

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. T. Lüdde

**Untersuchungen zu viralen, zellulären und pharmakologischen  
Determinanten des Uncoatings von HIV-1 *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sebastian Tischler

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Carsten Münk

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heiner Schaal

## Zusammenfassung

Der Begriff „Uncoating“ bezeichnet im Replikationszyklus des Humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) den Prozess des Capsidzerfalls nach der Fusion der Virus- mit der Wirtszellmembran. In der jüngeren Vergangenheit konnten mit Hilfe neuer Nachweismethoden virale, wirtszell-spezifische und pharmakologische Einflussfaktoren identifiziert werden, deren Effekte auf das Uncoating im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* experimentell gemessen und untersucht wurden.

Hierfür wurde zunächst ein Uncoating Assay aus der Literatur modifiziert, insgesamt wurden drei verschiedene experimentelle Herangehensweisen getestet. Zunächst wurde versucht, ein Fusionsprotein aus dem viralen Protein R (Vpr) und NanoLuciferase in die viralen Vektoren zu inkorporieren, um es nach erfolgter Transduktion in den Wirtszellen messen zu können. Dieser Ansatz erbrachte keine reproduzierbaren Ergebnisse. Auch die Verwendung eines NanoLuc-Split-Proteins, das durch Protein-Protein-Interaktion in der Wirtszelle ein messbares Signal erzeugen sollte, eignete sich nicht für die Gewinnung statistisch valider Daten. Mit Hilfe des dritten Ansatzes jedoch, der Verwendung einer translatierbaren Reporter-mRNA in virale Vektoren, konnten umfangreiche Messungen zu verschiedenen Determinanten des Uncoatings durchgeführt werden. Diese Reporter-mRNA kodiert für die NanoLuciferase und wird durch das Uncoating dem Translationsapparat der Zielzelle zugänglich, muss also nicht erst in cDNA umgeschrieben werden. Sie wird im Zytoplasma in funktionsfähige Luciferase translatiert, deren Signal luminometrisch messbar wird. Durch die Verwendung der NanoLuciferase als sehr sensitivem Reporterenzym gelang es, durch Einsatz verhältnismäßig geringer Mengen an Reagenzien signifikante Ergebnisse zu erzielen.

Die gewonnenen Daten zeigen, dass der frühe Infektionszyklus von HIV-1 auf verschiedenste Weisen beeinflussbar ist. So könnten beispielsweise pharmakologische Capsiddestabilisatoren in Zukunft eine neue Klasse der HIV-1-Therapeutika *in vivo* darstellen, da sie *in vitro* einen sehr starken Effekt auf das Uncoating zeigten. Hier sind allerdings weitere Untersuchungen nötig, bevor die Substanzen in der Humanmedizin nutzbar werden könnten. Auch die Erkenntnisse über virale und wirtszell-spezifische Determinanten des Uncoatings bieten interessante Ansatzpunkte für weitere Studien. Gerade die Kombination der viralen, zellulären und pharmakologischen Einflüsse jedoch bietet noch viel Raum für weitere Untersuchungen auf mögliche Synergieeffekte, um eine möglichst hohe Effektivität in der Inhibition des frühen Infektionszyklus zu ermöglichen. Langfristig könnten so möglicherweise neue Ansätze in der Therapie der HIV-1-Infektion *in vivo* gefunden werden.

## Abstract

In the replication cycle of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1), the term "uncoating" refers to the process of capsid decay following the fusion of the viral and host cell membranes. In the recent past, viral, host cell-specific and pharmacological factors have been identified with the aid of new detection methods. The effects of these factors on uncoating were experimentally measured and investigated *in vitro* in this work.

For this purpose, an uncoating assay published in literature was first modified, and a total of three different experimental approaches were tested. First, an attempt was made to incorporate a fusion protein consisting of viral protein R (Vpr) and NanoLuciferase into the viral vectors, in order to be able to measure it in the host cells after transduction had taken place. This approach did not yield reproducible results. The use of a NanoLuc split protein, which was supposed to generate a measurable signal by protein-protein interaction in the host cells also proved not suitable for obtaining statistically valid data. However, the third approach, the use of a translatable reporter mRNA in viral vectors, allowed extensive measurements to be made on various determinants of uncoating. This reporter mRNA codes for nanoluciferase and becomes accessible to the translational apparatus of the target cell through uncoating, thus not having to be transcribed into cDNA first. In cytoplasm, it is translated into functional luciferase, whose signal can be measured luminometrically. Nanoluciferase being a very sensitive reporter enzyme, it was possible to obtain significant results by using relatively small amounts of reagents.

The data obtained show that the early infection cycle of HIV-1 can be influenced in a variety of ways. For example, pharmacological capsid destabilizers may represent a new class of HIV-1 therapeutics *in vivo* in the future, as they showed a very strong effect on uncoating *in vitro*. However, further studies are needed before the compounds could become useful in treating human individuals infected with HIV-1. The findings on viral and host cell-specific determinants of uncoating also provide interesting approaches for further studies. Nevertheless, the combination of viral, cellular and pharmacological influences in particular offers much scope for further investigation into possible synergistic effects to maximize effectiveness in inhibiting the early infection cycle of the virus. In the long term, this could potentially lead to new approaches in therapy of HIV-1 infection *in vivo*.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<b>AGM</b>	<i>African Green Monkey</i> , westliche Grünmeerkatze
<b>AIDS</b>	Acquired Immunodeficiency Syndrome
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AWMF</b>	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
<b>BlaM</b>	Beta-Laktamase
<b>CA</b>	Capsid-Protein der Retroviren
<b>CCD</b>	Central Core Domain
<b>CCR5</b>	C-C-Motiv-Chemokinrezeptor 5
<b>CD4</b>	Cluster of Differentiation 4
<b>CHX</b>	Cycloheximid
<b>CPSF6</b>	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 6
<b>CRFK</b>	<i>Crandle Rees Feline Kidney</i> -Zellen
<b>CsA</b>	Cyclosporin A
<b>CXCR4</b>	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
<b>CypA</b>	Cyclophilin A
<b>D64V</b>	Mutation der Integrase: Austausch von Asparaginsäure durch Valin an Position 64
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure, von engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure, von engl. <i>double strand deoxyribonucleic acid</i>
<b>DTG</b>	Dolutegravir
<b>DYNLL1</b>	Dynein-Leichtketten-Molekül 1
<b>ECL</b>	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>

<b>Env</b>	<i>Envelope</i>
<b>FLuc</b>	Firefly-Luciferase
<b>fw</b>	forward (bei Primern)
<b>Gag</b>	<i>Group-Specific Antigen</i>
<b>gp120</b>	Glykoprotein 120
<b>gp41</b>	Glykoprotein 41
<b>HEK</b>	<i>Human Embryonic Kidney</i> -Zellen
<b>HeLa</b>	<i>Henrietta Lacks</i> -Zellen
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz-Virus
<b>HIV ΔIN</b>	HI-Viren, die keine (funktionierende) Integrase exprimieren
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase, von engl. <i>Horseradish Peroxidase</i>
<b>IN</b>	Integrase
<b>INSTI</b>	Integrase-Strangtransfer-Inhibitor
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	<i>Lysogeny Broth</i> , Nährmedium
<b>LgBIT</b>	Large Bit, großes Fragment der NLuc im NanoBIT-Assay
<b>LTR</b>	Long Terminal Repeat
<b>MA</b>	Matrix-Protein der Retroviren
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>mRNA</b>	Messenger-RNA
<b>NC</b>	Nucleocapsid-Protein der Retroviren
<b>Nef</b>	engl. <i>Negative Factor</i> , Gen/Protein von HIV-1

<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NLuc</b>	NanoLuciferase
<b>Nup153</b>	Nucleoporin 153
<b>OM</b>	Owl Monkey, Nachtaffe der Gattung <i>Aotus</i>
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBMC</b>	Mononukleare Zellen des peripheren Blutes, von engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung, von engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion, von engl. Polymerase Chain Reaction
<b>PF-74</b>	PF-3450074
<b>PIC</b>	Präintegrationskomplex, von engl. <i>Pre Integration Complex</i>
<b>Pol</b>	Polymerase
<b>PR</b>	Protease
<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluorid
<b>qPCR</b>	Quantitative Polymerasekettenreaktion
<b>RAL</b>	Raltegravir
<b>Rev</b>	engl. <i>regulator of expression of virion proteins</i> , Gen/Protein von HIV-1
<b>rev</b>	reverse (bei Primern)
<b>RhTRIM</b>	TRIM-Protein der Rhesusaffen ( <i>Macaca mulatta</i> )
<b>RhTRIMCyp</b>	TRIMCyp-Protein der Rhesusaffen
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure, von engl. <i>ribonucleic acid</i>
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase; auch: Raumtemperatur
<b>RTC</b>	Reverse Transcription Complex
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat (von engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>SIV</b>	Simianes Immundefizienz-Virus

<b>SmBIT</b>	Small Bit, kleines Fragment der NLuc im NanoBIT-Assay
<b>SV40</b>	Simian-Virus 40
<b>SU</b>	Surface Unit
<b>TAE</b>	Tris-Acetat
<b>Tat</b>	engl. <i>Trans-Activator of Transcription</i> , Gen/Protein von HIV-1
<b>TBS-T</b>	Tris-buffered Saline with Tween20
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>TFB</b>	Transformationspuffer, von engl. <i>Transformation Buffer</i>
<b>TM</b>	Transmembrane Unit
<b>TRIM</b>	Tripartite Motif Containing Proteins
<b>tRNA</b>	Transfer-RNA
<b>U</b>	Unit(s)
<b>Vif</b>	engl. <i>viral infectivity factor</i>
<b>Vpr</b>	engl. <i>viral protein R</i>
<b>Vpu</b>	engl. <i>viral protein U</i>
<b>VSV</b>	Vesikuläres Stomatitis-Virus
<b>VSV-G</b>	Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV)

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Retroviren.....	1
1.2 Das Humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1).....	2
1.3 Der Replikationszyklus der <i>Retroviridae</i> am Beispiel von HIV-1 .....	2
1.4 Das Capsid-Protein und Uncoating .....	7
1.5 Restriktionsfaktoren des Uncoatings von HIV-1 .....	8
1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	13
<b>2 ERGEBNISSE .....</b>	<b>14</b>
2.1 Überblick über die genutzten Testsysteme zur Analyse des Uncoatings von HIV-1.....	14
2.2 Interne Validierung des Assays durch Messungen unter Cycloheximid-Zugabe .....	25
2.3 Zelluläre Faktoren: TRIM-Proteine als Restriktionsfaktoren.....	26
2.4 Virale Faktoren: Integrase-defiziente Viren .....	28
2.5 Pharmakologische Faktoren.....	30
<b>3 DISKUSSION .....</b>	<b>37</b>
3.1 Zeitliche und örtliche Organisation des Uncoatings .....	39
3.2 Cycloheximid als Hemmer der Proteinbiosynthese validiert die Aussagekraft des verwendeten Assays.....	41
3.3 Die virale Integrase beeinflusst das Uncoating von HIV-1 auf mehreren Ebenen .....	42
3.4 TRIM-Proteine als Restriktionsfaktoren hemmen HIV-1 speziesabhängig in unterschiedlichem Umfang .....	44
3.5 PF-3450074 destabilisiert das Capsid von HIV-1 und führt so zu vorzeitigem Uncoating ..	48
3.6 GS-CA1 destabilisiert hochpotent das Capsid von HIV-1 und führt so zu vorzeitigem Uncoating .....	50
3.7 Hemmung der Capsid-Cyclophilin A-Interaktion durch CsA erhöht die zelluläre Immunabwehr durch Restriktionsfaktoren.....	52
3.8 Integrase-Inhibitoren hemmen die frühen Schritte der HIV-1-Infektion.....	55
3.9 Zusammenfassung und Ausblick .....	57
<b>4 MATERIAL .....</b>	<b>59</b>

4.1	Elektronische Geräte .....	59
4.2	Chemikalien .....	60
4.3	Puffer und Lösungen .....	61
4.4	Molekularbiologische Kits .....	62
4.5	Längen- und Größenstandards.....	63
4.6	Enzyme .....	63
4.7	Antikörper und Antiseren.....	64
4.8	Oligonukleotide / Primer .....	65
4.9	Plasmide .....	66
4.10	Medien .....	67
<b>5</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>69</b>
5.1	Molekularbiologische Methoden .....	69
5.2	Proteinbiochemische Methoden.....	73
5.3	Methoden mit <i>Escherischia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	75
5.4	Zellkultur .....	77
5.5	Virologische Methoden .....	78
5.6	Statistische Methoden .....	81
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>90</b>

# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 Retroviren

Die Retroviren (Retroviridae) stellen eine Familie von behüllten RNA-Viren dar, die ein einzel-(+)-strängiges Genom aufweisen. Der Unterschied zu anderen RNA-Viren liegt darin, dass bei den Retroviridae das als Ribonukleinsäure vorliegende Genom zunächst in Desoxyribonukleinsäure (DNA) umgewandelt werden muss, bevor es schließlich in das Genom der Wirtszelle integriert werden kann. Diesen Vorgang bezeichnet man als *Reverse Transkription*.

Retroviren befallen alle Spezies der Wirbeltiere, sind dabei aber meist relativ spezifisch für einen Wirt. Sie können vertikal (kongenital) oder horizontal innerhalb der Wirtspopulation übertragen werden.

Die Familie der Retroviren wird weiter unterteilt in zwei Unterfamilien: die *Orthoretrovirinae* umfasst die Gattungen *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-*, *Epsilonretrovirus* sowie die Gattung der *Lentiviren*. Die zweite Unterfamilie sind die *Spumaretrovirinae*. Die drei erstgenannten Gattungen der *Orthoretrovirinae* werden aufgrund des relativ einfachen Aufbaus ihres Genoms als „*einfache* Retroviren“ bezeichnet, sie besitzen lediglich die drei Gene *gag* (group-specific antigen), *pol* (polymerase) und *env* (envelope) und maximal ein weiteres. Die anderen Gattungen sowie die *Spumaretrovirinae* besitzen neben diesen drei bzw. vier Genen noch weitere Gene bzw. Proteine und werden daher als „*komplexe* Retroviren“ bezeichnet (Weiss, 2006). Eine schematische Gegenüberstellung des Genomaufbaus der simplen und komplexen Retroviren zeigt die untenstehende Abbildung 1-1.

Das *gag*-Gen der Retroviren kodiert für die Strukturproteine des Virus: neben dem Matrix-Protein (MA) sind dieses das Capsid-Protein (CA) und das Nucleocapsid-Protein (NC). Auf dem *pol*-Gen findet sich die Erbinformation für die Enzyme des Virus: die namensgebende Reverse Transkriptase (RT), die Integrase (IN) sowie die Protease (PR). Das *env*-Gen kodiert, wie der Name bereits suggeriert, für Proteine der Virushülle. Die Hauptdomänen des Spike-Proteins von HIV-1 werden als Transmembrane Unit (TM) sowie als Surface Unit (SU) bezeichnet. Beide sind Teil des Glykoproteinkomplexes der Virushülle, mit der das Virus seine Rezeptoren auf der Zielzelle erkennt und an diese bindet (Coffin, Hughes, & Varmus, 1997).

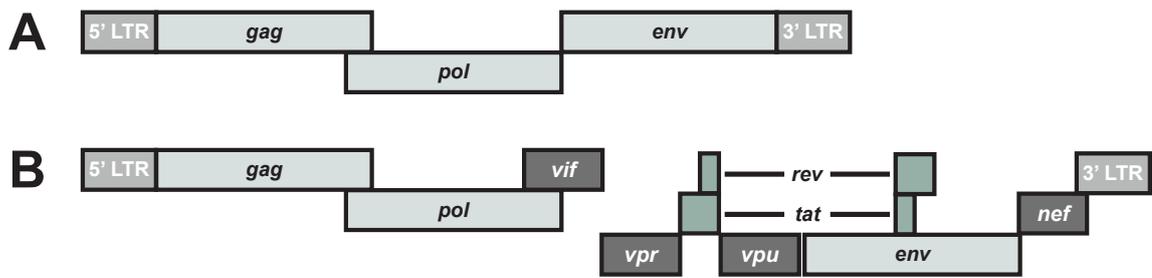


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Genomorganisation einfacher (A) und komplexer (B) Retroviren. Der Teil B zeigt exemplarisch das Genom von HIV-1.

## 1.2 Das Humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1)

Das humane Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) gehört zur Gattung *Lentivirus* und damit zu den sog. „komplexen“ Retroviren. Nach seiner Erstbeschreibung im Jahre 1983 durch Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi wurde das Virus aufgrund der weltweiten Pandemie und der oft drastischen Schicksale Infizierter bis heute sehr gut beforscht. Trotz fast vier Jahrzehnten an Forschung ist es jedoch nicht gelungen, das Virus und die dadurch hervorgerufene AIDS-Erkrankung heilbar zu machen. Das immer bessere Verständnis der virologischen Grundlagen der HIV-Infektion ermöglicht zwar immer bessere medikamentöse Eingriffe in den Replikationszyklus und damit eine gute pharmakologische Kontrolle der Infektion; einzelne Abschnitte des Infektionszyklus konnten jedoch bis heute noch nicht in Gänze nachvollzogen werden und bieten daher Potential für weiterführende Forschung. Aus dieser Forschung könnten sich eventuell neue Zielstrukturen für die pharmakologische Beeinflussung der HIV-Infektion ergeben. Eine dieser bisher nicht gut verstandenen Phasen des Replikationszyklus ist das sog. *Uncoating*, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

## 1.3 Der Replikationszyklus der *Retroviridae* am Beispiel von HIV-1

### 1.3.1 Bindung an die Zelloberfläche

Der retrovirale Replikationszyklus beginnt mit der Bindung des Virus an die Oberfläche seiner Wirtszelle. HIV-1 nutzt als Hauptrezeptor den CD4-Rezeptor, der sich typischerweise auf T-Helferzellen des Menschen befindet (Bour, Geleziunas, & Wainberg, 1995; Dalglish et al., 1984). Neben der Bindung an den Hauptrezeptor benötigt das Virus jedoch Korezeptoren, für deren Bindung es den Env-Glykoproteinkomplex benutzt. Mittels des gp120 (auch *SU*, für *Surface*, genannt) bindet das Virus CD4 und einen seiner Korezeptoren. HIV-1 nutzt als solche die Chemokinrezeptoren CXCR4 (T-trope Viren) und CCR5 (M-trope Viren). CXCR4 findet sich vor allem auf T-Zellen, Makrophagen hingegen exprimieren typischerweise CCR5; primäre Lymphozyten

können beide Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen. Nach erfolgter Bindung an CD4 und den Korezeptor induziert das gp120 eine Konformationsänderung in der Transmembrandomäne (TM, auch als gp41 bezeichnet) des Virus; dadurch können die Virus- und die Wirtszellmembran fusionieren. (Martin, Schaal, Scheid, & Ruyschaert, 1996; Schaal, Klein, Gehrman, Adams, & Scheid, 1995). Im Anschluss wird das sog. Core, das das Virusgenom sowie virale Proteine bzw. Enzyme enthält, ins Zytoplasma der Zelle abgegeben.

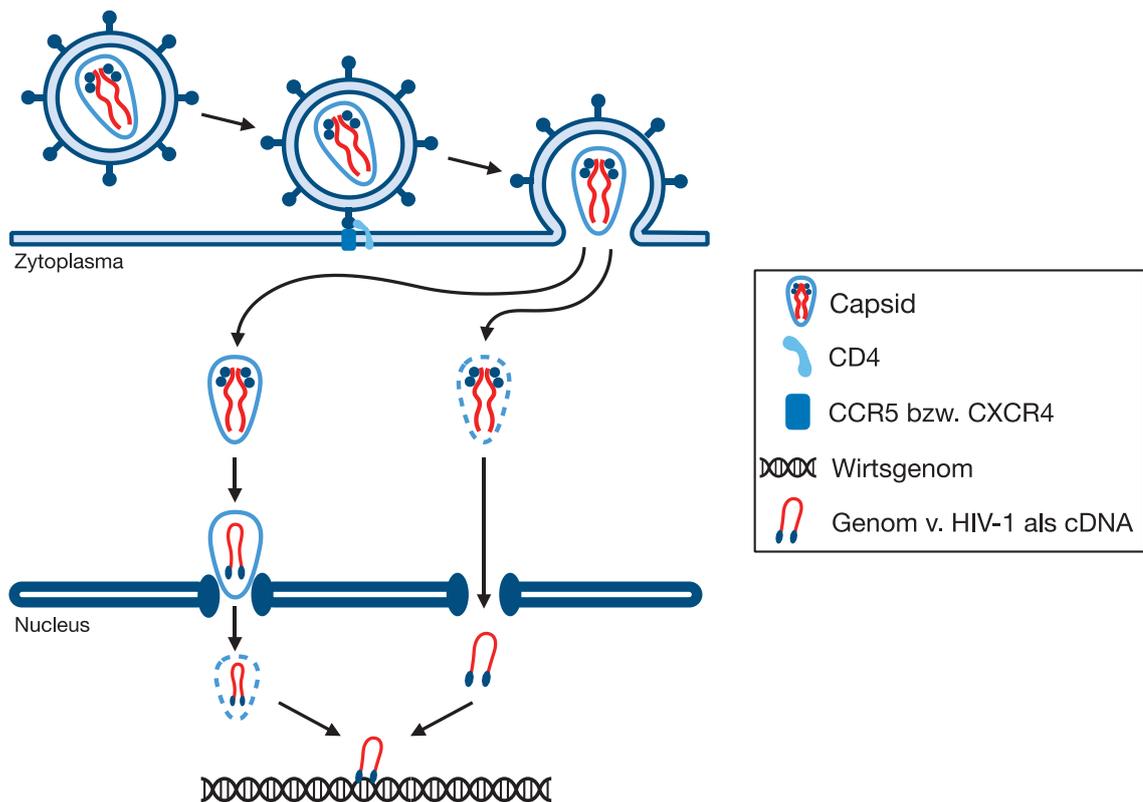
### **1.3.2 Uncoating und Reverse Transkription**

Nach der Membranfusion wird aus dem viralen Core, also dem CA-ummantelten Teil des Virus, der neben dem Genom einige Proteine und Enzyme beherbergt, der sog. *Reverse Transcription Complex* (RTC), aus dem im Verlauf der *Präintegrationskomplex* (PIC) wird (Miller, Farnet, & Bushman, 1997). Dieser Prozess wird als *Uncoating* bezeichnet und seine Beeinflussung ist der wesentliche Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Zum genauen Ablauf dieses Abschnitts des viralen Replikationszyklus existieren verschiedene Theorien. Die etablierte Meinung für lange Zeit besagte, dass das Uncoating im Zytoplasma durch einen koordinierten Zerfall des viralen Cores mit schrittweiser Auflösung der Capsid-Polymere gleichzeitigem Beginn der reversen Transkription stattfindet (Aboud, Shoor, & Salzberg, 1979; Lukic, Dharan, Fricke, Diaz-Griffero, & Campbell, 2014; Mamede, Cianci, Anderson, & Hope, 2017). Sie wurde jedoch in letzter Zeit durch Daten diverser Forschergruppen in Frage gestellt, die zeigen, dass der Zerfall des viralen Cores erst an der Kernmembran oder gar im Nukleus selbst stattfinden könnte (Ryan C. Burdick et al., 2020). Der genaue zeitliche und örtliche Ablauf des Uncoatings ist also Gegenstand der aktuellen Forschung und noch nicht abschließend geklärt, wobei sich die Hinweise zunehmend verdichten, dass das Uncoating erst im Zellkern stattfinden könnte. Einen starken Hinweis darauf liefert die Arbeit von Zila und Kollegen, denen es erstmals gelang, intakte Capside bei ihrer Passage der Kernmembran unter Verwendung von Elektronenmikroskopie und Kryoelektronentomografie bildlich darzustellen (Zila et al., 2021). Die vielen neuen Erkenntnisse der letzten Jahre zeigen, wie viel Potential in der Erforschung der frühen Schritte des Replikationszyklus von HIV-1 steckt. Einen Überblick über die mögliche örtliche Organisation des Uncoatings von HIV-1 zeigt die unten stehende Abbildung 1-2.

Nach der Membranfusion beginnt die Reverse Transkriptase (RT), das RNA-Genom zu doppelsträngiger DNA (dsDNA) zu transkribieren. Das Enzym hat dabei eine relativ geringe Affinität zu seinem Template, was dem Ablauf seines Arbeitszyklus geschuldet ist: ein RT-Molekül kann im Verlaufe der reversen Transkription zwischen den beiden im Viruspartikel befindlichen RNA-Templates „hin- und herspringen“ (Pathak & Hu, 1997). Darüber hinaus besitzt die RT eine relativ hohe Mutationsrate (Mansky & Temin, 1995). Nicht zuletzt dadurch bedingt kann es vorkommen, dass die beiden in einem Viruspartikel befindlichen RNA-Stränge genetisch nicht identisch sind. Das

Hin- und Herwechseln des Enzyms zwischen den beiden Strängen führt also zu einer weiteren Erhöhung der genetischen Variabilität von HIV-1. Diese Ungenauigkeiten bei der Verdopplung des viralen Genoms führen im Verlaufe der Infektion zu einer sogenannten Quasispezies (Goodenow et al., 1989). Unter anderem diese Eigenschaft des HI-Virus macht es so schwierig, eine Impfung oder eine Heilung für die Erkrankung zu entwickeln: das Virus verändert sich schnell, sodass es kaum gleichbleibende pharmakologische Zielstrukturen gibt (Freed, 2001). Dennoch ist es in den letzten Jahren glücklicherweise gelungen, durch immer detailliertere Einblicke in den Infektionsablauf die HIV-Infektion zu einer medikamentös beherrschbaren chronischen Erkrankung zu machen.

Die PIC gelangen nun in den Zellkern. Bei den Lentiviren liegt dem Transport über die Kernmembran ein aktiver Transportprozess zugrunde. Dieser ist nötig, da die PIC zu groß sind, um einfach durch die Poren der Kernmembran diffundieren zu können. Im Falle von HIV-1 konnte durch Fluoreszenzmarkierung von Capsid-Molekülen gezeigt werden, dass es eine Interaktion des Capsidproteins mit dem Kernporenprotein *Nup153* gibt, die eine Bindung des viralen Capsid in den Kernporen ermöglicht. Die viralen Capside scheinen dann den sog. *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 6* (CPSF6), ein Protein des Zellkerns, zu rekrutieren. Diese Bindung erfolgt an einer Stelle, die sich mit der Bindungsstelle des *Nup153* überlappt; sie verdrängt somit dessen Bindung und „zieht“ das Capsid in den Zellkern hinein (Bejarano et al., 2019). Der aktive Transport verschafft den Lentiviren (wie z.B. HIV-1) einen Vorteil gegenüber den einfachen Retroviren: letztere sind darauf angewiesen, dass die Kernmembran während der Mitose zerfällt und können sich deshalb nur in teilungsaktiven Zellen vermehren (Roe, Reynolds, Yu, & Brown, 1993).



**Abbildung 1-2: Mögliche Orte des HIV-1-Uncoatings in der Zelle (schematische Darstellung).**

Im Wesentlichen werden zwei Orte für das Uncoating von HIV-1 in der Zielzelle diskutiert. Vor allem neuere Daten sprechen dafür, dass das Capsid von HIV-1 nach der Membranfusion als Ganzes in den Zellkern gelangt und erst dort die virale Erbinformation freigibt (linker Teil der Abbildung). Dem gegenüber steht die These, dass das Uncoating im Zytoplasma stattfindet (rechter Teil der Abbildung) und dass lediglich die Inhalte des Capsids in den Nucleus gelangen, wo die Integration ins Wirtsgenom stattfindet.

### 1.3.3 Integration

Ob die Erbinformation von HIV-1 in Form des PIC oder gar als gesamtes Core im Zellkern ankommt, ist Gegenstand aktueller Forschung (vgl. „das Capsid-Protein und Uncoating“, unten). Ist der PIC (oder das Core) im Zellkern angekommen, kann die Integration stattfinden. Die Integrase schneidet dafür das Wirtsgenom, sodass ein freies 5'-Phosphatgruppen-Ende entsteht, an das ein vorher durch die Integrase am Virusgenom erzeugtes, freies 3'OH-Ende angeknüpft werden kann. Der zelluläre Reparaturapparat beseitigt dabei entstehende Lücken und Überlappungen (Chen, Wei, & Engelman, 1999). Das Virusgenom ist somit Teil des Wirtsgenoms geworden und wird als sog. *Provirus* bezeichnet. Zelluläre Transkriptionsfaktoren werden unter Nutzung von Enhancer- und Promotor-Elementen aus den *Long Terminal Repeat* (LTR)-Regionen des Genoms rekrutiert. Dabei ist die Aktivität der HIV-1-LTR per se relativ gering, wird aber mannigfaltig verstärkt durch die Präsenz des viralen Proteins *tat* (von engl. „*Transactivator of Transcription*“) als Transkriptionsverstärker (Kao, Calman, Luciw, & Peterlin, 1987).

### 1.3.4 Kernexport und Splicing der viralen Erbinformation

Durch die Transkription des Provirus entstehen mehr als 40 verschiedene mRNAs, aus denen durch alternatives Spleißen unterschiedliche Genprodukte gebildet werden. Die produzierten mRNAs lassen sich dabei in drei Kategorien einteilen. Zum einen entstehen große, ungespleißte mRNA-Moleküle. Diese können entweder als Genom für neue Viruspartikel dienen oder zu Gag oder Gag-Pol-Polypeptiden translatiert werden. Durch alternatives Spleißen werden Transkriptionsfaktoren gebildet, die für die viralen Proteine Env, Vif, Vpr und Vpu kodieren. Die dritte Kategorie bilden intronlose Transkripte, die durch mehrfaches Spleißen entstehen und für die Proteine Rev, Tat und Nef kodieren (Freed, 2001; Purcell & Martin, 1993; Sertznig, Hillebrand, Erkelenz, Schaal, & Widera, 2018).

### 1.3.5 Bildung neuer Viruspartikel

Die Bildung neuer, infektiöser Viruspartikel findet an der Plasmamembran der Wirtszelle statt. Hierfür vermittelt zunächst die MA-Domäne des Gag- bzw. Gag-Pol-Polypeptids die Bindung dieser Proteine an die Zellmembran. Über die NC-Domäne kommt es nun zu einer Interaktion zwischen der mRNA und den genannten Proteinen. Die Grundlage für diese Interaktion bildet von Seiten der RNA das sog. „*packaging signal*“ ( $\psi$ -Sequenz). Dabei handelt es sich um einen Abschnitt der viralen ungespleißten mRNA im 5'-Bereich, über dessen Sekundärstruktur eine Interaktion der Erbinformation mit den Zinkfingerdomänen der NC-Domäne der Gag- bzw. Gag-Pol-Polypeptide vermittelt werden kann (Darlix, Gabus, Nugeyre, Clavel, & Barré-Sinoussi, 1990; Gorelick et al., 1990). Über diese Interaktion kommt es zur Verkapselung der Nukleinsäure in die neuen Viruspartikel, die als unreife Partikel von der Plasmamembran der Wirtszelle abgeschnürt werden (Berkowitz, Fisher, & Goff, 1996; Lever, Gottlinger, Haseltine, & Sodroski, 1989). Die Reifung der Viruspartikel erfolgt über die Spaltung der verpackten Gag- und GagPol-Polypeptide über die virale Protease. Diese Spaltung der Vorläuferproteine zu funktionalen viralen Proteinen bewirkt innerhalb der Viruspartikel eine Reihe struktureller Umbauprozesse. So lagern sich beispielsweise CA-Moleküle wie eine Art Hülle um die innerhalb der Viren befindlichen Komplexe aus Proteinen und RNA. Bereits bei der Zusammensetzung der Viruspartikel innerhalb der Zelle bindet der N-Terminus von CA das zelluläre Cyclophilin A, eine Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase, und bewirkt so dessen Verpackung in die Viruspartikel. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Cyclophilin A und dem Capsid eine wichtige Rolle bei der Verhinderung einer Restriktion der HIV-1-Infektion durch humanes TRIM5 $\alpha$  darstellt (Kim et al., 2019).

## 1.4 Das Capsid-Protein und Uncoating

Das Capsid-Protein (CA) von HIV-1 ist ein 24 kDa großes Protein und umgibt als eine Art „Schutzmantel“ das virale Genom und seine assoziierten Proteine. Nach der Membranfusion gelangt das aus etwa 1500 CA-Molekülen bestehende Core ins Zytosol der Zelle. Die CA-Moleküle sind dabei in 250 Hexamere und 12 Pentamere organisiert (Ganser, Li, Klishko, Finch, & Sundquist, 1999). Es dient unter anderem dazu, das Virusgenom im Zytosol vor der Degradierung durch zelluläre Proteine zu schützen und die für die reverse Transkription nötigen Virusbestandteile zusammen zu halten (McArthur, Gallazzi, Quinn, & Singh, 2019; Zurnic Bönisch et al., 2020). Das sog. Uncoating bezeichnet den Prozess der Auflösung oder Umstrukturierung dieses viralen Cores und damit die koordinierte Freilegung seines Inhaltes; es stellt einen bisher nicht gut verstandenen Schritt des Replikationszyklus dar. So ist beispielsweise noch nicht abschließend geklärt, zu welchem Zeitpunkt der Infektion einer Wirtszelle und an welchem Ort der als „Uncoating“ beschriebene Prozess überhaupt stattfindet. Neben der Theorie des zytosolischen Uncoatings gibt es neue Daten, die auf ein Uncoating an der Kernmembran hinweisen. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das CA-Protein selbst auch in den Zellkern gelangt, seine Funktion dort ist aber noch nicht abschließend geklärt (Zurnic Bönisch et al., 2020).

### 1.4.1 Uncoating Assay

Um das Uncoating untersuchen zu können, musste zunächst ein Verfahren etabliert werden, um diesen Teil des Infektionszyklus von HIV-1 messbar zu machen. Hierfür haben *Da Silva Santos* und Kollegen einen Assay entwickelt, mit dessen Hilfe das Uncoating in Zellen quantifiziert werden kann. Sie transfizierten zusammen mit den Virusplasmiden eine sogenannte „Reporter-RNA“, die für eine Luciferase codiert. Diese soll in die Viruspartikel inkorporiert werden und bei ihrer Freisetzung im Rahmen des Uncoatings direkt in der Zielzelle translatiert werden. Die dabei entstehende Luciferase emittiert, beim Umsatz des passenden Substrates, Licht einer bestimmten Wellenlänge, das luminometrisch gemessen werden kann. Über die Höhe des Lichtsignals wird die Luciferasemenge quantifizierbar; somit lassen sich Rückschlüsse auf die Menge an Reporter-RNA in der Zelle ziehen. Diese wiederum korrespondiert mit der Menge der Viruspartikel, die in der Zelle „uncoaten“. Durch Verwendung dieser Methode konnte zum Beispiel der Effekt des Capsidinhibitors *PF-3450074* (kurz: PF-74) quantifiziert und weitere Erkenntnisse über den Zustand viraler Capside nach der Infektion gewonnen werden. Mit diesem Verfahren konnte also bereits wenige Stunden nach dem Kontakt der Viruspartikel mit den Zielzellen eine Infektion nachgewiesen werden (Da Silva Santos, Tartour, & Cimorelli, 2016). Bisherige Verfahren zum Nachweis der Infektion einer Zelle mit HIV hingegen beruhten auf dem direkten Nachweis viraler Proteine in der Zelle. So beruht beispielsweise der BlaM-Vpr-Assay darauf, ein in die Reporterviren verpacktes

Fusionsprotein aus dem viralen Protein R (*Vpr*) und Beta-Laktamase (*BlaM*) nachzuweisen, in dem man die enzymatische Spaltung eines Farbstoffes durch die *BlaM* misst (Cavrois, De Noronha, & Greene, 2002). Damit lässt sich die Fusion der Viren mit der Zelle nachweisen, nicht jedoch das Uncoating an sich. Auch andere Methoden, wie z.B. der Nachweis von Intermediärprodukten der Reversen Transkription mittels qPCR weisen virale Produkte in der Zelle nach. Bis diese jedoch in der Zelle nachweisbar werden, vergehen einige Stunden (Mbisa, Delviks-Frankenberry, Thomas, Gorelick, & Pathak, 2009). Dieses Verfahren weist Produkte der reversen Transkription nach, lässt jedoch keine Aussage über den Ablauf des Uncoatings zu. Wie oben beschrieben, liegt die Stärke des Uncoating Assays von *Da Silva Santos* und Kollegen darin, als einziges Verfahren die frühen Schritte des Infektionszyklus abzubilden: hier wird die Reporter-RNA bereits translatiert, bevor die reverse Transkription und Integration abgeschlossen sind. Käme es beispielsweise zu einer Störung der dem Uncoating nachgelagerten Schritte (reverse Transkription, Kernimport, Integration), könnten die bisher genutzten Verfahren nicht unterscheiden, in welchem Schritt der Infektionszyklus unterbrochen wurde; mit dem Uncoating Assay hingegen sollte der Nachweis der ersten Schritte des Replikationszyklus möglich sein.

