen an humaner Crm1-mRNA auf. Die Generierung eines für humanes Crm1 spezifischen Hühner Antiserums ermöglichte den Spezies-spezifischen Proteinnachweis, der jedoch nur eine sporadische und zumeist schwache Expression von humanem Crm1 in Primärzellen transgener Tiere aufzeigte. Hiermit einhergehend konnte keine Steigerung der HIV-Produktion in primären T-Zellen und Makrophagen transgener Ratten *ex vivo* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine stabile (Über-)Expression von humanem Crm1 in Rattenzellen wahrscheinlich einer posttranskriptionellen Gegenregulation unterliegt, die bisher eine für das Tiermodell notwendige langfristige Expression des Transgens verhindert.

In einem zweiten Teilaspekt der Arbeit wurden Beiträge zur Analyse Spezies-spezifischer Aspekte des neu identifizierten antiviralen Restriktionsfaktors CD317/Tetherin geleistet. Diese Untersuchungen zeigten auf, dass die Nagerorthologe von CD317 eine Blockade der HIV-Freisetzung vermitteln und, im Gegensatz zum humanen Ortholog, nicht durch das virale Hilfsprotein Vpu antagonisiert werden können. Weiterhin wurden CD317-Mutanten generiert, welche die Charakterisierung der Rolle der Vpu-vermittelten Degradation von CD317 für die Vpu-abhängigen Effekte auf die Virusfreisetzung erlaubten.

In einem dritten Projekt wurde eine vergleichende bioinformatisch/phänotypische Analyse des HIV-Korezeptor-Tropismus verschiedener HIV-Isolate durchgeführt. In der klinischen Praxis ist der Ausschluss CXCR4-nutzender HI-Viren vor Beginn einer Therapie mit dem CCR5-Antagonisten Maraviroc essentiell. Wir konnten zeigen, dass vier derzeit zur Verfügung stehende, auf der Sequenz der V3-Schleife des *env*-Gens basierende bioinformatische *online*-Algorithmen (geno2pheno[coreceptor], WebPSSM, SVM-SK, WetCat), zur Vorhersage des Korezeptor-Tropismus für Primärisolate der nicht-pandemischen HIV-1 Gruppe O unzulänglich sind. Die Spezifität dieser sequenzbasierten Vorhersage lag abhängig vom verwendeten Algorithmus nur bei 0%-28,6% bezogen auf den in Zellkultur ermittelten Korezeptor-Tropismus. Hieraus lässt sich ableiten, dass bei Patienten mit einer HIV-1 Gruppe O-Infektion derzeit ausschließlich phänotypische Tropismus-Untersuchungen durchgeführt werden sollten und bestehende Algorithmen optimiert werden müssen.