

Benedikt Obermaier
Dr. med.

The pathogenicity factor Nef in HIV-1 infection: functional characterization of patient-derived nef alleles and influence of Nef in an *ex vivo* CD4⁺ T cell model

Fach/Einrichtung: Hygiene

Doktorvater: Prof. Dr. Oliver T. Fackler

HIV-1 Nef ist ein vielseitiges virales Protein, das eine essenzielle Rolle in der Pathogenese von HIV-1 Infektionen spielt. Nef interagiert mit einer großen Anzahl von Elementen der Wirtszellen und führt zu vielfältigen Effekten. Es ist jedoch unklar, welche der verschiedenen Funktionen von Nef notwendig und verantwortlich für seine klinische Relevanz sind. Die Aktivitäten von Nef umfassen die Regulation von Molekülen an der Zelloberfläche, z. B. CD4 und MHCI, die Einflussnahme auf das Aktin Zytoskelett sowie die Steigerung der viralen Replikation. Außerdem beeinflusst Nef den Aktivierungszustand der Wirtszelle, unter anderem indem es die Hauptlokalisierung der Src Kinase Lck verändert. Eine weitere prominente Funktion von Nef ist die Steigerung der Infektiosität von Viruspartikeln, die kürzlich Nefs Antagonismus des in Wirtszellen vorkommenden Faktors SERINC5 zugeschrieben wurde. Wie genau Nef SERINC5 entgegenwirkt, ist unklar. Dass sich die dafür notwendigen molekularen Voraussetzungen in Nef mit denen decken, die für die Reduktion von CD4 an der Zelloberfläche notwendig sind, legt jedoch nahe, dass es sich um ähnliche Mechanismen handelt. Eine große Hürde für eine Heilung von HIV-1 besteht in der Persistenz eines HIV-1 Reservoirs in latent infizierten Zellen trotz antiretroviraler Therapie. Obwohl es unter Berücksichtigung von Nefs Effekten plausibel erscheint, dass Nef eine Rolle in der Entstehung von und Reaktivierung aus viraler Latenz spielt, ist Nefs Einfluss in diesem Kontext bisher kaum erforscht. In diesem Projekt sollte zum einen die Konservierung von Funktionen in brasilianischen Nef Varianten untersucht werden, um besser zu verstehen, welche Nef Funktionen im Einzelnen *in vivo* relevant sind. Zum anderen sollte ein *ex vivo* Modell zur Analyse von Nefs Rolle in viraler Latenz charakterisiert und optimiert werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden insgesamt 189 *nef* Allele von in der klinischen Studie NCT02961829 behandelten HIV-1 Infizierten aus Brasilien amplifiziert und sequenziert. Nach Auswahl der repräsentativsten *nef* Sequenz oder Sequenzen jedes Patienten erfolgte die Subklonierung von insgesamt 18 *nef* Allelen und deren funktionelle Charakterisierung bezüglich verschiedener Aktivitäten inklusive der Reduktion bestimmter Moleküle an der Zelloberfläche, der intrazellulären Relokalisierung von Lck und der Störung des F-Aktin Umbaus. Die meisten Nef Varianten zeigten zu einem hohen Grad erhaltene Funktionen. Das impliziert einen Selektionsvorteil und damit eine *in vivo* Relevanz dieser Funktionen. Einzelne Nef Varianten zeigten jedoch spezifische funktionelle Defekte, welche teilweise bestimmten strukturellen Polymorphismen zugeordnet werden konnten. Dies traf insbesondere für eine G176R Mutation zu, die zu einem Verlust der Aktivität, CD4 an der Zelloberfläche zu reduzieren, führte, während die Fähigkeit, den antiviralen Faktor SERINC5 zu neutralisieren,

uneingeschränkt erhalten blieb. Vor dem Hintergrund bisheriger Forschungsergebnisse, die eine enge mechanistische Verknüpfung und sich zu großen Teilen deckende molekulare Determinanten der beiden Funktionen zeigten, ist dies eine interessante Erkenntnis.

Im zweiten Teil des Projekts erfolgte die Charakterisierung eines auf primären menschlichen CD4⁺ T Zellen basierenden HIV-1 Latenz Modells und dessen Optimierung für einen Vergleich von vollständigem und Nef-defizientem HIV-1 bezüglich der Replikations-Kinetik, dem Aufbau viraler DNA Pools und dem Ansprechen auf reaktivierende Stimuli. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich stärkere Replikation sowie einen gesteigerten Aufbau viraler DNA durch HIV-1 WT und bestätigten damit den in früheren Studien beschriebenen Effekt von Nef auf die Replikation. Die Reaktivierungs-Experimente zeigten jedoch eine deutlich ausgeprägtere Reaktion in mit Nef-defizientem HIV-1 infizierten Kulturen. Weitere Kontroll-Experimente zeigten, dass dieser Effekt eher einer, durch den Reaktivierungs-Stimulus ausgelösten, erhöhten Anzahl an neuen Infektionen als der Reaktivierung zuvor latent infizierter Zellen zuzuschreiben war. Aufgrund der ausgeprägten Unterschiede in Infektions-Kinetik und zellulärem Überleben konnte der Frage nach Nefs Einfluss auf die Reaktivierung aus viraler Latenz nicht angemessen nachgegangen werden.

Zusammenfassend zeigte diese Arbeit (i) einen hohen Grad der Konservierung zentraler Nef Funktionen in in Brasilien prävalenten Nef Varianten, (ii) wurde ein G176R Polymorphismus neu identifiziert, der aufdeckte, dass die Nef Funktionen der Reduktion von Oberflächen-CD4 und des Antagonismus von SERINC5 mechanistisch entkoppelt werden können und (iii) es erfolgte die Charakterisierung von *nef* Allelen, die sich als hilfreich für die weitere Untersuchung von Nefs Effekten auf F-Aktin und Cofilin erweisen könnten. Außerdem erfolgten in dieser Arbeit (iv) die Charakterisierung und Optimierung eines auf primären CD4⁺ T Zellen basierenden HIV-1 Latenz Modells, das sich in der aktuellen Form für die Beschreibung von Nefs Rolle in der Reaktivierung aus viraler Latenz als unzureichend erwies, das aber (v) ein geeignetes Werkzeug für die zukünftige detaillierte Erforschung von Nefs Effekt auf die virale Replikation darstellt.