Neben der Entwicklung der Methode konnte die Gruppe zeigen, dass das Capsid von HIV-1 innerhalb der Zelle in verschiedenen Zuständen vorliegen kann und dass die Stabilität der Capsidpolymere entscheidend dafür ist, in welchem Maße die reverse Transkription stattfinden kann. Die Beeinflussung der Capsidstabilität, so folgerten sie, stellt eine Möglichkeit dar, das Virus gezielt zu inhibieren (Da Silva Santos et al., 2016). Diese Beobachtung bildet die Grundlage der Untersuchungen mit Capsiddestabilisatoren, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

## **1.5 Restriktionsfaktoren des Uncoatings von HIV-1**

### **1.5.1 TRIM-Proteine**

Viele Arten besitzen sog. Restriktionsfaktoren, um sich auf zellulärer Ebene in gewissem Maße vor viralen Infektionen zu schützen. Es konnte gezeigt werden, dass HIV-1 zwar die Membran der Zellen von Altweltaffen überwinden kann, der Infektionszyklus jedoch noch vor der reversen Transkription unterbrochen wird. Stremlau und Kollegen konnten zeigen, dass diese Spezies-spezifische Restriktion auf das virale Capsid abzielt und identifizierten als Restriktionsfaktor das Protein TRIM5 $\alpha$  (M. Stremlau et al., 2004).

Die sog. *Tripartite Motif-containing Proteins* (TRIM-Proteine) sind eine Familie von Proteinen, die in vielen Geweben dauerhaft exprimiert werden (Reymond et al., 2001). Eine große Menge von TRIM-Proteinen ist bekannt, und speziell für TRIM5 $\alpha$  konnte gezeigt werden, dass es die Infektion

von Zellen mit dem Simianen Immundefizienz-Virus (SIV) sowie mit HIV hemmen kann. Dies geschieht durch Anlagerung von TRIM5 $\alpha$  an das virale Capsid. Hierbei bilden die TRIM-Proteine hexagonale netzartige Strukturen um das Capsid (Li et al., 2016). Auf diese Weise markierte Capside werden ubiquitiniert, dadurch für das zelluläre Abwehrsystem erkennbar und schließlich von der Zelle degradiert (Campbell et al., 2016; Imam et al., 2019). Durch das Eingreifen des TRIM5 $\alpha$ -Proteins wird so der Ablauf des Uncoatings gestört und die reverse Transkription kann nicht in der benötigten Effizienz ablaufen.

*Stremlau und Kollegen* konnten eine Spezies-Spezifität der Effektstärke verschiedener TRIM-Proteine zeigen: TRIM5 $\alpha$ -Proteine von Altweltaffen wie z.B. Rhesusaffen sind gegen das HI-Virus viel stärker wirksam als ihr humanes Pendant (Matthew Stremlau et al., 2006). Der Grund dafür ist die Anpassung des Virus an den Menschen als Wirt: es hat eine Strategie entwickelt, der Restriktion durch humanes TRIM5 $\alpha$  zu entkommen, indem das Capsidprotein das zelluläre Cyclophilin A bindet und somit eine Interaktion mit humanem TRIM5 $\alpha$  verhindert (Kim et al., 2019; Towers et al., 2003). Die TRIM-Proteine der Affen hingegen können, speziesabhängig in unterschiedlicher Ausprägung, eine Restriktion vermitteln. Die Untersuchung des Ausmaßes der Restriktion mit Hilfe des hier verwendeten Uncoating Assays ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### **1.5.2 Die Integrase als ein Schlüsselenzym der frühen Replikationsschritte**

Die Integrase erhielt ihren Namen aufgrund ihrer Hauptfunktion, der Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom. Diverse Untersuchungen der frühen Schritte des Replikationszyklus von HIV-1 jedoch konnten zeigen, dass das Enzym eine viel weitreichendere Bedeutung für das Infektionsgeschehen in der Zelle hat.

*Briones et al.* untersuchten die Rolle der Integrase im Prozess des Uncoatings. Sie konnten zeigen, dass Integrase-Mutationen (sowohl komplettes Fehlen des Enzyms, als auch Punktmutationen) zu einer verringerten Infektiosität der Viren führen. Dabei waren sowohl die Zahl der Cores, als auch deren Stabilität deutlich reduziert. Hier konnte zum einen eine Störung der Interaktion zwischen dem viralen Capsid-Protein (CA) und dem zellulären Protein Cyclophilin A und eine dadurch vermittelte Herabsetzung der Core-Stabilität nachgewiesen werden. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass der ebenfalls beobachtete Einfluss auf die reverse Transkription durch Verwendung von VSV-G als Oberflächenprotein der Viren und die damit verbundene Änderung des Entry-Mechanismus umgangen werden kann (Briones, Dobard, & Chow, 2010).

Die Integrase geht über ihre Hauptfunktion hinaus auch Interaktionen mit zellulären Proteinen ein: *Jayappa et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass es eine Interaktion zwischen dem Dynein-Leichtketten-Molekül 1 (*DYNLL1*) und der viralen Integrase gibt. Untersuchungen mit Integrase-

defizienten HI-Viren (*HIV ΔIN*) zeigten dabei, dass die Menge an Präintegrationskomplex-gebundenem CA-Protein bei Infektionen mit diesen Viren deutlich geringer war als bei Infektionen mit Wildtyp-Viren. Die Autoren mutmaßen, dass durch die Interaktion von IN und Dynein Konformationsänderungen an der Integrase erfolgen, die das Enzym bei seiner Funktion der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen zur Core-Stabilisierung unterstützen (Jayappa et al., 2015).

Die Integrase besitzt insgesamt drei funktionale Domänen: eine Zink-bindende N-terminale Domäne, eine Magnesium-abhängige zentrale Domäne (engl. *Central Core Domain, CCD*) sowie eine C-terminale, DNA-bindende Domäne (Engelman, 1999; Qamar Saeed et al., 2014). Durch die Einführung von Mutationen an verschiedenen Stellen dieser Domänen lässt sich die Integrase in ihrer normalen Enzymfunktion behindern. Ein Beispiel dafür ist die Mutation D64V, also der Austausch von Asparaginsäure durch Valin an Position 64 in der zentralen Domäne, die in einer deutlichen Verringerung der Aktivität resultiert (Sarkis, Philippe, Mallet, & Serguera, 2008).

Aufgrund der Mannigfaltigkeit der Prozesse, an denen die Integrase im Rahmen des Replikationszyklus beteiligt zu sein scheint, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls Untersuchungen zum Einfluss des Enzyms auf den Uncoating Assay durchgeführt. Hierfür wurde zum einen die oben beschriebene D64V-Mutation verwendet und deren Einfluss auf den Assay untersucht; zum anderen wurden am Markt verfügbare, klinisch verwendete Integraseinhibitoren auf ihren Effekt hin getestet.

### **1.5.3 Capsidinhibitoren: PF-3450074 und GS-CA1**

Die Substanz *PF-3450074* (kurz: PF-74) ist ein kleines Molekül, das in höheren Konzentrationen durch Bindung an das virale Capsid selbiges destabilisieren kann und das Uncoating auf diesem Wege beeinträchtigt, sodass die Infektiosität der Viren dramatisch reduziert wird (Blair et al., 2010). Der Einfluss der Substanz auf das Uncoating wurde bereits im Uncoating-Assay von *Da Silva Santos et al.* beschrieben. Auffällig ist, dass PF-74 in niedrigeren Konzentrationen das virale Capsid stabilisiert und so am Uncoating hindert, während höhere Konzentrationen das Capsid destabilisieren und so zu vorzeitiger Freisetzung von dessen Inhalt führen (Saito et al., 2016). Die Bindungsstelle von PF-74 befindet sich zwischen der C- und der N-terminalen Domäne des CA-Proteins (Blair et al., 2010). Hier binden auch zelluläre Faktoren wie der *Cleavage and Polyadenylation Specific Factor 6* (CPSF6) oder *Nucleoporin 153* (NUP153), die treibenden Kräfte des Kernimportes der viralen Capside (Bejarano et al., 2019; Schaller et al., 2011).

Der Literatur ist zu entnehmen, dass PF-74 nicht nur dosisabhängig mit dem CA-Protein interagiert, sondern auch noch darüber hinaus in den Infektionszyklus eingreift: neben der Hemmung der

reversen Transkription konnte gezeigt werden, dass in Makrophagen die Virusreplikation durch die Substanz inhibiert wird. (Rasaiyaah et al., 2013; Shi, Zhou, Shah, Aiken, & Whitby, 2011). PF-74 kann also, konzentrationsabhängig, HIV-1 sowohl vor als auch nach der reversen Transkription hemmen: während in Konzentrationen von  $\leq 2 \mu\text{M}$  eine Hemmung des Eintritts der viralen DNA in den Zellkern gezeigt werden konnte (Blair et al., 2010; Price et al., 2014; Shi et al., 2011), konnte für Konzentrationen  $\geq 5 \mu\text{M}$  die Capsid-Destabilisierung mit der Folge der Hemmung der reversen Transkription gemessen werden (Peng et al., 2014). Diese umfangreichen Eingriffe in die frühen Schritte des Replikationszyklus machen die Substanz für eine Untersuchung im hier verwendeten Uncoating Assay interessant.

Neben PF-74 sind weitere Capsid-Destabilisatoren identifiziert worden, die sich in der Erprobung befinden. Einer davon ist die Substanz GS-CA1, ein hochpotenter Inhibitor der HIV-Infektion *in vitro*. Ähnlich wie PF-74 bewirkt auch diese Substanz eine Destabilisierung des viralen Capsids. Dabei besitzt es dieselbe Bindungsstelle wie PF-74 und eine ähnliche chemische Struktur (Singh et al., 2019), die jedoch nicht öffentlich zugänglich ist. Die Bindungsstelle für GS-CA1 scheint eine hoch konservierte Aminosäuresequenz zu sein, was die Substanz als Ausgang für die Entwicklung antiretroviraler Medikamente umso interessanter macht, da hier eine Resistenzentwicklung durch Mutationen eher unwahrscheinlich scheint (Singh et al., 2019).

Aufgrund der vielen Ähnlichkeiten in der chemischen Struktur und Bindungsstelle der Capsidinhibitoren PF-74 und GS-CA1 ist anzunehmen, dass der Wirkmechanismus der Substanzen ähnlich ist. Auch GS-CA1 destabilisiert die Capsidpolymere des viralen Cores und stört so die Abläufe des Uncoatings durch eine zu frühe Freilegung des viralen Genoms und der assoziierten Enzyme, ist jedoch bereits in viel geringeren Konzentrationen als PF-74 sehr potent und stellt daher eine große Hoffnung in der Entwicklung neuer Therapiestrategien dar (Singh et al., 2019). So konnte beispielweise für GS-CA1 eine größere Potenz bei gleichzeitig mehr als zehnfach höherer Selektivität als für bisher in der HIV-1-Therapie verwendete Medikamente (wie z.B. den nicht-nukleosidischen RT-Inhibitor Efavirenz oder den Integrase-Strangtransfer-Inhibitor Dolutegravir) gezeigt werden (Yant et al., 2019). Eine noch potentere Substanz, GS-6207, wurde bereits in Phase-I-Studien erprobt und zeigte bei einmal wöchentlicher subkutaner Applikation eine hohe antivirale Aktivität auch in Fällen, in denen eine Resistenz gegen etablierte Therapieregime vorlag (Link et al., 2020).

#### 1.5.4 Cyclosporin A

Cyclophilin A (Cyp A) gehört zu den Immunophilinen, einer Gruppe von Isomerasen, die in der Zelle für die Regulation einer Vielzahl von Prozessen verantwortlich sind (Galat, 1993). Die enge Verstrickung mit der Aktivierung von Immunprozessen sowie die Schlüsselrolle dabei wird deutlich in den dramatischen Effekten, die die Hemmung von CypA durch das Medikament Cyclosporin A hat: ohne die dadurch induzierte Immunsuppression wäre die moderne Transplantationsmedizin undenkbar. Cyclophilin A spielt jedoch auch eine wichtige Rolle im Falle einer HIV-Infektion, denn das Virus bindet CypA mit Hilfe seines Capsidproteins und entgeht auf diesem Wege der Restriktion durch zelluläre Abwehrfaktoren wie z. B. TRIM5 $\alpha$  (vgl. oben).

Das als Immunsuppressivum gebräuchliche Medikament Cyclosporin A ist ein zyklisches Peptid aus elf Aminosäuren, das aus norwegischen Schlauchpilzen (*Tolypocladium inflatum*) isoliert wurde (Kapturczak, Meier-Kriesche, & Kaplan, 2004). Es bindet mit hoher Affinität das zelluläre Cyclophilin A und verhindert somit im Falle der HIV-1-Infektion die Capsid-CypA-Interaktion. Damit wird eine der Strategien des Virus zur Beeinflussung des Wirts-Immunsystems ausgehebelt, denn auf diese Weise kommen „unter Normalbedingungen“ durch das Virus ausgeschaltete zelluläre Restriktionsfaktoren wie z.B. das humane TRIM5 $\alpha$  wieder zum Tragen und sind wieder aktiv gegen das Virus (Kim et al., 2019; Towers et al., 2003). Der Effekt dieser pharmakologisch herbeigeführten Wiederherstellung zellulärer Abwehrmechanismen gegen HIV-1 sollte durch Verwendung der Substanz bei der Transduktion von Zellen mit Reporterviren im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

## 1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit nutzt das von der Gruppe um Da Silva Santos beschriebene Verfahren als Grundlage, um das Uncoating von HIV-1 messbar zu machen. Durch Modifikation des Verfahrens sollte hierbei die Sensitivität erhöht werden und die benötigte Menge an Viruspartikeln reduziert werden. Weiterhin wurden die Einflüsse verschiedener Faktoren auf die frühen Abschnitte des Replikationszyklus geprüft. Hierfür wurde zunächst ein proteinbasierter Ansatz gewählt, bei dem versucht wurde, eine Luciferase durch eine Fusion mit viralen Proteinen in Viruspartikel zu inkorporieren. Aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde dieser Ansatz allerdings zu Gunsten eines DNA-basierten Vorgehens verworfen. Dabei wurde sich zunutze gemacht, dass das packaging signal ( $\psi$ ) die Inkorporation von RNA in die Viruspartikel vermitteln kann, somit wurde die Luciferase-RNA in die Viruspartikel „eingeschleust“ (Darlix et al., 1990; Gorelick et al., 1990).

Durch die Variation verschiedener Faktoren wurde in einer Reihe von Experimenten der Einfluss zellulärer, viraler und pharmakologischer Faktoren auf die Abläufe des frühen Infektionszyklus untersucht. Die Quantifizierung der Effizienz dieser Schritte erfolgte über die Messung eines Luciferasesignals acht Stunden nach der Infektion der Zellen. Der von Da Silva Santos et al. entwickelte Uncoating Assay wurde dabei durch Austausch der verwendeten Luciferase sowie durch geringfügige Änderungen im Handling der Zellen nach der Infektion verändert. Durch die Verwendung von *NanoLuciferase* statt *Firefly-Luciferase* sollte im hier angewandten Assay die Sensitivität erhöht werden: unter Einsatz geringerer Mengen Viren sollten signifikante Ergebnisse erzielbar werden.

## 2 ERGEBNISSE

---

### 2.1 Überblick über die genutzten Testsysteme zur Analyse des Uncoatings von HIV-1

Um das Uncoating von HIV-1 zu charakterisieren, wurden drei experimentelle Ansätze getestet:

- A) **Verpackung von NanoLuc-Protein in Viruspartikel** (s. Abb. 2-1)
- B) **Verpackung von NanoLuc-Proteinfragmenten in Viruspartikel** (s. Abb. 2-7 und 2-8)
- C) **Verpackung von NanoLuc-RNA in Viruspartikel** (s. Abb. 2-12)

Einen Vergleich der drei verwendeten Verfahren zeigt Abbildung 7-1 im Anhang.

In dieser Arbeit wurde als Reporter für das Uncoating ein Enzym mit der Bezeichnung NanoLuciferase genutzt. Die NanoLuciferase ist ein vom Hersteller PROMEGA vertriebenes Enzym, das aus der Tiefseegarnele *Oplophorus gracilirostris* isoliert wurde und sich vor allem durch eine, verglichen mit anderen Luciferasen, hohe Leuchtkraft bei geringer Größe auszeichnet: mit einer Molekülmasse von 19 kDa ist die NanoLuciferase viel kleiner als beispielsweise die Firefly-Luciferase (61,5 kDa, aus *Photinus pyralis*).

Im zuerst verfolgten **Ansatz A** (Abbildung 2-2) sollten Fusionsproteine aus dem viralen Protein R (*VPR*) und der NanoLuciferase durch Ko-Expression mit den übrigen viralen Bestandteilen in Reporterviren inkorporiert werden.

**Ansatz B** (Abbildungen 2-7 und 2-8): Neben der Verwendung des kompletten Enzyms *NanoLuciferase* steht mit NanoBIT auch ein System aus zwei komplementären Teilen des Enzyms zur Verfügung, mit dessen Hilfe Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden können. Die Eigenschaften dieses Systems sollten im Rahmen dieser Arbeit experimentell genutzt werden, um das Uncoating über Protein-Protein-Interaktion quantifizieren zu können. Zunächst wurde dafür ein Reporterprotein hergestellt, das in Virionen inkorporierbar sein sollte.

**Ansatz C** (Abbildung 2-12): Als weitere Methode sollte die direkte Verpackung einer NanoLuc-mRNA in Viruspartikel getestet werden. Daher wurde die für die Luciferase kodierende RNA mit einem „*packaging signal*“ (vgl. Einleitung) versehen. So sollte diese anstelle des viralen Genoms in die Viruspartikel verpackt und nach der Infektion einer Zelle durch den zellulären Translationsapparat in funktionierendes Enzym translatiert werden. Die beschriebenen Vorgänge sind in Abbildung 2-12 dargestellt (s. Abschnitt 2.1.3 „RNA-basierter Assay“, unten). Mit Hilfe dieses Assays wurden nun virale und zelluläre Faktoren auf ihren Einfluss auf das Uncoating hin

untersucht; des Weiteren wurden pharmakologische Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet und deren Effekt evaluiert.

### 2.1.1 Ansatz A: Verpackung von NanoLuc-Protein in Viruspartikel – hohe Standardabweichungen, geringe Reproduzierbarkeit

Im zuerst verfolgten Ansatz A wurden HEK293T-Zellen mit Plasmiden, die für HIV-1-Proteine codieren (*pMDLg/pRRE* für *Gag/Pol*, *pRSV-Rev* für *Rev*, *pMD2.G* für die Expression von VSV-G und *pcDNA 3.1* als Leervektor) sowie einem selbst hergestellten Plasmid transfiziert, das für ein Fusionsprotein aus NanoLuciferase und dem viralen Protein R (VPR) kodiert. Die transfizierten Zellen sollten so zur Herstellung von Reporterviren angeregt werden, die eine funktionstüchtige Luciferase als Reporter beinhalten. Nach der Transduktion von Zielzellen mit diesen Reporterviren sollte die Luciferaseaktivität bestimmt werden, um aus dieser auf die Uncoatingvorgänge rückschließen zu können. Die Fusion von Vpr und NanoLuciferase wurde dabei sowohl am 3'-Ende, als auch am 5'-Ende von Vpr durchgeführt, um beide Konstrukte auf ihre Effektivität hin vergleichen zu können (vgl. Abbildung 2-1). Der Ablauf dieses Assays wird schematisch in Abbildung 2-2 gezeigt.

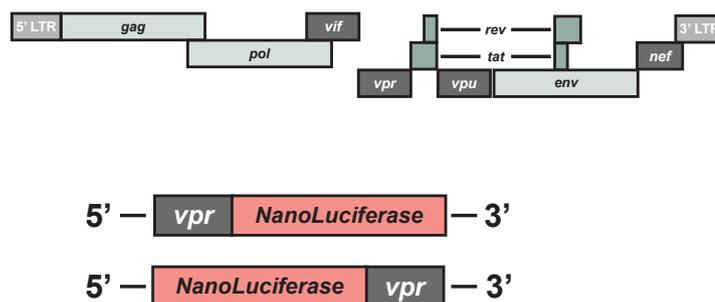


Abb. 2-1: Fusionsproteine aus Vpr und NanoLuciferase (schematisch).

Im Rahmen der Herstellung von Fusionsproteinen wurde das virale Protein R (Vpr) von HIV-1 sowohl N- als auch C-Terminal mit der NanoLuciferase fusioniert, um beide Fusionskonstrukte experimentell vergleichen zu können. Der obere Teil der Abbildung zeigt das vollständige Genom von HIV-1.

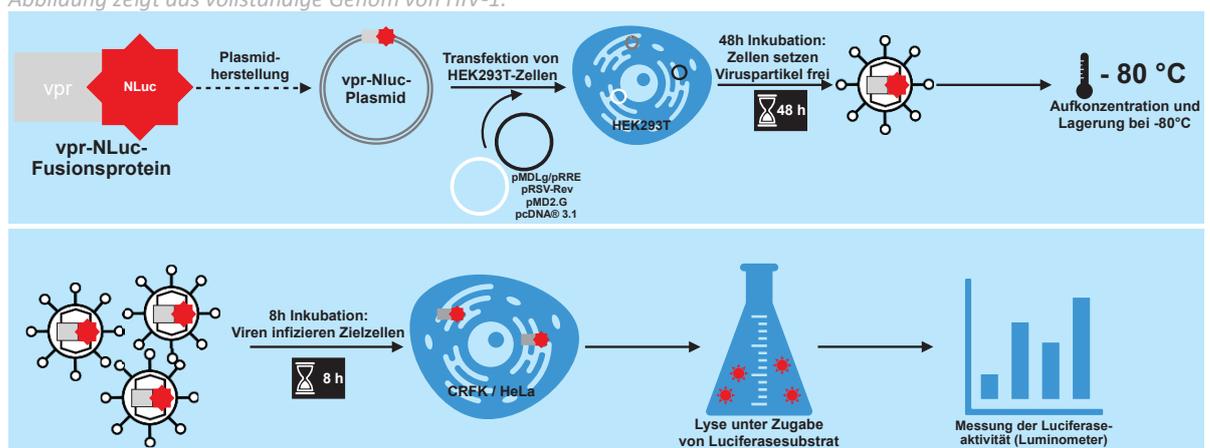
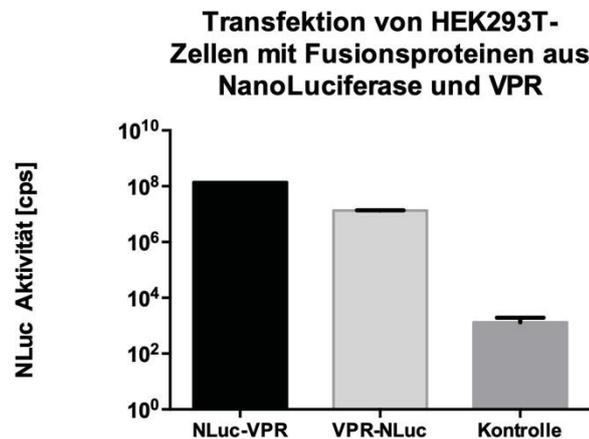


Abb. 2-2: Schematischer Versuchsablauf des fusionsprotein-basierten Assays (Vpr-NanoLuc/NanoLuc-Vpr).

Nach der Herstellung eines Fusionsproteins aus dem viralen Protein R (Vpr) und NanoLuciferase (NLuc) wurde das Protein in einen Vektor legiert und das entstehende Plasmid zusammen mit Virusplasmiden in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Reporterviren gesammelt, aufkonzentriert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im Rahmen der Infektion sollte sich das Fusionsprotein in der Zelle ansammeln und die Luciferase bei der Lyse unter Substratzugabe Licht emittieren, das luminometrisch erfasst werden kann.

Einen grundsätzlichen Funktionstest der verschiedenen Fusionsprotein-Konstrukte zeigt Abbildung 2-3. Dabei wurden HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und für 48 Stunden inkubiert, danach lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt, wobei sehr hohe Werte erreicht werden konnten (vgl. Skalierung der Ordinate). Auffällig ist jedoch, dass auch die als Negativkontrolle gedachte Messung von nicht transfizierten Zellen eine relativ hohe Luciferaseaktivität zeigte.

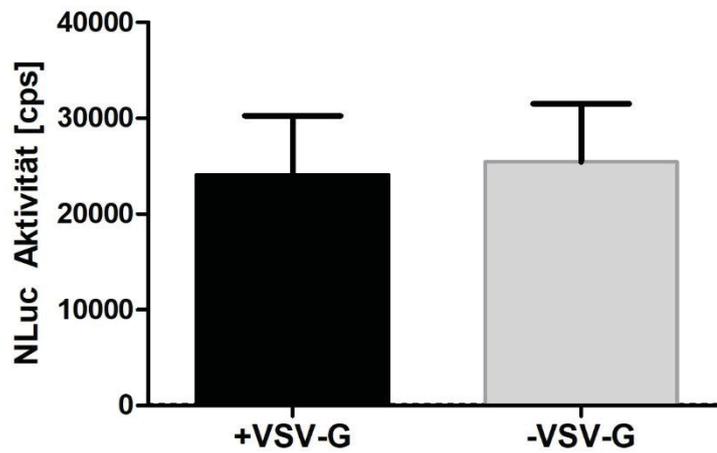


**Abb. 2-3: Luciferaseaktivität der Fusionsproteine aus NanoLuciferase und VPR.**

Die Abbildung zeigt die Messung der Luciferaseaktivität in HEK293T-Zellen, die mit den Fusionsproteinen aus der NanoLuciferase und dem viralen Protein R (VPR) transfiziert worden und für 48 Stunden inkubiert worden waren. Deutlich zu erkennen ist die hohe Luciferaseaktivität beider Fusionsproteine; auch die Negativkontrolle (keine Transfektion, rechter Balken) zeigt jedoch eine relativ erhöhte Aktivität.

Exemplarisch für die mit Viruspartikeln durchgeführten Messungen soll hier die Auswertung von Messungen zur Bestimmung der Luciferaseaktivität in verschiedenen Zellreihen nach der Transduktion mit VPR-NLuc-Fusionsprotein-haltigen Reporterviren gezeigt werden (Abbildungen 2-4 bis 2-6).

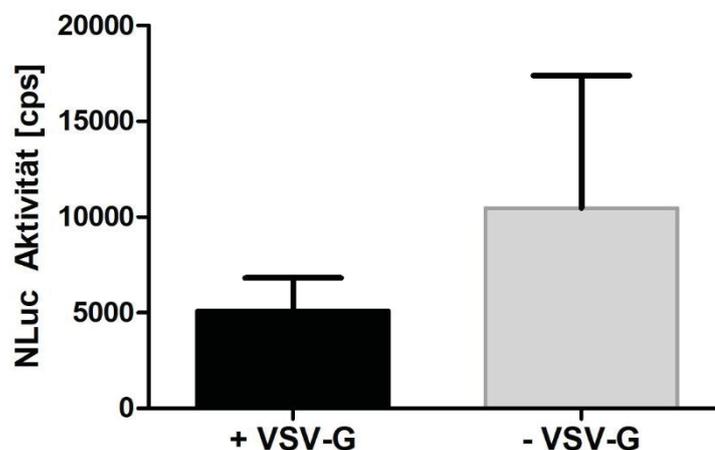
Die untenstehende Abbildung 2-4 zeigt die Messung der Luciferaseaktivität acht Stunden nach der Transduktion von HEK293T-Zellen mit den o.g. Reporterviren. Die zugrundeliegenden sechs Messungen (zwei zeitlich und technisch unabhängige Experimente, Messung in Triplets) ergaben grundsätzlich geringere Luciferaseaktivität als die o.g. Messung des reinen Fusionsproteins nach Transfektion in HEK293T-Zellen. In den sechs Messungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen VSV-G-pseudotypisierten viralen Vektoren („+VSV-G“ in der Abbildung, linker Balken) und der Negativkontrolle mit Viruspartikeln ohne VSV-G-Expression gezeigt werden (rechter Balken der Abbildung).



**Abb. 2-4: Transduktion von HEK293T-Zellen mit VPR-NLuc-Reporterviren.**

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Messung der NanoLuciferase-Aktivität in HEK293T-Zellen nach Transduktion mit VPR-NLuc-Reporterviren und 8 Stunden Inkubation. Verwendet wurden sowohl virale Vektoren, die VSV-G exprimieren („infektiöse Viren“) als auch solche, die das Glykoprotein nicht exprimieren (Balken „-VSV-G“, als Negativkontrolle). [n = 6 Messungen pro Balken, eingesetzte Virusmenge 10µL Viruskonzentrat pro Well/96-Well-Platte]

Die Grundlage der Abbildung 2-5 (s. unten) bildet ein technisch identisch durchgeführtes Experiment, hier wurden statt HEK293T-Zellen jedoch HeLa-Zellen mit den Reporterviren transduziert und acht Stunden inkubiert. In diesen Messungen lag der Mittelwert für die mit VSV-G-freien Vektorpartikeln transduzierten Zellen um etwa Faktor 2 höher als der Wert für diejenigen Zellen, die mit VSV-G-pseudotypisierten Viruspartikeln transduziert worden waren. Die Standardabweichung ist in dieser Messreihe jedoch besonders hoch; der Unterschied ist nicht signifikant.

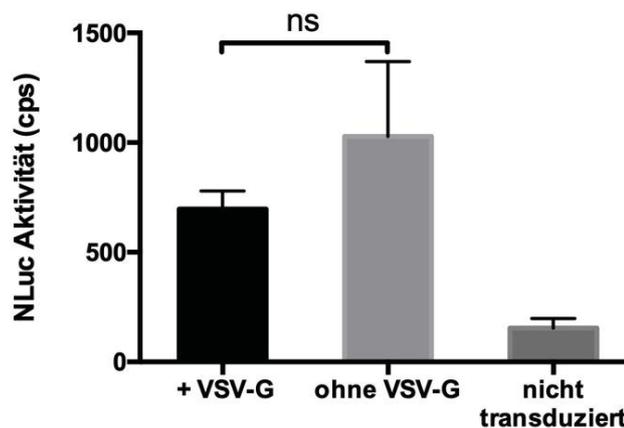


**Abb. 2-5: Transduktion von HeLa-Zellen mit VPR-NLuc-Reporterviren.**

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Messung der NanoLuciferase-Aktivität in HeLa-Zellen nach Transduktion mit VPR-NLuc-Reporterviren und 8 Stunden Inkubation. Verwendet wurden sowohl Viren, die VSV-G exprimieren („infektiöse Viren“) als auch solche, die das Glykoprotein nicht exprimieren (Balken „-VSV-G“, als Negativkontrolle). [n = 12 Messungen pro Balken, eingesetzte Virusmenge 10µL Viruskonzentrat pro Well/96-Well-Platte]

Neben der Anwendung des Assays auf HEK293T- und HeLa-Zellen wurde der Assay auch auf CRFK-Zellen angewandt. Diese haften gegenüber den beiden vorgenannten Zelllinien deutlich besser am Boden der Zellkulturflasche an und lösen sich beim Waschen weniger ab. Die Ergebnisse dieser

Messungen sind in Abbildung 2-6 dargestellt, für die drei zeitlich und technisch unabhängige Messungen in Triplets ausgewertet wurden. Bei Verwendung einer geringeren Menge Viruskonzentrat bewegte sich das Luciferasesignal in diesen Messungen in einem niedrigeren Bereich als bei den beiden vorherbeschriebenen Messungen; zusätzlich wurde diese Messung durch die Bestimmung der Luciferaseaktivität in nicht-transduzierten Zellen („Hintergrundsignal“) ergänzt. Ähnlich wie im Fall der HeLa-Zellen lag auch hier der Mittelwert der Messungen in mit VSV-G-freien Viruspartikeln transduzierten Zellen über dem Mittelwert der Messung in denjenigen CRFK-Zellen, die mit VSV-G-pseudotypisierten Viruspartikeln transduziert worden waren; auch hier liegt in dieser Messreihe eine besonders hohe Standardabweichung vor.



**Abb. 2-6: Transduktion von CRFK-Zellen mit Vpr-NLuc-Reporterviren.**

Messung der Luciferaseaktivität nach acht Stunden. Neben der Messung von VSV-G-pseudotypisierten Virionen wurde als Negativkontrolle eine Messung von Viren ohne VSV-G durchgeführt; die rechte Säule zeigt die Messung nicht transduzierter Zellen (Hintergrundsignal).  $n = 9$  Messungen, Verwendung von  $3\mu\text{L}$  Viruskonzentrat/Well (96-Well-Platte). Die Messergebnisse der Negativkontrolle lagen in den meisten Messungen höher als die Ergebnisse der Messung mit VSV-G-pseudotypisierten Virionen; bei hohen Standardabweichungen konnte außerdem kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Aufgrund der anhaltend schlechten Reproduzierbarkeit der mit experimentellen Ansatz A gewonnenen Ergebnisse, der hohen Standardabweichungen sowie der sich daraus ergebenden fehlenden Signifikanz wurde dieses Vorgehen ruhen gelassen.

### 2.1.2 Ansatz B: Verpackung von NanoLuciferase-Fragmenten in Viruspartikel (NanoBIT)

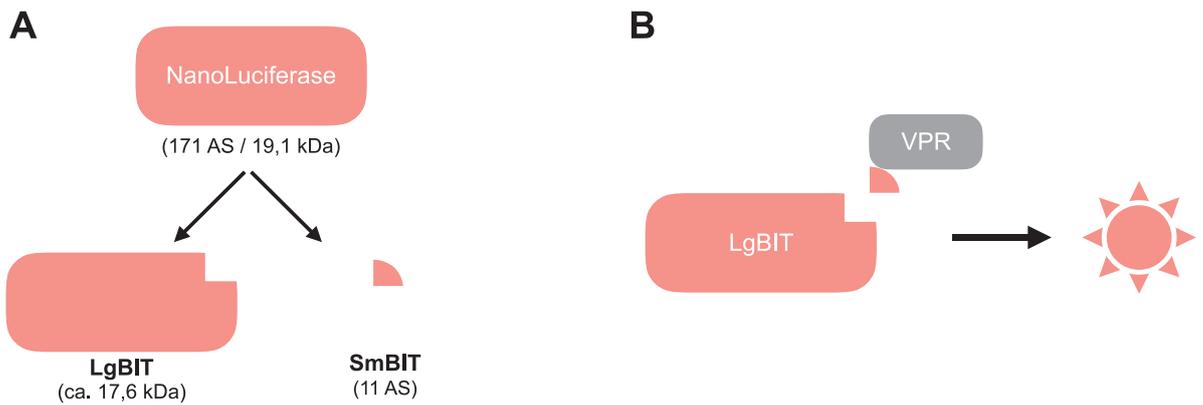
Im zweiten Ansatz zum Nachweis des Uncoatings von HIV-1 sollte ein kommerziell zur Verfügung stehendes Fragment des Reporterenzym NanoLuciferase in die hergestellten Viruspartikel verpackt werden. Dieses sehr kleine, nur elf Aminosäuren umfassende Peptid (vom Hersteller als *smBIT*, für engl. *small bit*, bezeichnet) umfasst lediglich 11 Aminosäuren und wurde dafür mit dem viralen Protein R (Vpr) fusioniert. Die kodierende Sequenz für das entstehende Fusionsprotein wurde in pcDNA 3.1 als Transkriptionseinheit kloniert und zusammen mit Plasmiden, die für virale Proteine kodieren (*pMDLg/pRRE* für *gag/pol*, *pRSV-Rev* für *rev*, *pMD2.G* für die Expression von VSV-

G und *pcDNA 3.1* als Leervektor) in HEK293T-Zellen transfiziert, damit diese mit der Herstellung entsprechender Reporterviren beginnen.

Die Zielzellen für die Transduktion wurden im Rahmen dieses Ansatzes zunächst mit einem Plasmid, das für das zum *smBIT*-Fragment komplementäre *LgBIT* (für engl. *large bit*, mit einer Masse von 17,6 kDa) kodiert, transfiziert. So sollte im Rahmen der Transduktion der Zielzellen mit den Reporterviren eine funktionsfähige Luciferase gebildet werden, deren Aktivität man durch Lyse der Zellen unter Substratzugabe luminometrisch erfassen kann (vgl. Abb. 2-7). Der Ablauf des Assays wird in Abbildung 2-8 schematisch gezeigt.

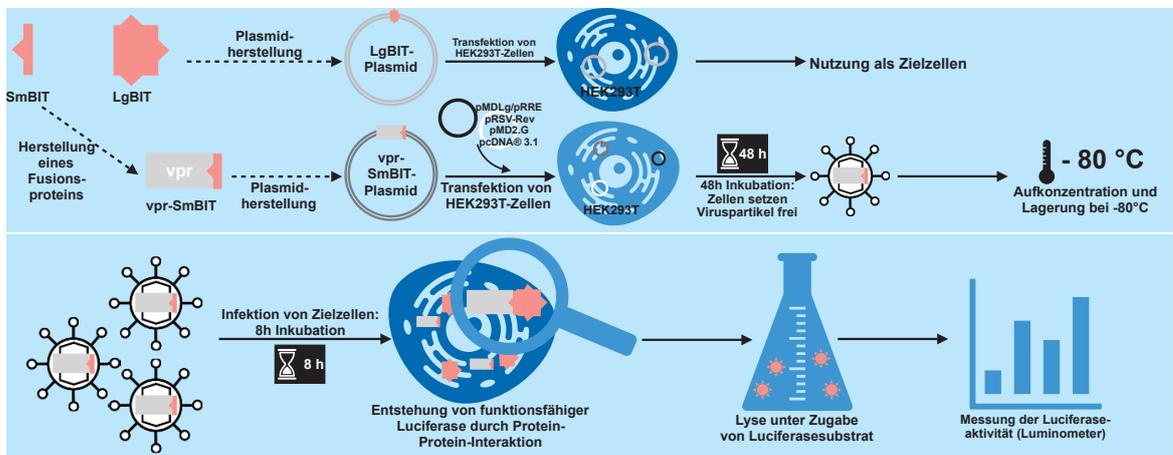
Ähnlich wie im oben dargestellten Ansatz A konnten auch mit Hilfe des NanoBIT-Assays keine reproduzierbaren Daten erzeugt werden. Wie bereits oben beschrieben, erreichte auch hier teilweise die gemessene Luciferaseaktivität der Negativkontrolle annähernd das Niveau des Referenzwertes oder lag sogar darüber. Auch hier waren die Varianzen der Ergebnisse derartig hoch, dass keine signifikanten Ergebnisse erhoben werden konnten. Auszüge aus den erhobenen Daten zeigen die Abbildungen 2-9 bis 2-11.

Abbildung 2-9 zeigt einen grundsätzlichen Funktionstest der NanoBIT-Fusionsproteine: durch Co-Transfektion von HEK293T-Zellen mit den kodierenden Sequenzen für das *LgBIT*-Fragment sowie dem jeweiligen Fusionsprotein aus *SmbIT* und *Vpr* wurden die Zellen zur Expression beider Teile der NanoLuciferase angeregt. Nach 48 Stunden Inkubation wurde die Luciferaseaktivität in diesen Zellen nach Lyse unter Substratzugabe luminometrisch bestimmt. In beiden Testreihen, also sowohl für die C- als auch für die N-terminale Fusion von *Vpr* und NanoLuciferase konnte eine Luciferaseaktivität gemessen werden, die das Hintergrundsignal nicht transfizierter Zellen um ein Vielfaches überstieg. Insgesamt war jedoch das Signal in denjenigen Zellen, die neben dem *LgBIT* auch mit dem *Vpr-SmbIT*-Expressionsvektor transfiziert worden waren, im Mittel etwa 100.000 cps höher als im Fall der Zellen, die das *SmbIT-Vpr*-Fusionsprotein exprimierten (im Mittel ca. 75.000 cps). Insgesamt war jedoch - trotz des Einsatzes einer vergleichbaren Menge DNA im Rahmen der Transfektion - das Luciferasesignal insgesamt nicht so hoch wie bei der Verwendung von Vollängen-NanoLuciferase (vgl. Skalierung der Ordinate in Abb. 2-3).



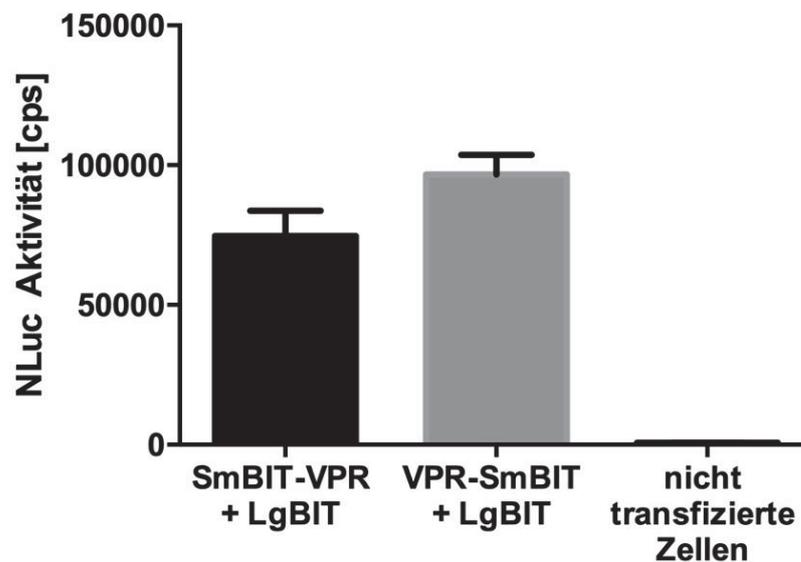
**Abb. 2-7: NanoBIT-System (A) und Anwendung im Rahmen dieser Arbeit (schematisch) (B).**

Das NanoBIT-System der Fa. PROMEGA umfasst zwei komplementäre Fragmente der NanoLuciferase: das größere, LgBIT genannte Fragment besitzt eine Masse von etwa 17,6 kDa; das komplementäre kleine Fragment (SmBIT) ist lediglich 11 Aminosäuren groß. Teil B der Abbildung zeigt die Anwendung im Rahmen dieser Arbeit: das kleine Fragment wurde mit Vpr fusioniert, sodass in der Zielzelle durch eine Protein-Protein-Interaktion der Fragmente ein Luciferasesignal messbar werden sollte.



**Abb. 2-8: Schematischer Ablauf des proteininteraktions-basierten Assays unter Verwendung des NanoBIT-Systems.**

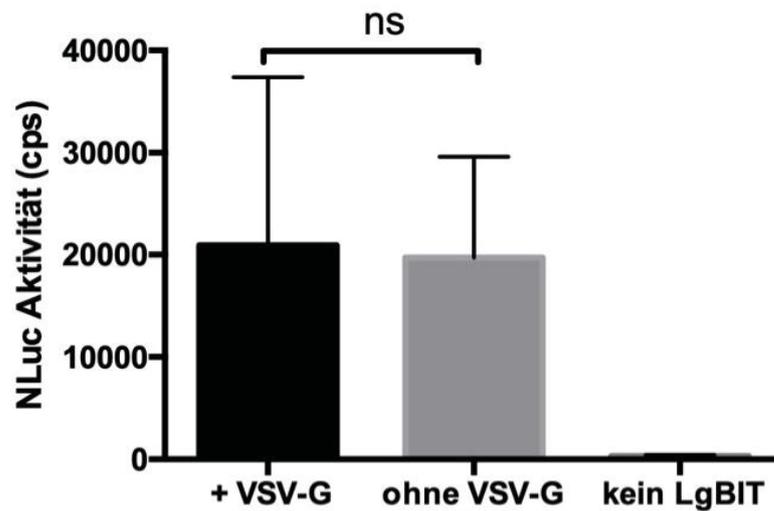
Zunächst wurde ein Fusionsprotein aus dem viralen Protein R (Vpr) und dem kleinen Fragment der NanoLuciferase (SmBIT) hergestellt und in einen Vektor legiert. Das dabei entstandene Plasmid wurde zusammen mit Virusplasmiden in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Reporterviren gesammelt, aufkonzentriert und bei -80°C gelagert (der Übersicht halber hier nicht dargestellt). Für die Transduktion wurden die Zielzellen zunächst mit einem Plasmid transfiziert, in das zuvor das komplementäre große Fragment der NanoLuciferase (LgBIT) legiert worden war. Nach der Transduktion der Zielzellen durch die Reporterviruspartikel und der konsekutiven Freisetzung des Vpr-SmBIT-Proteins sollte eine Protein-Protein-Interaktion zwischen den beiden Luciferasefragmenten eine funktionsfähige NLuc entstehen lassen. Durch Lyse unter Substratzugabe sollte die so entstandene Luciferase Licht emittieren, das luminometrisch erfasst werden kann.



*Abb. 2-9: Funktionstest der NanoBIT-Fusionsproteine durch Koftransfektion mit LgBIT in HEK293T-Zellen.*

*Die Abbildung zeigt die Luciferasemessung 48 Stunden nach der Transfektion von HEK293T-Zellen mit dem jeweiligen Fusionsprotein aus SmBIT und Vpr sowie dem komplementären LgBIT-Fragment der Luciferase. Als Kontrolle wurden zusätzlich nicht transfizierte Zellen gemessen. n = 6 Messungen.*

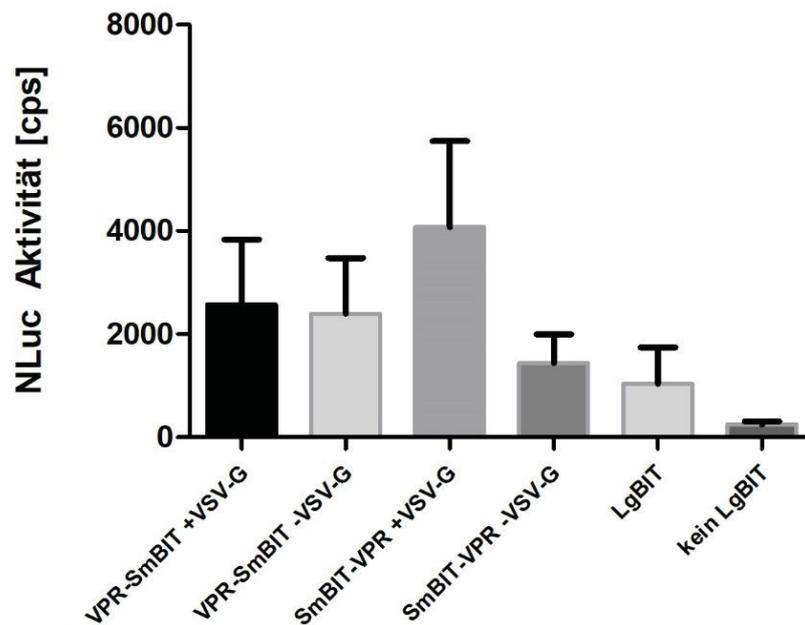
Die untenstehende Abbildung 2-10 zeigt die Auswertung eines Funktionstests der Transduktion von Zellen unter Verwendung der NanoBIT-Fusionsproteine: HEK293T-Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das für das LgBIT kodiert und 48 Stunden später mit den Reporterviren transduziert, die das Vpr-SmBIT-Fusionsprotein trugen. Es zeigte sich - bei hohen Standardabweichungen - kein signifikanter Unterschied zwischen der Transduktion mit VSV-G-pseudotypisierten („infektiösen“) Viruspartikeln und der als Negativkontrolle gedachten Transduktion mit nicht-VSV-G-pseudotypisierten Reporterviren. Die Messung von nicht-transduzierten Zellen, die lediglich mit LgBIT transfiziert wurden, zeigte in den Messungen keine Luciferaseaktivität. Grundlage der Abbildung sind die Daten aus vier zeitlich und technisch unabhängigen Messungen in Triplets, also 12 Einzelwerte.



*Abb. 2-10: Transduktion von LgBIT-transfizierten HEK293T-Zellen mit HIV-1-Reporterviren, die das Vpr-SmBIT-Plasmid enthielten.*

*Die rechte Säule zeigt die Messung der Luciferaseaktivität in HEK293T-Zellen, die nicht mit dem LgBIT-Plasmid transfiziert worden waren (Hintergrundsignal). Messung der Luciferaseaktivität nach acht Stunden. n = 12 Messungen. Es konnte bei hohen Standardabweichungen kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.*

In Abbildung 2-11 (s. unten) ist die Messung der Luciferaseaktivität der verschiedenen NanoBIT-Konstrukte in HEK293T-Zellen direkt gegenübergestellt: es wurden sowohl Reporterviren verwendet, die das SmBIT-Vpr-Protein trugen, als auch solche, die das Vpr-SmBIT-Protein beinhalteten. Es wurden sechs Messungen pro Versuchsreihe durchgeführt. Von beiden Typen viraler Vektoren wurden dabei jeweils als Negativkontrolle auch solche Partikel benutzt, die nicht mit VSV-G pseudotypisiert worden waren. Neben der Transduktion der LgBIT-exprimierenden Zellen wurden -wie auch für Abbildung 2-10- nicht transduzierte Zellen gemessen, die also nur LgBIT exprimierten und nicht mit Viren in Kontakt kamen; diese zeigten hier im Gegensatz zur o.g. Messung ebenfalls ein erhöhtes Luciferasesignal. Des Weiteren wurden hier nicht mit LgBIT transfizierte HEK293T-Zellen mit Viruspartikelkonzentrat versetzt. Wie auch in Abbildung 2-10 wurden hier hohe Standardabweichungen und keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen festgestellt. Sowohl nicht-VSV-G-exprimierende Viruspartikel als auch nicht transduzierte Zellen zeigten hier eine Luciferaseaktivität; insgesamt war die Luciferaseaktivität im Vergleich zu den Fusionsproteinen aus Vollängen-NanoLuciferase und Vpr deutlich erniedrigt (vgl. Skalierung der Ordinate in Abbildung 2-3).



**Abb. 2-11: In HEK293T-Zellen gemessene Luciferaseaktivität bei Verwendung der NanoBIT-Konstrukte.**

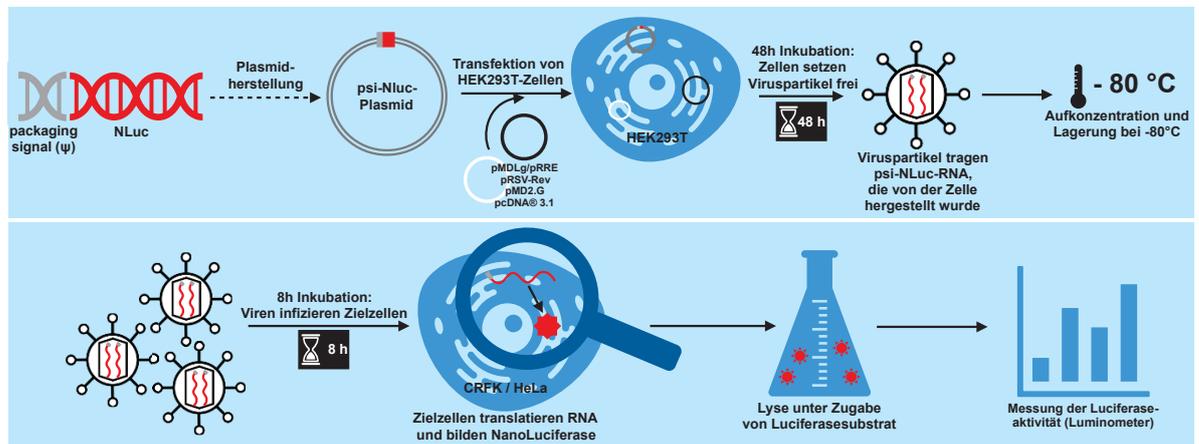
Die Abbildung zeigt die Aktivität der NanoLuciferase in HEK293T-Zellen, die auf unterschiedliche Weise mit den verschiedenen NanoBIT-Konstrukten transfiziert bzw. transduziert wurden. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte nach 8 Stunden. Die HEK293T-Zellen waren zuvor größtenteils mit dem LgBIT transfiziert wurden, sodass sie dieses exprimierten. Zum einen erfolgte die Transduktion dieser Zellen mit Reporterviren, die das Vpr-SmBIT- bzw. das SmBIT-Vpr-Fusionsprotein enthielten. Hier wurden parallel jeweils VSV-G-exprimierende („infektiöse“) und nicht-VSV-G-exprimierende Viruspartikel verwendet (Negativkontrolle). Zum anderen wurden Messungen an Zellen durchgeführt, die nur mit dem LgBIT-Plasmid transfiziert worden waren und nicht transduziert worden waren (Balken „LgBIT“). Der rechte Balken zeigt die Messung in Zellen, die nicht mit dem LgBIT transfiziert, jedoch trotzdem mit Vpr-SmBIT-Reporterviren transduziert worden waren. Deutlich zu erkennen ist neben hohen Standardabweichungen, dass in allen Messungen eine hohe NLuc-Aktivität gemessen werden konnte; auch in solchen, die eigentlich als Negativkontrolle gedacht waren. [n = 6 Messungen pro Balken, Ergebnisse allesamt nicht signifikant].

### 2.1.3 Ansatz C: RNA-basierter Assay: psi-NLuc-RNA

Nachdem die beiden oben genannten Ansätze zur Messung des Uncoatings von HIV-1 *in vitro* keine validen Ergebnisse erbrachten, wurde ein anderes System genutzt. Augustin Penda Twizerimana hatte ein Plasmid hergestellt, das die genetische Information für die NanoLuciferase enthielt, jedoch in Leserichtung unmittelbar davor das für HIV-1 typische „*packaging signal*“ (vgl. Einleitung) besaß. Bei Translation dieses Plasmids entsteht eine für die NLuc kodierende mRNA, die bei simultaner Transfektion des Reporterplasmids mit Virusplasmiden anstelle des viralen Genoms bzw. viraler Proteine in die entstehenden Reportervirionen inkorporiert wird. Nach der Transduktion von Zielzellen mit den so hergestellten Reporterviren sollte die psi-NLuc-mRNA durch den zellulären Translationsapparat in funktionstüchtige Luciferase translatiert und ihre Aktivität durch Lyse der Zellen unter Substratzugabe luminometrisch messbar werden. Der Ablauf dieses Assays ist in der untenstehenden Abbildung 2-12 schematisch dargestellt. Die Ergebnisse eines grundsätzlichen Funktionstests des verwendeten Luciferasekonstrukts zeigt Abbildung 2-13: durch Transfektion von HEK293T-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid wurden diese zur Expression

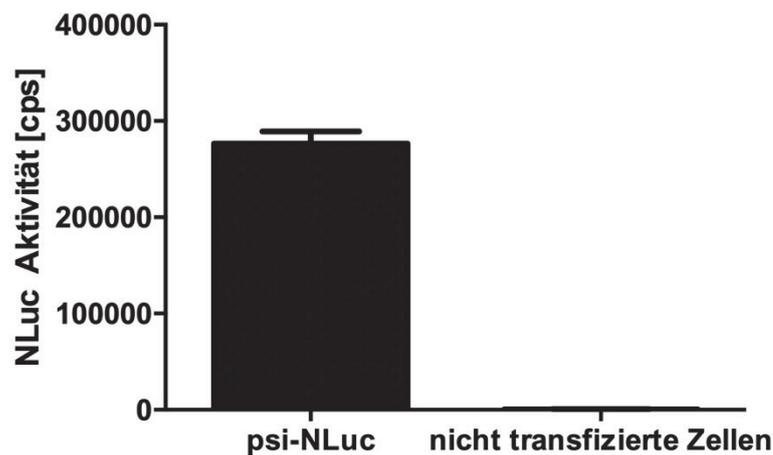
der Luciferase angeregt und nach 48 Stunden Inkubation deren Aktivität bestimmt. Diese zeigte sich gegenüber dem Hintergrundsignal (nicht transfizierte Zellen) um ein Vielfaches erhöht.

Da der Ansatz C signifikante und reproduzierbare Ergebnisse erbrachte, wurde er für alle im weiteren Verlauf dieser Arbeit dargestellten Experimente verwendet. Die Auflistung der Ergebnisse erfolgt unten getrennt nach dem jeweils untersuchten Einflussfaktor.



**Abb. 2-12: Schematischer Ablauf des RNA-basierten Ansatzes.**

Hierfür wurde (durch Augustin Penda Twizwerimana) ein Fusionskonstrukt hergestellt, das in Leserichtung vor der genetischen Information für die NanoLuciferase noch das HIV-1-typische Packaging-Signal ( $\psi$ ) besitzt. Dieses Fragment wurde in einen Vektor ligiert und das dabei entstandene Plasmid wurde zusammen mit Plasmiden, die für die übrigen viralen Proteine kodierten, in HEK293T-Zellen transfiziert. Die Zellen stellten daraufhin eine entsprechende RNA her, die in die Reporterviren inkorporiert werden konnte. Nach Transduktion der Zielzellen durch die Reporterviren konnte diese RNA durch den zellulären Translationsapparat zu NanoLuciferase translatiert werden, deren Aktivität durch Lyse unter Substratzugabe luminometrisch messbar wurde.



**Abb. 2-13: Funktionstest der psi-NLuc-Reporter-RNA durch Transfektion des Expressionsvektors in HEK293T-Zellen.**

Die Abbildung zeigt die Luciferasemessung in HEK293T-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit dem Plasmid, das für das psi-NLuc-Protein kodiert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen gemessen.  $n = 6$  Messungen.

## 2.2 Interne Validierung des Assays durch Messungen unter Cycloheximid-Zugabe

Cycloheximid (CHX) ist ein Antibiotikum, das die zelluläre Proteinbiosynthese, genauer die Translation hemmt. Diese Eigenschaft wurde sich zu Nutze gemacht, um zu untersuchen, ob das im Uncoating-Assay gemessene Luciferasesignal tatsächlich durch die Translation der Reporter-mRNA in der Zielzelle entsteht (vgl. Ansatz C) und nicht etwa durch Verpackung intakter Luciferase in die Reporterviruspartikel. Hierfür wurde pharmakologisch eine Hemmung der Translation herbeigeführt. Sollte das gemessene Signal durch intakte, im Rahmen der Vektorherstellung in die Viruspartikel verpackte Luciferase entstanden sein, ließe die Zugabe von CHX auf die zu transduzierenden Zielzellen keinen besonderen Effekt erwarten.

Der Einfluss von CHX auf den Uncoating Assay wurde mit zwei verschiedenen Zellreihen getestet, die Ergebnisse sind in Abbildung 2-14 grafisch dargestellt. Teil A zeigt die Ergebnisse der Messungen in CRFK-Zellen, Teil B zeigt die Daten aus der Untersuchung des Effektes in HeLa-Zellen. Die zu infizierenden Zellen in beiden Experimenten wurden vor und während der Transduktion mit Cycloheximid-haltigem Medium behandelt, als Referenz diente in beiden Fällen die pharmakologisch unbeeinflusste Transduktion von Zellen der jeweiligen Zelllinie. Acht Stunden nach der Transduktion wurde die Luciferaseaktivität gemessen.

Zur Messung des Effektes in CRFK-Zellen wurden insgesamt 18 Messungen durchgeführt (für die Konzentration 200  $\mu\text{M}$  und für die DMSO-Kontrolle lagen je 15 Messwerte vor), hier konnte ein dosisabhängiger Abfall des Signals beobachtet werden. Bereits in der geringsten getesteten Konzentration, 10  $\mu\text{M}$ , lag der gemessene Mittelwert bei ca. 43% des Referenzwertes. Eine weitere Erhöhung der CHX-Konzentration ließ die Mittelwerte weiter sinken, auf ca. 34% (100  $\mu\text{M}$ ), ca. 30% (200  $\mu\text{M}$ ) bzw. ca. 27% (300  $\mu\text{M}$ ). Zum Ausschluss einer Ergebnisverfälschung durch einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels DMSO wurden Zellen unter Zugabe einer mengenäquivalenten Dosis DMSO transduziert und auch in ihnen die Luciferaseaktivität nach acht Stunden gemessen. Es ergab sich ein Mittelwert von ca. 102% des Bezugswertes und somit kein signifikanter Unterschied zur Referenzmessung. Die ebenso durchgeführte Negativkontrolle ohne VSV-G ergab im Mittel eine Enzymaktivität von ca. 3%.

An HeLa-Zellen wurden insgesamt neun Messungen der Transduktion unter CHX-Einfluss durchgeführt. Auch hier ließ sich ein ähnlicher Effekt wie schon bei den CRFK-Zellen beobachten, mit steigender CHX-Konzentration fiel der gemessene Mittelwert ab. Anders als bei den vorgenannten Zellen blieben hier jedoch die gemessenen Mittelwerte trotz Erhöhung der Dosis relativ konstant. Sank die Luciferaseaktivität unter 10  $\mu\text{M}$  CHX auf ca. 61% des Bezugswertes, so lag sie bei 100  $\mu\text{M}$  CHX ebenfalls bei ca. 60%. Die Erhöhung der Konzentration auf 200  $\mu\text{M}$  CHX erbrachte einen Mittelwert von ca. 62%, durch weitere Erhöhung auf 300  $\mu\text{M}$  sank die

Enzymaktivität auf ein Mittel von ca. 59% des Bezugswertes. Die DMSO-Kontrolle erbrachte hier eine Aktivität von ca. 104% und somit ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zur Referenz, die Negativkontrolle erreichte ca. 7% des Bezugswertes.

Insgesamt konnte so experimentell gezeigt werden, dass aus der Hemmung der Translation ein Abfall des Luciferasesignals resultiert. Die Hypothese, dass die im Rahmen des Uncoating Assays gemessene Luciferaseaktivität durch Translation von RNA in der Zielzelle entsteht, lässt sich durch diese Daten untermauern.

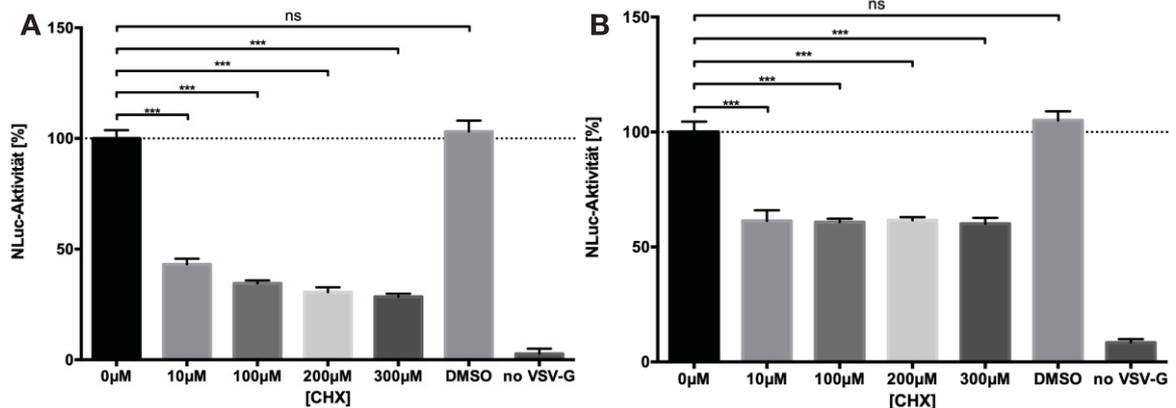


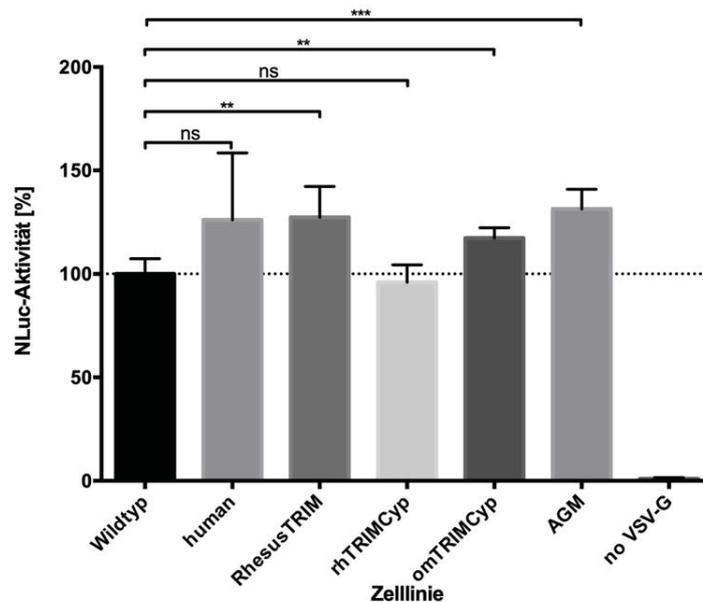
Abb. 2-14: Transduktion von CRFK-Zellen [A] bzw. HeLa-Zellen [B] mit HIV-1 psi-NLuc unter dem Einfluss von Cycloheximid.

Messung der Luciferaseaktivität nach acht Stunden. Sternchen zeigen die Signifikanz des Ergebnisses an: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p 0.001$  bis  $0.01$ ; \*  $p 0.01$  bis  $0.05$ ; ns,  $p > 0.05$  [Bonferroni-korrigierter t test].  $n = 18$  Messungen (CRFK, 15 Messungen für  $200 \mu\text{M}$  und DMSO) bzw.  $n = 9$  Messungen (HeLa).

### 2.3 Zelluläre Faktoren: TRIM-Proteine als Restriktionsfaktoren

Einen zellulären Restriktionsfaktor der HIV-1-Infektion stellt das *Tripartite Motif*-Protein 5alpha (TRIM5 $\alpha$ ) dar. Die Proteine unterschiedlicher Spezies weisen dabei eine unterschiedliche Effektivität der Restriktion gegenüber HIV-1 auf; die Restriktion findet dabei auf der Ebene des Uncoatings statt (Campbell et al., 2016; Imam et al., 2019; Li et al., 2016). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit verglichen werden, wie sich die unterschiedlichen Proteine auf das Infektionsgeschehen auswirken. Dafür wurden verschiedene CRFK-Zellreihen, von denen jede das TRIM-Protein einer anderen Spezies exprimiert, mit HIV-1-Luciferase-Reporterviren transduziert. CRFK-Zellen eignen sich deshalb für diesen Versuch, weil sie von Natur aus kein antiretroviral aktives TRIM5 $\alpha$  exprimieren, das den gemessenen Effekt verfälschen könnte. Als Vergleich diente die Transduktion wildtypischer CRFK-Zellen sowie eine Negativkontrolle mit viralen Vektoren, die kein VSV-G als Oberflächenprotein trugen. Mit dem menschlichen TRIM5 $\alpha$  verglichen wurden TRIM-Proteine unterschiedlicher Affenspezies: das der westlichen Grünmeerkatze (*Chlorocebus sabaeus*, engl. African Green Monkey, AGM) sowie das Protein des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*,

im Folgenden abgekürzt als *RhTRIM*). Neben den TRIM5 $\alpha$ -Proteinen wurden auch Zelllinien verwendet, die sog. TRIMCyp-Proteine exprimieren, in denen die Capsid-bindende *SPRY*- Domäne des TRIM5 $\alpha$  durch Cyclophilin A ersetzt wurde; das Protein der Rhesusaffen wird im Folgenden als *RhTRIMCyp* bezeichnet, das TRIMCyp-Protein aus Nachtaffen der Gattung *Aotus* (engl. Owl Monkey) wird im Folgenden als *OM* abgekürzt. Die Ergebnisse der Messungen sind in der untenstehenden Abbildung 2-15 grafisch dargestellt.



**Abb. 2-15:** Transduktion verschiedener Linien von CRFK-Zellen, die jeweils ein anderes TRIM-Protein exprimieren, mit HIV-1 psi-NLuc.

Messung der Luciferaseaktivität nach acht Stunden. Sternchen zeigen die Signifikanz des Ergebnisses an: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p$  0.001 bis 0.01; \*,  $p$  0.01 bis 0.05; ns,  $p > 0.05$  [Bonferroni-korrigierter t test].  $n = 6$  Messungen. Verglichen wurden wildtypische CRFK-Zellen mit solchen, die jeweils ein speziesspezifisches TRIM-Protein exprimieren: das menschliche TRIM5 $\alpha$  (human), TRIM5 $\alpha$  aus *Macaca mulatta* (RhesusTRIM), ein TRIM-Cyp-Fusionsprotein aus *Macaca mulatta* (rhTRIMCyp) bzw. aus Nachtaffen der Gattung *Aotus* (omTRIMCyp) sowie das TRIM5 $\alpha$  aus Affen der Spezies *Chlorocebus sabaeus* (AGM).

Insgesamt erbrachten die Untersuchungen mit TRIM-Proteinen nur erschwerte reproduzierbare Ergebnisse. Es zeigte sich, dass die einzelnen TRIM-Proteine das Luciferasesignal auf unterschiedliche Weisen beeinflussen. Bei den meisten der untersuchten TRIM-exprimierenden Zelllinien fand sich eine Steigerung des Luciferasesignals. Diese befand sich bei denjenigen Zelllinien, die das TRIM-Protein aus Rhesus- und *African Green Monkey*-Affen exprimieren, im Bereich von ca. 130% des Wildtyp-Signals. Bei humanem TRIM zeigte sich eine ähnliche Erhöhung des Signals, jedoch eine erhöhte Standardabweichung im Vergleich zu den Affen-Proteinen. Das TRIMCyp-Protein der Nachtaffen (OM, für engl. *Owl Monkey*) zeigte eine geringere Steigerung der Luciferaseaktivität, die Werte befanden sich hier im Mittel im Bereich von ca. 115% des Wildtyp-Signals. In allen Messungen zeigte sich ein sehr niedriges Hintergrundsignal durch Negativkontrolle mit Reporterviren ohne VSV-G.

Das TRIMCyp Protein der Rhesusaffen ergab in den Messungen keine signifikante Veränderung des Luciferasesignals, der Mittelwert betrug hier ungefähr 95% der Vergleichsmessung mit Wildtypviren. Insgesamt konnten somit tatsächlich unterschiedlich starke Effekte der verschiedenen TRIM-Proteine auf das Uncoating von HIV-1 gezeigt werden.

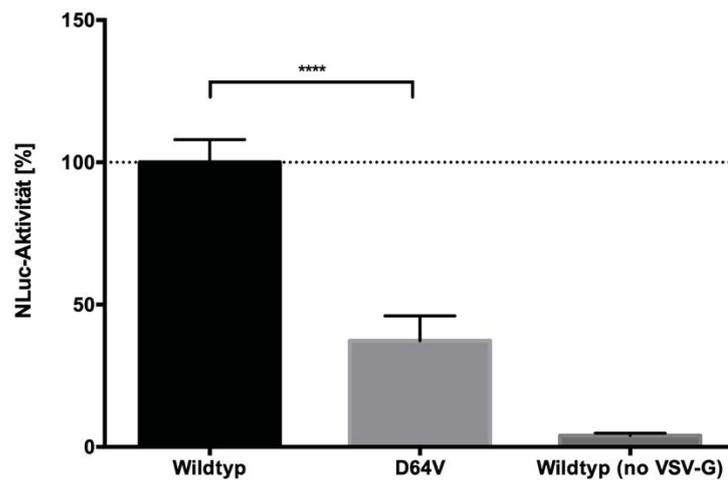
## **2.4 Virale Faktoren: Integrase-defiziente Viren**

Neben zellulären und pharmakologischen Faktoren sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch virale Einflüsse auf das Uncoating gemessen werden. Da in den letzten Jahren mehrfach gezeigt werden konnte, dass die virale Integrase eine größere Bedeutung zu besitzen scheint als allein die Integration des Virus- in das Wirtszellgenom (vgl. Einleitung), sollte untersucht werden, ob eine Modifikation der Aktivität des Enzyms die Ergebnisse des Uncoating Assays beeinflusst. Somit könnte eine Beteiligung der Integrase an den frühen Schritten des Infektionszyklus von HIV-1 experimentell dargestellt werden.

Zur experimentellen Prüfung dieser Hypothese stand mit dem Plasmid *D64V* eine Variante eines *gag-pol*-Plasmids zur Verfügung, bei dem die Integrase durch eine Punktmutation im aktiven Zentrum in ihrer Funktion gestört wird. Dieses Plasmid wurde anstelle des für die anderen Experimente verwendeten *gag-pol*-Plasmids verwendet, um Reporterviren zu erzeugen, deren dysfunktionale Integrase der einzige Unterschied zu den „Wildtyp-Reporterviren“ der anderen Experimente ist. Simultan wurden in diesem Experiment die Zielzellen sowohl mit den Integrase-defizienten als auch mit nach Standardprotokoll hergestellten Reporterviren infiziert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Transduktion von Zellen mit Reporterviren, die die mutierte Integrase in sich trugen (Balken „D64V“ in der untenstehenden Grafik) zeigte nach der Lyse eine verringerte Luciferaseaktivität. Die gemessene Luciferaseaktivität erreichte im Mittel nur eine Stärke von ca. 40% der links dargestellten Referenzmessung mit „Wildtypviren“ (die eine aktive Integrase beinhalten).

Zum Ausschluss einer möglichen Ergebnisverfälschung aufgrund abweichender Viruskonzentration in den Vergleichsmessungen zwischen Wildtyppartikeln und jenen mit Integrase-defizienten lentiviralen Partikeln wurde ein RT-Assay durchgeführt. Dieser erbrachte eine ähnliche Konzentration der Reversen Transkriptase in beiden Proben der Viruspartikelkonzentrate, die für die Transduktionen verwendet worden waren. Die Ergebnisse der Transduktionen waren somit vergleichbar und nicht allein auf eine unterschiedliche Konzentration bzw. Anzahl von Viruspartikeln in den beiden Vergleichsmessungen zurückzuführen (Ergebnis nicht grafisch dargestellt).

Abbildung 2-16 (s. unten) zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Messungen nach Transduktion von Zellen mit Integrase-defizienten Vektoren im Vergleich zur Transduktion mit Vektoren, die eine intakte Integrase trugen. Der im Uncoating Assay gemessene Unterschied zwischen den Luciferasesignalen der beiden verglichenen Virustypen war signifikant. Auch in diesem Experiment zeigte sich durch simultane Transduktion von Zellen mit Reporterviren ohne VSV-G als Negativkontrolle (rechter Balken im Diagramm) ein niedriges Hintergrundsignal. Die defektive Integrase scheint also einen Einfluss auf das Uncoating von HIV-1 auszuüben.



*Abb. 2-16: Transduktion von CRFK-Zellen mit "wildtypischen" HIV-1 psi-NLuc sowie mit Integrase-defizienten Viren (Punktmutation D64V).*

*Messung der Luciferaseaktivität (NLuc-Aktivität) nach acht Stunden im Rahmen des Uncoating Assays. Sternchen zeigen die Signifikanz des Ergebnisses an: \*\*\*,  $p < 0.001$  [t test].  $n = 6$  Messungen, die Virusmenge wurde mittels RT-Assay standardisiert.*

## 2.5 Pharmakologische Faktoren

### 2.5.1 Die Bindung des zellulären Cyclophilin A durch Cyclosporin A beeinflusst das Uncoating

Cyclosporin A (*kurz*: CsA) ist ein zyklisches Peptid, das in der Lage ist, zelluläres Cyclophilin A (*kurz*: Cyp A) zu binden. Da es im Rahmen der HIV-1-Infektion zu einer Interaktion zwischen dem Capsidprotein und Cyp A kommt, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern die pharmakologische Inhibition von Cyp A einen Einfluss auf die frühen Phasen des Infektionszyklus von HIV-1 nimmt.

Um diesen Einfluss messbar zu machen, wurden im Rahmen des Luciferaseassays Zellen verschiedener Zellreihen zwei Stunden vor ihrer Transduktion mit Reporterviren Cyclosporin-A-haltigem Medium versetzt und darin inkubiert. Auch bei Zugabe der Viruspartikel wurde für die Dauer der Inkubation weiter CsA-haltiges Medium mit verschiedenen CsA-Konzentrationen verwendet, das zwei Stunden vor der Messung durch reguläres Nährmedium ersetzt wurde. Als Referenz diente die Messung des Uncoatings in wildtypischen Zellen nach Transduktion mit HIV-1-Reporterviren ohne Zugabe pharmakologischer Inhibitoren. Die grafische Aufarbeitung der mit Cyclosporin A erzielten Ergebnisse zeigt die untenstehende Abbildung 2-17; die Ergebnisse sind hier nach Zellreihe getrennt dargestellt.

An CRFK-Zellen wurden insgesamt 18 Messungen durchgeführt, die Mittelwerte der dabei gemessenen Luciferaseaktivität sind im Teil A der Abbildung 2-17 grafisch dargestellt. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der Konzentration von CsA im Medium eine Erhöhung der Luciferaseaktivität nach sich zieht. Im Konzentrationsbereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  zeigte sich eine annähernd lineare Erhöhung des Signals auf einen Mittelwert von ca. 117% bei 1  $\mu\text{M}$ , 128% bei 5  $\mu\text{M}$  und 140% bei 10  $\mu\text{M}$ . Die Verwendung einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  erbrachte in allen Messungen eine Absenkung des Signals auf einen Wert unterhalb der Transduktion ohne Cyclosporin A, auf einen Mittelwert von 86%. Hier ist die Standardabweichung am größten. Die Transduktion unter Verwendung einer mengenäquivalenten Konzentration von DMSO erbrachte einen Mittelwert von ca. 101%, die Negativkontrolle mit Virionen ohne VSV-G-Expression erreichte Werte von deutlich unter 5% der Transduktion ohne Cyclosporin A.

An wildtypischen HeLa-Zellen wurden unter dem Einfluss von CsA insgesamt 9 Messungen durchgeführt, die grafische Auswertung zeigt Teil B der Abbildung 2-17. Der grundsätzliche Trend der oben geschilderten Transduktionen von CRFK-Zellen lässt sich auch bei diesen Zellen beobachten. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigt einen weniger linearen Verlauf, die Luciferaseaktivität erreicht Werte von ca. 130% bei Verwendung einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , 140% bei 5  $\mu\text{M}$ , 160% bei 10  $\mu\text{M}$ . Die Transduktion unter einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  CsA zeigt

hier eine Luciferaseaktivität von 140%, der Abfall gegenüber den Werten der Messung unter Verwendung einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ist somit nicht so ausgeprägt wie bei CRFK-Zellen. Bei Transduktion unter DMSO zeigt sich ein Mittelwert von annähernd 100%, die Negativkontrolle ohne VSV-G beläuft sich in diesem Fall auf ca. 8% des Bezugswertes.

Neben den wildtypischen Zelllinien wurde auch eine HeLa-Zelllinie getestet, die kein Cyclophilin A exprimiert. Diese Zellreihe wurde von Augustin Twizerimana hergestellt, die Ergebnisse der Messungen zeigt das Diagramm C der Abbildung 2-17. Hiermit sollte untersucht werden, inwieweit der Effekt von CsA tatsächlich vom zellulären Cyclophilin A abhängig ist. Auch hier wurden 9 Messungen durchgeführt. In diesem Fall zeigte sich ebenfalls eine fast lineare Zunahme der Luciferaseaktivität unter steigender CsA-Konzentration. Eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  bewirkte eine Steigerung auf 115% des Ausgangswertes, bei 5  $\mu\text{M}$  lag die Luciferaseaktivität bei 120%. 10  $\mu\text{M}$  CsA bewirkten eine weitere Zunahme auf 130%. Im Gegensatz zu den Wildtypzellen zeigt sich hier bei Verwendung einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  CsA kein Abfall, sondern eine weitere Steigerung der Enzymaktivität auf ca. 140%. Die Transduktion unter DMSO-Einfluss zeigte Werte um 100%, die Negativkontrolle erreichte eine Luciferaseaktivität von unter 3%.

Insgesamt konnten also bei allen Messungen eine konzentrationsabhängige Steigerung des Luciferasesignals durch Cyclosporin A beobachtet werden, wobei eine CsA-Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  in zwei von drei Experimenten wieder zu einem Abfall der Luciferaseaktivität führte. Die untenstehende Abbildung ist nach der untersuchten Zelllinie gegliedert: das Diagramm A zeigt die Transduktion von CRFK-Zellen; die Ergebnisse in Diagramm B wurden durch Infektion der parentalen HeLa-Zellen erzielt. Diagramm C zeigt die Transduktion von HeLa-Zellen, die kein Cyclophilin A exprimieren.

Die beobachtete Steigerung des Luciferasesignals lässt darauf schließen, dass mit steigender Konzentration von Cyclosporin A eine größere Menge der verwendeten Reporter- dem Translationsapparat der Zielzellen zugänglich gemacht wurde.

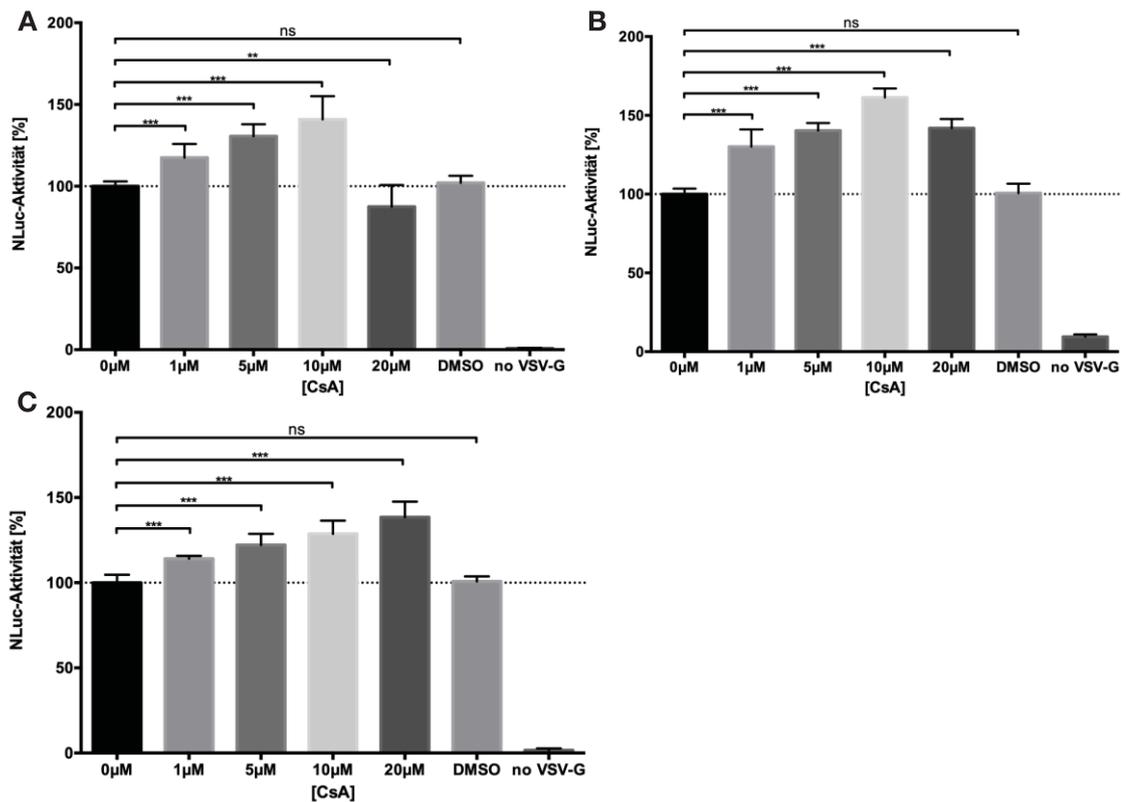


Abb. 2-17: Transduktion von CRFK-Zellen (A), HeLa-Wildtyp-Zellen (B) und HeLa-CypA-Knockout-Zellen (C) mit HIV-1 psi NLuc unter dem Einfluss von Cyclosporin A.

Messung der Luciferaseaktivität acht Stunden nach der Transduktion. Sternchen zeigen die Signifikanz des Ergebnisses an: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p 0.001$  bis  $0.01$ ; \*,  $p 0.01$  bis  $0.05$ ; ns,  $p > 0.05$  [Bonferroni-korrigierter t test].  $n = 18$  Messungen für CRFK bzw.  $n = 9$  Messungen für HeLa/HeLa-CypA-KO.

## 2.5.2 Destabilisierung des Capsids durch Einsatz von PF-3450074 (kurz: PF-74)

Die Substanz PF-3450074 (im Folgenden kurz: PF-74) behindert die Replikation von HIV-1 durch Interaktion mit dem viralen Capsid, das durch die Anlagerung der Substanz je nach Konzentration stabilisiert oder destabilisiert wird (vgl. Einleitung). Dieser Effekt sollte experimentell visualisiert und quantifiziert werden. Dazu wurden insgesamt 21 Messungen an wildtypischen CRFK-Zellen durchgeführt, die zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen von PF-74 behandelt worden waren. Mit einer Steigerung der Dosis von PF-74 ging dabei der Nachweis einer Steigerung der in der Zelle gemessenen Luciferaseaktivität einher; der Effekt ist in der untenstehenden Abbildung grafisch dargestellt (s. Abb. 2-18). Als Referenz diente auch hier die Messung des Uncoatings in wildtypischen Zellen nach Transduktion mit HIV-1-Reporterviren ohne Zugabe pharmakologischer Inhibitoren.

Lag bei Verwendung einer PF-74-Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  der Mittelwert der Luciferaseaktivität noch bei ca. 107%, führte eine Erhöhung der Konzentration auf  $5 \mu\text{M}$  zu einer mittleren Enzymaktivität von ca. 125% des Bezugswertes. Die höchste verwendete Dosis,  $10 \mu\text{M}$ , führte zur Erhöhung der Enzymaktivität auf ca. 150%. Zum Ausschluss einer Ergebnisverfälschung durch

mögliche toxische Effekte von DMSO als Lösungsmittel des PF-74 wurde auch eine Messung unter Zugabe einer mengenäquivalenten Dosis DMSO vor der Transduktion durchgeführt. Dabei lag der Mittelwert der durchgeführten 12 Messungen der DMSO-Kontrolle bei ca. 97%, das Mittel der 21 als Negativkontrolle durchgeführten Messungen ohne VSV-G belief sich auf unter 3% (vgl. Diagramm A der Abb. 2-18).

An HeLa-Zellen wurden insgesamt 9 Messungen unter PF-74 durchgeführt, die Ergebnisse finden sich im mit B bezeichneten Teil der Abbildung 2-18. Der oben beschriebene Trend der Messungen an CRFK-Zellen zeigte sich auch in dieser Zelllinie. Hier führte die Verwendung einer PF-74-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu einer Luciferaseaktivität von ca. 107% des Bezugswertes, eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  erbrachte im Mittel eine Aktivität von ca. 142%, die höchste Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) führte zu einer Steigerung auf ca. 164%. Die Luciferaseaktivität im Falle der hier ebenfalls durchgeführten DMSO-Kontrolle belief sich im Mittel auf ca. 103%, die Negativkontrolle (ohne VSV-G) auf ca. 8% des Referenzwertes.

Insgesamt zeigen die erzielten Ergebnisse eine dosisabhängige Steigerung der Luciferaseaktivität bei der Messung des Uncoatings von Viren, die ihre Zielzellen in einem PF-74-haltigen Milieu infizierten. Dies lässt darauf schließen, dass mit steigender Konzentration der Substanz deren Capsid-destabilisierende Wirkung stärker zum Tragen kommt und somit eine größere Menge der Reporter-mRNA in aktive Luciferase translatiert wird, was zu einer stärkeren Luciferaseaktivität führt.

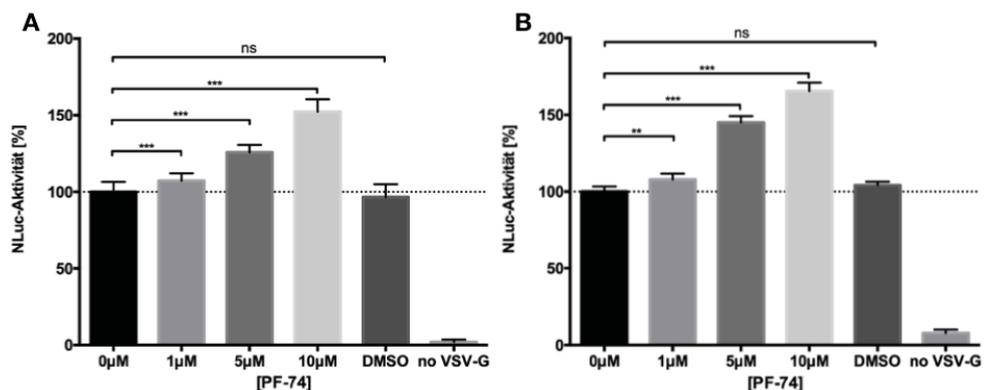


Abb. 2-18: Transduktion von CRFK-Zellen (A) und HeLa-Zellen (B) mit HIV-1 unter dem Einfluss von PF-74. Messung der Luciferaseaktivität (NLuc-Aktivität) nach acht Stunden. Sternchen zeigen die Signifikanz des Ergebnisses an: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p$  0.001 bis 0.01; \*  $p$  0.01 bis 0.05; ns,  $p > 0.05$  [Bonferroni-korrigierter  $t$  test].  $n = 9$  Messungen für HeLa bzw.  $n = 21$  Messungen für CRFK / 12 für DMSO-Kontrolle.

### 2.5.3 GS-CA1 – ein modernerer Capsiddestabilisator, potenter als PF-74

Seit der Entwicklung des oben geschilderten PF-74 wurden weitere Substanzen entwickelt, deren Wirkung auf einer Destabilisierung des viralen Capsids beruht. Eine dieser Substanzen ist GS-CA1, das eine wesentlich höhere Potenz als PF-74 besitzen soll. Die Wirksamkeit dieses Capsiddestabilisators sollte mit Hilfe des Uncoating Assays quantifiziert und mit der Wirksamkeit von PF-74 verglichen werden. Hierfür wurden die zu infizierenden Zellen zwei Stunden vor der Transduktion mit einem GS-CA-1-haltigen Medium in verschiedenen Dosierungen versetzt. Auch nach Zugabe der Viren wurden sechs der anschließenden acht Stunden Inkubation in inhibitorhaltigen Medium durchgeführt, bevor dieses durch normales DMEM-Nährmedium ersetzt wurde.

Die Messungen wurden an CRFK-Zellen durchgeführt, insgesamt wurden 12 Einzelmessungen ausgewertet; die Resultate werden in Abb. 5 grafisch dargestellt. Als Referenzgröße diente die Messung der Luciferaseaktivität in Zellen, die vor der Transduktion nicht mit GS-CA1 behandelt worden waren und so pharmakologisch unbeeinflusst blieben. Alle experimentell verwendeten Konzentrationen (0,05  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M) führten in allen Messungen zu einer deutlichen Erhöhung der Luciferaseaktivität. Bereits bei der geringsten Konzentration zeigte sich -wie auch bei der nächsthöheren- ein Mittelwert der Luciferaseaktivität von ca. 138% des Referenzwertes. Die Erhöhung der Konzentration auf 0,5  $\mu$ M bewirkte eine Erhöhung der Enzymaktivität auf ein Mittel von 143%, die höchste verwendete Konzentration führte zu einer weiteren Steigerung auf ca. 146%. Die Zunahme der Luciferaseaktivität mit steigender GS-CA1-Konzentration ist hier nicht so stark ausgeprägt wie bei PF-74 (vgl. Abb. 2-18).

Die Transduktion unter Zugabe einer mengenäquivalenten Dosis DMSO diente dem Ausschluss einer Ergebnisverzerrung durch einen Effekt des Lösungsmittels, sie zeigte keine wesentliche Veränderung des Signals gegenüber dem Bezugswert (Mittel ca. 99%). Das gemessene Signal der Negativkontrolle (ohne VSV-G) belief sich im Mittelwert auf unter 5% des Referenzwertes.

Die untenstehende Abbildung 2-19 verdeutlicht, dass bereits in der kleinsten verwendeten Dosis fast eine Sättigung des Capsid-destabilisierenden Effektes von GS-CA-1 erreicht zu sein scheint: selbst eine Verzwanzigfachung der Konzentration des Inhibitors führt zu keinem großen Unterschied in der Wirkausprägung. Insbesondere im direkten Vergleich mit den im Falle von PF-74 verwendeten Konzentrationen bzw. der dadurch erreichten Effekte stellt sich die hohe Potenz von GS-CA-1 dar.

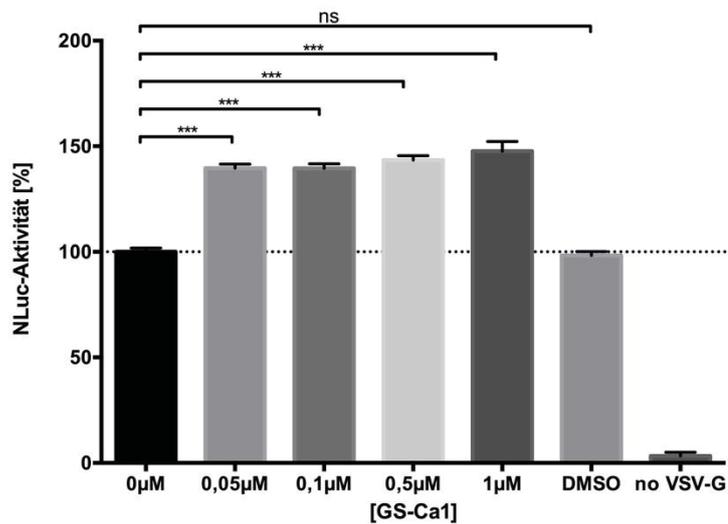


Abb. 2-19: Transduktion von CRFK-Zellen mit HIV-1 psi-NLuc unter GS-CA1-Einfluss.

Messung der Luciferaseaktivität (NLuc-Aktivität) nach acht Stunden. Sternchen zeigen die Signifikanz des Ergebnisses an: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p 0.001$  bis  $0.01$ ; \*  $p 0.01$  bis  $0.05$ ; ns,  $p > 0.05$  [Bonferroni-korrigierter t test].  $n = 12$  Messungen.

#### 2.5.4 Einfluss pharmakologischer Integraseinhibition auf den Uncoating Assay

Da im Rahmen dieser Arbeit die Verwendung einer dysfunktionalen Integrase zu einer deutlichen Verminderung des Luciferasesignals geführt hat (vgl. oben), sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, ob ein ähnlicher Effekt auch pharmakologisch provozierbar ist. Hierzu wurden zwei am Markt erhältliche Medikamente, Dolutegravir (kurz: DTG) und Raltegravir (kurz: RAL), ausgewählt und auf ihren Effekt hin untersucht.

Die zu infizierenden CRFK-Zellen wurden dafür vor und während der Transduktion mit HIV-1-Reporterviren mit dem jeweiligen Integraseinhibitor behandelt, acht Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Wie auch in den anderen Experimenten diente als Referenz eine pharmakologisch unbeeinflusste Transduktion von Zellen mit HIV-1-Reporterviren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-20 grafisch dargestellt.

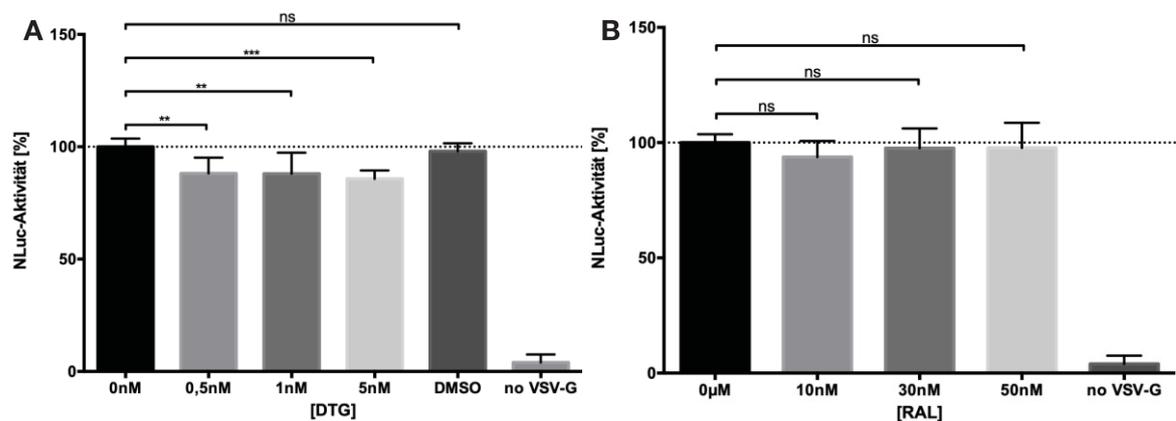


Abb. 2-20: Transduktion von CRFK-Zellen mit HIV-1 psi-NLuc unter dem Einfluss von Dolutegravir (DTG, A) bzw. Raltegravir (RAL, B).

Messung der Luciferaseaktivität (NLuc-Aktivität) nach acht Stunden. Sternchen zeigen die Signifikanz des Ergebnisses an: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p 0.001$  bis  $0.01$ ; \*  $p 0.01$  bis  $0.05$ ; ns,  $p > 0.05$  [Bonferroni-korrigierter t test].  $n = 9$  Messungen.

Die Transduktion von CRFK-Zellen, die zuvor mit dem Integrase-Inhibitor Dolutegravir behandelt worden waren, wurde insgesamt dreimal in Triplets durchgeführt, die grafische Darstellung der Ergebnisse findet sich im mit A bezeichneten Teil der Abbildung 2-20. In allen verwendeten Konzentrationen konnte ein ähnlicher Abfall der Luciferaseaktivität gemessen werden, jedoch fielen im Vergleich zu den anderen Experimenten leicht erhöhte Standardabweichungen auf. Sowohl bei einer DTG-Konzentration von 0,5 nM als auch bei einer Konzentration von 1 nM zeigte sich ein Abfall der Aktivität um im Mittel ca. 13% auf 87%. Eine Konzentration von 5 nM erbrachte einen Mittelwert der Enzymaktivität von ca. 85%. Die zum Ausschluss lösungsmittelbedingter Verfälschungen durchgeführte DMSO-Kontrolle belief sich in der Luciferaseaktivität auf einen Mittelwert etwa 99% und zeigte somit keinen signifikanten Unterschied zur Referenzmessung. Die ebenso durchgeführte Negativkontrolle ohne VSV-G erreichte ca. 4% des Bezugswertes.

Der Integraseinhibitor Raltegravir wurde in insgesamt drei Messungen in Triplets an CRFK-Zellen getestet, sodass insgesamt neun Messwerte ausgewertet wurden. Der mit B bezeichnete Teil der Abbildung 2-20 zeigt die grafische Darstellung dieser Ergebnisse. Es zeigte sich für die Konzentration 10 nM ein Abfall der mittleren Luciferaseaktivität auf 93%, für die Konzentrationen 30 und 50 nM auf 97%. Da Raltegravir in Wasser gelöst vorlag, konnte hier auf eine DMSO-Kontrolle verzichtet werden, das Signal der Negativkontrolle belief sich auf unter 4% des Bezugswertes. Die im Falle von RAL gemessenen Signalunterschiede zur Referenzmessung ohne pharmakologische Beeinflussung waren allesamt nicht signifikant.

In der Zusammenschau der Ergebnisse stellte sich bei erhöhten Standardabweichungen im Falle von Dolutegravir ein Effekt dar, der nicht die Stärke eines experimentell induzierten Enzymdefektes erreicht. Für Raltegravir konnte sogar kein signifikanter Einfluss der Substanz auf die Aktivität der NanoLuciferase in den Zielzellen gezeigt werden.

### 3 DISKUSSION

---

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Identifizierung zellulärer, viraler und pharmakologischer Einflussfaktoren auf das sogenannte Uncoating als Teil des Replikationszyklus von HIV-1. Dafür wurde ein aus der Literatur bekannter Uncoating Assay modifiziert. Aus Gründen der Biosicherheit wurde für alle dieser experimentellen Ansätze ein Vorgehen nach dem sog. *Drei-Plasmid-System* gewählt. Dabei werden für die Herstellung der viralen Vektoren lediglich Plasmide, die für die HIV-Gene *gag*, *pol* und *rev* kodieren, verwendet (Dull et al., 1998). Durch die resultierende Limitierung der Infektion auf einen Zyklus konnte die Biosicherheit erheblich erhöht werden. Neben den vorgenannten Plasmiden wurde als Oberflächenprotein das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitisvirus (*VSV-G*) transfiziert, um eine Transduktion von auch solchen Zielzellen zu ermöglichen, die nicht die HIV-1-spezifischen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen.

In einem ersten Ansatz wurde zunächst ein Plasmid hergestellt, das für ein Fusionsprotein aus dem viralen Protein R (Vpr) und NanoLuciferase codiert. Das entsprechende Plasmid wurde zusammen mit Plasmiden, die für virale Proteine codieren, in HEK293T-Zellen transfiziert, die so zur Herstellung viraler Vektoren angeregt werden sollten. Durch die Transduktion mit diesen Vektoren sollte das Fusionsprotein in Zielzellen gelangen und dort durch Messung der Luciferaseaktivität nachweisbar werden. Die durchgeführten Versuche führten jedoch, wie oben dargestellt, zu keinem reproduzierbaren Ergebnis.

Als Grundlage für diese fehlende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kommen grundsätzlich mehrere Möglichkeiten in Frage. Zum einen wäre denkbar, dass das Verfahren bereits auf der Ebene der Transfektion versagt und dass das Vpr-NLuc-Protein gar nicht erst in die Viruspartikel inkorporiert wird. Eine weitere Fehlerquelle könnte in der Zerstörung des Fusionsproteins durch die HIV-Protease (PR) liegen, die sowohl *vor* als auch *nach* der Bildung der Vektorpartikel stattfinden könnte. Zur Klärung dieser möglichen Fehlerquellen wurde ein Nachweis des Proteins sowohl in Zell-, als auch in Viruslysat mittels Western Blot angestrebt. Obwohl hier in beiden Fällen die Luciferase nachgewiesen werden konnte, ist eine Modifikation bzw. eine zumindest partielle Zerstörung des Proteins durch die HIV-1-Protease nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen. Häufig erbrachte jedoch die eigentlich als Negativkontrolle gedachte Messung der Transduktion mit viralen Vektoren, die kein *VSV-G* besaßen, ein Signal. Dieses übertraf oft sogar den Referenzwert, was darauf schließen lässt, dass eine nicht unwesentliche Menge der Luciferase in den Zielzellen ankommt. Da die Luciferase in diesem Fall offenbar in der Lage war, ihr Substrat unter Lichtemission umzusetzen, scheint die Zerstörung des Fusionsproteins durch die Protease keine besondere Rolle für die fehlende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu spielen.

Neben der enzymatischen Spaltung des Fusionsproteins wurde auch seine Zerstörung durch den Auftau- oder den Einfrierprozess der Vektorpartikelkonzentrate in Betracht gezogen und entsprechend untersucht. Der Einfrierprozess war nötig, um das in einer Transfektion hergestellte Viruspartikelkonzentrat für mehrere Transduktionen verwenden bzw. über einige Tage lagern zu können. Zur Klärung des Einflusses dieser möglichen Fehlerquelle wurden Messungen durchgeführt, für die ein Teil des Vektorpartikelkonzentrats direkt nach seiner Herstellung für Transduktionen verwendet wurde, während ein anderer Teil zunächst wie üblich eingefroren und später für die Transduktionen auf Eis aufgetaut wurde. Die vorbeschriebenen Probleme traten jedoch auch hier auf, sodass die Hypothese einer Zerstörung von Vektorpartikeln durch die Lagerung bzw. das Einfrieren und Auftauen verworfen wurde.

In einem zweiten experimentellen Ansatz sollte durch die Verwendung des NanoBIT-Assays, bei dem die Luciferase als in zwei Teile zerlegtes Protein genutzt wurde, die durch Protein-Protein-Interaktion in der Zelle ein Signal erzeugt werden. Auch dieses Vorgehen erbrachte keine signifikanten Messergebnisse und zeigte sich als störanfällig. Als mögliche Ursache dieser Störanfälligkeit wäre beispielsweise denkbar, dass es nach der Transfektion der zu infizierenden Zellen mit dem großen Fragment der Luciferase (LgBIT) zu einer inkonstanten Expression bzw. einem verstärkten Abbau des Proteins in den Zellen kommt. Das daraus resultierende Missverhältnis zwischen großem und kleinem Fragment der NanoLuciferase könnte die Signalstärke wesentlich beeinflusst haben. Für weiterführende Studien könnte gegebenenfalls versucht werden, eine Zelllinie zu etablieren, die das große Fragment der NanoLuciferase stabil exprimiert, um durch Variation der Vektorpartikelkonzentratmenge Aussagen über das ideale Verhältnis von kleinem und großem Fragment der Luciferase treffen zu können. Darauf aufbauend könnte versucht werden, die hier beschriebenen Experimente zu wiederholen und auf ihre Reproduzierbarkeit zu prüfen.

Aufgrund des fehlenden Erfolgs der beiden erstgenannten Verfahren wurde ein Strategiewechsel vollzogen: es wurde ein von Augustin Penda Twizerimana hergestelltes Plasmid genutzt, das für das Enzym *NanoLuciferase* kodiert, wobei das Enzym jedoch zusätzlich mit dem *Packaging Signal* für HIV-1 fusioniert wurde. Dieses Plasmid wurde zusammen mit Plasmiden transfiziert, die für virale Proteine kodieren. Die transfizierten Zellen begannen dadurch, virale Vektoren herzustellen, in die die Luciferase-mRNA inkorporiert wurde. Diese Vektoren wurden zur Transduktion verschiedener Zellreihen genutzt; im Rahmen dieser Transduktionen wurden zelluläre, virale und pharmakologische Faktoren variiert und auf ihren Effekt hin untersucht. Eine reverse Transkription der mRNA und eine Integration in das Genom der Wirtszelle ist hier nicht Grundlage des gemessenen Signales; Ziel war lediglich der Nachweis der Expression von NanoLuciferase in der Zielzelle durch Messung ihrer Aktivität und somit der Nachweis, dass die Luciferase durch das

Uncoating der Reporterviruspartikel in die Zielzelle gelangt ist. Dass das gemessene Luciferasesignal tatsächlich auf die Herstellung des Enzyms durch die Zielzelle und nicht durch die Verpackung des Proteins bei der Viruspartikelbildung zurückzuführen ist, konnte durch die Verwendung von Cycloheximid (CHX) während der Transduktion von Zellen mit den entsprechenden viralen Vektoren gezeigt werden (vgl. *Cycloheximid als Hemmer der Proteinbiosynthese validiert die Aussagekraft des verwendeten Assays*, unten).

Durch Lyse der Zielzellen unter Zugabe des Luciferasesubstrates konnte schließlich luminometrisch die Luciferaseaktivität in den Zellen erfasst und quantifiziert werden. Da sich die Ergebnisse der nach diesem Protokoll durchgeführten Versuche deutlich besser reproduzieren ließen, basieren die unten diskutierten Daten ausschließlich auf Experimenten mit dem *Packaging-Signal*-Plasmid.

Zusammen mit den jeweiligen Testreihen wurde immer auch eine Kontrolle mit nicht transduzierten Zellen sowie eine Negativkontrolle (ohne VSV-G, d.h. mit nicht-transduktionskompetenten Vektorpartikeln) gemessen, um das Resultat qualitativ einordnen zu können. Dabei konnten auf diversen Feldern Erkenntnisse gewonnen werden, die im Folgenden einzeln dargestellt und diskutiert werden sollen.

### **3.1 Zeitliche und örtliche Organisation des Uncoatings**

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, an welchem Punkt genau der Prozess des Uncoatings im zeitlichen, aber auch im örtlichen Kontext des Infektionszyklus stattfindet. Lange Zeit war die vorherrschende Hauptmeinung, das Uncoating finde im Anschluss an die Membranfusion im Zytosol statt; entsprechende Daten als Beleg wurden publiziert (vgl. unten). In neueren Veröffentlichungen kommen jedoch vermehrt Arbeitsgruppen aufgrund neuer Daten zu dem Schluss, dass das Uncoating an der Kernmembran der Zelle stattfindet. Eine Abwägung der aktuell vorhandenen Daten nehmen Novikova und Kollegen in einem entsprechenden Review vor (Novikova, Zhang, Freed, & Peng, 2019).

Für ein zytosolisches Uncoating sprechen vor allem ältere Daten. So konnte beispielsweise nach der Lyse HIV-infizierter Zellen und Auftrennung der Lysate nach Fraktionen in derjenigen Fraktion, die HIV-DNA enthielt, kein CA-Protein nachgewiesen werden. Daraus schloss man, dass das Capsidprotein nach dem Viruseintritt in die Zelle verloren ginge (Miller et al., 1997).

Neuere Arbeiten jedoch konnten Belege dafür liefern, dass das Capsidprotein CA nicht nur die Funktion hat, Virusbestandteile als eine Art Schutzmantel zu umgeben. Stattdessen konnte eine Vielzahl darüberhinausgehender Aufgaben nachgewiesen werden, deren Erfüllung die Präsenz von CA-Molekülen an Reverse-Transkriptions-Komplexen (RTC) sowie Präintegrationskomplexen (PIC)

voraussetzt. Bereits 2002 konnte experimentell gezeigt werden, dass RTCs bzw. PICs zum überwiegenden Teil CA-Moleküle beinhalten (McDonald et al., 2002). Deren funktionelle Relevanz für das Virus zeigt sich darin, dass eine Interaktion zwischen CA und Mikrotubuli der Zelle den Transport der relativ gesehen sehr großen PIC in Richtung Zellkern ermöglicht (Fernandez et al., 2015). Am Zellkern angekommen, ermöglichen erst weitere CA-vermittelte Interaktionen den Eintritt des PIC in den Zellkern: Nucleoporin 153 (*Nup153*) als Bestandteil des Kernporenkomplex bindet CA, wie beispielsweise Di Nunzio und Kollegen zeigen konnten (Di Nunzio et al., 2013). Da weiterhin Nup153 CA-Hexamere mit höherer Affinität binden als CA-Monomere und Nup153 sich auf der Innenseite der Kernmembran befindet, ist davon auszugehen, dass zumindest einige CA-Hexamere als Bestandteil des viralen Capsids in den Zellkern gelangen, was wiederum die Theorie des Uncoatings in der Nähe des Zellkerns bzw. an der Kernmembran unterstützt (Novikova et al., 2019; Price et al., 2014).

*Burdick et al.* gelang es, CA direkt mit einem Fluoreszenzprotein zu fusionieren. So konnten sie intakte Cores noch im Zellkern nachweisen und propagieren daher, das Uncoating finde erst dort statt, kurz vor der Integration. Dass die bisherigen Ergebnisse auf ein zytosolisches Uncoating hinweisen, könnte den Autoren nach unter anderem daran liegen, dass nur ca. eines von 50 Viruspartikeln eine produktive Infektion hervorruft. Der Transport über die Kernmembran gelingt den Ergebnissen dieser Studie nach durch eine Interaktion des Capsids mit *Nucleoporin 153* (NUP153) sowie dem *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 6* (CPSF6), die Kernmembran zu überwinden, deren Poren dafür eigentlich zu klein sind. Neuere Studien bestätigen diese Ergebnisse. (Bejarano et al., 2019; Briggs, Wilk, Welker, Kräusslich, & Fuller, 2003; R. C. Burdick, Hu, & Pathak, 2013; Ryan C. Burdick et al., 2020). Einen weiteren starken Hinweis dafür, dass das Uncoating erst nach der Passage der Kernmembran stattfindet, konnten Zila und Kollegen zeigen: ihnen gelang es, intakte Capside bei der Passage der Kernmembran bildlich darzustellen, was stark darauf hinweist, dass ihr Zerfall tatsächlich erst im Zellkern passiert (Zila et al., 2021).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten basieren auf einer Messung der Luciferaseaktivität acht Stunden nach der Zugabe von Viruspartikeln auf Zielzellen. Der Wirkmechanismus von Inhibitoren wie beispielsweise *PF-3450074* (kurz: *PF-74*), das die Capsid-Hülle destabilisiert, kommt unabhängig vom „physiologischen“ Ort des Uncoatings zum Tragen: der Inhalt des Capsids, somit auch die Reporter-mRNA, die für die Nano-Luciferase codiert, wird durch die Wirkung von *PF-3450074* dem Translationsapparat der Zelle zugänglich, was zur Bildung von NanoLuciferase führt (vgl. Abschnitt über *PF-74*, unten). Dieser Mechanismus stellt eine Beeinflussung des „normalen“ Infektionszyklus dar, somit ist der genaue Ort des „physiologischen“ Uncoatings zunächst einmal unerheblich für die hier erhobenen Daten.

Darüber hinaus eignen sich die hier verwendeten Methoden nicht, um eine valide Aussage über den Ort des Uncoatings treffen zu können, weil die Luciferasemessung mit Zelllysaten durchgeführt wird. Zur Untersuchung des genauen Schicksals des Capsids nach der Transduktion der Zellen mit den Reporterviruspartikeln wären Methoden wie die Elektronenmikroskopie oder Fluoreszenzmikroskopie nötig. Trotzdem bietet insbesondere eine mutmaßliche Interaktion des Capsids mit der Kernmembran ggf. weitere Ansatzpunkte für eine pharmakologische Beeinflussung/Inhibition des Uncoatings. Weiterführende Studien könnten sich beispielsweise mit ebendieser Interaktion befassen. So könnte zum Beispiel eine weiterführende Untersuchung der Interaktion zwischen Nup153 und CA-Hexameren potentielle Ansätze für eine pharmakologische Restriktion hervorbringen (vgl. Abschnitt über PF-74, unten). Nichtsdestoweniger ist die Frage nach dem genauen Ort des Uncoatings eine wichtige Frage, da sich aus ihrer Beantwortung womöglich neue Therapiestrategien bzw. -Zielstrukturen ergeben könnten.

### **3.2 Cycloheximid als Hemmer der Proteinbiosynthese validiert die Aussagekraft des verwendeten Assays**

Cycloheximid (CHX) ist ein Antibiotikum, das aus Bakterien der Spezies *Streptomyces griseus* isoliert wurde. Seine Wirkung beruht auf einer Hemmung der 80S-Ribosomen in eukaryotischen Zellen. Die Proteinbiosynthese wird dabei auf verschiedene Weisen gestört: sowohl die Bindung als auch die Prozessierung und Freisetzung von transfer-RNA (tRNA) an den Ribosomen werden gestört. Außerdem konnten im Tierversuch auch Effekte der Substanz auf die Zusammensetzung der Ribosomen-Untereinheiten sowie die Initiation von Peptiden gezeigt werden (Obrig, Culp, McKeehan, & Hardesty, 1971).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit dient die Verwendung von CHX vor allem der Validitätsprüfung des verwendeten Assays. Grundsätzlich sind für den Ursprung der nach der Lyse der infizierten Zellen gemessenen Luciferaseaktivität zwei Mechanismen denkbar. Zum einen könnte die gemessene Aktivität aus Luciferasemolekülen stammen, die im Rahmen der Transfektion von HEK293T-Zellen zur Virusproduktion mit in die Partikel verpackt werden. Die andere Möglichkeit wäre, dass die Luciferase-RNA (als „Reporter-RNA“) in die Virionen verpackt wurde und nach Transduktion der Zielzellen im Rahmen des Uncoating für den zellulären Translationsapparat zugänglich wird. Zur Klärung dieser Frage in einem Experiment wurde CHX als Translationshemmer auf die zu transduzierenden Zellen gegeben: intakte Luciferase aus den Viruspartikeln würde durch die resultierende Hemmung der Proteinbiosynthese nicht beeinflusst, aus den Virionen stammende RNA hingegen schon.

Die Versuche zeigten allesamt einen deutlichen Abfall des Luciferasesignals unter CHX und somit klare Hinweise dafür, dass der überwiegende Teil des gemessenen Signals durch die Aktivität von in den Zielzellen produzierten Luciferase-Moleküle stammt. Dies legitimiert die Annahme, dass der in allen durchgeführten Versuchen gemessene Effekt tatsächlich die Beeinflussung der Effektivität des frühen Infektionszyklus von HIV-1 abbildet und nicht etwa das Korrelat bei der Transfektion akzidentell in die Vektorpartikel verpackten Enzyms aus den HEK293T-Zellen.

Der Effekt von CHX in der Zelle ist ungerichtet, das heißt die Proteinbiosynthese insgesamt wird gehemmt, unabhängig vom Ursprung der zu translatierenden mRNA. Somit wird durch den Einsatz von CHX auf virusinfizierten Zellen auch die Produktion viraler Proteine eingeschränkt. Durch den ungerichteten Wirkmechanismus von CHX bzw. seine Wirkung an einer Struktur der Zelle (den Ribosomen) und nicht an einer Struktur oder einem Enzym des Virus, eignet es sich nicht als sinnvolles Therapeutikum einer (HI-)Virusinfektion *in vivo*; die zu erwartenden Nebenwirkungen wären zu groß. Gleichwohl konnte die Verwendung der Substanz für die vorliegende *in vitro*-Arbeit wichtige Erkenntnisse über die Aussagekraft des Assays liefern, die bei der Interpretation der übrigen Ergebnisse dienlich sind: die Abnahme des Signals mit steigender Konzentration des CHX in der Zelle zeigt, dass das luminometrisch gemessene Luciferasesignal tatsächlich durch die Translation der Reporter-RNA in der Zielzelle entsteht. Entstände es durch in die Viruspartikel verpackte, intakte Luciferase, wäre durch die Verwendung eines translationshemmenden Wirkstoffes wie CHX kein nennenswerter Effekt auf die Höhe des Luciferasesignals zu erwarten.

### **3.3 Die virale Integrase beeinflusst das Uncoating von HIV-1 auf mehreren Ebenen**

In der Literatur ist von mehreren Autoren beschrieben worden, dass die virale Integrase (IN) auch über ihre primäre Funktion im Zellkern hinaus eine Rolle spielt. Dabei werden in unterschiedlichen Veröffentlichungen diverse Mechanismen diskutiert; allen gemeinsam ist die Schlussfolgerung, dass der Einfluss der Integrase auf die Virusreplikation bereits nach der Membranfusion beginnt und nicht erst bei der Integration viraler DNA in das Wirtsgenom.

So konnten beispielsweise Briones und Kollegen zeigen, dass HI-Viren weniger infektiös sind, wenn sie bestimmte Mutationen der Integrase besitzen. In ihrer Arbeit nehmen sie einen Einfluss der IN auf die reverse Transkription an, weil in den Messungen neben der Anzahl und Stabilität der Cores die Gesamtmenge proviraler DNA in der Zelle reduziert war. Da die Integrase als Teil des *gag-pol*-Polyproteins vorliegt, wäre jedoch ebenso denkbar, dass die beobachteten Effekte auf die Veränderung des Polyproteins und nicht auf die Integrase an sich zurückzuführen sind, was durch die Autoren jedoch experimentell widerlegt werden konnte. Demzufolge scheint tatsächlich die

Beeinträchtigung der Enzymfunktion der RT ausschlaggebend für die verminderte Infektiosität der Viren zu sein (Briones et al., 2010).

In einer Veröffentlichung von Jayappa und Kollegen (Jayappa et al., 2015) konnte im Rahmen von Infektionen mit Viruspartikeln, die eine voll funktionsfähige Integrase besitzen, eine deutlich höhere Menge an PIC-gebundenem CA-Protein gemessen werden als bei Infektionen mit Viruspartikeln, die keine funktionstüchtige Integrase besaßen. Dies lässt darauf schließen, dass die Integrase bei der Koordination der Abläufe zwischen Membranfusion und Integration eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Die Autoren schlussfolgern, dass durch die Interaktion von Integrase und Dynein Konformationsänderungen der IN erfolgen, die letztendlich dazu beitragen, dass die Integrase Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann, die die viralen Capside im Zytosol stabilisieren.

Auch in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigte sich ein ähnlicher Zusammenhang: die Transduktion von Zielzellen mit  $\Delta$ Integrase-Vektoren, also solchen, die die D64V-Mutation der Integrase in sich trugen, führte zu einer erheblich geringeren Luciferaseaktivität als die Transduktion durch Vektoren, die eine unmutierte Integrase besaßen. Um die Ergebnisse besser interpretieren zu können, wurde mit den verwendeten Vektorpartikelkonzentraten ein RT-Assay durchgeführt, welcher eine vergleichbare Konzentration der RT beider Proben erbrachte. Die eingesetzte Virusmenge war demnach ebenso vergleichbar wie die eingesetzte Menge an Zielzellen, was die Interpretation des gemessenen Effektes erlaubt.

Bei der weiteren Interpretation dieser Messergebnisse stellte sich die Frage, warum das Luciferasesignal durch Verwendung einer inaktiven Integrase absinkt und nicht ansteigt, wie in anderen Experimenten, in denen die Restriktion der Infektion aus einer Capsid-Destabilisierung resultiert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Gesamtzahl funktionierender Capside durch die Integrasemutation verringert ist und demnach insgesamt weniger Reporter-RNA anfällt, die zu NanoLuciferase translatiert werden kann. Ein solcher Effekt wurde bereits in mehreren Quellen aus der Literatur beschrieben, unter anderem auch bei Briones und Kollegen. Auch sie konnten zeigen, dass die Mutation der Integrase in einer Schwächung der Capsidintegrität bzw. einem leichteren Zerfall der viralen Capside resultiert. Um auch für den hier verwendeten Assay eine Aussage über die Reduktion der Gesamtzahl funktioneller Cores treffen zu können, müssten weitere Experimente angeschlossen werden. Diese könnten z.B. elektronenmikroskopische Betrachtung der infizierten Zellen oder eine Quantifizierung der Cores durch Purifikation umfassen, wie sie in einigen der Vorarbeiten durchgeführt wurde.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden ausschließlich VSV-G-pseudotypisierte Reporterviren verwendet. Die Gruppe um Briones legt in ihrer Arbeit dar, dass eine solche Pseudotypisierung mit VSV-G den Einfluss der von ihnen getesteten Integrasemutationen (einer kompletten Deletion sowie der C130S-Mutation) teilweise aufheben kann. Der von den Autoren gemessene Einfluss der Mutationen zielte jedoch auf die Effektivität der reversen Transkription ab, sie maßen die Menge an Virus-DNA in der Zielzelle. Der für die hier vorliegende Arbeit genutzte Assay hingegen misst nicht die reverse Transkription; das hier gemessene Luciferasesignal gibt einen Anhalt für die Effizienz der Freisetzung von Reporter-mRNA aus den viralen Vektoren und die anschließende Translation dieser zu Luciferase. Trotz dieses methodischen Unterschieds wäre in weiterführenden Untersuchungen der Einfluss der Entry-Methode auf das Messergebnis des hier genutzten Assays zu klären. Dafür müssten virale Vektoren hergestellt werden, die neben der D64V-Mutation der Integrase die hier genutzte psi-Nluc-Reporter-RNA enthalten und einen anderen Entry-Mechanismus nutzen. Beispielsweise wäre hier die Verwendung eines ENV-Proteins zu nennen. Dies würde aber bedeuten, dass die Vektorpartikel nicht mehr zur Transduktion der im Kontext dieser Arbeit verwendeten Zellreihen geeignet wären, da diese nicht die HIV-spezifischen Rezeptoren exprimieren. Man müsste demzufolge die genutzten Zellreihen durch stabile Transfektion zur Expression der HIV-1-spezifischen Korezeptoren anregen oder andere nutzen.

### **3.4 TRIM-Proteine als Restriktionsfaktoren hemmen HIV-1 speziesabhängig in unterschiedlichem Umfang**

Viele Arten haben Restriktionsfaktoren entwickelt, um sich auf zellulärer Ebene gegen virale Infektion schützen zu können. Ein Beispiel für einen solchen Restriktionsfaktor zur Abwehr retroviraler Infektionen stellt das Protein *TRIM5 $\alpha$*  dar. Es entstammt der Familie der TRIM-Proteine (Abkürzung für engl. *Tripartite Motif*) (M. Stremlau et al., 2004). Diese Proteine kommen in vielen Säugetierarten ubiquitär vor und werden permanent in vielen Geweben exprimiert; die Proteine unterschiedlicher Arten sind jedoch in unterschiedlichem Maße effektiv bei der Abwehr einer HIV-1-Infektion. So gelingt HIV-1 beispielsweise in einigen Altweltaffen-Arten zwar der Zelleintritt, der Infektionszyklus wird jedoch vor der reversen Transkription unterbrochen (Matthew Stremlau et al., 2006). Beim Menschen hingegen ist trotz der Expression eines *TRIM5 $\alpha$* -Proteins die HIV-1-Infektion von Zellen möglich. Der Grund dafür ist bekannt: HIV-1 hat einen Mechanismus entwickelt, die Restriktion durch humanes *TRIM5 $\alpha$*  zu umgehen. Die Restriktion einer HIV-1-Infektion durch *TRIM5 $\alpha$*  ist abhängig von einer Interaktion zwischen dem Protein und zellulärem Cyclophilin A (*CypA*). HIV-1 jedoch bindet mithilfe seines CA-Proteins das zelluläre *CypA* und

verhindert somit die für eine Restriktion notwendige Interaktion der zellulären Proteine (Kim et al., 2019; Towers et al., 2003).

Diverse Arbeiten aus der Literatur beschäftigen sich mit den TRIM-Proteinen unterschiedlicher Arten und ihrem Effekt in der Restriktion von HIV-1. Dabei konnte beobachtet werden, dass einige Altweltaffen-Arten ein TRIM-Protein besitzen, in der die SPRY-Domäne durch Cyclophilin-A im TRIM-Gen ersetzt ist, sog. TRIMCyp-Proteine (Wilson et al., 2008). Diese Fusion bietet vermutlich einen Selektionsvorteil, der sich aus der Rekrutierung von CypA durch das CA-Protein von HIV-1 ergibt: durch die Rekrutierung des TRIMCyp-Proteins statt des reinen Cyclophilin A wird die oben beschriebene Umgehung des Restriktionsmechanismus ausgehebelt und das Protein kann als Restriktionsfaktor der HIV-1-Infektion wirken. Für die vorliegende Arbeit wurden im Labor bereits vorhandene stabile CRFK-Zelllinien, die das TRIM5 $\alpha$ - bzw. das TRIMCyp-Protein unterschiedlicher Spezies exprimieren, miteinander verglichen im Hinblick auf die Beeinflussbarkeit des Uncoatings durch diesen zellulären Abwehrmechanismus. Die TRIM5 $\alpha$ -Zellen wurden dabei von Augustin Penda Twizerimana hergestellt; die RhTRIMCyp-Zellen von Rachel Constanze Scheck. CRFK-Zellen eignen sich für diese Untersuchungen besonders, da sie zum einen sehr gut technisch handzuhaben sind und zum anderen von Natur aus kein antiretroviral aktives TRIM5 $\alpha$  exprimieren, das den zu messenden Effekt durch das jeweilige Protein verzerren könnte.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transduktionssexperimente zeigten, dass die verglichenen Proteine unterschiedlicher Arten das Luciferasesignal auf verschiedene Weisen beeinflussen. So konnte beispielsweise im Falle des TRIMCyp-Proteins aus Rhesusaffen kein messbarer Einfluss auf das Luciferasesignal gezeigt werden. Dieses Erkenntnis deckt sich mit der Literatur: es ist vorbeschrieben, dass das TRIMCyp-Protein der Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) zwar eine Aktivität gegen HIV-2, SIV und FIV, jedoch keine Wirksamkeit gegen HIV-1 zu haben scheint; das TRIMCyp-Protein der Nachtaffen (*Aotus*) hingegen besitzt diese (Nisole, Lynch, Stoye, & Yap, 2004; Wilson et al., 2008). Der direkte Vergleich der beiden Proteine im Uncoating Assay wäre ein interessanter Ansatzpunkt für Folgeuntersuchungen. Eventuell könnten Untersuchungen zur Proteinstruktur weitere Erkenntnisse für die genaue Interaktion der Proteine mit HIV-1 bzw. dessen Capsid liefern. Hieraus könnten womöglich Gründe für die Wirksamkeit bzw. Unwirksamkeit der Restriktion gegen die jeweiligen Viren abgeleitet werden.

Weiterhin zeigte sich in den erhobenen Daten eine deutliche Steigerung des gemessenen Luciferaseignals durch das TRIM5 $\alpha$ -Protein aus westlichen Grünmeerkatzen (*Chlorocebus sabaues*, engl. *African Green Monkey*, AGM). Die Aktivität des TRIM5 $\alpha$ -Proteins dieser Spezies gegen HIV-1 konnten Yap und Kollegen bereits 2004 in einem Infektions-Assay zeigen (Yap, Nisole, Lynch, & Stoye, 2004). Mit dem Wissen um den genauen Mechanismus der Inhibition durch TRIM-Proteine

lassen sich die im Kontext der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten sehr gut einordnen. Die hier gemessene Steigerung der Luciferaseaktivität durch das Protein der westlichen Grünmeerkatzen stellt vermutlich die Grundlage der durch Yap und Kollegen gemessenen Restriktion der Infektion dar: durch eine Destabilisierung des HIV-1-Capsids kommt es zum vorzeitigen Uncoating und, im hier durchgeführten Assay, konsekutiv zu einem erhöhten Luciferasesignal durch Steigerung der Translation der dabei freiwerdenden Reporter-mRNA.

In der Veröffentlichung von *Da Silva Santos et al.*, deren Uncoating-Assay die Grundlage für diese Arbeit bildete, maßen die Autoren gegenüber wildtypischen CRFK-Zellen eine etwa 1,5-fache Erhöhung des Luciferasesignals durch Verwendung von TRIMCyp-Proteinen aus Nachtaffen der Spezies *Aotus* (engl. *Owl Monkeys OM*) (Da Silva Santos et al., 2016). Die hier durchgeführten Transduktionen von Zellen, die OM-TRIMCyp exprimierten, ergab eine Steigerung des Signals auf lediglich etwa 115% des Referenzwertes. Eine Erklärung für diese Diskrepanz der Ergebnisse findet sich möglicherweise in der Methodik des hier verwendeten Assays: im Gegensatz zu den Messungen von Da Silva Santos und Kollegen wurde hier bereits acht Stunden nach der Transduktion die Luciferaseaktivität gemessen und nicht erst nach drei Tagen. Darüber hinaus könnte das Ergebnis dadurch beeinflusst worden sein, dass hier sechs Stunden nach der Transduktion das virushaltige Medium entfernt und durch virusfreies ersetzt wurde. Da die Bindung von TRIM-Proteinen an das Capsid eine vermehrte Ubiquitinierung dieser capsidgebundenen TRIM-Moleküle bewirkt, könnte dies zu einer Degradierung des Capsids und seines Inhaltes geführt haben (Nakayama & Shioda, 2015). Konsekutiv könnte es zu einem verstärkten Abbau der Reporter-mRNA und folglich zu einer geringeren Expression der NanoLuciferase in der Zielzelle gekommen sein. Die Wiederholung der Messungen mit einer Lyse der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im Sinne der Erstellung einer Kinetik des Signals könnte hier einen Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen darstellen. Außerdem könnte, ähnlich wie im Falle der Gruppe um Da Silva Santos, eine Messung des Luciferasesignals erst nach drei Tagen durchgeführt und die Ergebnisse verglichen werden.

Die im Rahmen der hier durchgeführten Experimente gemessene Luciferasesignalerhöhung durch das humane TRIM5 $\alpha$ -Protein ging einher mit einer deutlich erhöhten Standardabweichung, der gemessene Unterschied zur Kontroll-Transduktion (ohne Einfluss eines TRIM-Proteins) war dabei auch nicht signifikant. In der Literatur konnte mehrfach gezeigt werden, dass das humane TRIM5 $\alpha$  aus den oben genannten Gründen keinen so deutlichen Effekt im Sinne einer Restriktion von HIV-1 besitzt (Nakayama & Shioda, 2010; Matthew Stremlau et al., 2006). Die hier gemessenen Ergebnisse besitzen eine hohe Standardabweichung, die wahrscheinlich durch eine Wiederholung der Messungen reduziert werden könnte; dabei würde sich die Signifikanz des Ergebnisses erhöhen.

Bei der Durchführung der hier beschriebenen Experimente wurde die Transduktion durch Zugabe aufkonzentrierter HIV-1-Luciferase-Reporterviren in gleicher Menge aus dem gleichen Behältnis durchgeführt. Da die Reporterviruspartikel zuvor mit Medium verdünnt und durch vorsichtiges Pipettieren gemischt worden waren, sowie durch die Durchführung der Messung in Triplets, ist von einer homogenen Verteilung auszugehen. Zur genaueren Verifizierung der Ergebnisse müsste mittels RT-Assay die Aktivität der reversen Transkriptase in den jeweiligen Wells gemessen werden, um belegen zu können, dass tatsächlich dieselbe Menge an Vektorpartikeln in jedem der Test-Wells vorlag.

Auch hier zeigt der verwendete Luciferase-Assay vor allem einen quantitativen Effekt der TRIM-Proteine, die Darstellung des genauen Inhibitionsmechanismus gelingt mit diesem Verfahren jedoch nicht. Die Angaben aus der Literatur könnten hier ggf. mit elektronenmikroskopischen Verfahren verifiziert werden. Ebenso könnte die experimentelle Kombination verschiedener Mechanismen der Capsid-Destabilisierung, beispielsweise die simultane Verwendung von Pharmaka wie PF-74 oder GS-Ca1 (vgl. unten) auf TRIM(Cyp)-exprimierenden Zellen Erkenntnisse darüber liefern, ob sich die Effekte addieren lassen.

Die mögliche therapeutische Relevanz der TRIM-Proteine als zelluläre Restriktionsfaktoren ist, verglichen mit pharmakologischen Einflussfaktoren des Uncoatings, relativ gering. Da die simianen Varianten von *TRIM5α* im Gegensatz zum humanen Protein aktiv gegen HIV-1 sind, böte sich hier jedoch gegebenenfalls ein Ansatzpunkt für eine mögliche Gentherapie einer HIV-1-Infektion. Ähnlich wie beim „Berlin Patient“, der durch eine Stammzelltransplantation mit Zellen, die eine Mutation des CCR5-Rezeptors trugen, von seiner (CCR5-tropen) HIV-1-Infektion geheilt werden konnte (Hütter et al., 2009), könnte die Modifikation des humanen TRIM5α in HIV-positiven Patienten eine Chance auf „endogene“ Therapie oder gar Heilung bieten. Da jedoch eine HIV-Infektion heutzutage sehr gut medikamentös behandelbar ist, müssen zurzeit solche Überlegungen nach einer Kosten-Nutzen-Analyse aufgrund der hohen Risiken einer Stammzelltherapie bzw. aufgrund der fehlenden Erfahrungen mit Gentherapie noch verworfen werden. Da jedoch zu erwarten ist, dass die Gentherapie in Zukunft auch für andere Erkrankungen weiter etabliert werden wird, könnte diese Strategie auch im Hinblick auf die HIV-Therapie schon in wenigen Jahren durchaus eine Alternative zur pharmakologischen Therapie darstellen.

### **3.5 PF-3450074 destabilisiert das Capsid von HIV-1 und führt so zu vorzeitigem Uncoating**

PF-74 ist ein mittlerweile gut erforschter Capsid-Inhibitor. Seine Wirksamkeit gegen verschiedene HIV-1-Stämme wird, bezogen auf die Infektion, mit einer medianen  $EC_{50}$  von  $0,207 \mu\text{M}$  beschrieben (Blair et al., 2010). Das Besondere an PF-74 ist, dass seine Wirkung auf das Capsid von HIV-1 dosisabhängig ist. So konnten Saito und Kollegen zeigen, dass die Dosis-Wirkungs-Kurve von PF-74 triphasisch zu sein scheint, einen besonders starken inhibitorischen Effekt auf HIV-1 konnten sie bei Verwendung von PF-74-Konzentrationen  $>7 \mu\text{M}$  feststellen (Saito et al., 2016).

In den hier durchgeführten Messungen führte die Verwendung von PF-74 zu einer Erhöhung der Luciferaseaktivität sowohl in CRFK-Zellen als auch in HeLa-Zellen. In beiden Zelllinien ließ sich, abhängig von der verwendeten Inhibitorkonzentration, eine Erhöhung der Luciferaseaktivität auf etwa das 1,5-fache des Bezugswertes feststellen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass hier die Destabilisierung des Capsid-Proteins durch PF-74 messbar wird. Durch die Capsid-Destabilisierung wird die im Core enthaltene Luciferase-RNA dem zellulären Translationsapparat früher zugänglich gemacht. Somit wird mehr Luciferase produziert als in der Vergleichsmessung ohne PF-74, die Luciferaseaktivität steigt.

Auffällig ist, dass in keiner Messung die Luciferaseaktivität auf mehr als ca. 160% des Referenzwertes steigt. Hierfür sind mehrere Ursachen denkbar: es könnte sein, dass dort eine Art natürliches Maximum liegt, der Effekt also gesättigt ist und eine weitere Steigerung nicht möglich ist. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz wäre, dass die hier gemessenen Transduktionen nicht zeitlich simultan ablaufen und somit eine Art „Vermengung der Signale“ abgebildet wird. Diesen Effekt könnte man in Folgeuntersuchungen ausschließen oder nachweisen, indem man nach Zugabe der Viruspartikel die Zellen zunächst für eine Stunde bei  $10^\circ\text{C}$  inkubiert, um die Viruspartikel an die Zelloberfläche binden zu lassen. Anschließend müsste man die Temperatur für eine Stunde auf  $37^\circ\text{C}$  erhöhen, um eine simultane Infektion der Zellen zu ermöglichen und danach die überschüssigen Viruspartikel durch Waschen der Zellen entfernen.

Der Mittelwert der Luciferaseaktivität zeigt auch in den hier erhobenen Daten eine sprunghafte Steigerung durch Erhöhung der PF-74-Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  auf  $5 \mu\text{M}$ . Dies bestätigt die in der Literatur vorbeschriebene Dosisabhängigkeit des Wirkmechanismus (Blair et al., 2010; Peng et al., 2014; Price et al., 2014). Kommt es bei der Verwendung von  $1 \mu\text{M}$  noch eher weniger zur Capsid-Destabilisierung, so zeigt sie sich bei  $5 \mu\text{M}$  ganz deutlich durch Zunahme der Luciferaseaktivität. Der zugrundeliegende Mechanismus ist auch hier als Freilegung der Luciferase-mRNA aus den viralen Capsiden und konsekutive Translation selbiger zu NanoLuciferase anzunehmen. Auch Saito und

Kollegen beschreiben in ihrer Arbeit eine starke Zunahme der Inhibition von HIV-1 durch PF-74 ab einer Konzentration  $>5 \mu\text{M}$  mit einer deutlichen Steigerung in einer Konzentration  $>7,5 \mu\text{M}$  (Saito et al., 2016).

Da Silva Santos und Kollegen konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass bei der Infektion einer Zelle mindestens zwei verschiedene Zustände des viralen Capsids existieren. Neben denjenigen Cores, die nach dem Entry ihre Struktur auflockern und ihren Inhalt dem zellulären Translationsapparat zugänglich machen, gibt es auch einen weiteren möglichen Zustand der viralen Cores: die Struktur der Capsid-Polymere kann so dicht gepackt sein, dass es unter Normalbedingungen nicht sofort zum Uncoating käme. Durch die Bindung von PF-74 an das Capsidprotein jedoch werden auch diese Cores destabilisiert und geöffnet (Da Silva Santos et al., 2016). Auch dies ist eine mögliche Erklärung für die Signalerhöhung durch Zugabe von PF-74. Die fehlende Möglichkeit zur Quantifizierung der unterschiedlichen Zustände der viralen Cores ist eine der Schwächen des hier verwendeten Assays; vertiefende Forschung bzw. Methoden wie die Elektronenmikroskopie der transduzierten Zellen könnte hier weitere Erkenntnisse zu Tage bringen.

Wie oben erläutert, deuten neuere Daten zunehmend darauf hin, dass das Uncoating der HIV-1-Capside wahrscheinlich erst im Zellkern stattfindet und dass der Transport der Capside über Kernporen der Zellkernmembran wahrscheinlich durch eine Interaktion zwischen CA und Nucleoporin 153 (Nup153, einem Bestandteil der Kernporen) ermöglicht wird (vgl. Abschnitt „3.1 Zeitliche und örtliche Organisation des Uncoatings“, oben). Price und Kollegen beschreiben, dass die Affinität von Nup153 zu CA-Hexameren deutlich höher ist als die Affinität zu Monomeren des Capsidproteins (Price et al., 2014). Da der Wirkmechanismus von Capsiddestabilisatoren wie PF-74 auf der Zerstörung der hüllenbildenden CA-Polymere beruht, könnte deren Anwendung auch den Eintritt der Präintegrationskomplexe in den Zellkern beeinträchtigen, da die Bindungsaffinität herabgesetzt wird. Diese Hypothese lässt sich untermauern durch neuere Ergebnisse aus der Literatur: Balasubramaniam und Kollegen stellten fest, dass durch die Zugabe von PF-74 der Kerneintritt von HIV-1 signifikant reduziert wird, darüber hinaus konnte durch den Einfluss der Substanz auf die PIC eine Hemmung der Integration gezeigt werden. Diese Effekte ließen sich durch die Zugabe von Raltegravir als Integrase-Inhibitor weiter verstärken (Balasubramaniam et al., 2019). In der Zusammenschau dieser Ergebnisse stellt sich weiterhin die Frage, wie sich das Infektionsgeschehen durch die Kombination der vorgenannten Mechanismen mit einem Defekt der Integrase (z.B. D64V-Mutation) beeinflussen ließe. Auch der Vergleich des beschriebenen Effektes von Raltegravir mit dem Effekt anderer pharmakologischer Inhibitoren der Integrase könnte einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen darstellen. Hierzu muss allerdings betont werden, dass der für die vorliegende Arbeit genutzte Assay die Untersuchung solcher Mechanismen

nicht im Detail erlaubt. Für den Nachweis der Menge integrierter viraler DNA beispielsweise böte sich eine quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) als Verfahren an; der Nachweis der Lokalisation viraler PICs wäre beispielsweise durch Fluoreszenzmarkierung des CA-Proteins und Mikroskopie der transduzierten Zellen möglich.

Neben der Kombination von PF-74 mit Integrase-defizienten Viruspartikeln könnte man weiterhin Messungen durchführen, bei denen man die verschiedenen Capsid-Destabilisatoren kombiniert, also eine Transduktion unter dem Einfluss von PF-74, GS-CA1 (vgl. Kapitel 3.6) und/oder Cyclosporin A (vgl. Kapitel 3.7). Hier könnte man untersuchen, ob sich die Capsid-destabilisierende Wirkung der verschiedenen Substanzen addiert. Da auch die oben beschriebenen TRIM5 $\alpha$ -Proteine eine Destabilisierung des Capsids bewirken, könnte man auch diese experimentell mit den vorgenannten Substanzen kombinieren, um mögliche Synergieeffekte darstellen zu können.

Die vorliegenden Hinweise auf einen Synergieeffekt zwischen Capsiddestabilisierung und Integrasehemmung stellen möglicherweise einen Ansatzpunkt für potente neue Therapieregime der HIV-1-Infektion beim Menschen dar. Sollten in Zukunft Capsiddestabilisatoren zur klinischen Anwendung zugelassen werden, könnte also die Kombination eines solchen Präparates mit einem Integraseinhibitor (und gegebenenfalls einer weiteren Substanzklasse) in Frage kommen. Denkbar wäre hier der Nutzen sowohl als Erstlinientherapie wie auch als Reservetherapie für Patienten, bei denen aufgrund von Mutationen oder Unverträglichkeiten andere Substanzklassen nicht in Frage kommen.

### **3.6 GS-CA1 destabilisiert hochpotent das Capsid von HIV-1 und führt so zu vorzeitigem Uncoating**

Neben dem gut erforschten Capsid-Destabilisator PF-3450074 wurden weitere Substanzen entwickelt, die einen ähnlichen Effekt auf das virale Capsid haben. Eine dieser neuen Substanzen heißt GS-CA1, sie stellt einen sehr potenten Inhibitor der HIV-1-Infektion dar. Die Bindungsstelle der Substanz scheint eine hoch konservierte Region des HIV-1-Capsidproteins zu sein, was GS-CA1 zu einem sehr interessanten möglichen Kandidaten für zukünftige HIV-Therapieregime macht (McArthur et al., 2019; Singh et al., 2019). Ähnliche Substanzen wurden bereits in klinischen Studien erprobt und zeigten eine sehr hohe Potenz auch *in vivo*, selbst bei Resistenzen gegen etablierte Therapieregime (Link et al., 2020).

In den hier durchgeführten Messungen zeigt sich die Potenz von GS-CA1 insofern, als dass bereits sehr geringe Konzentrationen der Substanz zu einer starken Erhöhung des Luciferasesignals führten. Dies deckt sich mit der Literatur, die für die Hemmung der Infektiosität eine EC<sub>50</sub> von 140-

240 pM in mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (engl. *PBMC*) bzw. in T-Zellen beschreibt. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass GS-CA1 neben den Strukturähnlichkeiten zu PF-74 weitere funktionelle Gruppen besitzt, die starke Interaktionen mit einigen Aminosäuren der N-terminalen Domäne des CA-Moleküls eingehen können und dadurch mutmaßlich eine höhere Bindungsaffinität erzeugen (McArthur et al., 2019; Singh et al., 2019). Es scheint hier also nicht wie bei PF-74 eine Dosisabhängigkeit des Effektes zu geben; die starke Signalerhöhung bereits durch geringe Konzentrationen des Inhibitors lassen hier bereits Rückschlüsse auf eine messbare Capsid-Destabilisierung zu. Mit den Gegebenheiten des verwendeten Luciferase-Assays ist es nicht möglich, die genaue Morphologie der Capside zu untersuchen bzw. eine Quantifizierung möglicherweise unterschiedlicher Capsidzustände vorzunehmen. Aus einer Erfassung dieser zusätzlichen Informationen könnten sich Erkenntnisse ergeben, ob GS-CA1 neben einer stärkeren Bindungsaffinität auch andere Auswirkungen auf die Capsidmorphologie hat als PF-74. Zusätzlich erschwert werden Aussagen über die genaue molekulare Wirkweise dadurch, dass die genaue Struktur der Substanz bis heute nicht öffentlich zugänglich ist.

Die Stärke des Effektes von GS-CA1 war in den durchgeführten Messungen im Konzentrationsbereich von 0,05 µM bis 1 µM kaum steigerbar, sodass hier das Maximum eines therapeutischen Effektes für das Uncoating der viralen Vektoren in CRFK-Zellen beinahe ausgeschöpft zu sein scheint. Die aus der Literatur bekannten Angaben hinsichtlich der Kinetik des Wirkstoffes beziehen sich auf Untersuchungen zur Infektiosität, nicht jedoch auf das Uncoating, das in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Hier könnte man zusätzliche Untersuchungen anschließen, um eine Kinetik in Bezug auf das Uncoating zu bestimmen. Eine Ausweitung der Versuche auf verschiedene humane Zelllinien könnte Hinweise auf geeignete Wirkstoffspiegel für eine mögliche pharmakologische Anwendung der Substanz liefern. Aufwändigere Untersuchungen wären nötig, um herauszufinden, ob es, ähnlich wie bei PF-74, zu einer konzentrationsabhängigen Änderung des Wirkmechanismus kommt. Die im Luciferase-Assay als bloße Quantifizierung eines Effektes erhobenen Daten sprechen bisher nicht dafür, sind jedoch nicht aussagekräftig genug für eine verlässliche Beurteilung; hierfür fehlt es an einem Messinstrument zur Qualifizierung des Effektes (Reaktionsmechanismen o.Ä.). Untersuchungen aus dem Bereich der Molekularbiologie könnten helfen, diese Unklarheiten zu beseitigen.

Für PF-74 konnten, wie oben beschrieben, Synergieeffekte mit Integraseinhibitoren gezeigt werden. Da Bindungsstelle und Struktur von GS-CA1 und PF-74 ähnlich sind, ist anzunehmen, dass der Wirkmechanismus der Substanzen sich ebenfalls ähneln wird. Daher besteht Grund zur Annahme, dass auch für GS-CA1 synergistische Effekte bei der Kombination mit einem IN-Inhibitor zu erwarten sind. Weitere Untersuchungen könnten sich der oben genannten Methoden (qPCR,

Fluoreszenzmikroskopie) bedienen, um einen solchen Effekt *in vitro* nachzuweisen. Im Falle einer klinischen Zulassung der Capsiddestabilisatoren für die Behandlung der HIV-1-Therapie ergäben sich, wie bereits oben ausgeführt, hieraus vielversprechende Ansätze für effektive Kombinationstherapien. Durch die Nutzung hochpotenter Substanzen wie GS-CA1 könnte eventuell die Belastung des Organismus durch unerwünschte Arzneimittelwirkungen minimiert werden, da bereits geringe Dosen den gewünschten Effekt auf den Replikationszyklus der Viren ausüben könnten. Bevor hierzu allerdings verlässliche Angaben gemacht werden können, müsste selbstverständlich zunächst die *in vivo* notwendige  $EC_{50}$  bestimmt werden.

### **3.7 Hemmung der Capsid-Cyclophilin A-Interaktion durch CsA erhöht die zelluläre Immunabwehr durch Restriktionsfaktoren**

Die Peptidyl-Prolyl-Isomerase Cyclophilin A (im Folgenden kurz: *CypA*) interagiert auf verschiedene Weisen mit dem viralen Capsid-Protein (CA). In der Literatur konnte gezeigt werden, dass Cyclophilin A an bestimmte, Prolin-reiche Regionen der CA-Schleife des Gag-Polypeptids binden kann. Somit interagiert es bereits während der Zusammensetzung viraler Partikel in der Zelle mit dem Virus. Weitere Untersuchungen konnten jedoch darlegen, dass der immunologisch bedeutsame Teil der Capsid-CypA-Interaktion erst in der Zielzelle zum Tragen kommt: durch Bindung von CypA schützt sich das Virus nach dem Entry in die Zielzelle vor einer Erkennung und Bekämpfung durch zelluläre Restriktionsfaktoren wie *TRIM5 $\alpha$*  (Kim et al., 2019). Die reverse Transkription der viralen RNA kann so effizienter ablaufen, die Infektiosität erhöht sich (Sokolskaja, Sayah, & Luban, 2004; Towers et al., 2003). Mögliche molekulare Mechanismen des CypA-vermittelten Schutzes vor zellulären Restriktionsfaktoren sind zum Beispiel die sterische Behinderung der Restriktionsfaktorbindung, aber auch Konformationsänderungen am Capsid-Protein durch die Isomerase-Aktivität von Cyclophilin A wären denkbar (Kim et al., 2019). HIV-1 hat hiermit also im Laufe seiner Evolution durch Selektion einen Mechanismus entwickelt, um wirtsspezifische Proteine durch „Zweckentfremdung“ für sich zu nutzen, in dem zelluläre Abwehrmechanismen überwunden werden. Der klare Selektionsvorteil dadurch erklärt die Verbreitung des Virus unter Menschen.

Auch die hier erhobenen Daten lassen entsprechende Rückschlüsse zu. Cyclosporin A (CsA), ein pharmakologischer Inhibitor von Cyclophilin A, bindet die CypA-Moleküle und verhindert ihre Interaktion mit dem viralen Capsid. Letzteres wird dadurch zugänglicher für zelluläre Restriktionsfaktoren. Solche Faktoren, wie z.B. *TRIM5 $\alpha$* , binden an das Capsidprotein und destabilisieren selbiges. So kommt es neben der Hemmung der effektiven reversen Transkription

im verwendeten Assay zu einer Akkumulation von NanoLuciferase-mRNA, die im Folgenden translatiert wird und deren Aktivität in der Zelle luminometrisch messbar wird.

Aus den Erkenntnissen über die Interaktion zwischen CypA und dem viralen Capsid-Protein lässt sich ableiten, dass durch Störung dieser Interaktion eine Reduktion der Infektiosität erreicht werden kann. Dieser „Therapieansatz“ beruht hierbei nicht auf einer Hemmung viraler Enzyme durch Inhibitoren (wie es der aktuelle Therapiestandard ist), sondern aktiviert lange konservierte zelleigene Abwehrmechanismen. Der hierdurch ausgeübte Selektionsdruck auf das Virus geht in eine andere Richtung als der durch die etablierten Substanzen ausgeübte Druck. Es wäre daher ggf. eine sinnvolle Kombination, die etablierten Therapien in diese Richtung zu ergänzen, um die Resistenzentwicklung zu verlangsamen bzw. ihr entgegenzuwirken. Hierfür wären jedoch weitere Untersuchungen und Entwicklungen nötig, denn Cyclosporin A wirkt durch die Bindung von Calcineurin und die dadurch supprimierte T-Zell-Aktivierung immunsuppressiv. Es kommt daher als Therapeutikum einer HIV-Infektion auf keinen Fall in Frage. Die Literatur kennt jedoch Derivate der Substanz, die die CA-CypA-Interaktion bekämpfen, jedoch nicht immunsuppressiv wirken (Prell, Kahlert, Rücknagel, Malešević, & Fischer, 2013). Die Forschung zur klinischen Anwendung der HIV-Inhibition auf dem beschriebenen Wege sollte sich demnach auf diese Substanzen konzentrieren. Die Wiederholung der Messungen mit dem hier beschriebenen Assay unter Verwendung dieser nicht-immunsuppressiven, Cyclophilin-bindenden CsA-Derivate könnte erste Anhaltspunkte liefern, ob die Hypothese der HIV-1-Restriktion durch diese Substanzen haltbar ist.

Neben der Durchführung der Transduktionen mit CRFK- und HeLa-Wildtypzellen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Experimente mit HeLa-Zellen durchgeführt, die kein Cyclophilin A exprimieren (HeLa-CypA-Knockout-Zellen). Interessanterweise konnte auch in diesen Zellen eine Erhöhung der NanoLuciferase-Aktivität mit steigender Dosis an Cyclosporin A (CsA) gemessen werden. Diese Erhöhung fiel etwas geringer aus als in den Messungen auf CypA-exprimierenden Zellen. Eigentlich wäre hier jedoch zu erwarten gewesen, dass durch das Fehlen der Zielstruktur von CsA kein Effekt durch die Substanz erreicht werden könnte. Zur Erklärung dieser Ergebnisse wäre zum Beispiel denkbar, dass es ein anderes CsA-sensitives Protein in den Zellen gibt, bzw. dass die Substanz ihre Wirkung über einen anderen Weg entfaltet als über eine Interaktion mit Cyclophilin A. Solche Effekte sind auch für andere Viren beschrieben worden, beispielsweise für Influenza A. Hier wird vermutet, dass CsA einen direkten Effekt auf virale Enzyme ausübt (Liu et al., 2012). Sollte eine Wiederholung der Experimente mit CypA-Knockout- und unveränderten Zellen den bisher gemessenen Effekt bestätigen, könnte im Anschluss eine Untersuchung der Infektion bzw. der Integration der viralen DNA in diesen Zellen erfolgen. Um den genauen Wirkmechanismus der CypA-unabhängigen HIV-1-Restriktion durch CsA zu klären, bedarf es dann im Anschluss

weiterer molekularbiologischer oder biochemischer Untersuchungen. Zu klären wäre beispielsweise, ob CsA einen direkten Einfluss auf virale Enzyme, wie beispielsweise die Integrase, die Protease oder reverse Transkriptase ausüben kann und darüber eine Inhibition erreicht.

Da eine immunsuppressive Medikation *in vivo* wie oben beschrieben mit schweren Nebenwirkungen einhergeht und gerade Cyclosporin A ein sehr großes Potential für Interaktionen mit anderen Medikamenten bietet, käme eine therapeutische Nutzung in der Therapie einer HIV-1-Infektion eher nicht in Frage. Es gibt jedoch in der Transplantationsmedizin und Rheumatologie viele Ansätze, besser verträgliche Substanzen zu entwickeln, die auf zellulärer Ebene ähnliche Effekte ausüben wie CsA. Hier wäre zu prüfen, ob auch diese Substanzen eine antivirale Aktivität besitzen und falls dies der Fall sein sollte, welche  $EC_{50}$  im Plasma hier zu erreichen ist. Die unerwünschten Wirkungen einer solchen Therapie könnten sich gegebenenfalls begrenzen lassen, sollte für die antiretrovirale Wirkung der jeweiligen Substanz eine geringere  $EC_{50}$  nötig sein als für die Verhinderung einer Abstoßungsreaktion im Kontext einer Organtransplantation. In einer kleinen klinischen Studie konnte beispielsweise beobachtet werden, dass unter vielen getesteten Substanzen in der immunsuppressiven Therapie HIV-1-Infizierter nach einer Organtransplantation die Substanz Sirolimus als einzige nicht zu einem Anstieg der HIV-1-RNA-Konzentration im Blut führte, woraus die Autoren Hinweise für eine mögliche antiretrovirale Aktivität des Medikamentes ableiten. Sicherlich ist die Fallzahl hier viel zu gering für valide Aussagen, dennoch bietet das Feld offenbar noch Raum für weitere Forschung (Stock et al., 2014).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier *in vitro* beobachteten Effekte aktuell noch keine hohe Relevanz für die klinische Anwendung haben dürften, zumal sie zunächst noch in weiteren Studien validiert werden müssen. Nichtsdestotrotz geben die Ergebnisse in Zusammenschau mit den bisher in der Literatur publizierten Daten Hinweise darauf, dass die weitere Beforschung dieses Feldes eine neue Richtung der HIV-1-Therapie darstellen könnte. Gegebenenfalls könnten sich hieraus auch Erkenntnisse für die Transplantationsmedizin ableiten und das Outcome von HIV-Patienten, die eine Organtransplantation mit konsekutiver immunsuppressiver Therapie benötigen, verbessert werden. Durch die immer bessere Prognose einer gut therapierten HIV-1-Infektion sowie den Fortschritten auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin dürfte sich die Zahl der davon Betroffenen in Zukunft weiter erhöhen.

### 3.8 Integrase-Inhibitoren hemmen die frühen Schritte der HIV-1-Infektion

Wie bereits beschrieben, besitzt die virale Integrase vielseitige Einflüsse auf die frühen Schritte der HIV-Infektion. Hier stellte sich die Frage, ob sich eine Beeinflussung des Uncoatings nur durch direkte Manipulation des Enzyms als solches erreichen lässt, oder ob auch eine pharmakologische Hemmung der Integrase Veränderungen des Luciferasesignals nach sich zieht. Diese böte im Gegensatz zu der untersuchten Mutation des Enzyms Ansätze für die klinische Anwendung bzw. wird bereits in der Therapie der HIV-1-Infektion eingesetzt.

In der medikamentösen Therapie der HIV-Infektion des Menschen finden bisher die Integrase-Inhibitoren Raltegravir (*RAL*) und Dolutegravir (*DTG*) Anwendung. Beide Wirkstoffe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf mögliche Effekte auf das Uncoating untersucht. Es konnte in beiden Fällen eine ähnliche Tendenz beobachtet werden wie bei der Transduktion der Zellen mit Vektorpartikeln, die eine dysfunktionale Integrase besaßen (D64V-Mutation, s. oben). Die Stärke des Effektes durch die pharmakologische Integrasehemmung blieb jedoch in beiden Fällen deutlich hinter der Effektstärke der künstlich induzierten Enzymdysfunktion zurück.

Wie alle bisher am Markt verfügbaren Integrasehemmer entstammen auch *RAL* und *DTG* der Gruppe der Integrase-Strangtransfer-Inhibitoren (INSTI), hemmen also primär den Schritt des Transfers der viralen DNA in das Wirtsgenom. Ihre Hauptfunktion kommt folglich in der bisherigen Betrachtungsweise beim Uncoating zunächst nicht zum Tragen, da der hier verwendete Assay die frühen Schritte des Infektionszyklus misst und die Integration demnach nicht abbilden kann. Auch entsprechende Literatur zu möglichen Zusammenhängen findet sich nicht.

Der molekulare Wirkmechanismus von *DTG* und *RAL* beruht auf der Komplexierung divalenter Magnesium-Ionen, die als Kofaktor sowohl für die Bindung der Integrase an die virale DNA als auch für den Strangtransfer an sich benötigt werden. Diese Bindung geschieht im aktiven Zentrum des Enzyms und ist für die Aktivität der sog. *Central Core Domain* (CCD) nötig – jenem Teil des Enzyms, in dem auch die Punktmutation D64V liegt (Fan et al., 2011; Qamar Saeed et al., 2014). Es wäre also durchaus denkbar, dass der gemessene Effekt aufgrund der Komplexierung des Magnesiums durch *DTG* bzw. *RAL* und der daraus folgenden Hemmung der Funktion der Central Core Domain als aktivem Zentrum des Enzyms entsteht. Über welchen Mechanismus genau sich die Wirkung der Inhibitoren auf das Uncoating als solches auswirkt, ist jedoch aus den erhobenen Daten nicht ersichtlich und mit dem verwendeten Verfahren nicht festzustellen. Hier bedarf es weiterer pharmakologisch-biochemischer Untersuchungen.

Wie bereits oben geschildert, könnte eine therapeutische Relevanz der medikamentösen Integrasehemmung in Zusammenhang mit dem Uncoating von HIV-1 vor allem durch die

messbaren Synergieeffekte zwischen Integraseinhibitoren und Capsiddestabilisatoren entstehen. Wie oben beschrieben gibt es Hinweise, dass durch die Capsiddestabilisation der Kerneintritt von HIV-1 behindert wird, die Infekte ließen sich experimentell durch Zugabe von Integraseinhibitoren verstärken (Balasubramaniam et al., 2019). Folgeuntersuchungen könnten beispielsweise den hier genutzten Assay verwenden, um die in der Arbeit von Balasubramaniam und Kollegen geschilderten Experimente, die sich auf die Messung der tatsächlichen Integration des Viruserbguts in die Wirts-DNA konzentrierten, zu reproduzieren und festzustellen, ob sich auch im Uncoating-Assay Synergieeffekte zeigen (vgl. Kapitel über PF-74). Neben der Verwendung von Raltegravir, wie sie in der zitierten Arbeit erfolgte, könnte man auch andere medikamentöse Integraseinhibitoren verwenden, wie beispielsweise das hier genutzte Dolutegravir.

### 3.9 Zusammenfassung und Ausblick

Im Kontext dieser Arbeit wurde zunächst ein Uncoating-Assay aus der Literatur adaptiert und leicht verändert, um die Beeinflussbarkeit der frühen Schritte des Infektionszyklus von HIV-1 zu untersuchen. Wie viel Potential in der Erforschung des Uncoatings liegt und wie hoch das Interesse daran ist, zeigt vor allem die Entwicklung der Erkenntnisse aus der Forschungsliteratur im Verlaufe der Entstehung dieser Arbeit. War das Uncoating zu Beginn der experimentellen Arbeiten noch ein wenig verstandener Prozess, von dem man annahm, er fände direkt nach dem Viruseintritt in die Zelle statt, so verdichten sich mittlerweile die Hinweise auf ein kernmembrannahes, wenn nicht sogar im Zellkern selbst stattfindendes Uncoating.

Der hier genutzte Assay kann aufgrund seiner Struktur nicht dazu beitragen, den Ort des Uncoatings näher zu klassifizieren. Er ist jedoch geeignet, um mit verhältnismäßig geringem experimentellen Aufwand Erkenntnisse zu gewinnen über die Beeinflussbarkeit des Uncoatings durch virale, zelluläre oder pharmakologische Eingriffe ins Infektionsgeschehen. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse decken sich zum großen Teil mit den aus der Literatur bekannten Daten und liefern teilweise interessante Hinweise für Folgeuntersuchungen, um einzelne gewonnene Ergebnisse weiterführend zu untersuchen. Die meisten Ansätze sind bisher beschränkt auf die Nutzung *in vitro*, eine Nutzung *in vivo* wäre jedoch durch weiterführende Entwicklung in naher Zukunft denkbar und könnte eventuell sogar zur Nutzung in der Therapie der humanen HIV-1-Infektion nutzbar gemacht werden.

Durch die durchgeführten Experimente konnten verschiedene Einflussfaktoren des Uncoatings untersucht und bewertet werden. Es konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass die Integrase als virales Enzym einen Einfluss auf das Uncoating zu haben scheint, der in Folgeuntersuchungen weiter untersucht werden muss. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es starke Spezies-spezifische Unterschiede in der Effektivität antiretroviraler TRIM-Proteine zu geben scheint: die Proteine verschiedener Affenarten scheinen eine Capsid-destabilisierende Aktivität zu haben, die sich als Signalerhöhung im Luciferaseassay zeigt. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass HIV-1 mit der Bindung des zellulären Cyclophilin A durch sein Capsid-Protein eine Strategie entwickelt hat, der Restriktion durch das humane TRIM5 $\alpha$  zu entkommen. Dieser Effekt konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht signifikant reproduziert werden.

Neben den viralen und zellulären Einflussfaktoren des Uncoatings konnten diverse pharmakologische Faktoren evaluiert werden. Durch die Verwendung von Cyclosporin A konnte das zelluläre Cyclophilin A gebunden werden und somit der oben beschriebene Escape-Mechanismus von HIV-1 aufgehoben werden. Die Folge der Verwendung von CsA im Luciferaseassay war ein Anstieg der Luciferaseaktivität, was sich mit der erhöhten Vulnerabilität des Capsids für zelluläre

Restriktionsfaktoren erklären lässt. Die genauen molekularen Mechanismen müssen in weiteren Arbeiten beleuchtet werden. Darüber hinaus konnte durch Verwendung der Capsid-destabilisierenden kleinen Moleküle PF-74 und GS-Ca1 im Uncoating Assay gezeigt werden, dass diese Substanzen das Uncoating bereits in niedrigen Konzentrationen sehr potent beeinflussen konnten. Schließlich wurden mit Raltegravir und Dolutegravir auch bereits am Markt verfügbare antiretrovirale Wirkstoffe im Uncoating Assay auf ihre Wirkung hin untersucht. Hier konnte zwar ein Effekt gemessen werden, der jedoch in der Literatur bisher noch nicht vorbeschrieben ist. Weitere Experimente mit diesen Substanzen könnten dazu beitragen, die zugrundeliegenden Zusammenhänge zu ergründen.

Hervorzuheben als Perspektive für Folgeuntersuchungen ist hier nicht nur die vertiefende Betrachtung der einzelnen geschilderten Experimente für sich allein, sondern die zum Teil durch die Literatur angeregte vielversprechende Kombination der verschiedenen Einflüsse auf das Uncoating und die dadurch erreichte Synergiewirkung der Substanzen. Auch der bisherige Goldstandard zur Behandlung einer HIV-1-Infektion beim Menschen, die antiretrovirale Therapie (ART), besteht stets aus einer Kombination verschiedener Wirkstoffe (AWMF, 2014). Obwohl die Auswahl der zur Verfügung stehenden Wirkstoffe und Kombinationspräparate stetig wächst, treten weiter auch resistente Virusvarianten auf, die einzelne Substanzen unwirksam machen. Der Nutzen einer Erweiterung der bisher etablierten Therapieregime um neue Substanzklassen und -kombinationen ist also klar gegeben.

Der hier genutzte Assay könnte verwendet werden, um als eine Art *in vitro*-Screeningmethode verschiedene Wege zur Beeinflussung des Uncoatings von HIV-1 schnell und mit geringem Aufwand zu testen und Synergieeffekte weiter zu untersuchen. Die Anwendung des Protokolls auf weitere Zellarten, vor allem solche humanen Ursprungs, könnte zu einer Steigerung der Aussagekraft der Ergebnisse beitragen. Unter S3-Bedingungen könnte zudem der Vergleich zwischen Ergebnissen auf der Ebene des Uncoatings und der Infektion von replikationskompetentem HIV-1 gezogen werden, um so die gemessenen Effekte weiter zu untersuchen. Die unter Verwendung dieses Assays gewonnenen Erkenntnisse könnten anschließend als Ausgangspunkt für vertiefende Studien zu bestimmten Einflussfaktoren des frühen Replikationszyklus von HIV-1 genutzt werden. Diese Faktoren könnten dabei viraler, zellulärer oder pharmakologischer Natur sein.

## 4 MATERIAL

---

### 4.1 Elektronische Geräte

Folgende elektronische Geräte wurden im Rahmen dieses Projektes verwendet:

*Tabelle 4-1: Verwendete elektronische Geräte*

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CO2-Inkubator</b>	IBS (Fernwald, Deutschland)
<b>Durchflusszytometer</b>	Becton Dickinson (USA)
<b>Filmentwicklungsmaschine Curix 60</b>	AGFA (Belgien)
<b>Geldokumentationsgerät</b>	Peqlab (Darmstadt, Deutschland)
<b>Heizblock</b>	Bioblock Scientific (Frankreich)
<b>Inkubationsschüttler (Mikroplatten)</b>	VWR (Darmstadt, Deutschland)
<b>Inkubationsshaker KS 4000 I Control</b>	IKA (Staufen, Deutschland)
<b>Luminometer Centro XS<sup>3</sup> LB960</b>	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
<b>NanoDrop NP-1000</b>	Peqlab (Darmstadt, Deutschland)
<b>PCR-Thermocycler T3</b>	Biometra (Jena, Deutschland)
<b>PCR-Tube-Zentrifuge Galaxi MiniStar</b>	VWR (Darmstadt, Deutschland)
<b>Power Pac / Power Pac HC</b>	BioRad (Feldkirchen, Deutschland)
<b>Semidry-Transferzelle Transblot SD</b>	BioRad (Feldkirchen, Deutschland)
<b>Shaker Type 3006</b>	GFL (Lauda, Deutschland)
<b>Vortexer</b>	VWR (Darmstadt, Deutschland)
<b>Zentrifuge 4K15</b>	Sigma (USA)
<b>Zentrifuge Fresco 21</b>	Heraeus / Thermo Scientific (Hanau, Deutschland)
<b>Zentrifuge Pico 21</b>	Heraeus / Thermo Scientific (Hanau, Deutschland)

## 4.2 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden im Rahmen des Projektes verwendet. Die Lagerung und Anwendung der Substanzen erfolgte nach Herstellerangaben.

*Tabelle 4-2: Verwendete Chemikalien*

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Agar</b>	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
<b>Agarose</b>	Bio & Sell (Nürnberg, Deutschland)
<b>Ampicillin</b>	SigmaAldrich (USA)
<b>Casein Pepton</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<b>Ethanol</b>	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
<b>Ethidiumbromid</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Fötales Bovines Serum (FBS)</b>	Biochrom (Berlin, Deutschland)
<b>Glycerol</b>	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
<b>Hefeextrakt</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Isopropanol</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>L-Glutamin</b>	Biochrom (Berlin, Deutschland)
<b>Methanol</b>	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
<b>Milchpulver</b>	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
<b>Natriumchlorid</b>	MP Biomedicals
<b>Natriumhydroxid</b>	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
<b>Natriumlaurylsulfat (SDS)</b>	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
<b>Penicillin</b>	Biochrom (Berlin, Deutschland)
<b>Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)</b>	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
<b>Proteaseinhibitoren: Cocktail Set III</b>	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
<b>Streptomycin</b>	Biochrom (Berlin, Deutschland)
<b>Tetramethylethyldiamin (TEMED)</b>	MP Biomedicals (Eschwege, Deutschland)
<b>Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan</b>	Applichem (Darmstadt, Deutschland)

### 4.3 Puffer und Lösungen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

*Tabelle 4-3: Verwendete Puffer und Lösungen*

<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Blottingpuffer</b>	10 % Methanol 1x SDS
<b>DNA-Ladepuffer (6x)</b>	100 µL 6x Ladepuffer 150 µL Glycerol 1250 µL dest. Wasser
<b>RIPA-Puffer</b>	25 mM Tris 137 mM NaCl 0,1 % SDS 0,1 % Glycerol 0,5 % Natriumdesoxycholat 1,0 % NP-40 2 mM EDTA
<b>SDS (10x)</b>	250 mM Tris 1,9 M Glycin 1 % SDS
<b>TAE (20x)</b>	0,8 M Tris 0,8 M Essigsäure 20 mM EDTA pH 8,0
<b>TFB-1 (Transformationspuffer)</b>	30 mM Kaliumacetat (KAc) 100 mM RbCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub> 15 % Glycerol pH 5,8 (HAc)
<b>TFB-2 (Transformationspuffer)</b>	10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl <sub>2</sub> 15 % Glycerol pH 6,05 (KOH)
<b>TBST (10x, <i>Tris-buffered Tween Solution</i>)</b>	0,1 M Tris-HCl 1,5 M NaCl 0,5 % Tween-20
<b>Tris-HCl, pH 6,8</b>	1 M Tris-HCl pH 6,8
<b>Tris-HCl, pH 8,0</b>	1.5 M Tris-HCl pH 8,0

#### 4.4 Molekularbiologische Kits

Die folgenden Kits wurden im Rahmen dieses Projektes zu den jeweils angegebenen Zwecken genutzt. Dabei wurde stets nach Kit-Protokoll gearbeitet.

*Tabelle 4-4: Verwendete molekularbiologische Kits kommerzieller Hersteller*

<b>Kit</b>	<b>Zweck</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CloneJET PCR Cloning Kit</b>	Ligation von DNA in den pJET-Vektor	Thermo Scientific (USA)
<b>DNA T4 Ligation</b>	Ligation von DNA	Thermo Scientific (USA)
<b>Lipofectamine LTX</b>	Transfektion eukaryotischer Zellen	Life Technologies (USA)
<b>Nano-Glo Luciferase Assay System</b>	Reporterassay mit NanoLuciferase	PROMEGA (USA)
<b>NanoBiT PPI Starter System</b>	Reporterassay für Protein-Protein-Interaktion mittels Fragmenten der NanoLuciferase	PROMEGA (USA)
<b>Plasmid Miniprep Classic Kit</b>	Aufbereitung von Plasmid-DNA aus <i>E. Coli</i> -Bakterien	Zymo Research (USA)
<b>Pure Yield Plasmid MaxiPrep</b>	Aufbereitung von Plasmid-DNA aus <i>E. Coli</i> -Bakterien	PROMEGA (USA)
<b>QIAquick Gel Extraction Kit</b>	Extraktion von DNA aus Banden in Agarosegelen	Qiagen (Hilden, Deutschland)

#### 4.5 Längen- und Größenstandards

Zur Analyse von DNA in Agarosegelen diente der *Gene Ruler 1 kb Plus*-Längenstandard der Firma Thermo Scientific; für Proteine wurde der Protein-Größenstandard *PageRuler Prestained* desselben Herstellers verwendet.

#### 4.6 Enzyme

Für die Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation wurden die folgenden Restriktionsenzyme verwendet, das Dreieck markiert die Schnittstelle des Enzyms.

*Tabelle 4-5: Verwendete Restriktionsenzyme*

Enzym	Schnittstelle (5' → 3')	Hersteller
<b>BamHI</b>	G▼GATTC	Thermo Scientific (USA)
<b>Bgl II</b>	A▼GATCT	Thermo Scientific (USA)
<b>EcoRI</b>	G▼AATTC	Thermo Scientific (USA)
<b>HindIII</b>	A▼AGCTT	Thermo Scientific (USA)
<b>NotI</b>	GC▼GGCCGC	New England Biolabs (USA)
<b>XbaI</b>	T▼CTAGA	Thermo Scientific (USA)

Darüber hinaus wurden die folgenden weiteren Enzyme benutzt:

*Tabelle 4-6: Verwendete weitere Enzyme*

Enzym	Verwendung	Hersteller
<b><i>Pfu</i> Polymerase</b>	Amplifikation von DNA-Fragmenten im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion	Thermo Scientific (USA)
<b>T4 Ligase</b>	Ligation von DNA	Thermo Scientific (USA)

#### 4.7 Antikörper und Antiseren

Die folgenden primären Antikörper und Antiseren wurden im Rahmen dieser Dissertation verwendet:

*Tabelle 4-7: Verwendete primäre Antikörper/-seren*

<b>Antikörper/-serum</b>	<b>Hergestellt in</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ -FLAG (M2)	Mäusen	1:1000	1 Stunde (RT)	SigmaAldrich (USA)
$\alpha$ -Tubulin (B-5-1-2)	Mäusen	1:20000	Über Nacht (4 °C)	SigmaAldrich (USA)
HIV-1 <sub>NL4-3</sub> Vpr Antiserum (1-46)	Kaninchen	1:500	Über Nacht (4 °C)	Dr. Jeffrey Kopp <sup>1</sup>

<sup>1</sup>AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1<sub>NL4-3</sub> Vpr Antiserum (1-46)

Der folgende sekundäre Antikörper fand im Rahmen dieser Arbeit Verwendung:

*Tabelle 4-8: Verwendete sekundäre Antikörper*

<b>Antikörper</b>	<b>Hergestellt in</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Mouse-HRP	Schafen	1:10000	1 Stunde (RT)	GE Healthcare (USA)
Anti-Rabbit-IgG-HRP	Eseln	1:10000	1 Stunde (RT)	GE Healthcare (USA) (NA934-1ML)

#### 4.8 Oligonukleotide / Primer

Die folgenden Primer wurden bei der Firma Eurofins Genomics (Luxemburg, Luxemburg) in Auftrag gegeben und im Rahmen dieser Dissertation verwendet:

*Tabelle 4-9: Verwendete Oligonukleotide*

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
<b>NLuc fw</b>	AATGGAGCCAGTAGATCCGTCTTCACACTCGAAGATTTTCG	Primer für Amplifikation von NanoLuc
<b>NLuc-Vpr rev</b>	GTCTTCTGGGGCTTGTTCCGCCAGAATGCGTTCGCACA	Primer für Fusions-PCR
<b>Vpr-NLuc fw</b>	TGCGAACGCATTCTGGCGGAACAAGCCCCAGAAGACCAA	Primer für Fusions-PCR
<b>Vpr rev</b>	GGATCCCTAGGATCTACTGGCTCCATTTTC	Primer für Amplifikation von Vpr
<b>Vpr fw</b>	AAGCTTACCATGGAACAAGCCCCAGAAGAC	Primer für Amplifikation von Vpr
<b>Vpr-NLuc rev</b>	ATCTTCGAGTGTGAAGACGGATCTACTGGCTCCATTTTC	Primer für Fusions-PCR
<b>NLuc-Vpr fw</b>	GGAGCCAGTAGATCCTAGGTCTTCACACTCGAAGATTTTCG	Primer für Fusions-PCR
<b>NLuc rev</b>	GGATCCTTACGCCAGAATGCGTTCGCAC	Primer für Amplifikation von NanoLuc
<b>SmBIT fw</b>	AAGCTTACCATGGTGACCGGCTACCGGCTGT	Primer für Amplifikation von SmBIT
<b>SmBIT-Vpr rev</b>	GTCTTCTGGGGCTTGTTCAAACCTCAGAAAACCTCCTTGC	Primer für Fusions-PCR
<b>Vpr-SmBIT fw</b>	AAGGAGTTTTCTGAGTTTGAACAAGCCCCAGAAGACCA	Primer für Fusions-PCR
<b>Vpr-SmBIT rev</b>	CCGGTAGCCGGTCACCATGGATCTACTGGCTCCATTTTC	Primer für Fusions-PCR
<b>SmBIT-Vpr fw</b>	AATGGAGCCAGTAGATCCATGGTGACCGGCTACCGGCT	Primer für Fusions-PCR
<b>SmBIT rev</b>	GGATCCCTAAAACCTCAGAAAACCTCCTTGCCA	Primer für Amplifikation von SmBIT

## 4.9 Plasmide

Folgende fertige Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit benutzt:

*Tabelle 4-10: Bereits vorhandene Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden*

Name	Kurzbeschreibung	Herkunft
LgBIT-PRKAR2A	Positivkontrolle des NanoBIT-Kits der Fa. PROMEGA: großes Fragment der NanoLuc + PRKAR2A	Fa. PROMEGA (USA)
NanoLuc	NanoLuciferase	Fa. PROMEGA (USA)
pcDNA 3.1 (+)	Vektorplasmid für die Proteinexpression in Säugetierzellen, mit Ampicillinresistenzdomäne	Fa. ThermoFisher (USA)
pMD-G	Expressionsplasmid für VSV-G	(Dull et al., 1998)
pMDLg/pRRE	Expressionsplasmid für gag, pol, RRE	AddGene #12251 (Dull et al., 1998)
pRSV-Rev	Expressionsplasmid für rev	AddGene #12253 (Dull et al., 1998)
psi-NLuc	Expressionsplasmid für das Fusionskonstrukt aus NanoLuciferase und Packaging Signal	Hergestellt von Augustin Penda Twizerimana
SmbIT-PRKACA	Positivkontrolle des NanoBIT-Kits der Fa. PROMEGA: kleines Fragment der NanoLuc + PRKACA	Fa. PROMEGA (USA)

Folgende Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt:

*Tabelle 4-11: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide*

Name	Kurzbeschreibung
NLuc-Vpr in pcDNA 3.1 (+)	Expressionsplasmid für das NLuc-Vpr-Fusionsprotein in pcDNA 3.1 als Vektor
SmbIT-Vpr in pcDNA 3.1 (+)	Expressionsplasmid für das SmbIT-Vpr-Fusionsprotein in pcDNA 3.1 als Vektor
Vpr-NLuc in pcDNA 3.1 (+)	Expressionsplasmid für das Vpr-NLuc-Fusionsprotein in pcDNA 3.1 als Vektor
Vpr-SmbIT in pcDNA 3.1 (+)	Expressionsplasmid für das Vpr-SmbIT - Fusionsprotein in pcDNA 3.1 als Vektor

Die in Tabelle 10 aufgeführten Plasmide wurden hergestellt durch Amplifikation aus den in Tabelle 9 genannten Plasmiden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und darauffolgende Fusion mittels Fusions-PCR. Dafür wurden als Primer Oligonukleotide verwendet, die bei der Firma Eurofins bestellt wurden (vgl. Abschnitt 4.8, oben). Mit den bestellten Oligonukleotiden wurden in die amplifizierten DNA-Sequenzen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII (am 5'-Ende) und HindIII (am 3'-Ende) eingebracht, um den Verdau für die Ligation in pcDNA möglich zu machen.

## 4.10 Medien

### 4.10.1 Kulturmedium für *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium, das sich wie unten angegeben zusammensetzt. Die Bestandteile wurden in 1 L ddH<sub>2</sub>O suspendiert und das Medium nach der Einstellung des pH auf 7-7,5 autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf unter 50 °C wurde Ampicillin als Selektions-Antibiotikum zugegeben, die Konzentration betrug dabei 50 µg / ml.

Tabelle 4-12: Zusammensetzung des LB-Medium für die Kultivierung von *E. coli*

Bestandteil	LB-Flüssigmedium	LB-Festmedium
Casein Pepton	10 g	10 g
Hefeextrakt	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g
Agar	--	15 g

### 4.10.2 Kulturmedium für eukaryotische Zellen

Die eukaryotischen Zelllinien wurden in DMEM-Medium (Fa. Biochrom) kultiviert. Vor der Benutzung des kommerziell vertriebenen DMEM wurde das Medium gemäß der untenstehenden Tabelle supplementiert.

Tabelle 4-13: Supplementierung von DMEM-Medium zur Kultivierung eukaryotischer Zellen

Supplement	Menge / Anteil
Fötale Kälberserum	10 % des Gesamtansatzes
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U / ml
Streptomycin	50 mg / ml

### 4.10.3 Medium für Transfektionen

Für Transfektionen wurde OPTI-MEM (Fa. Life Technologies) verwendet, das kommerziell vertrieben wird.

#### 4.10.4 Bakterienstämme

Die verwendeten chemisch kompetenten Bakterien vom *E. coli*-Stamm Top10 wurden von Life Technologies bezogen. Die Kultivierung und Handhabung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben bzw. etablierter Protokolle (s. unten).

#### 4.10.5 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit fanden HEK293T-Zellen, Henrietta Lacks-Zellen (HeLa) sowie Crandle Rees Feline Kidney-Zellen (CRFK) Verwendung. Alle vorgenannten Zellen sind adhärenzte Zellen. HEK293T-Zellen sind Human Embryonic Kidney Cells, die das große T-Antigen von SV40 (Simian-Virus 40) exprimieren, sie wurden durch Transfektion mit Plasmiden, die für Virusproteine kodieren, zur Produktion viraler Vektoren angeregt.

CRFK-Zellen sind felines Ursprungs, sind durch eine verhältnismäßig starke Adhärenz zur Kulturflasche experimentell gut zu handhaben und zeichnen sich dadurch aus, dass sie keine TRIM-Proteine exprimieren. Sie wurden, neben HeLa-Zellen, für die Transduktion mit viralen Vektoren genutzt.

HeLa-Zellen sind humane Epithelzellen, die einem Zervixkarzinom entstammen, unter dem die namensgebende Patientin Henrietta Lacks in den 1950er-Jahren litt (Scherer, Syverton, & Gey, 1953). Sie wurden, wie auch die CRFK-Zellen, für Transduktionen mit viralen Vektoren genutzt.

#### 4.10.6 Software

*Tabelle 4-14: Verwendete Software*

Software	Zweck	Hersteller
MikroWin 2000	Luminometrische Analyse von Proben und Datenexport	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
NanoDrop 2000 1.6	Analyse und graphische Darstellung des DNA-Gehalts von Proben	ThermoFisher (USA)
PRISM 5 bzw. PRISM 6	Statistische und graphische Datenanalyse	GraphPad Software (USA)
Vector NTI Advance 10	Analyse und Bearbeitung von Gensequenzen	LifeTechnologies (USA)

## 5 METHODEN

---

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein molekularbiologisches Verfahren, mit dessen Hilfe im Rahmen dieser Arbeit DNA-Abschnitte aus Plasmiden amplifiziert und später miteinander fusioniert wurden. Es beruht auf der zyklischen Erhitzung und Abkühlung der Reaktionsansätze, wobei die unterschiedlichen Temperaturen die gewünschten Reaktionen ermöglichen. Neben der zu amplifizierenden DNA wurden eine Polymerase, passende Oligonukleotide als sog. Primer sowie Desoxynukleotide als „Bausteine“ für neue DNA-Moleküle hinzugegeben.

Die doppelsträngige DNA wird im Laufe des Zyklus zunächst durch Erhitzen auf 95°C denaturiert, sodass die Doppelstränge zu zwei Einzelsträngen zerfallen. Die Proben werden dann gekühlt; in diesem Schritt binden die hinzugegebenen Primer spezifisch an ihre komplementären Zielabschnitten auf den DNA-Einzelsträngen.

Im nun folgenden Schritt, der sog. *Elongation*, dienen die Primer der DNA-Polymerase als Startpunkt, um den Doppelstrang durch Einbau komplementärer Desoxynukleotide vervollständigen zu können. Der effiziente Ablauf der Elongation wird durch eine Temperaturerhöhung auf 72°C ermöglicht, hier liegt das Temperaturoptimum der Polymerase.

Nach Abschluss der Elongationsphase begann der Zyklus mit einem neuen Schritt der Denaturierung wieder von vorn. Durch diese Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte kommt es zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung des gewünschten DNA-Bereiches. Nach Durchlaufen einer vordefinierten Anzahl von Zyklen (im Rahmen dieser Arbeit meist etwa 30) folgt eine letzte Elongationsphase für fünf Minuten, um die Synthese unvollständiger DNA-Stränge abschließen zu können. Im Anschluss daran wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt und bis zur Entnahme aus dem PCR-Gerät bei dieser Temperatur gelagert.

Als Polymerase im Rahmen der PCR wurde die *pfu*-Polymerase der Firma ThermoScientific (Waltham, USA) verwendet, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus*. Deren Vorteil ist ihre Korrekturlesefunktion sowie ihr sequenzexaktes Arbeiten durch ihre *read ahead*-Funktion.

Die als Primer fungierenden Oligonukleotide wurden bei der Firma Eurofins Genomics (Luxemburg, Luxemburg) in einer Konzentration von 0,01 µmol und aufgereinigt bestellt. Für die Durchführung einer PCR benötigt man dabei sowohl einen Primer für den (+)-Strang, als auch einen für den (-)-

Strang. Nach Erhalt der Primer erfolgte die Verdünnung auf eine Konzentration von 100 nM für die weitere Verwendung.

Der PCR-Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 50 µl, wobei 5µl auf den pfu-Puffer (Fa. ThermoScientific) entfielen, 5 µl auf die Template-DNA, jeweils 1 µl auf pfu-Polymerase, Desoxynukleotide in einer Konzentration von 5 mM sowie (+)- und (-)-Strang-Primer. Das Restvolumen wurde mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Die für die Hybridisierungsphase nötige Temperatur ergab sich aus der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur der bestellten Oligonukleotide; diese ist abhängig vom Verhältnis der Adenin/Thymin zu Cytosin/Guanin-Basen im Molekül. Im Falle von ungleichen Schmelztemperaturen der verwendeten Primer wurden hierbei 5° C von der höheren der beiden Temperaturen subtrahiert und die Reaktion bei dieser Temperatur durchgeführt.

Für die Polymerase-Kettenreaktionen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Thermocycler T3 der Firma Biometra benutzt.

*Tabelle 5-1: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion*

Phase der PCR	Temperatur	Zeit
<b>initiale Denaturierung</b>	95 °C	3 Min
<b>Denaturierung</b>	95 °C	30 Sekunden
<b>Primerhybridisierung</b>	primerabhängig	1 Minute
<b>Elongationsphase</b>	72 °C	2 Minuten pro kb
<b>finale Elongationsphase</b>	72 °C	5 Minuten
<b>Probenlagerung</b>	4 °C	bis zur Probenentnahme

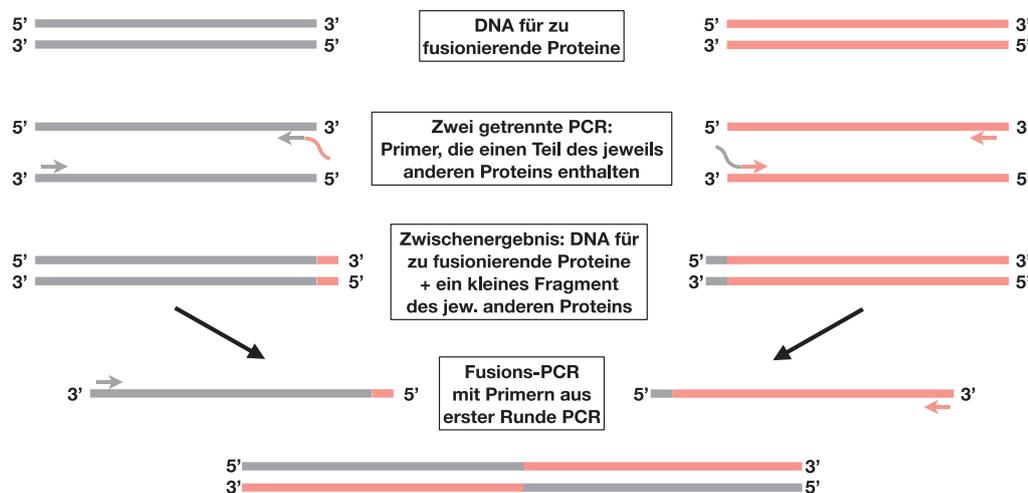
### 5.1.2 Fusions-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Fusions-PCR wird benutzt, um zwei DNA-Fragmente miteinander zu fusionieren. So lassen sich beispielsweise DNA-Moleküle herstellen, die für ein Fusionsprotein kodieren, wie beispielsweise die für dieses Projekt benutzten Fusionskonstrukte aus viralen Proteinen und *NanoLuciferase*.

Die Fusions-PCR benötigt zunächst dieselben Reagenzien wie die Standard-PCR, zusätzlich jedoch wird ein Fusionsprimer benötigt. Dieser Primer besteht zum Teil aus einer Sequenz, die komplementär zum Ende des einen zu fusionierenden DNA-Abschnittes ist. Der andere Teil des Fusionsprimers hingegen ist komplementär zum Beginn des anderen DNA-Abschnittes.

In einem ersten PCR-Zyklus entstehen so also Kopien der ursprünglichen DNA-Stränge, die jedoch um einen Teil des zu fusionierenden Stranges erweitert sind. In einer zweiten PCR-Runde geschieht

dann die eigentliche Fusion, bei der die beiden Fragmente mit Hilfe der Primer aus dem ersten Zyklus verlängert werden: es entstehen nun DNA-Stränge, die für die Aminosäuresequenz beider Proteine hintereinander kodieren.



**Abb. 5-1: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Fusions-Polymerase-Kettenreaktion (PCR).**

Dieses Verfahren wurde zur Herstellung der NanoLuc-Vpr-Fusionsproteine genutzt. Die Fusion der Proteine erfolgt durch insgesamt drei Runden der PCR. Zunächst werden separat die zu fusionierenden Proteine vervielfältigt, jedoch unter Nutzung eines Primers, der ein kleines Fragment des jeweiligen Fusionspartners abbildet. Die hierbei entstehenden Zwischenprodukte werden schließlich in einer finalen PCR mit den jeweiligen Primern ohne „Überhangfragment“ vervielfältigt, wodurch Fusionsproteine entstehen.

### 5.1.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Für die Auftrennung von DNA nach ihrer Molekülgröße in Banden wurde das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass die negativ geladenen DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode, also des positiven Pols, wandern. Hierbei bewegen sich kleine Fragmente schneller durch das Agarosegel als größere, sodass bei Applikation des elektrischen Feldes über eine definierte Zeit eine Auftrennung der DNA-Moleküle in Banden erfolgt, jede Bande enthält dabei DNA-Moleküle gleicher Größe.

Für die Elektrophorese wurden Agarose-Gele verwendet, die durch Kochen von Agarosepulver (Fa. Bio&Sell, Feucht/Nürnberg) in 1x TAE-Puffer hergestellt wurden. Die Agarosekonzentration im Gel von 1% wurde dabei auf Grund der Größe der DNA-Fragmente von 1000-2000 Basenpaaren gewählt. Nach dem Kochen wurde die Mischung unter Wasser auf ca. 60 °C abgekühlt, bevor Ethidiumbromid (EtBr) in einer Dosis von 1 µg/ml hinzugegeben wurde. Das so hergestellte Gel wurde dann in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gegossen und zum Erkalten abgedeckt. Nach der Festigung des Gels wurde der Slotkamm entfernt und die mit 6x Ladepuffer (Fa. ThermoScientific) versetzten DNA-Proben in die Gelvertiefungen gegeben. Als Größenstandard diente bei der Elektrophorese die *GeneRuler 1 kB Plus DNA-Leiter* der Firma ThermoScientific. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für ca. 30-45 Minuten, je nach Größe der Gelkammer. Durch

einen UV-Transilluminator konnten die Banden im Gel dargestellt und durch einen Ausdruck dokumentiert werden.

#### **5.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegel**

Die Aufreinigung von PCR-Produkten oder verdauten Plasmidfragmenten aus Banden im Agarosegel erfolgte nach dem Ausschneiden der Banden mit einem Skalpell durch Nutzung des *QIAquick Gel Extraktion Kit* (Firma QIAGEN, Hilden) gemäß mitgeliefertem Protokoll des Herstellers.

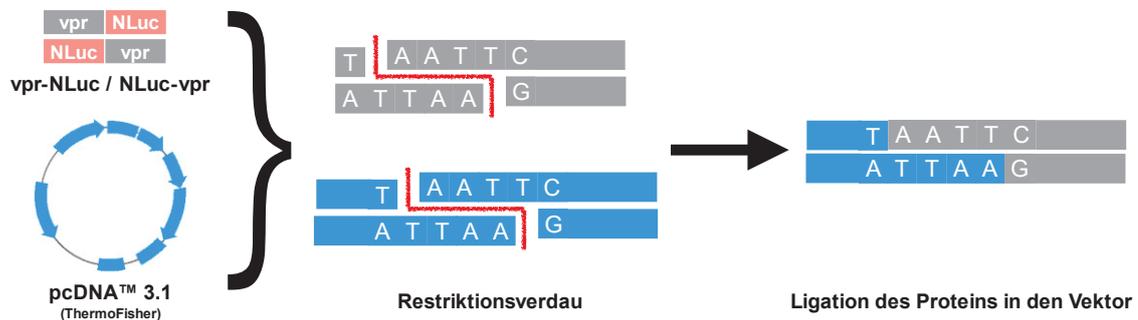
#### **5.1.5 Restriktionsverdau und Ligation von DNA**

Der Restriktionsverdau von DNA wird genutzt, um DNA-Fragmente für die Ligation in Vektoren vorzubereiten. Hierfür nutzt man Endonukleasen als Restriktionsenzyme. Diese Enzyme schneiden die DNA hochspezifisch an bestimmten, meist palindromischen Restriktionsstellen und produzieren dabei einen Überhang aus einzelsträngiger DNA, sogenannte „*sticky ends*“, die dann für die Ligation mit Vektor-DNA genutzt werden können. Die Vektor-DNA wird mit demselben Restriktionsenzym verdaut, sodass sowohl die Vektor- als auch die Ziel-DNA komplementäre „*sticky ends*“ aufweisen. Für den Restriktionsverdau im Rahmen dieser Arbeit wurden Enzyme der Firma ThermoScientific (Waltham, USA) bzw. Fermentas (heute ebenfalls ThermoScientific) verwendet. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um BamHI (ThermoScientific), HindIII (Fermentas); BglIII (ThermoScientific) wurde für den Verdau von NLuc-Vpr aus pJET benutzt. Als Puffer diente dabei jeweils der vom Hersteller angegebene, für das Enzym spezifische Puffer. Im Falle eines Doppelverdaus mit BamHI und HindIII wurde Buffer R (Fa. ThermoScientific) benutzt, bei BglIII diente Buffer O (Fa. ThermoScientific) als Puffer.

Für den Kontrollverdau von DNA aus Mini-Prep-Proben wurden 3 µl DNA eingesetzt, für den präparativen Verdau wurden 1000 ng DNA verwendet. Der gesamte Ansatz umfasste 20 µL, davon entfielen neben der DNA-Probe 2 µL auf den Puffer, 1 µL auf das Enzym (entsprechend 10 U), der Rest wurde mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, im Falle des Kontrollverdaus für 90 Minuten, der präparative Verdau wurde für 2 Stunden inkubiert.

Die Ligation von Restriktionsfragmenten und entsprechend vorverdauter Vektor-DNA (*pcDNA 3.1*) fand im molaren Verhältnis 3:1 statt, wobei zur Berechnung der eingesetzten Mengen der NEBioCalculator der Firma New England BioLabs Inc. v1.6.0 verwendet wurde. Als Enzym wurde *T4 DNA-Ligase* der Firma ThermoScientific benutzt, als Puffer diente der mitgelieferte *T4 DNA Ligase Puffer*. Die Gesamtmenge des Ansatzes wurde so gering wie möglich gehalten, sie betrug in den meisten Fällen 15-20 µl. Inkubiert wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur.

Die durch Ligation in Leervektoren überführten Plasmide wurden nach Abschluss der Ligation genutzt, um kompetente *E. coli* des Stamms TOP F10 zu transformieren (s. Abschnitt Mikrobiologische Methoden).



**Abb. 5-2: Schematische Darstellung der Herstellung von Plasmiden zur Verwendung für Transfektionen.**

Das Zielprotein sowie der passende Vektor (beispielhaft pcDNA 3.1, Fa. ThermoFisher) werden mit demselben Restriktionsenzym verdaut, um kompatible Enden der DNA-Stränge zu erzeugen. Diese sog. „sticky ends“ werden schließlich unter Verwendung einer DNA-Ligase als Katalysator miteinander verbunden, sodass das Plasmid in den Vektor eingebaut wird.

### 5.1.6 Photometrische Quantifizierung von DNA-Mengen

Die Messung der DNA-Konzentration in Proben erfolgte mittels NanoDrop-Verfahren auf einem NanoDrop NP1000-Gerät der Fa. PEQLAB unter Benutzung der entsprechenden Gerätesoftware. In diesem Gerät wird der Absorptionsgrad der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Das Verfahren macht sich das Absorptionsverhalten von Nucleinsäuren in diesem Wellenlängenbereich zu Nutze und berechnet daraus den DNA-Gehalt der Probe.

## 5.2 Proteinbiochemische Methoden

### 5.2.1 Herstellung von Lysaten aus eukaryotischen Zellen zur Analyse der Proteinexpression

Um die Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen zu analysieren und zu quantifizieren, wird das sog. *Western Blot*-Verfahren angewandt (s. unten). Die dafür nötigen Proteinlysate werden durch Lyse der exprimierenden Zellen hergestellt. Dafür werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Dafür wird nach Entfernung des Kulturmediums aus der Zellkulturflasche das PBS mittels einer Pipette immer wieder auf die Zellen gegeben und aspiriert, sodass sich die Zellen von der Kulturflasche lösen. Durch Zentrifugation bei 2000 x g für 5 Minuten entsteht am Boden des Zellkulturröhrchens ein Zell-Pellet; der PBS-Überstand wird abpipettiert und verworfen. Das Pellet wird sodann in 100 µL RIPA-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Der RIPA-Puffer enthält dabei neben Detergenzien auch Protease- und Phosphataseinhibitoren. Nach der Inkubation wird das Lysat für 10 Minuten bei 21000 x g für 10 Minuten zentrifugiert; der hierdurch

entstehende Überstand ist das Proteinlysate, das nun weiterverarbeitet oder bei -20° C gelagert wird.

### **5.2.2 Herstellung von Natriumdodecylsulfat-Gelen und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Gelelektrophorese von Proteinlysaten in einem Natriumdodecylsulfat-Gel (engl. Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) wird benutzt, um Proteine aus den oben beschriebenen Lysaten nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Hierfür wird das Proteinlysate zunächst mit einem SDS-haltigen Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Aufgrund der Anlagerung negativer Ladung an die denaturierten Proteine durch den Überschuss an SDS entsteht so eine molekulargewichtabhängige Verteilung negativer Ladungen, die nun die Auftrennung der Probe nach Molekulargewicht durch Anlegen eines elektrischen Feldes ermöglicht. Das Gel wird dabei aus den Bestandteilen Acrylamid, Bisacrylamid, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer, SDS, bidestilliertem Wasser, Ammoniumpersulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) angemischt. Für die SDS-PAGE wird dabei zunächst ein Ladegel hergestellt, in das die Proben gegeben werden sowie ein Trenngel, in dem die Auftrennung durch Gelelektrophorese geschieht. Die beiden Gele unterscheiden sich dabei durch die Acrylamidkonzentration und damit in der Porengröße: für das Ladegel wurde eine Konzentration von 5% gewählt, als Trenngel diente ein 10%-iges Gel. Durch den Einsatz von Slotkammern wurden Kammern im Gel geschaffen, in die die Proben gegeben werden konnten. Als Skala diente ein standardisierter Größenmarker, der in eine der Probenkammern gegeben wurde.

Nach dem Beladen des Ladegels mit den Proben wurde durch Anlage einer Spannung von 85 V die Elektrophorese gestartet. Wenn die Proben das Ende des Ladegels erreicht hatten, wurde die Spannung auf 110 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn eine klare Auftrennung der Banden zu erkennen war.

### **5.2.3 Western Blot**

Zum Nachweis der Ziel-Proteine mittels spezifischer Antikörper müssen die mittels SDS-PAGE nach Molekülgröße aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen werden. Hierfür wird diese zunächst in Methanol eingelegt, um ihre Hydrophobie zu mindern und dann mit bidestilliertem Wasser abgespült. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Semi-Dry-Blotting-Verfahren genutzt, um die Proteine mittels Elektrotransfer auf die Membran zu übertragen. Zwei Lagen dicken Filterpapiers werden in Blotting-Puffer eingelegt; eine Lage davon wird auf der Anode platziert. Darauf wird die aktivierte, abgespülte PVDF-Membran platziert, auf dieser das Gel aus der SDS-PAGE. Auf die zweite Lage Blottingpapier folgt die Kathode; vor

Applikation der Spannung von 25 V für 45 Minuten werden eventuelle Luftblasen mittels eines Glättspatels entfernt. Im entstehenden elektrischen Feld wandern die Proteine aus dem Gel in Richtung der Anode, werden jedoch bei Passage der PVDF-Membran auf dieser fixiert, sodass sie für die Proteindetektion mittels spezifischer Antikörper (Immunodetektion) nutzbar werden.

#### **5.2.4 Detektion von Proteinen durch spezifische Antikörper (Immunodetektion)**

Die durch das Western Blot-Verfahren auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine können durch die Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Hierfür wird zunächst die Membran in einer fettfreien Milchlösung (5% fettfreies Milchpulver in TBS-T-Puffer) für eine Stunde auf einem Schüttelinkubator platziert. Dies dient der Blockierung von freien Proteinbindestellen auf der Membran; diese verhindert unspezifische Bindungen der Antikörper und dadurch ausgelöste Artefakte bei der Proteindetektion. Nach dem Blocken wird die Membran zunächst über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttelinkubator mit dem primären Antikörper inkubiert. Am Folgetag wird die Membran dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend für eine Stunde unter Schütteln mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase (*engl. Horseradish Peroxidase, HRP*) versetzt und kann somit nach weiteren drei Waschgängen in TBS-T durch Zugabe einer ECL-Lösung (*Enhanced Chemiluminescence*) sichtbar gemacht werden. Die ECL-Lösung enthält das HRP-Substrat Luminol sowie Hilfsstoffe zur Verstärkung des Lichtsignals. Sowohl der primäre als auch der sekundäre Antikörper sind in fettfreier Milchlösung (vgl. oben) verdünnt; der Verdünnungsgrad ist dabei antikörperspezifisch. Das durch den sekundären Antikörper emittierte Licht kann in einer Dunkelkammer mit Hilfe von Chemilumineszenzfilmen nachgewiesen und dokumentiert werden.

### **5.3 Methoden mit *Escherichia coli* (*E. coli*)**

#### **5.3.1 Kultivierung von *E. coli***

Für die Vervielfältigung der für dieses Projekt benötigten Plasmid-DNA dienten Bakterien der Spezies *Escherichia coli* (*E. coli*). Diese wurden in LB-Flüssigmedium bzw. auf LB-Selektionsplatten kultiviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bakterien des Stammes *Top10* (Genotyp: *F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*) benutzt. Die Kultur von *Top10*-Bakterien fand bei 37 °C in bzw. auf LB-Medium statt. Flüssigkulturen wurden auf einer Schüttelplatte bei 200-300 rpm inkubiert.

### **5.3.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien**

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde der *E. Coli*-Stamm *Top10* mit einer nach *Hanahan* (1983) modifizierten Methode chemisch kompetent gemacht: Hierfür wurden zunächst 200ml LB-Medium mit 5ml einer Übernachtskultur von *E. coli* angeimpft und diese Bakteriensuspension bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte ( $OD_{550}$ ) von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, bevor sie in 50ml-Polypropylenröhrchen aufgeteilt wurden. Diese Röhrchen wurden in einer Zentrifuge bei 4500 rpm und einer Temperatur von 4° C für 10 min pelletiert. Das entstehende Bakterienpellet wurde nun in 20 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde für fünf Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000 rpm und 4° C zentrifugiert. Danach wurde das Bakterienpellet in 2ml TFB2-Puffer resuspendiert. Die entstehende Suspension wurde nach einer Inkubation von 15 min in Aliquots à 100µl aufgeteilt und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **5.3.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli***

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden die kompetenten Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut, bevor 50 ng der zu transformierenden DNA hinzupipettiert wurden. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 Minuten wurden die Bakterien für 45 Sekunden einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt. Nach diesem sog. Hitzeschock wurde 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikazusatz hinzugegeben und die Zellen unter Schütteln für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert wurden.

### **5.3.4 Plasmid-Präparation aus *E. coli***

Die Plasmid-Präparation aus Bakterien erfolgte für kleine Mengen unter Verwendung des *ZR Plasmid Miniprep-Classik Kit* der Firma *ZYMO Research* (Irvine, USA). Dafür wurden zunächst Flüssigkulturen in 5ml LB-Medium angelegt, nachdem das Medium mit Ampicillin in der Konzentration von 50 µg/ml versetzt worden war. Nach Abfüllen des Mediums in 13 ml-Plastikröhrchen wurde jeweils eine kleine Bakterienkultur von der Agarplatte mittels einer Pipettenspitze in das Medium überführt. Die Flüssigkulturen wurden im 45°-Winkel bei 37°C unter Schütteln (160-200rpm) über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die DNA durch Befolgen des mitgelieferten Kit-Protokolls extrahiert und aufgereinigt.

Für die Präparation großer Mengen DNA aus Bakterien wurde eine Flüssigkultur in 300 ml LB-Amp-Medium angelegt und zur DNA-Gewinnung das *PureYield Maxiprep System* der Firma *Promega* benutzt, hierbei wurde ebenfalls nach Kit-Protokoll gearbeitet.

## 5.4 Zellkultur

### 5.4.1 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Um eukaryotische Zellen, die aktuell nicht für Experimente gebraucht werden, über längere Zeiträume lagern zu können, müssen diese in Flüssigstickstoff eingefroren werden. Dafür wurden nach Bestimmung der Zellzahl mittels einer Zählkammer zunächst ca.  $2 \times 10^6$  Zellen aus der Kultur entnommen und durch Zentrifugieren bei 2000 Umdrehungen pro Minute für drei bis vier Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem Milliliter DMSO-haltigem Einfriermedium (bestehend aus 10 % DMSO, 40 % fötalem bovinem Serum und 50 % Zellkulturmedium) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden dann in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Isopropanol-gefüllten Einfriergefäß zunächst für 24 Stunden bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Da Isopropanol konstant um ca.  $1\text{ °C}$  pro Minute abkühlt, kommt es zu einem sehr schonenden Einfrieren der Zellen. Nach der Lagerung bei  $-80\text{ °C}$  für ca. 24 Stunden konnten die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff für die Langzeitlagerung überführt werden.

### 5.4.2 Auftauen eukaryotischer Zellen

Die Langzeit-Aufbewahrung eukaryotischer Zellen für die Zellkultur findet bei  $-152\text{ °C}$  in flüssigem Stickstoff statt. Zum Auftauen eines Aliquots aus dem Lagerbestand wurde das Probenröhrchen zuerst in einem Wasserbad bei  $37\text{ °C}$  aufgetaut. Die Zellen wurden sodann in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem Medium versetzt und anschließend zur Entfernung des Dimethylsulfoxid (DMSO), in dem die Zellen gelagert waren, zentrifugiert: 2000 Umdrehungen pro Minute für drei bis vier Minuten, um die Zellen zu pelletieren und das Medium abpipettieren zu können. Das Zellpellet wurde anschließend abermals in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Diese wurde dann in einem Inkubatorschrank bei  $37\text{ °C}$  und einer  $\text{CO}_2$ -Konzentration von 5% unter gesättigter Wasserdampfatmosfera gelagert, bis die Zellen in ausreichender Dichte vorhanden waren, um sie für Experimente benutzen zu können.

### 5.4.3 Kultur eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden in DMEM-Medium (Biochrom KG, Berlin) gehalten. Zur Zellpassage wurden die Zellen mit einer Trypsin-Lösung aus den Kulturflaschen gelöst und dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 umgesetzt und mit frischem Medium versetzt. Alle Kulturmedien wurden mit 10 % fötalem Kälberserum (Biochrom KG, Berlin), 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin), und Antibiotika (100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, [Biochrom KG, Berlin]) supplementiert. Das fötale Kälberserum (FKS) wurde vor Gebrauch zur Inaktivierung von

Komponenten des Komplementsystems 20 min bei 56° C inkubiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen bzw. -platten in einem Zellinkubator (BBD 6220, Heraeus, Hanau) bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre.

#### **5.4.4 Transfektion und Ernte virushaltiger Zellüberstände**

Zur Transfektion von HEK293T-Zellen wurde das Transfektionsreagenz *Lipofectamin* LTX (*Invitrogen, Carlsbad, USA*) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Substanz enthält kationische Liposomen, die die negativ geladene DNA binden und bildet dadurch DNA-haltige Liposomen. Diese können mit der Zellmembran der eukaryotischen Zellen verschmelzen und helfen so, die Nukleinsäuren in die Zellen einzuschleusen.

Für die Transfektion von Zellen im 24-Well-Format wurden 500 ng DNA und 1µl Lipofectamin LTX pro Well verwendet, im 6-Well-Format 2500 ng DNA und 3.5 µl Lipofectamin LTX. Als Medium für den Transfektionsansatz diente OptiMEM. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert und anschließend vorsichtig tröpfchenweise zu den am Vortag in Kulturplatten ausgesäten Zellen hinzupipettiert und die Platten für 48 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre inkubiert.

### **5.5 Virologische Methoden**

#### **5.5.1 Herstellung viraler Vektoren**

Die Herstellung viraler Reporterviren erfolgte im Rahmen dieses Projektes nach dem sog. „3-Plasmid-System“, das das Virusgenom auf *gag* (*group specific antigene*) und *pol* (DNA-Polymerase) als Strukturgene sowie *rev* (*regulator of expression of virion proteins*) als regulatorisches Gen reduziert. Die akzessorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, und *nef* entfallen. Dies erhöht die Sicherheit der Arbeiten durch Beschränkung der viralen Infektion auf einen einzigen Zyklus. (Dull et al., 1998)

Über den beschriebenen Sicherheitsmechanismus hinaus gibt es weitere Faktoren, die die biologische Sicherheit des 3-Plasmid-Systems erhöhen. So werden zum einen für die o. g. Gene zwei verschiedene Plasmide verwendet: das Plasmid pMDLg/pRRE kodiert für die viralen Proteine *gag* und *pol*, das *rev*-Gen wird durch das Plasmid pRSV-*rev* exprimiert. Darüber hinaus enthalten die Transkripte des *gag*- und des *pol*-Gens sog. *cis-repressive Sequenzen*: durch diese werden die Gene erst dann exprimiert, wenn eine Interaktion zwischen dem regulatorischen *Rev*-Protein und dem *rev-responding element* (RRE) stattfindet. Erst dadurch wird dann der Export viraler RNA ins Zytoplasma ermöglicht. (Dull et al., 1998).

Für die Herstellung von HIV-1-Reporterviren wurden folgende Plasmide in folgender Menge verwendet:

*Tabelle 5-2: Quantitative Zusammensetzung der Transfektionsansätze*

<b>Reportervektor</b>	<b>Plasmid</b>	<b>Gene</b>	<b>Menge</b>
<b>HIV-1</b>	pMDLg/pRRE	<i>gag, pol, RRE</i>	1000 ng
	pRSV-Rev	<i>rev</i>	200 ng
	psi-NLuc bzw. Vpr-NLuc / NLuc-Vpr	<i>packaging-signal-NanoLuciferase bzw. Vpr-NanoLuciferase-Fusionsprotein</i>	1000 ng
	pMD.G	<i>VSV-G</i>	200 ng
	pcDNA 3.1	Leervektor	100 ng (bzw. 300 ng bei Negativkontrolle)

Für die Herstellung von Reportervirionen wurden HEK293T-Zellen im 6-Loch-Platten-Format transfiziert, hierbei wurde eine Gesamt-DNA-Menge von 2500 ng/Well angestrebt; zum Auffüllen der DNA-Gesamtmenge wurde *pcDNA 3.1* als Leervektor benutzt. Die Transfektion für Reporterviren zur Negativkontrolle enthielt kein VSV-G, dessen Menge wurde mit einem höheren Anteil pcDNA ausgeglichen.

Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Wasserdampfatosphäre erfolgte die Virusernte. Dafür wurden die Überstände der Zellen aus den einzelnen Löchern in Eppendorf-Gefäßen gesammelt und kurz zentrifugiert (3000rpm, 4 Minuten), um Zellreste zu pelletieren. Die dabei entstehenden Überstände wurden vorsichtig abpipettiert und auf eine in Eppendorfgefäßen vorbereitete Schicht aus 500 µl Lösung aus 20 % Sucrose in PBS pipettiert. Hierbei wurde bestmöglich eine Vermischung der Phasen zu verhindern versucht. Diese Gefäße wurden für 4 Stunden bei 18.000rpm zentrifugiert, um den Virionen die Passage durch die Sucrose zu ermöglichen. Nach Ablauf der 4 Stunden wurde die Flüssigkeit aus den Gefäßen abpipettiert und das Pellet in 100µl DPBS pro Tube mit einer Pipette gründlich resuspendiert. Das entstandene Viruskonzentrat wurde anschließend bei -80 °C gelagert.

### **5.5.2 Transduktion von Zellen mit Reporterviren - Vollängenkonstrukte**

Die Transduktion von eukaryotischen Zellen mit Reporterviren im Rahmen dieses Projektes fand im 96-Well-Format statt. Hierfür wurden die zu infizierenden Zellen zunächst mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend auf eine Konzentration von 4-6 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Milliliter verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µL in jede Vertiefung der 96-Well-Platte gegeben und die Zellen so bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Wasserdampfatosphäre für 24 Stunden

inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden das Wachstum und die Adhäsion der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Für jede unterschiedliche Konzentration eines Wirkstoffes bzw. jede einzelne Transduktion wurden drei Wells der 96-Well-Platte genutzt, um bei der Messung einen Mittelwert bilden zu können.

Für die Messung des Uncoatings unter dem Einfluss pharmakologischer Inhibitoren wurde in einem separaten Reaktionsgefäß ein Kulturmedium vorbereitet, das die jeweilige Substanz in doppelter Zielkonzentration enthielt. Der Überstand der Zellen in der Kulturplatte wurde abpipettiert, verworfen und durch 50 µL des inhibitorhaltigen Mediums und 50 µL Kulturmedium ersetzt, das zuvor auf 37 °C vorgewärmt worden war. Durch die 1:1-Verdünnung ergab sich in den Wells so die gewünschte Zielkonzentration. In den Referenz-Wells (Transduktion ohne Inhibitoren) sowie die Negativkontrollen (kein Inhibitor, kein VSV-G) wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Platten wurden erneut für zwei Stunden unter den o.g. Bedingungen inkubiert und währenddessen die benötigte Menge Viruskonzentrat auf Eis bei Raumluft aufgetaut.

Nach dem Auftauen wurde das Viruskonzentrat in einer ausreichenden Menge Kulturmedium verdünnt, sodass sich eine Menge von 3-5 µL Viruskonzentrat plus 45-47 µL Kulturmedium pro Well ergab.

Nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit wurde erneut der Überstand verworfen und die Zellen mit je 50 µL virionen- und inhibitorhaltigem Medium (letzteres in doppelter Zielkonzentration) versetzt. Die anschließende Inkubationszeit unter den o.g. Standardbedingungen betrug sieben Stunden, nach Ablauf dieser sieben Stunden erfolgte der Ersatz des virus- und inhibitorhaltigen Mediums durch vorgewärmtes inhibitorhaltiges Medium (bzw. reines Kulturmedium im Falle der „Wildtyp“- Transduktion und der Negativkontrollen) und die abermalige Inkubation unter o.g. Bedingungen für eine Stunde.

### **5.5.3 Transduktion von Zellen mit Reporterviren - NanoBiT**

Für die Untersuchung des Uncoatings in Zellen unter Nutzung des komplementären NanoBiT-Systems mussten die Zielzellen zunächst mit dem LargeBiT-Fragment transfiziert werden. Dies erfolgte unter Nutzung des im Abschnitt „Herstellung viraler Vektoren“ beschreibenden Transfektionsreagenz Lipofectamin LTX.

Nach 48h Inkubation konnten die so transfizierten Zellen mit small-BiT-exprimierenden Reportervirionen infiziert werden. Die Schritte der Transduktion waren dabei identisch zu den oben geschilderten Abläufen der Transduktion bei Nutzung von Plasmiden, die für die komplette NanoLuciferase kodieren.

#### 5.5.4 Luciferaseassay mit NanoLuciferase

Nach der Inkubation der Zellen mit dem virushaltigen Medium und den oben beschriebenen Schritten des Mediumwechsels wurden die Zellen aus dem Inkubator entnommen und die Überstände abpipettiert. Anschließend wurden die Zellen sehr behutsam mit 300  $\mu\text{L}$  vorgewärmtem PBS pro Well gewaschen. Der mit dem NanoLuciferase-Kit mitgelieferte Lysepuffer wurde aufgetaut und im Verhältnis 1:1 mit Zellkulturmedium verdünnt. Dem Gemisch wurde das NanoLuc-Substrat (Fa. PROMEGA) im Verhältnis 50:1 zugesetzt. Das Gemisch wurde dann auf die Zellen gegeben (100  $\mu\text{L}$ /Well) und schnell auf- und abpipettiert, bis sich Schaum bildete. Aufgrund der Photosensibilität des Substrates musste hierbei im Dunkeln gearbeitet werden. Nachdem alle Zellen lysiert worden waren, wurden je Well 75  $\mu\text{L}$  des Lysates in eine schwarze 96-Well-Platte überführt; die Platte wurde anschließend in einer dunklen Box zum Luminometer gebracht, um damit die Luciferaseaktivität messen zu können. Aus den jeweils drei Wells mit gleichem Inhibitorgehalt wurde anschließend ein Mittelwert ermittelt. Für das NanoBiT-System wurde bei der Durchführung des Luciferaseassays analog zum Vollängen-Enzym verfahren.

#### 5.6 Statistische Methoden

Die statistische Signifikanz der erhobenen Messdaten wurde mittels ungepaarter t-Tests ermittelt und wenn nötig mittels Bonferroni-Korrektur korrigiert. Dafür wurde, wie auch für die grafische Darstellung der Ergebnisse, die Software *GraphPad Prism* in den Versionen 5 und 6 auf MacOS bzw. Windows 10 verwendet (GraphPad Software, San Diego, USA). In allen abgebildeten Diagrammen werden die Messergebnisse mit Standardabweichung angegeben, Sternchen verdeutlichen dabei das Signifikanzniveau. Dabei galt  $p < 0.001$  als *extrem signifikant* (\*\*\*) , Werte von 0.001 bis 0.01 als *sehr signifikant* (\*\*) und Werte zwischen 0.01 und 0.05 als *signifikant* (\*). Werte  $> 0.05$  galten als *nicht signifikant* (ns).

## 6 ANHANG

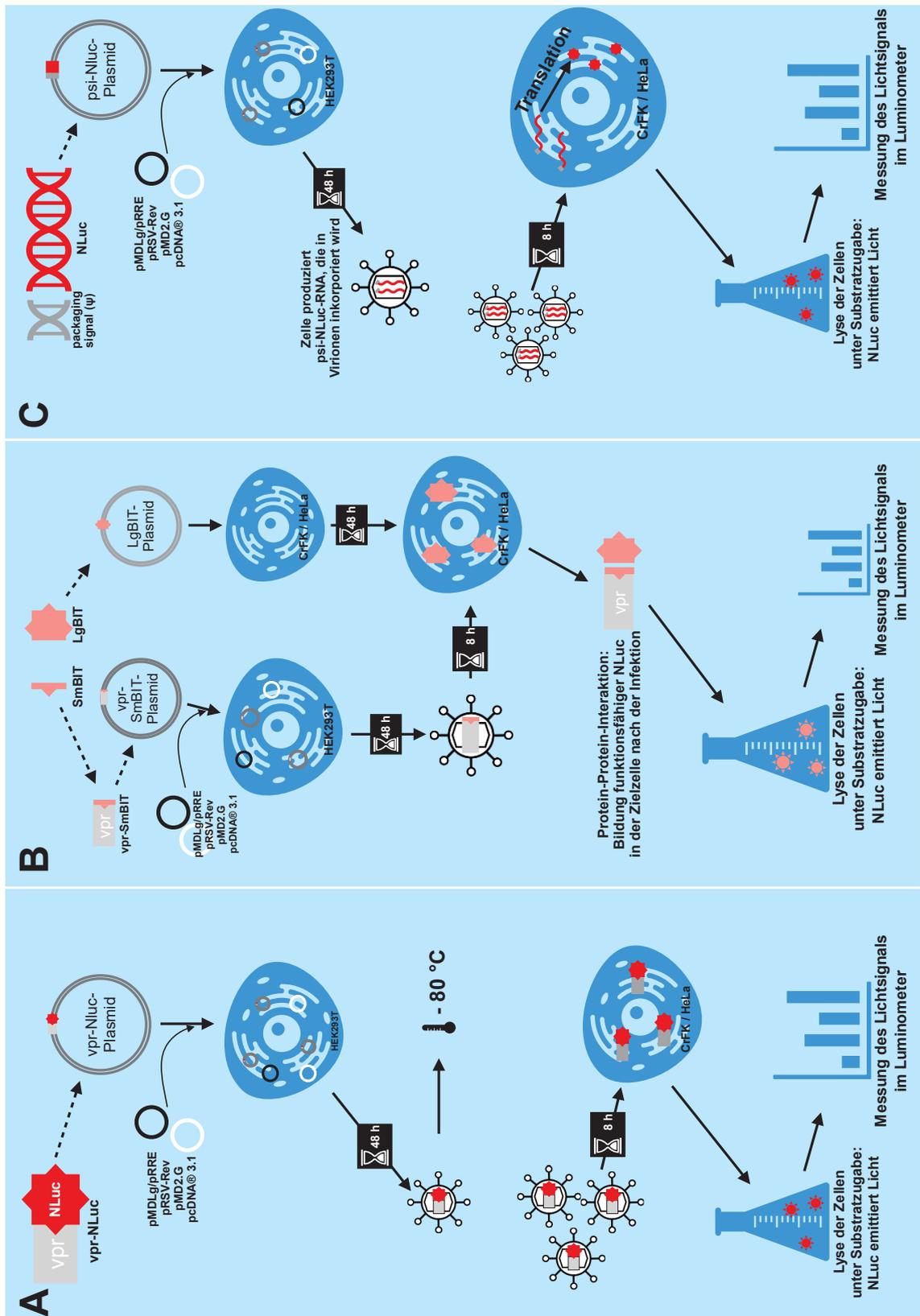


Abb. 6-1: Übersicht über die drei verwendeten Strategien zur Messung des Uncoatings von HIV-1 in vitro. Links (A) ist der fusionsproteinbasierte Assay dargestellt. Der mittlere Teil der Abbildung (B) zeigt den NanoBIT-basierten Assay. Rechts (C) ist das letztendlich benutzte, RNA-basierte Verfahren dargestellt.

## Literaturverzeichnis

- Aboud, M., Shoor, R., & Salzberg, S. (1979). Adsorption, penetration, and uncoating of murine leukemia virus studied by using its reverse transcriptase. *J Virol*, *30*(1), 32-37. doi:10.1128/jvi.30.1.32-37.1979
- AWMF. (2014). S2k-Leitlinie Antiretrovirale Therapie der HIV-Infektion.
- Balasubramaniam, M., Zhou, J., Addai, A., Martinez, P., Pandhare, J., Aiken, C., & Dash, C. (2019). PF74 Inhibits HIV-1 Integration by Altering the Composition of the Preintegration Complex. *J Virol*, *93*(6). doi:10.1128/jvi.01741-18
- Bejarano, D. A., Peng, K., Laketa, V., Börner, K., Jost, K. L., Lucic, B., . . . Kräusslich, H.-G. (2019). HIV-1 nuclear import in macrophages is regulated by CPSF6-capsid interactions at the nuclear pore complex. *eLife*, *8*, e41800. doi:10.7554/eLife.41800
- Berkowitz, R., Fisher, J., & Goff, S. P. (1996). RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol*, *214*, 177-218. doi:10.1007/978-3-642-80145-7\_6
- Blair, W. S., Pickford, C., Irving, S. L., Brown, D. G., Anderson, M., Bazin, R., . . . Butler, S. L. (2010). HIV Capsid is a Tractable Target for Small Molecule Therapeutic Intervention. *PLoS Pathogens*, *6*(12), e1001220. doi:10.1371/journal.ppat.1001220
- Bour, S., Geleziunas, R., & Wainberg, M. A. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev*, *59*(1), 63-93.
- Briggs, J. A. G., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H.-G., & Fuller, S. D. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *The EMBO journal*, *22*(7), 1707-1715. doi:10.1093/emboj/cdg143
- Briones, M. S., Dobard, C. W., & Chow, S. A. (2010). Role of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase in Uncoating of the Viral Core. *J Virol*, *84*(10), 5181. doi:10.1128/JVI.02382-09
- Burdick, R. C., Hu, W. S., & Pathak, V. K. (2013). Nuclear import of APOBEC3F-labeled HIV-1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(49), E4780-4789. doi:10.1073/pnas.1315996110
- Burdick, R. C., Li, C., Munshi, M., Rawson, J. M. O., Nagashima, K., Hu, W.-S., & Pathak, V. K. (2020). HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(10), 5486-5493. doi:10.1073/pnas.1920631117
- Campbell, E. M., Weingart, J., Sette, P., Opp, S., Sastri, J., O'Connor, S. K., . . . Bouamr, F. (2016). TRIM5 $\alpha$ -Mediated Ubiquitin Chain Conjugation Is Required for Inhibition of HIV-1 Reverse Transcription and Capsid Destabilization. *J Virol*, *90*(4), 1849-1857. doi:10.1128/jvi.01948-15
- Cavrois, M., De Noronha, C., & Greene, W. C. (2002). A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat Biotechnol*, *20*(11), 1151-1154. doi:10.1038/nbt745
- Chen, H., Wei, S. Q., & Engelman, A. (1999). Multiple integrase functions are required to form the native structure of the human immunodeficiency virus type I intasome. *J Biol Chem*, *274*(24), 17358-17364. doi:10.1074/jbc.274.24.17358
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., & Varmus, H. E. (1997). The Interactions of Retroviruses and their Hosts. In J. M. Coffin, S. H. Hughes, & H. E. Varmus (Eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Da Silva Santos, C., Tartour, K., & Cimarelli, A. (2016). A Novel Entry/Uncoating Assay Reveals the Presence of at Least Two Species of Viral Capsids During Synchronized HIV-1 Infection. *PLoS Pathog*, *12*(9), e1005897. doi:10.1371/journal.ppat.1005897

- Dalgleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., & Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, *312*(5996), 763-767. doi:10.1038/312763a0
- Darlix, J.-L., Gabus, C., Nugeyre, M.-T., Clavel, F., & Barré-Sinoussi, F. (1990). Cis elements and Trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *Journal of Molecular Biology*, *216*(3), 689-699. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90392-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(90)90392-Y)
- Di Nunzio, F., Fricke, T., Miccio, A., Valle-Casuso, J. C., Perez, P., Souque, P., . . . Diaz-Griffero, F. (2013). Nup153 and Nup98 bind the HIV-1 core and contribute to the early steps of HIV-1 replication. *Virology*, *440*(1), 8-18. doi:10.1016/j.virol.2013.02.008
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, *72*(11), 8463-8471. doi:10.1128/JVI.72.11.8463-8471.1998
- Engelman, A. (1999). In vivo analysis of retroviral integrase structure and function. *Adv Virus Res*, *52*, 411-426. doi:10.1016/s0065-3527(08)60309-7
- Fan, X., Zhang, F.-H., Al-Safi, R. I., Zeng, L.-F., Shabaik, Y., Debnath, B., . . . Long, Y.-Q. (2011). Design of HIV-1 integrase inhibitors targeting the catalytic domain as well as its interaction with LEDGF/p75: a scaffold hopping approach using salicylate and catechol groups. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *19*(16), 4935-4952. doi:10.1016/j.bmc.2011.06.058
- Fernandez, J., Portilho, D. M., Danckaert, A., Munier, S., Becker, A., Roux, P., . . . Arhel, N. J. (2015). Microtubule-associated proteins 1 (MAP1) promote human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) intracytoplasmic routing to the nucleus. *J Biol Chem*, *290*(8), 4631-4646. doi:10.1074/jbc.M114.613133
- Freed, E. O. (2001). HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet*, *26*(1-6), 13-33. doi:10.1023/a:1021070512287
- Galat, A. (1993). Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem*, *216*(3), 689-707. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18189.x
- Ganser, B. K., Li, S., Klishko, V. Y., Finch, J. T., & Sundquist, W. I. (1999). Assembly and Analysis of Conical Models for the HIV-1 Core. *Science*, *283*(5398), 80-83. doi:10.1126/science.283.5398.80
- Goodenow, M., Huet, T., Saurin, W., Kwok, S., Sninsky, J., & Wain-Hobson, S. (1989). HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J Acquir Immune Defic Syndr* (1988), *2*(4), 344-352.
- Gorelick, R. J., Nigida, S. M., Jr., Bess, J. W., Jr., Arthur, L. O., Henderson, L. E., & Rein, A. (1990). Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J Virol*, *64*(7), 3207-3211. doi:10.1128/jvi.64.7.3207-3211.1990
- Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müssig, A., Allers, K., . . . Thiel, E. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, *360*(7), 692-698. doi:10.1056/NEJMoa0802905
- Imam, S., Kömürlü, S., Mattick, J., Selyutina, A., Talley, S., Eddins, A., . . . Campbell, E. M. (2019). K63-Linked Ubiquitin Is Required for Restriction of HIV-1 Reverse Transcription and Capsid Destabilization by Rhesus TRIM5 $\alpha$ . *J Virol*, *93*(14). doi:10.1128/jvi.00558-19
- Jayappa, K. D., Ao, Z., Wang, X., Moulard, A. J., Shekhar, S., Yang, X., & Yao, X. (2015). Human immunodeficiency virus type 1 employs the cellular dynein light chain 1 protein for reverse transcription through interaction with its integrase protein. *J Virol*, *89*(7), 3497-3511. doi:10.1128/jvi.03347-14
- Kao, S. Y., Calman, A. F., Luciw, P. A., & Peterlin, B. M. (1987). Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, *330*(6147), 489-493. doi:10.1038/330489a0
- Kapturczak, M. H., Meier-Kriesche, H. U., & Kaplan, B. (2004). Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc*, *36*(2 Suppl), 25s-32s. doi:10.1016/j.transproceed.2004.01.018

- Kim, K., Dauphin, A., Komurlu, S., McCauley, S. M., Yurkovetskiy, L., Carbone, C., . . . Luban, J. (2019). Cyclophilin A protects HIV-1 from restriction by human TRIM5alpha. *Nat Microbiol*, *4*(12), 2044-2051. doi:10.1038/s41564-019-0592-5
- Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W., & Sodroski, J. (1989). Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J Virol*, *63*(9), 4085-4087. doi:10.1128/jvi.63.9.4085-4087.1989
- Li, Y. L., Chandrasekaran, V., Carter, S. D., Woodward, C. L., Christensen, D. E., Dryden, K. A., . . . Sundquist, W. I. (2016). Primate TRIM5 proteins form hexagonal nets on HIV-1 capsids. *eLife*, *5*. doi:10.7554/eLife.16269
- Link, J. O., Rhee, M. S., Tse, W. C., Zheng, J., Somoza, J. R., Rowe, W., . . . Cihlar, T. (2020). Clinical targeting of HIV capsid protein with a long-acting small molecule. *Nature*, *584*(7822), 614-618. doi:10.1038/s41586-020-2443-1
- Liu, X., Zhao, Z., Li, Z., Xu, C., Sun, L., Chen, J., & Liu, W. (2012). Cyclosporin A inhibits the influenza virus replication through cyclophilin A-dependent and -independent pathways. *PLOS ONE*, *7*(5), e37277. doi:10.1371/journal.pone.0037277
- Lukic, Z., Dharan, A., Fricke, T., Diaz-Griffero, F., & Campbell, E. M. (2014). HIV-1 uncoating is facilitated by dynein and kinesin 1. *J Virol*, *88*(23), 13613-13625. doi:10.1128/jvi.02219-14
- Mamede, J. I., Cianci, G. C., Anderson, M. R., & Hope, T. J. (2017). Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(34), E7169-E7178. doi:10.1073/pnas.1706245114
- Mansky, L. M., & Temin, H. M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol*, *69*(8), 5087-5094. doi:10.1128/JVI.69.8.5087-5094.1995
- Martin, I., Schaal, H., Scheid, A., & Ruyschaert, J. M. (1996). Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer. *J Virol*, *70*(1), 298-304. doi:10.1128/jvi.70.1.298-304.1996
- Mbisa, J. L., Delviks-Frankenberry, K. A., Thomas, J. A., Gorelick, R. J., & Pathak, V. K. (2009). Real-time PCR analysis of HIV-1 replication post-entry events. *Methods Mol Biol*, *485*, 55-72. doi:10.1007/978-1-59745-170-3\_5
- McArthur, C., Gallazzi, F., Quinn, T. P., & Singh, K. (2019). HIV Capsid Inhibitors Beyond PF74. *Diseases*, *7*(4). doi:10.3390/diseases7040056
- McDonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M., & Hope, T. J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *Journal of Cell Biology*, *159*(3), 441-452. doi:10.1083/jcb.200203150
- Miller, M. D., Farnet, C. M., & Bushman, F. D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*, *71*(7), 5382-5390. Retrieved from <https://jvi.asm.org/content/jvi/71/7/5382.full.pdf>
- Nakayama, E. E., & Shioda, T. (2010). Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha. *Rev Med Virol*, *20*(2), 77-92. doi:10.1002/rmv.637
- Nakayama, E. E., & Shioda, T. (2015). Impact of TRIM5alpha in vivo. *Aids*, *29*(14), 1733-1743. doi:10.1097/qad.0000000000000812
- Nisole, S., Lynch, C., Stoye, J. P., & Yap, M. W. (2004). A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(36), 13324-13328. doi:10.1073/pnas.0404640101
- Novikova, M., Zhang, Y., Freed, E. O., & Peng, K. (2019). Multiple Roles of HIV-1 Capsid during the Virus Replication Cycle. *Viol Sin*, *34*(2), 119-134. doi:10.1007/s12250-019-00095-3
- Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeenan, W. L., & Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem*, *246*(1), 174-181. Retrieved from <https://www.jbc.org/content/246/1/174.full.pdf>

- Pathak, V. K., & Hu, W.-S. (1997). "Might as Well Jump!" Template Switching by Retroviral Reverse Transcriptase, Defective Genome Formation, and Recombination. *Seminars in Virology*, 8(2), 141-150. doi:<https://doi.org/10.1006/smvy.1997.0114>
- Peng, K., Muranyi, W., Glass, B., Laketa, V., Yant, S. R., Tsai, L., . . . Kräusslich, H.-G. (2014). Quantitative microscopy of functional HIV post-entry complexes reveals association of replication with the viral capsid. *eLife*, 3, e04114. doi:10.7554/eLife.04114
- Prell, E., Kahlert, V., Rücknagel, K. P., Malešević, M., & Fischer, G. (2013). Fine tuning the inhibition profile of cyclosporine A by derivatization of the MeBmt residue. *Chembiochem*, 14(1), 63-65. doi:10.1002/cbic.201200621
- Price, A. J., Jacques, D. A., McEwan, W. A., Fletcher, A. J., Essig, S., Chin, J. W., . . . James, L. C. (2014). Host Cofactors and Pharmacologic Ligands Share an Essential Interface in HIV-1 Capsid That Is Lost upon Disassembly. *PLOS Pathogens*, 10(10), e1004459. doi:10.1371/journal.ppat.1004459
- Purcell, D. F., & Martin, M. A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol*, 67(11), 6365-6378. doi:10.1128/jvi.67.11.6365-6378.1993
- Qamar Saeed, M., Dufour, N., Bartholmae, C., Sieranska, U., Knopf, M., Thierry, E., . . . Serguera, C. (2014). Comparison Between Several Integrase-defective Lentiviral Vectors Reveals Increased Integration of an HIV Vector Bearing a D167H Mutant. *Mol Ther Nucleic Acids*, 3(12), e213. doi:10.1038/mtna.2014.65
- Rasaiyaah, J., Tan, C. P., Fletcher, A. J., Price, A. J., Blondeau, C., Hilditch, L., . . . Towers, G. J. (2013). HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. *Nature*, 503(7476), 402-405. doi:10.1038/nature12769
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., . . . Ballabio, A. (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *The EMBO journal*, 20(9), 2140-2151. doi:10.1093/emboj/20.9.2140
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., & Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *The EMBO journal*, 12(5), 2099-2108. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05858.x
- Saito, A., Ferhadian, D., Sowd, G. A., Serrao, E., Shi, J., Halambage, U. D., . . . Yamashita, M. (2016). Roles of Capsid-Interacting Host Factors in Multimodal Inhibition of HIV-1 by PF74. *J Virol*, 90(12), 5808-5823. doi:10.1128/jvi.03116-15
- Sarkis, C., Philippe, S., Mallet, J., & Serguera, C. (2008). Non-integrating lentiviral vectors. *Curr Gene Ther*, 8(6), 430-437. doi:10.2174/156652308786848012
- Schaal, H., Klein, M., Gehrman, P., Adams, O., & Scheid, A. (1995). Requirement of N-terminal amino acid residues of gp41 for human immunodeficiency virus type 1-mediated cell fusion. *J Virol*, 69(6), 3308-3314. doi:10.1128/jvi.69.6.3308-3314.1995
- Schaller, T., Ocwieja, K. E., Rasaiyaah, J., Price, A. J., Brady, T. L., Roth, S. L., . . . Towers, G. J. (2011). HIV-1 Capsid-Cyclophilin Interactions Determine Nuclear Import Pathway, Integration Targeting and Replication Efficiency. *PLOS Pathogens*, 7(12), e1002439. doi:10.1371/journal.ppat.1002439
- Scherer, W. F., Syverton, J. T., & Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*, 97(5), 695-710. doi:10.1084/jem.97.5.695
- Sertznig, H., Hillebrand, F., Erkelenz, S., Schaal, H., & Widera, M. (2018). Behind the scenes of HIV-1 replication: Alternative splicing as the dependency factor on the quiet. *Virology*, 516, 176-188. doi:10.1016/j.virol.2018.01.011
- Shi, J., Zhou, J., Shah, V. B., Aiken, C., & Whitby, K. (2011). Small-Molecule Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection by Virus Capsid Destabilization. *J Virol*, 85(1), 542-549. doi:10.1128/jvi.01406-10

- Singh, K., Gallazzi, F., Hill, K. J., Burke, D. H., Lange, M. J., Quinn, T. P., . . . Sonnerborg, A. (2019). GS-CA Compounds: First-In-Class HIV-1 Capsid Inhibitors Covering Multiple Grounds. *Front Microbiol*, *10*, 1227. doi:10.3389/fmicb.2019.01227
- Sokolskaja, E., Sayah, D. M., & Luban, J. (2004). Target cell cyclophilin A modulates human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol*, *78*(23), 12800-12808. doi:10.1128/jvi.78.23.12800-12808.2004
- Stock, P. G., Barin, B., Hatano, H., Rogers, R. L., Roland, M. E., Lee, T.-H., . . . Investigators, f. S. O. T. i. H. S. (2014). Reduction of HIV Persistence Following Transplantation in HIV-Infected Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, *14*(5), 1136-1141. doi:<https://doi.org/10.1111/ajt.12699>
- Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P., & Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, *427*(6977), 848-853. doi:10.1038/nature02343
- Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., . . . Sodroski, J. (2006). Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(14), 5514-5519. doi:10.1073/pnas.0509996103
- Towers, G. J., Hatziioannou, T., Cowan, S., Goff, S. P., Luban, J., & Bieniasz, P. D. (2003). Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med*, *9*(9), 1138-1143. doi:10.1038/nm910
- Weiss, R. (2006). The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*, *3*, 67. doi:10.1186/1742-4690-3-67
- Wilson, S. J., Webb, B. L. J., Ylinen, L. M. J., Verschoor, E., Heeney, J. L., & Towers, G. J. (2008). Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(9), 3557. doi:10.1073/pnas.0709003105
- Yant, S. R., Mulato, A., Hansen, D., Tse, W. C., Niedziela-Majka, A., Zhang, J. R., . . . Link, J. O. (2019). A highly potent long-acting small-molecule HIV-1 capsid inhibitor with efficacy in a humanized mouse model. *Nat Med*, *25*(9), 1377-1384. doi:10.1038/s41591-019-0560-x
- Yap, M. W., Nisole, S., Lynch, C., & Stoye, J. P. (2004). Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(29), 10786-10791. doi:10.1073/pnas.0402876101
- Zila, V., Margiotta, E., Turoňová, B., Müller, T. G., Zimmerli, C. E., Mattei, S., . . . Beck, M. (2021). Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores. *Cell*, *184*(4), 1032-1046.e1018. doi:10.1016/j.cell.2021.01.025
- Zurnic Bönisch, I., Dirix, L., Lemmens, V., Borrenberghs, D., De Wit, F., Vernailen, F., . . . Debyser, Z. (2020). Capsid-Labelled HIV To Investigate the Role of Capsid during Nuclear Import and Integration. *J Virol*, *94*(7). doi:10.1128/jvi.01024-19

## 7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Genomorganisation einfacher (A) und komplexer (B) Retroviren.....	2
Abbildung 1-2: Mögliche Orte des HIV-1-Uncoatings in der Zelle (schematische Darstellung). ....	5
Abb. 2-1: Fusionsproteine aus Vpr und NanoLuciferase (schematisch).....	15
Abb. 2-2: Schematischer Versuchsablauf des fusionsprotein-basierten Assays (Vpr-NanoLuc/NanoLuc-Vpr).....	15
Abb. 2-3: Luciferaseaktivität der Fusionsproteine aus NanoLuciferase und VPR.....	16
Abb. 2-4: Transduktion von HEK293T-Zellen mit VPR-NLuc-Reporterviren.....	17
Abb. 2-5: Transduktion von HeLa-Zellen mit VPR-NLuc-Reporterviren. ....	17
Abb. 2-6: Transduktion von CRFK-Zellen mit Vpr-NLuc-Reporterviren.....	18
Abb. 2-7: NanoBIT-System (A) und Anwendung im Rahmen dieser Arbeit (schematisch) (B).....	20
Abb. 2-8: Schematischer Ablauf des proteininteraktions-basierten Assays unter Verwendung des NanoBIT-Systems.....	20
Abb. 2-9: Funktionstest der NanoBIT-Fusionsproteine durch Kotransfektion mit LgBIT in HEK293T-Zellen. ....	21
Abb. 2-10: Transduktion von LgBIT-transfizierten HEK293T-Zellen mit HIV-1-Reporterviren, die das Vpr-SmBIT-Plasmid enthielten. ....	22
Abb. 2-11: In HEK293T-Zellen gemessene Luciferaseaktivität bei Verwendung der NanoBIT-Konstrukte.....	23
Abb. 2-12: Schematischer Ablauf des RNA-basierten Ansatzes. ....	24

<b>Abb. 2-13: Funktionstest der psi-NLuc-Reporter-RNA durch Transfektion des Expressionsvektors in HEK293T-Zellen.....</b>	<b>24</b>
<b>Abb. 2-14: Transduktion von CRFK-Zellen [A] bzw. HeLa-Zellen [B] mit HIV-1 psi-NLuc unter dem Einfluss von Cycloheximid.....</b>	<b>26</b>
<b>Abb. 2-15: Transduktion verschiedener Linien von CRFK-Zellen, die jeweils ein anderes TRIM-Protein exprimieren, mit HIV-1 psi-NLuc.....</b>	<b>27</b>
<b>Abb. 2-16: Transduktion von CRFK-Zellen mit "wildtypischen" HIV-1 psi-NLuc sowie mit Integrase-defizienten Viren (Punktmutation D64V).....</b>	<b>29</b>
<b>Abb. 2-17: Transduktion von CRFK-Zellen (A), HeLa-Wildtyp-Zellen (B) und HeLa-CypA-Knockout-Zellen (C) mit HIV-1 psi NLuc unter dem Einfluss von Cyclosporin A.....</b>	<b>32</b>
<b>Abb. 2-18: Transduktion von CRFK-Zellen (A) und HeLa-Zellen (B) mit HIV-1 unter dem Einfluss von PF-74.....</b>	<b>33</b>
<b>Abb. 2-19: Transduktion von CRFK-Zellen mit HIV-1 psi-NLuc unter GS-CA1-Einfluss.....</b>	<b>35</b>
<b>Abb. 2-20: Transduktion von CRFK-Zellen mit HIV-1 psi-NLuc unter dem Einfluss von Dolutegravir (DTG, A) bzw. Raltegravir (RAL, B).....</b>	<b>35</b>
<b>Abb. 5-1: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Fusions-Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</b>	<b>71</b>
<b>Abb. 5-2: Schematische Darstellung der Herstellung von Plasmiden zur Verwendung für Transfektionen.....</b>	<b>73</b>
<b>Abb. 6-1: Übersicht über die drei verwendeten Strategien zur Messung des Uncoatings von HIV-1 in vitro.....</b>	<b>82</b>

## 8 TABELLENVERZEICHNIS

---

<b>Tabelle 4-1: Verwendete elektronische Geräte .....</b>	<b>59</b>
<b>Tabelle 4-2: Verwendete Chemikalien.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabelle 4-3: Verwendete Puffer und Lösungen .....</b>	<b>61</b>
<b>Tabelle 4-4: Verwendete molekularbiologische Kits kommerzieller Hersteller .....</b>	<b>62</b>
<b>Tabelle 4-5: Verwendete Restriktionsenzyme .....</b>	<b>63</b>
<b>Tabelle 4-6: Verwendete weitere Enzyme.....</b>	<b>63</b>
<b>Tabelle 4-7: Verwendete primäre Antikörper/-seren .....</b>	<b>64</b>
<b>Tabelle 4-8: Verwendete sekundäre Antikörper .....</b>	<b>64</b>
<b>Tabelle 4-9: Verwendete Oligonukleotide.....</b>	<b>65</b>
<b>Tabelle 4-10: Bereits vorhandene Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden</b>	<b>66</b>
<b>Tabelle 4-11: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabelle 4-12: Zusammensetzung des LB-Medium für die Kultivierung von E. coli .....</b>	<b>67</b>
<b>Tabelle 4-13: Supplementierung von DMEM-Medium zur Kultivierung eukaryotischer Zellen...</b>	<b>67</b>
<b>Tabelle 4-14: Verwendete Software .....</b>	<b>68</b>
<b>Tabelle 5-1: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion .....</b>	<b>70</b>
<b>Tabelle 5-2: Quantitative Zusammensetzung der Transfektionsansätze .....</b>	<b>79</b>

## DANKSAGUNG

---

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Carsten Münk danken für die Gelegenheit, unter seiner Supervision in seinem Labor arbeiten zu dürfen sowie für die Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Heiner Schaal für die Beurteilung dieser Arbeit und das konstruktive Feedback danken.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern der AG Münk: Augustin Penda Twizerimana, Edmund Osei Kuffour, Kristina Meier, Rachel Scheck, Qinyong Gu, Zeli Zhang und insbesondere Wioletta Hörschken für ihre dauerhafte Unterstützung. Augustin Penda Twizerimana und Rachel Scheck haben durch Überlassung von Plasmiden und stabil transfizierten Zellen entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Mein gesamtes Studium und auch die Umsetzung dieser Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die großartige Unterstützung meiner Eltern, Freundinnen und Freunde. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin. Vielen Dank.